

**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA  
FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGIA Y FARMACOLOGÍA**



**VNiVERSIDAD  
D SALAMANCA**

**CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL**

**ANÁLISIS DE LA PRESENCIA Y POSIBLE SÍNTESIS DE PRL Y  
SU RECEPTOR EN EL HIPOCAMPO. POSIBLE IMPLICACIÓN  
EN LOS PROCESOS DE APRENDIZAJE Y CONSOLIDACIÓN  
DE LA MEMORIA.**

**TESIS DOCTORAL  
MENCION INTERNACIONAL**

**D<sup>a</sup> Virginia Sánchez Robledo  
2018**



**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA  
FACULTAD DE MEDICINA**

**DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA Y FARMACOLOGÍA**



**VNiVERSIDAD  
D SALAMANCA**

**CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL**

**ANÁLISIS DE LA PRESENCIA Y POSIBLE SÍNTESIS DE PRL Y  
SU RECEPTOR EN EL HIPOCAMPO. POSIBLE IMPLICACIÓN  
EN LOS PROCESOS DE APRENDIZAJE Y CONSOLIDACIÓN  
DE LA MEMORIA.**

Memoria que presenta Dña. **Virginia Sánchez Robledo** para optar al  
Título de Doctora por la Universidad de Salamanca  
MENCIÓN INTERNACIONAL

Salamanca, 15 de Junio de 2018





Durante la realización de esta Tesis Doctoral, Dña. Virginia Sánchez Robledo ha realizado una estancia predoctoral tutelada por la Dra. Dña. María Cecilia Hidalgo Tapia en su Unidad de Señales Mediadas por Calcio, Programa de Fisiología y Biofísica, Instituto de Ciencias Biomédicas, en la Facultad de Medicina en la Universidad de Chile.

La doctoranda ha disfrutado durante el procedimiento de esta Tesis Doctoral de una beca de la Sociedad Española de Farmacología para estancias predoctorales y de un contrato de alumno visitante ofrecido por el Instituto de Neurociencia Biomédica (BNI) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

En el desarrollo de esta Tesis Doctoral, a la doctoranda se le otorgaron becas de ayuda a congresos y publicaciones de la Universidad de Salamanca y una beca de financiación a alumnos de doctorado por parte del Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL).

Este trabajo experimental incluido en esta Memoria ha sido financiado por el siguiente proyecto:

Proyecto I+D “Excelencia” y Proyectos de I+D+I “Retos Investigación”. Dirección General de Investigación Científica y Técnica Subdirección General de Proyectos de Investigación, Ministerio de Economía y Competitividad. “Regulación de la plasticidad sináptica en el hipocampo por el sistema endocrino. Papel de la Prolactina”. Referencia: BFU2014-57929-P. Periodo: 2015-2017.



- Durante el tiempo de desarrollo de esta Tesis Doctoral, la doctoranda ha participado en publicaciones como artículos en las siguientes revistas:

Carretero J, Sánchez-Robledo V, Carretero-Hernández M, Catalano-Iniesta L, García-Barrado MJ, Iglesias-Osma MC, Blanco EJ. Prolactin system in the hippocampus. *Cell Tissue Res*, 2018.

García-Barrado MJ, Blanco EJ, Iglesias-Osma MC, Carretero-Hernández M, Catalano-Iniesta L, Sánchez-Robledo V, Carretero M, Herrero JJ, Carrero S, Carretero J. Relation among Aromatase P450 and Tumoral Growth in Human Prolactinomas. *Int J Mol Sci.*, 2017.

Iglesias-Osma MC, Blanco EJ, Carretero-Hernández M, García-Barrado MJ, Catalano-Iniesta L, Carretero M, Sánchez-Robledo V, Carretero J. Endothelial immunocytochemical expression of pituitary IL-1 $\beta$  and its relation to ACTH-positive cells is regulated by corticosterone in the male rat. *Cytokine*, 2017.

Carretero J, López F, Catalano-Iniesta L, Sánchez-Robledo V, Garcia-Barrado MJ, Iglesias-Osma MC, Carretero-Hernandez M, Blanco EJ, Burks DJ. Pituitary Aromatase P450 May Be Involved in Maintenance of the Population of Luteinizing Hormone-Positive Pituitary Cells in Mice. *Cells Tissues Organs*, 2016.

García-Barrado MJ, Blanco EJ, Catalano-Iniesta L, Sánchez-Robledo V, Iglesias-Osma MC, Carretero-Hernández M, Rodríguez-Cobos J, Burks DJ, Carretero J. Relevance of pituitary aromatase and estradiol on the maintenance of the population of prolactin-positive cells in male mice. *Steroids*, 2016.

Garcia Barrado MJ, Iglesias Osma MC, Blanco EJ, Carretero Hernández M, Sánchez Robledo V, Catalano Iniesta L, Carrero S, Carretero J. Dopamine modulates insulin release and is involved in the survival of rat pancreatic beta cells. *PLoS One*, 2015.



- Presentación a congresos:

*Congreso:* XVIII Congreso de la Sociedad de Anatomía Española. Badajoz (Febrero, 2018).

*Autores:* V.Sánchez-Robledo, L.Catalano-Iniesta, E.Blanco , MJ.García-Barrado, MC.Iglesias-Osma, J.Carretero , C.Hidalgo.

*Título:* Hippocampal prolactin is involved in the learning and spatial memory consolidation. Experimental Study.

*Tipo de participación:* Comunicación Oral.

*Congreso:* 38th World Congress of the International Union of Physiological Sciences (IUPS), Rio de Janeiro, Brazil (August, 2017).

*Autores:* Lobos,P, Bruna.B, Galaz.JI, Figueroa.P, Namias.S., Sánchez-Robledo. V, Arias. A, Barrientos.G, Paula-Lima.A.C., Hidalgo.C & Adasme.T.

*Título:* BDNF-Induced hippocampal structural plasticity requires Ros-stimulated RyR2 mediated Ca<sup>2+</sup> release.

*Tipo de participación:* Póster

*Congreso:* 36º Congreso Nacional de la Sociedad Española de Farmacología, Valencia (Septiembre, 2015).

*Autores:* Sánchez Robledo V; Carretero M; Blanco EJ; Catalano-Iniesta L; Iglesias-Osma MC; García Barrado MJ; Carretero Hernandez M; Carrero S; Hernandez- Cosido L; Carretero J.

*Título:* Evaluation of a neurodegeneration animal model by the morphometric approach with magnetic resonance imaging.

*Tipo de participación:* Póster

*Congreso:* XXVII Congreso de la Sociedad Anatómica Española. Oviedo (Septiembre, 2015)

*Autores:* Carretero J, López F, Blanco EJ, Iglesias-Osma MC, Carretero-Hernández M, Carrero S, Catalano Iniesta L, Sánchez-Robledo V, Puerto E, García-Barrado MJ.

*Título:* Aromatase P450 could be involved in the maintenance of the population of pituitary cells in mice.

*Tipo de participación:* Comunicación Oral.

*Congreso:* International Congress of Clinical Anatomy. Roen, Francia (June, 2015).

*Autores:* Carretero J, López F, Blanco EJ, Iglesias-Osma MC, Carretero-Hernández M, Carrero S, Catalano Iniesta L, Sánchez-Robledo V, Puerto E, García-Barrado MJ.

*Título:* Aromatase P450 in the maintenance of the population in the population of LH-positive pituitary.

*Tipo de participación:* Póster



## AGRADECIMIENTOS

---

Este trabajo no hubiera sido posible sin la ayuda de muchas personas a las que quiero dedicar estas líneas de agradecimiento:

En primer lugar, a mis directores, Dr. José Carretero, Dra. M<sup>a</sup> José García Barrado y la Dra. M<sup>a</sup> Carmen Iglesias, por haber hecho posible que conozca el mundo de la investigación trabajando en este proyecto, por darme la primera oportunidad en este tiempo tan difícil, por sus consejos, correcciones y sobre todo por haber depositado en mí la confianza necesaria para formar parte de su grupo.

A los técnicos, becarios y demás compañeros del Departamento, por su dedicación y su afán por hacerme comprender todos los conocimientos que han sido la base de este trabajo.

A la Dra. Cecilia Hidalgo Tapia, por darme la oportunidad de incorporarme a su laboratorio como si fuera una más. Por ser una de las mujeres más admirables en este mundo, no sólo por sus capacidades si no por lo cercana y amable que es en el terreno personal.

Al resto de los compañeros de Chile, especialmente a Jamileth More. Siempre me hicieron sentir que estaba en casa.

También quisiera agradecer este Trabajo a toda la gente que comenzó conmigo esta aventura. Después de más de diez años, seguimos siendo unos amigos inseparables, hemos estado en lo bueno y en lo malo, pero siempre juntos. Esther, Sara, Ruth, Juan y Tamara porque me han ayudado a apreciar la Biología y enseñarme los caminos tan difíciles que hay en ella. La verdadera amistad permanecerá eterna.

A la persona más especial que he conocido durante la realización de este trabajo, Leonardo Catalano Iniesta. Sin ti, no hubiera continuado en muchos momentos. Es una enorme suerte tener a un gran compañero, inteligente, leal, amable, “el simpático del grupo”, y paciente. Pero mi gran regalo fue que ese compañero se convirtiera en uno de mis mejores amigos, un apoyo incondicional, mi mano derecha y una de las personas que más confío en esta vida. Soy una gran afortunada por tenerte a mi lado compi.



## Dedicado a

---

A mi familia, quien realmente ha hecho posible que mis sueños se hagan realidad:

A mi tía M<sup>a</sup> Esther, por ser una de las personas más importantes de mi vida, y ser imprescindible en ella, eres una auténtica hermana mayor, aunque ahora te hayas convertido en mi madre sustituta, por haberme dado tres de las personas que me dan la vida, David, Lorena y Rodrigo, sin mis niños no soy nadie.

A Dani y Keysi, uno cogerá mi relevo en el mundo de la ciencia y la otra hará un maravilloso lienzo de él, siempre dándome ánimos para continuar, me habéis enseñado que no me rinda porque todo se puede conseguir. A mis abuelos, por estar siempre que los necesito, sobre todo mi yayita que siempre piensa que somos lo mejor, aunque nos equivoquemos. Al resto de mis tíos y primos por ser geniales.

A las tres personas que más quiero en este mundo, mi padre, mi madre y mi hermana Beatriz, sin vosotros nunca llegaría a nada. Nuestra vida nunca ha sido fácil, mamá ha dejado un vacío que nunca se podrá llenar, estar sin ella ha sido lo más difícil de nuestra vida, ella lo era todo, me convirtió en la mujer que soy hoy. Ella me dio los auténticos valores de la vida, fuerza, lucha, no rendirte hasta el final y resignación siempre con una sonrisa y sin una sola queja, espero que estés donde estés me veas y sientas orgullo de mí, tanto como yo de ser tu hija.

A mi padre, sin ti estaría perdida, por enseñarme que se puede sobrevivir cuando tienes todo en tu contra, por demostrarme que la familia es lo primero y por enseñarme que unidos superaremos todo. A mi pequeña Beatriz, eres lo mejor que me ha pasado, por muchos años que viviera siempre elegiría una hermana como tú, por poner un poco de cordura e indicarme el camino cuando estaba perdida, nunca olvidaré lo que prometimos a mamá "Siempre juntas, siempre unidas", te quiero.

A mis amigos, Rosa, Sacha, Chuchi, Lara y Álvaro, gracias por comprenderme y apoyarme en el caos de este año.

A mis amigas de toda la vida, Esther H., Esther A., Arhoa, Sheila y Noe, porque a veces no comprendéis mi forma de vida pero, me la respetáis. Os quiero.

A unas personas que nunca pensé encontrar y sin embargo la vida hizo que cruzara un océano y ellos estuvieran esperándome al otro lado de la orilla. Noemí Grispun y su familia, Carlos Chacón, Erick, Cheryl, Pancha y Sebas, hacéis que parezca que aún estoy con vosotros y estos dos años no hubieran pasado.

A Álex Córdova, el claro ejemplo de que la distancia, el cambio de horario y dos personalidades tan diferentes, no son motivos ni excusas para que las personas se olviden. Fuiste mi compañero, mi apoyo, mi confidente, mis risas y a veces mi desesperación, a pesar del tiempo lo sigues siendo y espero que no cambie jamás. De una manera o de otra, siempre estarás en mi vida.

A mi periodista favorito Pato Chacur, por enseñarme el mundo radiofónico, tan desconocido para mí, por ser tan divertido y atento con una españolita recién llegada a Chile.

A ti, Luna Paz Torres Ferretti, un día me contaste que la gente cuando nacía tenía un hilo rojo que unía dos vidas, aunque estuvieran muy lejos. Estoy segura que mi hilo rojo une la tuya. A los 10 minutos de conocerte supe que serías mi amiga del alma, mi felicidad. Eres la mujer junto con mi madre, que más admiro y respeto porque ante un gran bache que te pone la vida como es sufrir una enfermedad lo haces con una sonrisa, con normalidad, con deseos de superación, sin quejas ni reproches y mirando al futuro dando las gracias por todas las cosas maravillosas que tienes a tu alrededor, no te hundes y siempre sales a flote. Características que hacen que me levante cada día y quiera dedicarme a ser científica. Eres ADMIRABLE y “no” te quiero Lunita.

He viajado bastante, conocido países, pero contigo comprendí que soy española de nacionalidad pero Chile es mi lugar, mi Serendipity. Confío en que nuestros caminos se vuelvan a cruzar mi querida amiga.

A mi madre, mi ángel en el cielo.

Aunque nuestros cuerpos están separados,  
nuestros corazones permanecerán eternamente  
entrelazados.

***“Siempre juntas, Siempre unidas”***





## ABREVIATURAS

---

**Ac:** Anticuerpo

**AKT:** Proteins serina/treonina kinasas

**ANGII:** Angiotensina II

**ANP:** Péptido natriurético atrial

**ARNm:** Mensajero del ácido ribonucleico

**CA:** Asta de Ammón

**CCK:** Colecistoquinina

**CE:** Corteza entorrinal

**GD:** Giro dentado

**GH:** Hormona del crecimiento

**hPL:** Lactógeno placentario humano

**JAK:** Janus Tyrosine kinasas

**LCR:** Líquido cefalorraquídeo

**MAPK:** Mitogenic activated protein kinasas

**MCP:** Memoria a Corto Plazo

**ME:** Memoria Espacial

**MLP:** Memoria a Largo Plazo

**MS:** Memoria Sensorial

**MWM:** Morris Water Maze o laberinto de agua

**PIF:** Factor inhibidor de prolactina

**PRF:** Factor liberador de prolactina

**PRL:** Prolactina

**RPRL:** Receptor de prolactina

**SL:** Sistema Límbico

**SNC:** Sistema Nervioso Central

## ABREVIATURAS

---

**STATs:** Signal transducers and activators of transcription

**TRH:** Hormona liberadora de tirotrópina

**VIP:** Polipéptido intestinal vasoactive

**WB:** Western blotting

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Hipocampo</b> .....	<b>1</b>
1.1.1. Historia .....	1
1.1.2. Anatomía .....	4
1.1.2.1. <i>Desarrollo Embrionario</i> .....	4
1.1.2.2. <i>Características anatómicas del hipocampo</i> .....	10
1.1.3. Conexiones y fibras del hipocampo .....	24
1.1.4. Hipocampo y enfermedades relacionadas.....	27
1.1.4.1. <i>Degeneración cerebral (envejecimiento)</i> .....	27
1.1.4.2. <i>Estrés</i> .....	27
1.1.4.3. <i>Epilepsia</i> .....	28
1.1.4.4. <i>Esquizofrenia</i> .....	28
<b>1.2. Memoria y Aprendizaje</b> .....	<b>29</b>
1.2.1. Historia .....	30
1.2.2. Tipos de memoria .....	33
1.2.2.1. <i>Memoria sensorial</i> .....	34
1.2.2.2. <i>Memoria a corto plazo</i> .....	37
1.2.2.3. <i>Memoria a largo plazo</i> .....	40
1.2.3. Memoria en el hipocampo.....	45
1.2.4. Aprendizaje .....	48
1.2.5. Tipos de aprendizaje.....	54
<b>1.3. Prolactina</b> .....	<b>59</b>
1.3.1. Estructura génica y proteica de PRL.....	59
1.3.2. Síntesis y secreción de PRL .....	62
1.3.3. Receptor de PRL .....	72
1.3.4. Mecanismos de señalización intracelular de PRL.....	78
1.3.5. Funciones biológicas de la PRL.....	84
1.3.6. Regulación de la secreción de PRL .....	99
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	<b>117</b>
<b>2.1. Hipótesis</b> .....	<b>117</b>
<b>2.2. Objetivos</b> .....	<b>125</b>

2.3. Diseño experimental .....	126
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>127</b>
<b>3.1. Materiales .....</b>	<b>127</b>
3.1.1. Material biológico .....	127
3.1.1.1. <i>Animales</i> .....	127
3.1.2. Medios instrumentales .....	128
<b>3.2. Métodos .....</b>	<b>130</b>
3.2.1. Water Maze de Morris o laberinto de agua .....	130
3.2.1.1. <i>Fundamento</i> .....	130
3.2.1.2. <i>Descripción y funcionamiento</i> .....	132
3.2.2. Sacrificio y extracción del encéfalo .....	141
3.2.2.1. <i>Técnica de perfusión intracardiaca</i> .....	142
3.2.2.2. <i>Eutanasia por decapitación</i> .....	145
3.2.3. Realización de cortes histológicos .....	148
3.2.3.1. <i>Fundamento</i> .....	148
3.2.3.2. <i>Descripción y procedimiento</i> .....	149
3.2.4. Localización y detección de proteínas por IQ .....	151
3.2.4.1. <i>Fundamento</i> .....	151
3.2.4.2. <i>Inmunodetección</i> .....	154
3.2.5. Detección de proteínas por Western blotting .....	156
3.2.5.1. <i>Fundamento</i> .....	156
3.2.5.2. <i>Obtención de las muestras</i> .....	156
3.2.5.3. <i>Electroforesis desnaturalizante en gel</i> .....	158
3.2.5.4. <i>Inmunodetección</i> .....	161
3.2.6. Cuantificación y localización de los niveles de ARNm por hibridación “ <i>In situ</i> ” .....	162
3.2.6.1. <i>Fundamento</i> .....	162
3.2.6.2. <i>Diseño de sondas TaqMan®</i> .....	163
3.2.6.3. <i>Inmunodetección</i> .....	165
3.2.7. Doble marcaje para la cuantificación y localización de los niveles de ARNm por hibridación “ <i>in situ</i> ” y la detección de proteínas por inmunofluorescencia.....	168

3.2.8. Tratamiento de los resultados.....	169
3.2.8.1. <i>Análisis de las imágenes</i> .....	169
3.2.8.2. <i>Análisis estadístico</i> .....	170
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>171</b>
<b>4.1. Determinación de la conducta, aprendizaje y memoria .....</b>	<b>171</b>
4.1.1. Conducta de los animales en nado libre y en plataforma invisible removida .....	171
4.1.2. Valoración del aprendizaje en el MWM.....	183
4.1.3. Estimación de la memoria a los 9, 16 y 25 días después del entrenamiento en el MWM .....	191
<b>4.2. Prolactina en el hipocampo .....</b>	<b>203</b>
4.2.1. Determinación del patrón de distribución de PRL en hipocampo de ratas en aprendizaje .....	203
4.2.1.1. <i>Cuantificación de la positividad a PRL en los estratos de la zona CA1 del hipocampo</i> .....	206
4.2.1.2. <i>Cuantificación de la positividad a PRL en los estratos de la zona CA3 del hipocampo</i> .....	214
4.2.1.3. <i>Cuantificación de la positividad a PRL en las capas de la región GD del hipocampo</i> .....	220
4.2.2. Determinación del patrón de distribución de PRL en hipocampo de ratas con consolidación de la memoria a 9, 16 y 25 días .....	227
4.2.2.1. <i>Cuantificación de las células positivas a PRL en los estratos de la región CA1 del hipocampo</i> .....	230
4.2.2.2. <i>Cuantificación de las células positivas a PRL en los estratos de la región CA3 del hipocampo</i> .....	237
4.2.2.3. <i>Cuantificación de las células positivas a PRL en las capas de la región GD del hipocampo</i> .....	243
4.2.3. Valoración global de la intensidad y localización de PRL en el aprendizaje y consolidación de la memoria.....	251
4.2.3.1. <i>Intensidad de positividad a PRL</i> .....	252
4.2.3.2. <i>Porcentaje de células positivas a PRL</i> .....	254
4.2.3.3. <i>Porcentaje de positividad nuclear total a PRL</i> .....	256

4.2.3.4. Porcentaje de positividad nuclear exclusiva a PRL.....	<b>258</b>
4.2.3.5. Porcentaje de positividad citoplásmica total a PRL.....	<b>260</b>
4.2.3.6. Porcentaje de positividad citoplásmica exclusiva PRL.....	<b>262</b>
4.2.3.7. Porcentaje de positividad nuclear y citoplásmica conjunta a PRL .....	<b>264</b>
4.2.4. Análisis de la influencia del aprendizaje y la consolidación de la memoria en la apresencia de PRL en el hipocampo en WB.....	<b>267</b>
4.2.5. Valoración global de la intensidad de positividad a PRL en Western blotting .....	<b>277</b>
4.2.6. Cuantificación y localización de los niveles de ARNm por hibridación “ <i>in situ</i> ” .....	<b>282</b>
4.2.6.1. Cuantificación de las células positivas a ARNm en la zona CA1 .....	<b>282</b>
4.2.6.2. Cuantificación de las células positivas a ARNm en la zona CA3 .....	<b>290</b>
4.2.6.3. Cuantificación de las células positivas a ARNm en el Giro dentado .....	<b>297</b>
4.2.6.4. Cuantificación de las células positivas a ARNm en la región CA4 del hipocampo.....	<b>304</b>
4.2.7. Cuantificación y localización de los niveles de ARNm por hibridación “ <i>in situ</i> ” para PRL e inmunohistoquímica para RPRL, con doble marcaje .....	<b>314</b>
4.2.7.1. Cuantificación de las células positivas a ARNm de PRL y del RPRL en la zona CA1 del hipocampo.....	<b>314</b>
4.2.7.2. Cuantificación de las células positivas a ARNm de PRL y RPRL en la zona CA3 del hipocampo.....	<b>325</b>
4.2.7.3. Cuantificación de las células positivas a ARNm de PRL y RPRL en la zona GD del hipocampo .....	<b>341</b>
4.2.7.4. Cuantificación de las células positivas a ARNm de PRL y RPRL en la región CA4 del hipocampo.....	<b>356</b>

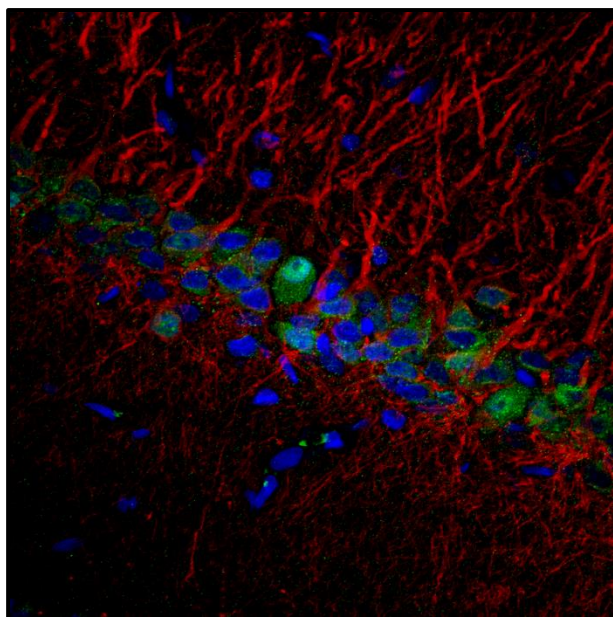
# ÍNDICE

---

<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	<b>368</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>370</b>
<b>7. ENGLISH SUMMARY</b> .....	<b>416</b>
<b>7.1. Introduction</b> .....	<b>416</b>
7.1.1. Hippocampus.....	416
7.1.2. Memory in the hippocampus.....	417
7.1.3. Prolactin.....	419
<b>7.2. Aims</b> .....	<b>422</b>
<b>7.3. Materials and methods</b> .....	<b>423</b>
7.3.1. Animals.....	423
7.3.2. Water Maze Training .....	423
7.3.3. Brain sacrifice and extraction.....	424
7.3.3.1. <i>Intracardiac perfusion techniques</i> .....	424
7.3.3.2. <i>Euthanasia by decapitation</i> .....	425
7.3.4. Protein and RNA detection .....	425
7.3.4.1. <i>Immunofluorescence</i> .....	425
7.3.4.2. <i>Western blotting</i> .....	426
7.3.4.3. <i>"In situ" hybridization</i> .....	427
7.3.5. Statistic analysis .....	428
<b>7.4. Results</b> .....	<b>429</b>
7.4.1. Determination of behaviour, learning and memory .....	429
7.4.1.1. <i>Animals behaviour</i> .....	429
7.4.1.2. <i>Evaluation about learning</i> .....	433
7.4.1.3. <i>Consolidation memory</i> .....	437
7.4.2. Prolactin in the hippocampus.....	439
7.4.3. Protein content of PRL.....	449
7.4.4. Quantification and localization of mRNA levels by hybridization "in situ" .....	451
7.4.5. Quantification and localization of mRNA levels and RPRL, double marking .....	456
<b>7.5. Discussion</b> .....	<b>462</b>
<b>7.6. Conclusions</b> .....	<b>467</b>
<b>7.7. References</b> .....	<b>469</b>







*Cuando recordar no pueda,  
¿dónde mi recuerdo irá?  
Una cosa es el recuerdo  
y otra cosa es recordar*

RECORDAR Y OLVIDAR  
Antonio Machado

# 1. INTRODUCCIÓN



## 1.1. HIPOCAMPO

El hipocampo es una de las principales estructuras del cerebro humano y de otros mamíferos.

Estructura que deriva de la región medial del telencéfalo, pertenece por una parte al sistema límbico (SL) y por otra a la arquicorteza. Formando junto al subículo y el giro dentado (GD) la formación hipocampal.

Tiene un papel importante en la adquisición del aprendizaje espacial y la consolidación de la memoria a largo y corto plazo.

Dentro del SL las estructuras más representativas son, la formación hipocampal, el giro parahipocampal, el área entorrinal, el giro cingulado, los cuerpos mamilares y la amígdala.

El SL tiene un gran interés no solo por su papel en aprendizaje y memoria sino también por, el comportamiento emocional con influencia en los sistemas endocrinos y autónomos, según han sugerido algunos neuropatólogos como Broca, Papez (que propuso un sistema complejo de circuitos para el mecanismo de la emoción y la memoria, actualmente conocido como *el circuito de Papez* (Aggleton, Pralus et al. 2016)) y McLean (Roxo, Franceschini et al. 2011).

Aunque la formación hipocampal y sus conexiones con los cuerpos mamilares, núcleos talámicos y corteza cingular forman un circuito responsable de las emociones y de sus respuestas. La amígdala es el órgano más considerado en todas las relaciones y experiencias emocionales (McFadyen, Mermillod et al. 2017, Sweeney and Yang 2017).

### 1.1.1. HISTORIA

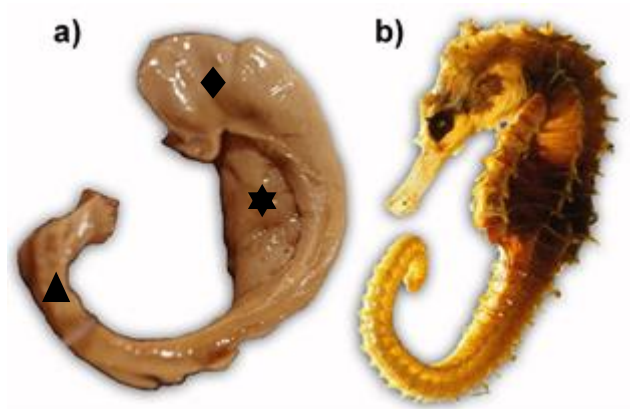
El primer anatomista en describir el hipocampo, fue Giulio Cesare Aranzi en 1587. Alumno de Andreas Vesalius (autor del libro sobre anatomía “De humani corporis fabrica”, la estructura del cuerpo humano), el cual, comparó el suelo del asta del lóbulo temporal con el hipocampo, al que le llamo caballo de mar (*hippocampus*). Dado que su forma, recuerda mucho a este animal (Figura I-1)(Henry Duvernoy 2013).

Se cree que el término *pes hippocampi* fue introducido por Diemerbroeck en 1627, aunque existe un poco de controversia en esto. Al principio el hipocampo fue descrito con dos pies: *pes hippocampi major* (para el hipocampo) y *pes hippocampi minor* (para el calcar avis, una protrusión en el asta occipital).

Bartholomeo Eustachio, en 1714 fue el creador de las primeras ilustraciones. Seguido en 1729 por J.G. Duvernoy que también, realizó grabados de este órgano dudando entre llamarlo “hipocampo” o “gusano de seda (Finger 2001).

En 1732, Winslow sugirió el término “Asta de carnero” debido al parecido interventricular del hipocampo.

El asta de carnero fue cambiado en 1742 por De Garengot hasta *Cornu Ammonis* asociado al dios egipcio Ammón (Ammun Kneph), el asta de Amón (CA) se puede encontrar en el templo de Karnak en Louxor (Figura I-2)(Henry Duvernoy 2013).



**Figura I-1. (a)** Aspecto interventricular del hipocampo derecho: ◆ Segmento anterior o cabeza; ★ Segmento medio o cuerpo; ▲ Segmento posterior o tallo. **(b)** *hippocampus hippocampus* o caballito de mar.

Tanto el asta de Amón como el pie del hipocampo son utilizados como sinónimos, aunque este último se suele utilizar para hablar de las digitaciones del hipocampo.

En los comienzos, este órgano fue relacionado con el sentido del olfato, más que por su función en la adquisición de la memoria (Vanderwolf 2001).

En el 1900, Vladímir Bétjerev estudió el papel que desempeñaba el hipocampo en la memoria, se basó en diferentes observaciones de un paciente que se encontraba a su cargo con problemas graves de la misma.



**Figura I-2.** Cuerno de Ammón en el templo de Karnak, Luxor (Egipto).

Aunque debemos tener en cuenta que, las características sobre la estructura hipocámpica con una información detallada se debe a diferentes autores como por ejemplo, Ramón y Cajal. Este investigador, desarrolló diversos trabajos describiendo la organización del CA y su estratificación, aportando detalles novedosos de estructuras anatómicas ya conocidas, utilizando las nuevas técnicas de la época aportadas por Golgi y mejoradas por él (Ramon y Cajal 1909-1911).

Lorente de Nó también, desarrolló amplias investigaciones sobre la estructura y las conexiones del hipocampo. Al igual que realizó detalladas revisiones de la terminología propuesta para las distintas láminas y sus subdivisiones (Lorente de Nó 1934, Williams 1998, Fairen 2007).

En los últimos tiempos, se han presenciado avances importantes en el conocimiento de la organización y las funciones de la formación hipocámpica. No

solo en los roedores, sino también en los primates e incluso en el hombre como indican Amaral e Insausti en sus estudios experimentales sobre las conexiones de la formación hipocampal del mono y las relaciones con las del hombre (Amaral DG; Insausti 1990).

### **1.1.2. ANATOMÍA**

El hipocampo es una estructura anatómica que forma parte de la formación hipocampal (Allen 2016), junto con el subículo y el GD.

Deriva de la región medial del telencéfalo y forma parte del sistema límbico. Tiene un papel importante en la adquisición del aprendizaje espacial y la consolidación de la memoria a corto plazo para formar posteriormente la de largo plazo (Olivares 2015).

#### **1.1.2-1 DESARROLLO EMBRIONARIO**

Este órgano tiene una gran complejidad anatómica. Gran parte de ella, se debe a los cambios que ocurren durante el desarrollo embriológico y en las relaciones de los componentes filogenéticamente más antiguos del lóbulo límbico con el neocórtex.

Por este motivo, es importante describir el desarrollo embrionario, el proceso de formación y el plegamiento progresivo del hipocampo (circunvolución dentada o GD, asta de Ammón, subículo y circunvolución parahipocampal).

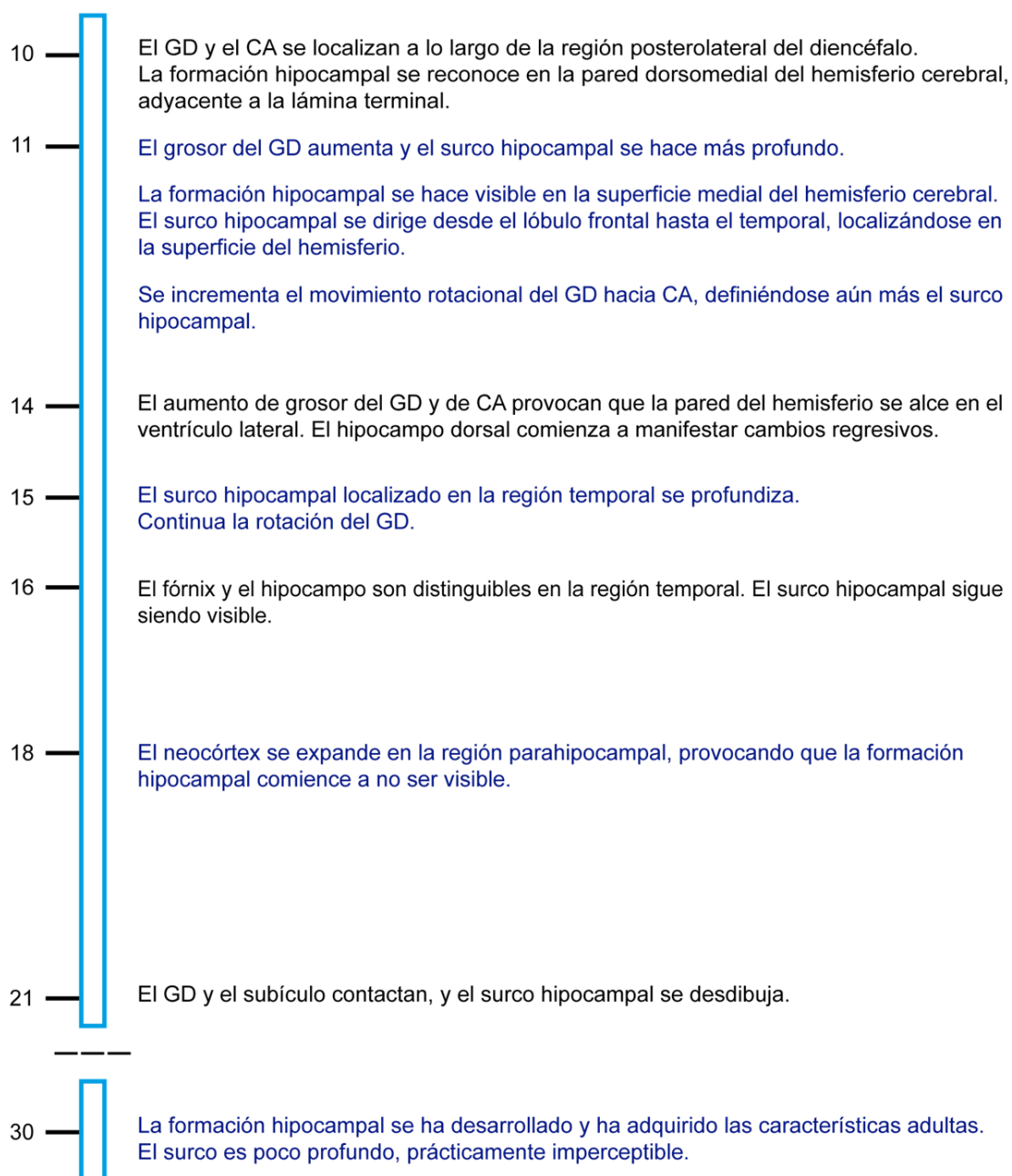
Es de relevancia conocer este proceso para poder comprender la anatomía de este órgano en el adulto (Figura I-3).

Los hemisferios cerebrales comienzan a formarse a partir de la 5ª semana del desarrollo embrionario en forma de evaginaciones a cada lado de las paredes laterales del prosencéfalo.

Hacia la segunda mitad del segundo mes, estas evaginaciones comienzan a aumentar de tamaño.

Para cuando llega el tercer mes, las evaginaciones sobresalen de tal manera por encima del diencéfalo que son identificables como los hemisferios cerebrales (Netter and Brass 1994).

### Semanas



**Figura I-3.** Esquema representativo de las fases del desarrollo embrionario. Se representa la semana de desarrollo, junto con la función y el proceso más característico surgido en ese periodo.



Antes de la semana 10ª, GD y CA son estructuras primarias localizadas a lo largo de la zona posterolateral del diencéfalo (Ge, Shi et al. 2015). Debido a que el hipocampo es la primera área cortical en diferenciarse (Kier, Kim et al. 1997, Moore and Persaud 2004).

La formación del hipocampo aparece por primera vez en la semana 10ª de gestación, en la pared dorsomedial del hemisferio cerebral adyacente a la lámina terminal (Kier, Fulbright et al. 1995).

Podemos encontrar un surco hipocampal ancho y poco profundo. Este surco aparece cuando la pared telencefálica del primordio del GD llega a ser más gruesa que la del asta de Ammón. La primera vez que se identifica el primordio del surco se sitúa en frente del propio giro.

De la semana 10ª a la 11ª, la circunvolución dentada aumenta en grosor y el surco se hace más profundo. Provocando que esta estructura haga girar al surco hipocampal dejando libre CA. (Robert I. Grossman 2010, Sperber, Sperber et al. 2010).

En la semana 13ª, antes de la formación del cuerpo calloso. La formación completa del hipocampo es visible en la superficie medial del hemisferio cerebral.

El arco límbico interno se extiende desde el tracto olfatorio al lóbulo temporal. Así, el surco del hipocampo va desde el lóbulo frontal hasta el polo temporal.

Este surco, es ancho y se puede ver en la superficie del hemisferio. Aquí, tanto el neocórtex del lóbulo temporal como el uncus, tienen un tamaño pequeño (Kier, Fulbright et al. 1995).

Entre la semana 12ª a la 14ª, sigue incrementándose el grosor del GD. Lo que conlleva de nuevo un movimiento rotacional más profundo hacia el CA. De esta manera, el surco del hipocampo es más definido.

A medida que el surco se profundiza, llega a estar más orientado hacia la unión del asta con la región del subículo.

Cuando el GD y el asta de Ammón se aproximan el uno al otro, una zona difusa de células dispersas aparecen en la profundidad del surco.

En el humano, esta zona difusa se transforma en un área triangular bien definida durante la 13ª a la 14ª semana de gestación. Pudiéndola encontrar en el estrato molecular del GD, al igual que en el estrato molecular del CA.

El aumento del tamaño tanto del GD como del asta, hace que la pared medial del hemisferio se alce en el ventrículo lateral.

Aproximadamente, alrededor de la semana 14ª coincide con el desarrollo del cuerpo calloso. Es cuando el hipocampo dorsal (área supracallosa), comienza a manifestar cambios regresivos.

Convirtiendo al indusium griseum supracallosa y a la circunvolución paraterminal residuos del hipocampo dorsal inicial (Kier, Kim et al. 1997).

En la semana 15ª a la 16ª, el surco del hipocampo se encuentra desarrollado en la parte temporal. Éste profundiza y se va ensanchando a medida que el GD se agranda.

Posteriormente se volverá a estrechar cuando sus dos paredes entren en contacto.

Cuando el GD se alarga y rota se va alejando y la porción de la zona difusa se alinea. Gracias a la presión que se ejerce sobre ella.

En la 16ª semana, el arco límbico neocortical más externo está formado. Ahora, se convierte en el área subcallosa, la circunvolución del cíngulo y la circunvolución parahipocampal.

En la región temporal, la formación del fórnix y la del hipocampo se ven como estructuras separadas. Aunque el surco del hipocampo aún sigue teniendo un gran tamaño. Por lo tanto, sigue siendo visible.

Pero, tanto en la región frontal como en la parietal, el hipocampo subcalloso ha disminuido de tamaño y llega a ser el indusium griseum.

Como el cuerpo calloso está presente, oculta a este indusium griseum y no se puede apreciar.

Asociado con el desarrollo del cuerpo calloso, el propio surco del hipocampo de la región frontal y parietal es el que se convierte en ese cuerpo calloso. Este

surco está más desarrollado en la porción temporal, haciéndose cada vez más profundo y ancho a medida que el GD se va agrandando.

En la semana 18<sup>a</sup> a la 21<sup>a</sup>, es cuando el surco del hipocampo con las estructuras adyacentes son similares a las del cerebro del adulto (Silvers, Lumian et al. 2016).

La relación del surco del hipocampo con la capa granular del GD permanece constante, si se compara con otras estructuras del sistema límbico que son más cambiantes en el desarrollo.

En la parte anterior el surco profundo aún, se encuentra presente. Mientras que, en la parte más caudal donde el GD está más plegado, la parte profunda del surco está cerrada.

Sus paredes se encuentran fusionadas y permanece una hendidura poco profunda entre el GD y el presubículo. Más tarde aparecerá el GD y el córtex entorrinal adyacente.

Según se van fusionando las paredes del hipocampo, tanto la piamadre como los vasos sanguíneos se van incluyendo.

Al mismo tiempo, puede seguir quedando una parte residual del surco (estructura quística con una señal intensa del líquido cefalorraquídeo (LCR) dentro del hipocampo).

En la semana 18<sup>a</sup>, el arco límbico exterior neocortical, que contiene al área subcallosa, el giro del cíngulo y el parahipocampo es más acusado.

Surge una marcada expansión del neocórtex en la región parahipocampal y en el uncus.

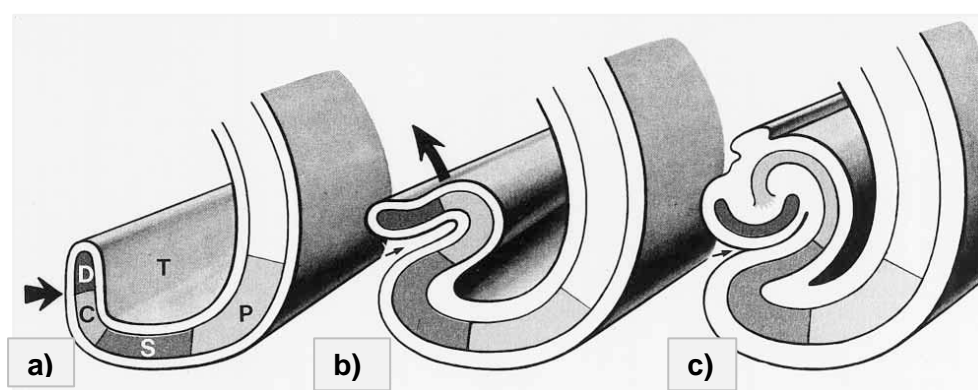
De este modo, la formación del hipocampo se encuentra en la superficie medial del hemisferio y comienza a no ser visible.

Después de estas semanas de gestación, la formación del hipocampo y del surco hipocampal son menos reconocibles que, el crecimiento del lóbulo temporal del neocórtex.

El resultado final del plegamiento es que la disposición final de los componentes del hipocampo ha cambiado. Así, en superficie el GD y el subículo contactan y desdibujan el surco hipocampal (Williams 1998).

Su grado de plegamiento es variable a lo largo de todo el hipocampo.

La parte más superior de la fisura del hipocampo, llegará a ser el surco calloso que separará el indusium griseum de la circunvolución del cíngulo. Llegando a ser el surco paralelo a la fisura coroidea a lo largo de su extensión (Figura I-3).



**Figura I-4.** Diagrama en plano coronal mostrando el plegamiento secuencial de los componentes del hipocampo en el lóbulo temporal izquierdo. Giro dentado (D); Asta de Ammón (C); Subículo (S); Giro parahipocampal (P); Pared medial y suelo del cuerno temporal (T). **(a)** Esquema del desarrollo fetal temprano. **(b y c)** Esquema de la expansión del neocórtex y del crecimiento desigual de los diferentes componentes del hipocampo (Kier, Kim et al. 1997).

Por la semana 30<sup>a</sup>, la formación del hipocampo está bien desarrollado. Adquiriendo la mayoría de las características adultas.

El surco es muy poco profundo en la superficie. Prácticamente, imperceptible su fusión con las paredes e incluso, en algunas regiones los residuos de las leptomeninges se identifican.

### **1.1.2-2 CARACTERÍSTICAS ANATÓMICAS DEL HIPOCAMPO**

Si nos fijamos en las características anatómicas hipocampales (Figura I-1a), podemos dividirlo en tres segmentos (Kiefer, Slotboom et al. 2004). Y en su totalidad puede medir entre 4 a 4.5 cm en el humano:

- Una cabeza (*caput hippocampi*) o segmento anterior, con orientación transversal. Tiene forma curvada, se caracteriza por el plegamiento del cornu Ammonis.

Presenta unas dilataciones con elevaciones en la parte superior que son las digitaciones hipocampales, tanto internas como externas.

Su localización es lo que se denomina pie del hipocampo (*pes hippocampi*).

Por la parte anterior, se separa de la amígdala por el receso uncal del cuerno temporal del ventrículo lateral (Amaral 2006). Debido a que aquí, el uncus se eleva medialmente para descansar sobre el giro parahipocampal (Konrad, Ukas et al. 2009).

- Un cuerpo (*corpus hippocampi*) o segmento medio, posee orientación sagital con morfología cilíndrica.

Esta estructura, queda bordeada por el asta temporal (*cornu ammonis*) entre la parte superior y lateral, incluyendo la fascia dentata.

A la vez que, forma parte de las regiones histológicamente definidas CA1 a CA4.

Por la parte inferior del asta, pasa por el subículo, que a su vez puede estar histológicamente dividido en el prosubiculum, subiculum, presubiculum y parasubiculum. Éste último, conduce a la CE (Amunts, Kedo et al. 2005).

La superficie del cuerpo hipocampal, está cubierta por el alveus. Cuyas fibras forman la fimbria, que es la que dará lugar a la columna posterior del fórnix (Mark, Daniels et al. 1993, Amaral, Park et al. 2016) y bordeado medialmente por la cisterna ambiens.

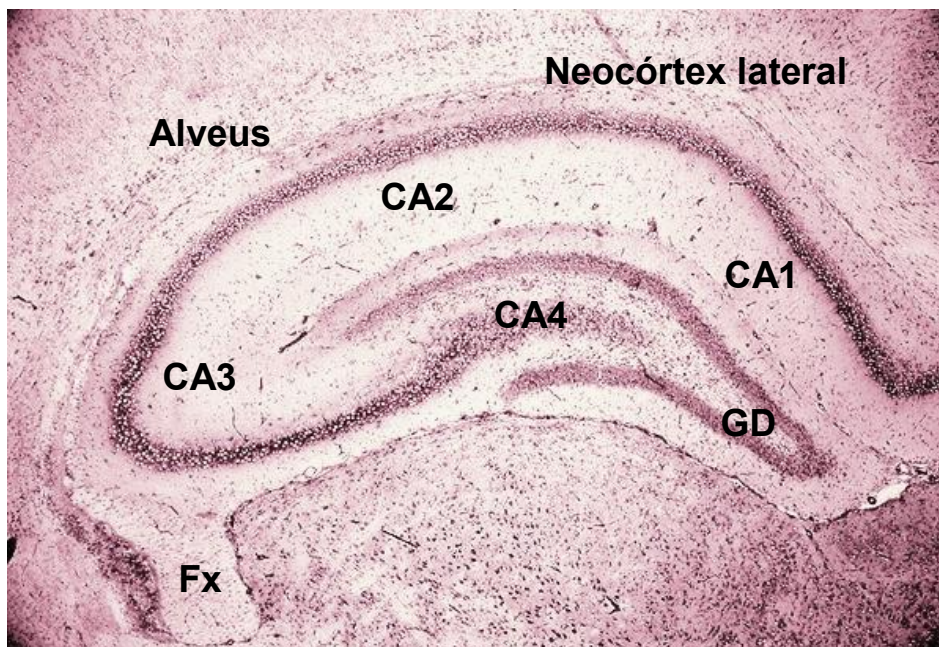
- Una cola (cauda hippocampi) o segmento posterior, orientado transversalmente con un estrecho.

Pone en contacto las capas estructurales del cuerpo con el CA y el GD. Se estrechan los márgenes denticulados y se funde en la fasciola cinerea. Medialmente, es una zona cubierta por la fimbria que asciende hasta el criso del fórnix. Haciéndose superficial la región CA3 en el giro fasciolar, mientras que, la región CA1 que se encuentra plegada se hace superficial en el giro Andreas-Retzius.

La cola del hipocampo desaparece sobre el Splenium del cuerpo calloso (Henry Duvernoy 2013).

La formación hipocampal, abarca la circunvolución supracallosa, la circunvolución fasciolar, el GD, el asta de Ammón, el subículo y algunas partes del uncus.

La anatomía del hipocampo es compleja (Figura I-5) y el término como tal hace referencia a un área formada por el GD o fascia dentada, el asta de Ammón o hipocampo propio, el complejo subicular y la corteza entorrinal (CE) (Fogwe and Mesfin 2018).



**Figura I-5.** Corte coronal de una sección hipocampal de rata, donde se visualiza diferentes partes de esta estructura, neocórtex lateral; CA1-CA4 corresponde al asta de Ammón; GD hace referencia a Giro dentado; alveus y Fx son siglas que corresponden al fórnix.

## 1- GIRO DENTADO

El GD se sitúa en la región coronal del cuerpo del hipocampo, siendo una lámina estrecha y cóncava.

Sus concavidades envuelven al segmento CA4 del asta de Ammón. Es una estructura que está separada de CA1-CA3 por el surco hipocampal el cual, desaparece después del desarrollo llegando a ser vestigial.

Es una estructura crucial en el clásico “circuito trisináptico” del hipocampo ya que transmite la información que le llega de la CE hasta CA3 (Sloviter and Lomo 2012).

Está formado por tres estratos histológicos. De más superficial a profundidad; capa Molecular, capa Granular y capa Polimórfica e Hilus (Figura I-6) (Treves, Tashiro et al. 2008):

a) **Capa Granular**: también llamada capa celular.

Es la capa principal del GD, formada por una lámina estrecha densamente poblada por neuronas granulares.

Estas neuronas son pequeñas y redondas muy empaquetadas, haciendo a esta capa fácilmente visible.

Sus axones son los encargados de formar las fibras musgosas. Atraviesan la capa Polimórfica hasta CA4 y CA3.

Estas fibras musgosas poseen numerosas ramas que hacen sinapsis con las células piramidales de los sectores CA3 y CA2, formando un sistema conocido como “*conexión musgosa*”.

Las dendritas basales de cada soma granular se extienden hasta el estrato Molecular.

Las células granulosas principalmente son excitadoras.

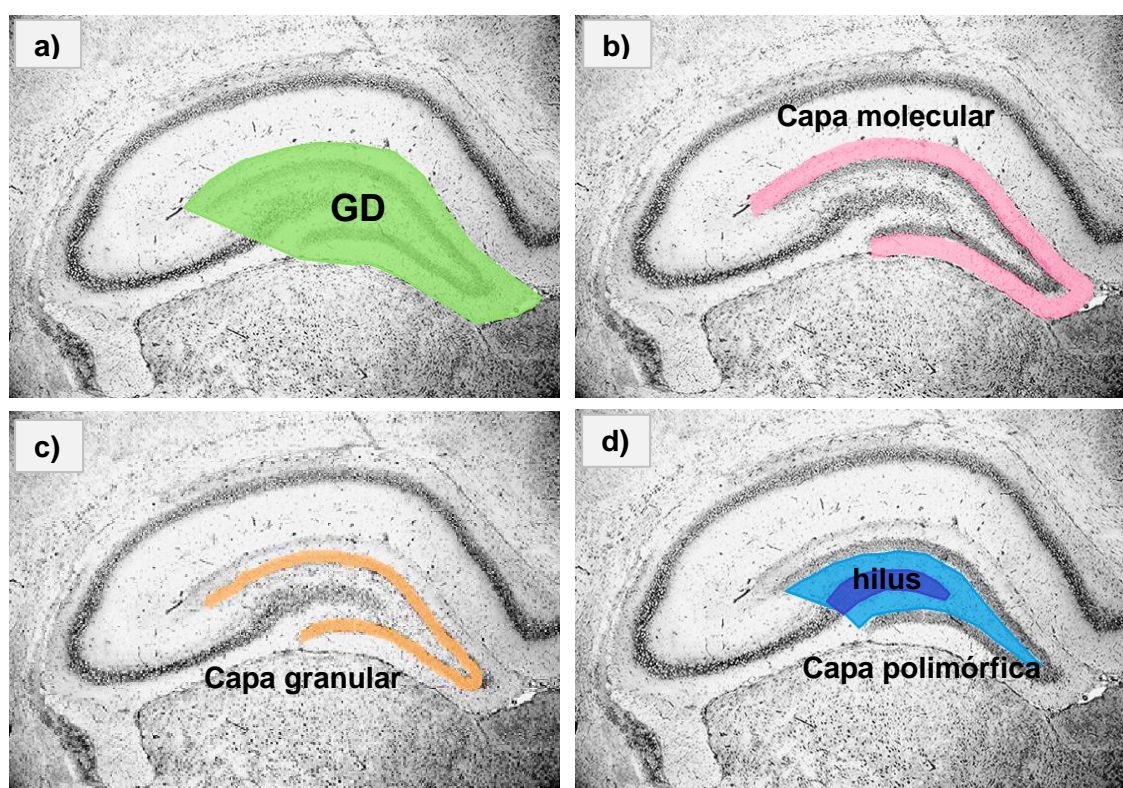
Esta región no solo está implicada en la memoria espacial y de referencia, sino también, en la neurogénesis del Sistema Nervioso Central (SNC) en adultos (Myers and Scharfman 2011, Henry Duvernoy 2013, Kominami, Shinohara et al. 2013, Oomen, Bekinschtein et al. 2014).

b) **Capa Molecular**: esta capa está ocupada por las dendritas de las células granulares y algunas interneuronas polimórficas.

Contiene pocas neuronas, principalmente son inhibitoras.

Está formada principalmente por neuropilo, dendritas de neuronas granulares y de axones aferentes (Jones and Peters 2012).

Las principales vías glutamatérgicas aferentes inervan dos tercios de esta capa a partir de la CE y el otro tercio, interno y en contacto con el estrato Granular.



**Figura I-6.** Cortes coronales de secciones hipocampales de rata. (a) en verde, región que ocupa el giro dentado (GD), (b) en rosa la posición de la capa Molecular del GD, (c) en naranja la capa Granular del GD, (d) en azul oscuro se encuentra la localización del Hilus, mientras que en azul claro se encuentra situado la capa Polimórfica del GD.



- c) **Capa Polimórfica e Hilus:** une la capa Granular con CA4 y es atravesada por axones de neuronas granulares.

Contiene neuronas excitadoras (glutamatérgicas) e inhibitoras (GABAérgicas).

En muchas especies, el Hilus aparece subestratificado. Algunos autores sugieren que las diferencias más comparativas en la organización del GD se encuentran en la estratificación real de esta capa (Hevner 2016).

## 2- ASTA DE AMMÓN

También conocido como hipocampo propio, representa la mayor parte de la formación hipocampal.

Está comprendido desde el nivel más profundo a la superficie es decir, desde la cavidad ventricular hacia el surco hipocampal vestigial.

Puede dividirse en seis capas histológicas. Del ventrículo al surco hipocampal se encuentran: el alveus, el estrato Oriens, el estrato Piramidal, el estrato Radiado, el estrato Lacunoso y el estrato Molecular (Miller, Mark et al. 1996) (Figura I-7).

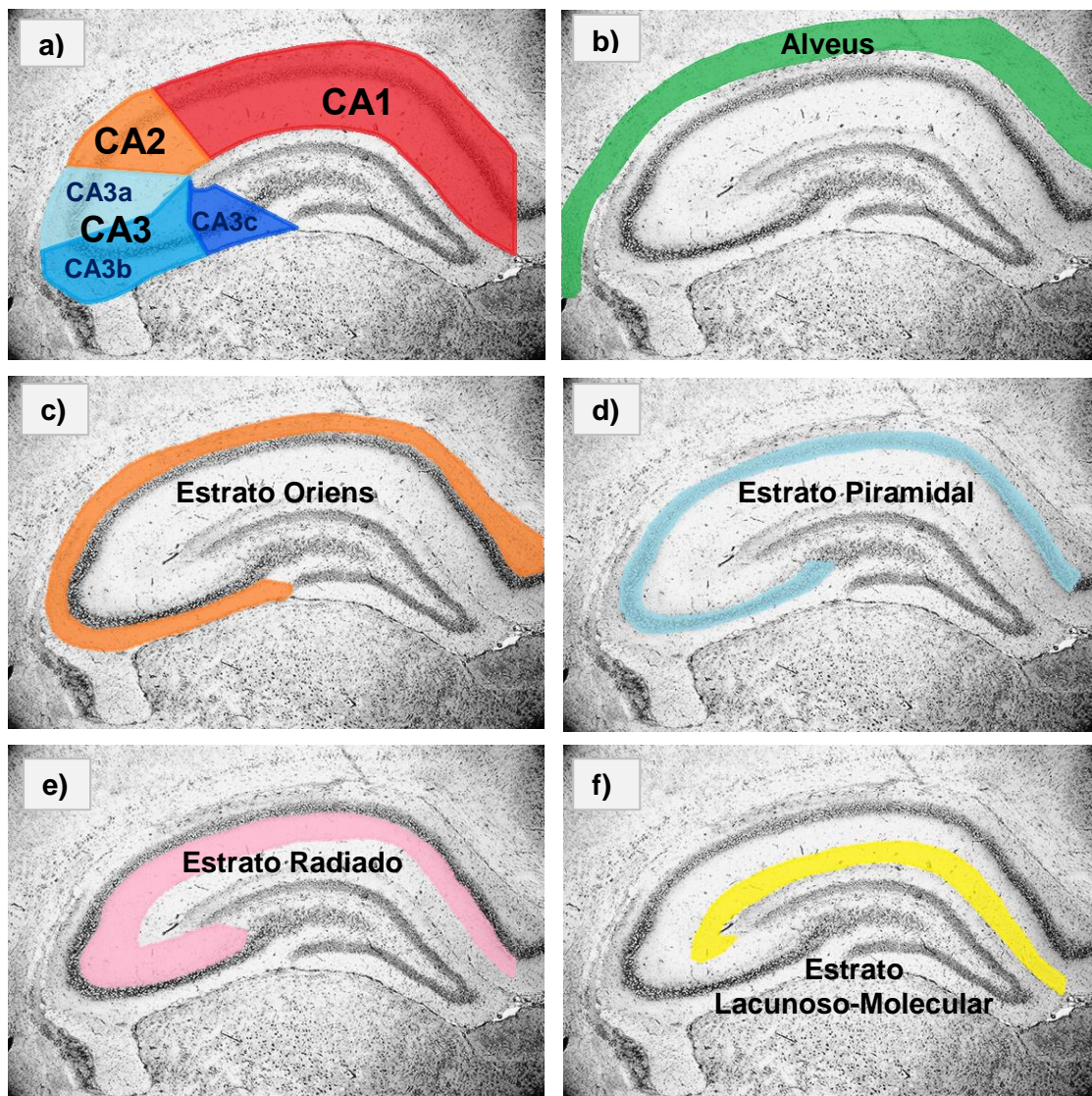
- a) **Alveus:** es una delgada lámina de sustancia blanca que recubre la superficie ventricular del CA, contiene axones de neuronas hipocampales y subiculares.

Es la principal vía eferente de esta estructura, los axones se reúnen en un haz llamado fimbria, la cual se continúa con el fórnix hasta el núcleo septal lateral, el tálamo y el hipotálamo.

El alveus también posee fibras aferentes en gran parte procedentes del septum (Amaral, Park et al. 2016).

- b) **Estrato Oriens:** es una capa difícil de definir debido a que se mezcla con el estrato Piramidal subyacente (sobre todo en los seres humanos).

Se compone de células nerviosas dispersas (células en cesta “*basket cells*”) de axones procedentes de las neuronas piramidales que llegan al alveus y de las dendritas basales de las neuronas piramidales.



**Figura I-7.** Cortes coronales de secciones hipocampales de rata. **(a)** Posición de las 4 áreas del CA según el aspecto que presentan las neuronas piramidales, distinguiendo CA1 en color rojo; CA2 en color naranja; CA3 en azul, subdividido en CA3a, CA3b y CA3c; y por último el área CA4, **(b)** en verde la capa histológica más superficial de CA, llamada alveus, **(c)** en naranja el estrato Oriens, **(d)** en azul, localización del estrato Piramidal, **(e)** en rosa la posición que ocupa otra de las capas histológicas denominada estrato Radiado, **(f)** en amarillo la unión del estrato Lacunoso-Molecular.

- c) **Estrato Piramidal:** la capa de células piramidales son las que forman las células principales del CA.

Conforman un soma piramidal típicamente triangular, de tamaño grande, su base mira hacia el alveus y su vértice hacia el surco hipocampal vestigial.

Desde su base, el axón atraviesa el estrato Oriens hasta el alveus. Estas neuronas piramidales principalmente están proyectadas hacia el núcleo septal y el hipotálamo.

Pero, algunas de ellas son fibras de asociación para otras células piramidales. Cruzando al hipocampo contralateral y formando unas ramas llamadas colaterales de Schaffer que, atraviesan estas estructuras para hacer sinapsis con otras dendritas piramidales (Christiansen, Metzler-Baddeley et al. 2017, Fogwe and Mesfin 2018).

Estos axones se curvan detrás del estrato Radiado poniéndose en contacto con otras estructuras de este tipo.

En el ápice de dichas neuronas, existe una dendrita apical con gran longitud, debido a que atraviesa todo el CA para alcanzar el estrato Molecular cerca del surco vestigial hipocampal.

Además de la dendrita apical, existen otras dendritas basales que se ramifican en el estrato Oriens.

Por este motivo, en algunas ocasiones a las neuronas piramidales del hipocampo se las ha llamado “double piramidal” debido a la morfología de estos árboles dendríticos.

Encontramos dos tipos diferentes de neuronas piramidales; superficiales y profundas.

**\*\* las superficiales**, se encuentran dispuestas de forma densa en una o dos filas.

**\*\* las profundas**, se agrupan en varias filas por debajo de éstas, con un grosor menos denso.

Es importante distinguir entre estos dos tipos celulares por dos razones fundamentales:

1- la primera es que las células profundas son menos numerosas en mamíferos inferiores como ratón, conejo, perro, gato, etc. en comparación con primates como monos y el hombre.

2- la segunda razón está relacionada con las conexiones aferentes entre las células piramidales propiamente dichas.

Las células en cesta, tanto de profundas como en superficiales, requieren células postsinápticas aferentes individuales (Klausberger and Somogyi 2008).

De forma dispersa a lo largo de todo el estrato, podemos encontrar interneuronas de tipo cesta y en estrella, como ocurre en otros estratos de la región CA (Slomianka, Amrein et al. 2011, Henry Duvernoy 2013).

Las células piramidales del área CA1 son muy sensibles a un déficit de oxígeno (hipoxia) provocando su muerte en pocos minutos sin el aporte de éste.

Por este motivo, estas células se encuentran entre las primeras en verse afectadas cuando existen alteraciones que provocan pérdida de memoria y funciones intelectuales como ocurre en la enfermedad de Alzheimer (Lushnikova 2009, Fried 2016).

- d) **Estrato Radiado:** es una capa que principalmente consiste en dendritas apicales de neuronas piramidales, cuya disposición paralela da un aspecto estriado a esta capa.

En este estrato, las dendritas apicales se conectan con las ramas colaterales de Schaffer, con las fibras de los núcleos septales, con fibras comisurales y con las proyecciones del GD.

- e) **Estrato Lacunoso:** es una estructura que contiene numerosos haces de axones paralelos a la superficie del CA.

Formando fibras perforantes y colaterales de Schaffer.

- f) **Estrato Molecular:** se encuentra junto al surco hipocampal vestigial, debido a que parte de este surco desaparece durante el desarrollo.

El estrato Molecular del CA se mezcla con el del GD.

Esta capa contiene pocas neuronas, aunque se encuentran algunas interneuronas.

También, existen las ramificaciones de las dendritas apicales de las neuronas piramidales que se prolongan por toda la superficie alcanzando las regiones del CA recibiendo gran información a partir de sus dendritas.

Como el alocórtex se define como corteza formada por muestra sólo tres capas.

Las seis capas del CA descritas anteriormente se agrupan en tres, el estrato Oriens; el estrato Piramidal y una capa combinada del estrato Radiado, Lacunoso y Molecular, llamado zona molecular (Ramon y Cajal 1909-1911, Amaral 2006, Kiernan 2012).

Si nos fijamos en las regiones que dividen al hipocampo propio en una sección coronal, este órgano tiene una estructura heterogénea debido al aspecto tan diferente que presentan las neuronas piramidales. De este modo, distinguimos cuatro regiones en el CA denominadas: CA1, CA2, CA3 y CA4 (Figura I-7a).

- a) **CA1**: llamado sector de Sommer o sector Vulnerable (*“vulnerable sector”*)(Sommer October 1880).

Esta lámina se continúa desde el subículo. Es el área de mayor tamaño de las cuatro regiones.

Los somas de estas neuronas piramidales, son típicamente triangulares, suelen ser células pequeñas y dispersas.

El estrato Piramidal de CA1 en humanos, es bastante grande comparado al de rata que es más estrecho y denso.

En el humano se han diferenciado dos subcapas de esta zona piramidal; un estrato profundo y uno más superficial.

El primero contacta con el estrato Oriens, posee pocas neuronas piramidales. Mientras que el último es mucho más rico en este tipo de neuronas (Taveira, Carraro et al. 2012, Bezchlibnyk, Stone et al. 2017).

- b) **CA2**: la presencia de esta área es tema de debate para diversos autores, debido a que su existencia no está muy clara en numerosas especies. Aunque sí es descrita en el hipocampo de humanos y de simios (Amaral 2006).

CA2 contiene unos somas grandes piramidales con forma ovoide, cuyas células se encuentran densamente empaquetadas haciendo que la

morfología del estrato Piramidal sea amplia y estrecha, debido a la dificultad de su delimitación en la rata, no es objeto de nuestro estudio.

- c) **CA3**: conocido también como sector de Spielmeyer o sector resistente (*“resistant sector”*)(Spielmeyer. 1930).

Es la zona que corresponde a la curva del CA donde entra en contacto con el GD.

También, posee somas piramidales similares a los de CA2 cuya densidad es mucho menos pronunciada que éstos.

CA3 tiene una característica típica y es la presencia de fibras finas sin mielina, llamadas fibras musgosas que emergen del GD. Estas fibras rodean a los somas y oprimen al estrato Radiado y Piramidal formando una capa suplementaria llamada estrato Lucido que es muy propia de esta región (Henry Duvernoy 2013).

Podemos dividirlo en 3 partes, denominadas CA3a, CA3b y CA3c.

- d) **CA4**: denominado como sector de Bratz o sector de vulnerabilidad media (*“medium vulnerability sector”*)(Bratz 1899).

Este tramo está situado dentro de la concavidad del GD en el espesor del hilus, distinguiéndose de CA3.

Los somas de sus células son ovoides, grandes pero poco numerosos. Se localizan entre las fibras mielinizadas musgosas representativas de CA4.

Últimamente se admite que CA4 se puede equiparar a la funcionalidad de CA3, por eso existe alguna controversia entre los investigadores.

### 3- COMPLEJO SUBICULAR (*Subiculum*)

Desde un punto de vista anatómico, el subículo forma parte del giro parahipocampal.

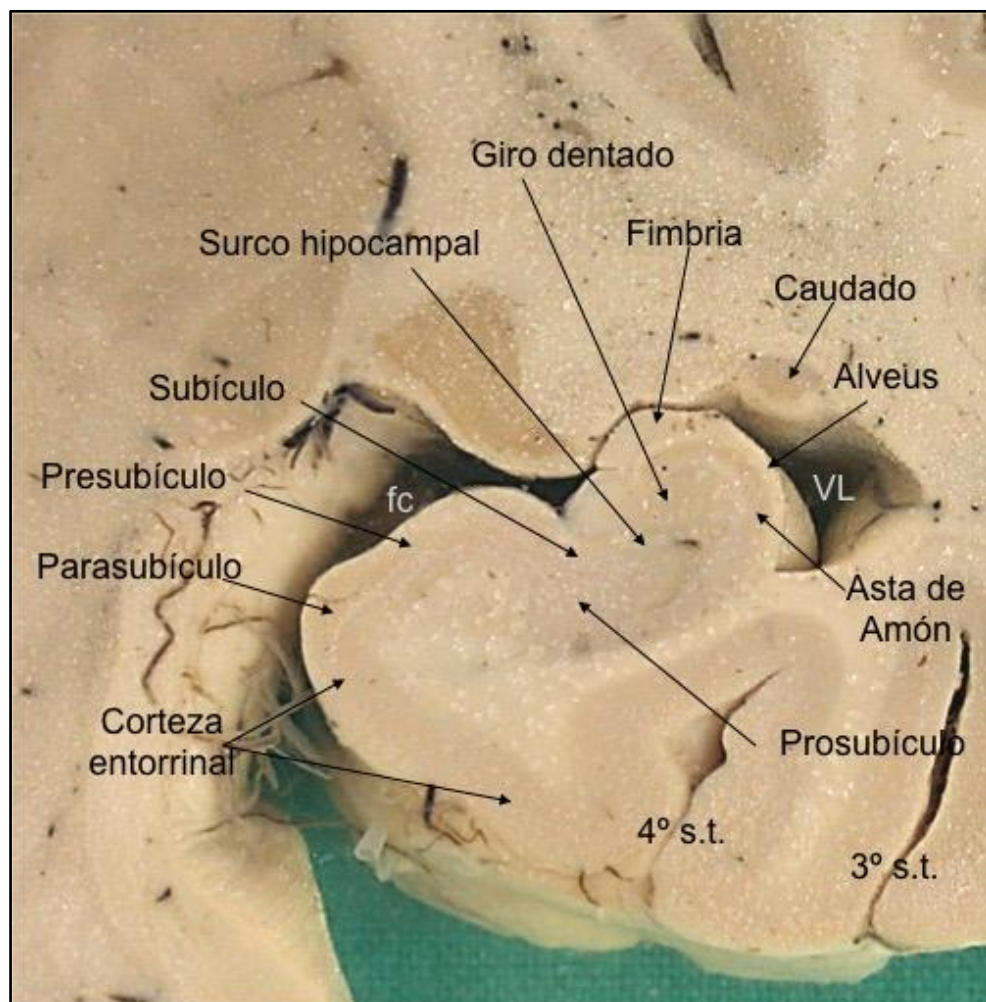
Está situado entre la CE y la región CA1 del hipocampo propiamente dicho, ya que el estrato Radiado de CA1 se considera que es la zona que divide el CA y el subículo.

Se puede dividir en una capa Molecular superficial y una capa profunda de células piramidales. Ambas capas contienen numerosas interneuronas inmunorreactivas para GABA (Szegedi, Paizs et al. 2016).

Es la principal zona eferente del hipocampo, hacia los núcleos mamilares del hipotálamo a través del fórnix, recibe aferencias de CA1 y de la capa III de neuronas piramidales de la CE.

Las neuronas piramidales envían proyecciones al núcleo accumbens, a los núcleos septales y a la corteza prefrontal, al hipotálamo, a la CE y a la amígdala.

Esta sección del hipocampo se divide en diferentes segmentos, Prosubículo; Subículo propio; Presubículo y Parasubículo (Figura RD-8).



**Figura I-8.** Corte anatómico del complejo subicular. Se puede observar la localización del prosubículo, presubículo y parasubículo. VL: ventrículo lateral, fc: fascia cinérea, s.t. surco temporal.

- **El Prosubículo**, es la continuación de CA1 (para algunos autores es un territorio no muy aceptado por su existencia).
- **El Subículo propio**, se encuentra oculto por el GD.
- **El Presubículo** cuyas neuronas piramidales superficiales son de tamaño pequeño y convergen muy empaquetadas formando racimos, dando un aspecto típico de macula.
- **El Parasubículo** cruza del margen del giro parahipocampal al área entorrinal por su cara medial (Cooper, Chung et al. 2005).

Las neuronas piramidales del subículo manifiestan una transición a la hora de descargar su potencial de acción. Existiendo dos modos de disparo, uno llamado de tipo “bursting” y otro en espiga simple.

Se piensa que la transición entre ambos modos es muy importante para dirigir la información que sale del hipocampo.

El complejo subicular es el responsable de la actividad ictal (epiléptica) pero también se encuentra implicado en la memoria operativa y las toxicomanías (Cooper, Moore et al. 2003).



#### 4- CORTEZA ENTORRINAL

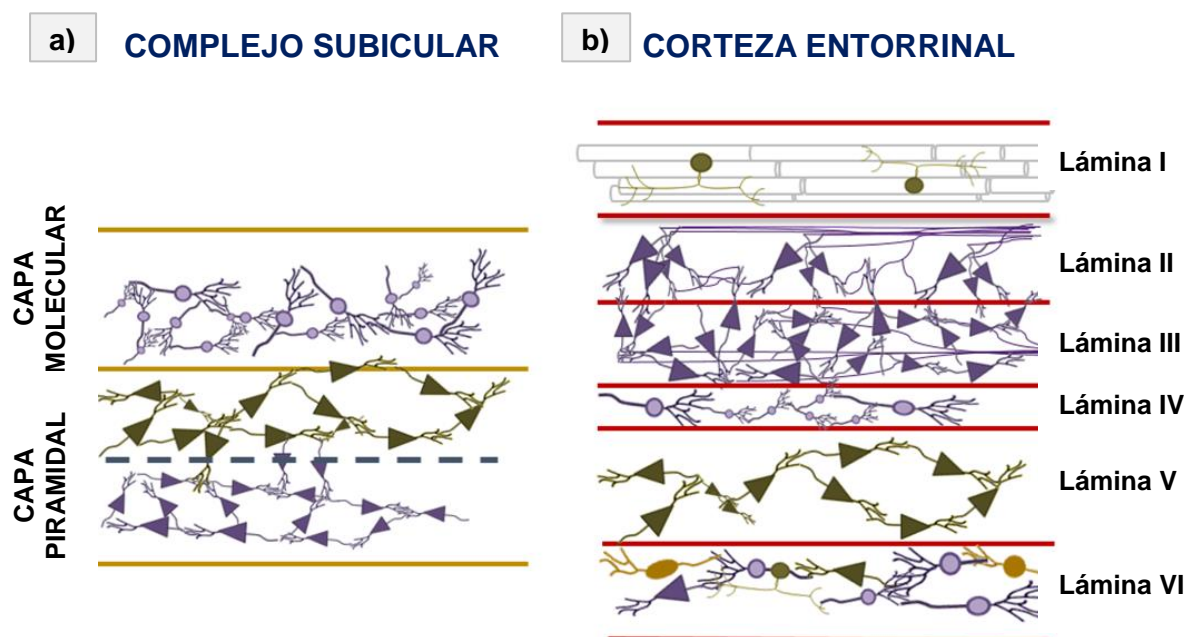
La corteza entorrinal (CE) es una franja de sustancia gris, a esta zona también se la conoce como área 28 de Brodmann.

Se encuentra localizada en las regiones, anterior, medial y basal del lóbulo temporal, incluido el uncus.

Comprende la parte anterior del giro parahipocampal y la corteza adyacente al surco colateral.

Anterior y medialmente en profundidad, se relaciona con el complejo amigdalino y corteza periamigdalina, mientras que caudal y medialmente se vincula con el Pre y Parasubículo.

El límite lateral se extiende más allá del surco colateral y en el humano no existe ningún límite macroscópico que lo separe del giro temporal inferior por lo tanto, su diferenciación se fundamenta en estudios citoarquitectónicos.



**Figura I-9.** Representación esquemática de las diferentes capas o láminas del complejo subicular (a) y de la corteza entorrinal (b) junto sus conexiones neuronales de manera gráfica.

La CE incluye seis láminas al igual que el neocórtex (Figura I-9).

- **La lamina I**, posee un escaso número de células.
- **La lámina II**, es densamente celular, contiene células piramidales y estrelladas que forman agregados muy compactos, los cuales se pueden ver a simple vista dado que aparecen como pequeñas prominencias en la superficie de la CE.
- **La lámina III**, corresponde a la lámina piramidal externa con dendritas apicales que se extienden hasta la lámina I. Los axones de las láminas II y III alcanzan el fascículo angular dando lugar a la vía perforante y a la vía alvear que terminarán en el GD y en el CA.
- **La lámina IV** se conoce por la presencia casi exclusiva de fibras, se la llama *lámina disecante*. En algunos sitios la lámina disecante está ausente por lo tanto, las láminas III y V son adyacentes.
- **La lámina V** es gruesa, contiene varias hileras de células piramidales cuyas dendritas se extienden hasta la lámina I.
- **La lámina VI** es polimórfica en su constitución celular, da lugar a fibras corticotálamicas y está limitada inferiormente por la sustancia blanca (Marta I. Escobar; Hernan J 2006).

La CE es una corteza asociativa múltiple a la que llega información de todas las cortezas asociativas sensitivas y a ella, proyecta la corteza cingular a través del haz en el cíngulo.

El sistema CE-hipocampo juega un rol importante en las memorias autobiográficas, declarativas de episodios y en particular en las memorias espaciales, incluyendo memoria de formación, consolidación de la memoria y optimización de la memoria durante el sueño.

La CE es también responsable del pre-procesamiento (familiaridad) de las señales de entrada en la respuesta de condicionamiento de los reflejos de la membrana nictitante; la asociación de los impulsos del ojo y el oído (Amakhin, Ergina et al. 2016, Kitanishi and Matsuo 2017).

### 1.1.3. CONEXIONES Y FIBRAS DEL HIPOCAMPO.

En el hipocampo se distinguen cuatro tipos de fibras: *aférentes*, que se forman en la corteza cerebral y en estructuras subcorticales; *intrínsecas*, se originan en la formación hipocampal y terminan en ella misma; *comisulares*, conectan bilateralmente áreas específicas del hipocampo y por último, *eférentes*, que abandonan la formación hipocampal hacia diversas estructuras.

Con excepción de las conexiones intrínsecas los tres tipos restantes de fibras cursan por el fórnix o por el fascículo angular.

**1- AFERENTES:** La mayor parte de este tipo de fibras surgen de la CE. Existen dos probabilidades:

**\*\*Vía perforante**, es la más voluminosa y procede de la CE

**\*\*Vía alvear** que proviene de la porción medial de la misma.

Ambas vías, se originan de células piramidales de las capas II y III, probablemente glutamatérgicas. Sus axones pasan por el fascículo angular el cual, subyace a la CE y al subículo. Posteriormente continúan según su origen por una de las dos vías.

Las fibras de *la vía perforante* atraviesan la corteza del subículo invirtiéndola para terminar sucesivamente en la capa Molecular de los sectores CA1, CA3 y GD.

*La vía alvear*, integra al alveus y termina en sectores más profundos de la capa Molecular de los campos CA1, CA3 y GD.

En los primates, el Parahipocampo cuya estructura es neocortical, envía fibras a la formación hipocampal que pasan por el fascículo angular y se integran a la vía perforante.

Las fibras aferentes subcorticales, proceden de la formación reticular, incluyendo el locus coeruleus y los núcleos del rafe, la región supramamilar, los núcleos laterales del hipotálamo, el estriado ventral, núcleo septal medial, núcleos basales del telencéfalo y la amígdala.

La distribución en las diferentes láminas del hipocampo de estos aferentes no está plenamente establecida en el hombre, aunque algunas evidencias en primates indican su terminación en la zona superficial de la capa piramidal.

Igualmente se reconoce el carácter predominantemente colinérgico de la proyección septohipocampal, que toma la vía del fórnix para terminar en el GD, en el estrato Oriens de los sectores CA3 y CA2 y en las capas Molecular y Piramidal del Subículo.

**2- INTRÍNSECAS Y COMISURALES:** Las conexiones intrínsecas del hipocampo se desarrollan entre sus regiones o dentro de un mismo sector.

Al contrario de lo que ocurre en otros sitios del SN donde predominan las conexiones recíprocas, en el hipocampo se destaca el carácter unidireccional de las mismas; de tal manera que se establece una secuencia de conexiones como sigue: GD, a través de las fibras musgosas, CA3, CA2, CA1 y subículo.

Se puede identificar cuatro sistemas de fibras intrínsecas en este órgano:

- \*\* *fibras asociativas* del GD.
- \*\* *fibras musgosas* (entre el GD y CA3).
- \*\* *fibras colaterales de Schaffer* de los sectores del CA.
- \*\* *fibras amonicosubiculares*, que van de CA1 al subículo.

Las fibras asociativas intrínsecas del GD discurren longitudinalmente y enlazan los diferentes tramos del mismo.

Las colaterales de Schaffer se distribuyen preferentemente en sentido longitudinal y asocian las diversas partes del CA. La anterior disposición garantiza la propagación de impulsos a lo largo de todas las estructuras debido a que se van activando todos los sectores.

Por otra parte, las fibras musgosas (del GD y CA3) y las fibras amonicosubiculares (de CA1 al subículo) son menos divergentes y se proyectan de manera circunscrita en el eje transversal.

Las fibras asociativas del GD nacen de neuronas localizadas en el Hilus y se extienden longitudinalmente sin abandonarlo.

Las colaterales de Schaffer son ramas recurrentes de las neuronas piramidales que alcanzan los estratos Radiado, Piramidal y Oriens de los diferentes compartimentos del CA. Estas colaterales son excitadoras y se consideran glutamatérgicas.(Beltran, Reyes et al. 2012).

Aunque en mamíferos pequeños se han demostrado abundantes fibras comisulares entre la formación hipocampal. Los estudios en primates restringen su localización sólo a los sectores más anteriores del GD y del CA. Éstas corresponden a colaterales de las fibras asociativas del GD y de las colaterales de Schaffer que a través de la comisura del fórnix alcanzan el lado contrario.

**3- EFERENTES:** Las fibras eferentes de la formación hipocampal parten del subículo y de los diferentes sectores del CA.

Las proyecciones que terminan en los cuerpos mamilares, en el núcleo septal lateral y el estriado ventral se originan también en el CA.

Las anteriores proyecciones atraviesan el fórnix para alcanzar las estructuras mencionadas.

Existen proyecciones desde el hipocampo hacia la corteza y la amígdala, éstas van por la sustancia blanca subcortical de la corteza temporal.

Las que terminan en la amígdala se originan en el subículo y en el sector CA1, mientras que las que terminan en la CE, giro parahipocampal, corteza retrosplenial, cíngulo, corteza orbitofrontal y áreas laterales del lóbulo frontal (corteza prefrontal) se originan predominantemente en el subículo y en menor grado en el sector CA1 (Buckmaster and Amaral 2001, Marta I. Escobar; Hernan J 2006, Jaffe and Gutierrez 2007, Blackstad, Osen et al. 2016).

El GD es la única parte del hipocampo que no proyecta parte del mismo, de forma que sus eferencias siempre son fibras intrínsecas o comisurales.

### **1.1.4. HIPOCAMPO Y ENFERMEDADES RELACIONADAS**

Las lesiones en el hipocampo producen una serie de síntomas, la mayoría de ellos relacionados con la pérdida de memoria y sobretodo en la disminución de la capacidad de aprendizaje.

No obstante, los problemas de memoria por lesiones severas no son las únicas enfermedades relacionadas con el hipocampo.

También existen otras enfermedades vinculadas con el funcionamiento de esta región cerebral.

#### **1.1.4-1 DEGENERACIÓN CEREBRAL (envejecimiento)**

Tanto el envejecimiento normal como patológico del cerebro parece estar estrechamente relacionado con el hipocampo.

De este modo, los problemas de memoria relativos a la edad o la disminución de las capacidades cognitivas que se experimentan durante la vejez se relacionan con un decremento de la población neuronal del hipocampo (Duncan, Song et al. 2018).

Las personas que por algún motivo han perdido la función de las principales partes del sistema límbico pero, todavía mantienen las del hipocampo, tienen memoria únicamente a largo plazo y no son capaces de registrar ningún nuevo recuerdo o función (Fjell, McEvoy et al. 2014).

Este problema se hace mucho más notorio en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, en la que se observa una muerte masiva de las neuronas de esta región cerebral (Janota, Brites et al. 2015, Hassan, Abbas et al. 2018).

#### **1.1.4-2 ESTRÉS**

El hipocampo contiene elevados niveles de receptores relacionados con esta enfermedad por lo que esta región resulta muy vulnerable al estrés (McFadden 2017).

Los esteroides relacionados con el estrés pueden afectar al hipocampo, reduciendo la excitabilidad de algunas de sus neuronas. Inhibiendo la génesis

de nuevas neuronas en el GD y produciendo atrofas de algunas dendritas en las células piramidales de la región CA3.

Estos factores explican los problemas cognitivos o los fallos de memoria que podemos experimentar cuando estamos estresados y se hacen especialmente notorios entre las personas que padecen un trastorno de estrés postraumático (Frasch, Lobmaier et al. 2018).

#### **1.1.4-3 EPILEPSIA**

El hipocampo es con frecuencia el foco de ataques epilépticos. La esclerosis del hipocampo es el tipo más visible de daño tisular en la epilepsia del lóbulo temporal. Aunque no está claro si la epilepsia se produce debido a anomalías en el funcionamiento del hipocampo o si los ataques epilépticos producen anomalías en el hipocampo.

En condiciones experimentales donde los ataques repetitivos son inducidos artificialmente en animales, el daño hipocampal es muy frecuente. El hipocampo es una de las partes más eléctricamente excitables del cerebro. También, puede estar relacionado con el hecho de que esta estructura es una de las pocas regiones del cerebro donde la neurogénesis continúa produciéndose a lo largo de la vida (Sperling and Nehlig 2018).

#### **1.1.4-4 ESQUIZOFRENIA**

La esquizofrenia es una enfermedad del neurodesarrollo que implica la presencia de numerosas anomalías en la estructura cerebral.

La principal diferencia patológica que se encuentra en cerebros de afectados con esta enfermedad, reside en un aumento del tamaño ventricular y una disminución tanto del volumen como del peso de este órgano (Lin, Chung et al. 2018).

La región más asociada con la esquizofrenia es la corteza cerebral. Sin embargo, el hipocampo también podría tener su importancia, ya que la existencia de una disfunción de esta zona podría producir una alteración de la liberación de dopamina en los ganglios basales y afectar indirectamente la integración de información en la corteza prefrontal. (Heckers and Konradi 2002, Harrison 2004, Sloviter 2005, Keller 2006, Voytek, Kramer et al. 2015).

## 1.2. MEMORIA Y APRENDIZAJE

La memoria es una función del cerebro que permite al organismo codificar, almacenar y recuperar la información del pasado como indica su definición en la Real Academia Española de la lengua (RAE) (De la Lengua Española 2001).

Algunas teorías, afirman que surge como resultado de las conexiones sinápticas repetitivas entre las neuronas. Lo que crea redes neuronales dando lugar a la potenciación a largo plazo (LTP).

La memoria permite retener experiencias pasadas y según el alcance temporal se clasifica en:

**\*\*Memoria a corto plazo** (consecuencia de la simple excitación de la sinapsis para reforzarla o sensibilizarla transitoriamente, origina memoria de nueva y reciente información).

**\*\*Memoria a medio plazo y memoria a largo plazo** (consecuencia de un reforzamiento permanente de la sinapsis gracias a la activación de ciertos genes y a la síntesis de ciertas proteínas, produce memoria de información antigua).

El hipocampo, es una estructura cerebral relacionada con la memoria y el aprendizaje.

La información parte de las zonas isocorticales que convergen hacia el área entorrinal y de ahí se dirige al hipocampo.

La CE a pesar de su pequeño tamaño es el principal aporte de comunicación del hipocampo. Se compone del periallocórtex que a su vez, está dividido en capas profundas y superficiales.

La capa superficial contiene la capa II y la capa III. En la capa II, se puede observar un grupo de grandes neuronas piramidales en la superficie, dando un aspecto granular a la CE y permitiendo que sea la delimitación macroscópica para definir los límites de dicha corteza (Suzuki and Eichenbaum 2000, Henry Duvernoy 2013).

Por lo tanto, en términos prácticos. La memoria o mejor dicho los recuerdos, son la expresión de que ha ocurrido un aprendizaje.



De ahí que, los procesos de memoria y de aprendizaje sean difíciles de estudiar por separado. Porque se entiende como aprendizaje al proceso de adquisición de conocimientos, habilidades, valores y actitudes, posibilitado mediante el estudio, la enseñanza o la experiencia.

### **1.2.1. HISTORIA**

Los primeros estudios sobre la memoria comenzaron en el campo de la filosofía e incluían técnicas para mejorarla como *la regla mnemotécnica* (“*ars memoriae*”).

Son un conjunto de técnicas de memorización y rememoración basado en la asociación mental de la información a memorizar, con datos que ya son parte de nuestra memoria o de nuestra práctica cotidiana.

Esta técnica, aprovecha la capacidad natural que tiene nuestro cerebro para recordar imágenes y para prestarle más atención a los sucesos poco comunes o extraordinarios.

Consiste en una oración corta y fácil de recordar que ayuda a relacionar palabras con el objetivo de memorizar conceptos con facilidad (Fellner, Volberg et al. 2016).

A finales del siglo XIX y principios del XX, la memoria pasó a ser el paradigma para *la psicología cognitiva*, cuyo objetivo es el estudio de los mecanismos básicos y profundos por los que se elabora el conocimiento desde la percepción. Desde la memoria y el aprendizaje hasta la formación de conceptos y razonamiento lógico (Neisser 1967).

En las últimas décadas, se ha convertido en uno de los principales pilares de la neurociencia cognitiva una rama de la ciencia entre la psicología cognitiva y la neurociencia.

En 1890 el psicólogo William James, fue el primero en distinguir formalmente entre memoria primaria (a corto plazo) y memoria secundaria (a largo plazo).

Gracias al estudio del modelo de almacenamiento múltiple de Atkinson y Shiffrin en 1963, contamos con tres tipos distintos de memoria.

El material a recordar, atraviesa nuestros sentidos para llegar a la memoria sensorial. En menos de un segundo, esta información desaparece o es transferida a la memoria a corto plazo donde puede permanecer alrededor de 20 segundos.

Sino desaparece en esta etapa, se dirigirá a la memoria a largo plazo donde puede permanecer el resto de nuestra vida.

En 1885, Hermann Ebbinghaus fue el primero en realizar estudios experimentales sobre memoria. Él mismo, fue quien se utilizó para realizar esas investigaciones en el laboratorio.

Estudió curvas de aprendizaje y olvido, empleando sílabas sin sentido para desarrollar esos estudios. Así, inició la investigación cuantitativa de la memoria asociativa, describiendo condiciones que influyen en la formación de la memoria y determinando varios principios básicos de codificación y recuerdo.

Formuló un modelo teórico que defendía que el mecanismo de la memoria requiere la repetición continuada. Para que, los datos que recordamos se asocien entre sí (Sternberg 2000, Moser, Rowland et al. 2015).

En paralelo con los estudios de Ebbinghaus, surgió una nueva generación de psicólogos experimentales que describían leyes del aprendizaje asociativo en animales.

En el siglo XX, existió un dominio conductismo (el estudio experimental objetivo y natural de la conducta (Watson Mar 1913)).

Se realizaron estudios relacionados con la conducta verbal. Utilizando el aprendizaje de pares asociados, en el cual, se representan pares de palabras no relacionadas. El primer miembro del par representa el estímulo y el segundo, la respuesta.

Es un enfoque asociacionista. Este enfoque, permitió que el estudio de la memoria tuviera una posición conceptual conductista en la teoría de interferencia.

Diversos conductistas como Pavlov, Watson, Hull, Skinner y Tolman comenzaron a realizar programas rigurosos para identificar y poder explicar el

aprendizaje animal. Sugiriendo que el condicionamiento produce cambios químicos o eléctricos en el cerebro, relacionando ambiente y comportamiento.

Aunque estos investigadores, huían de las explicaciones fisiológicas. Eran tiempos en que aún la naturaleza de la actividad neuronal no era del todo conocida.

Pero fue en 1950, con la revolución cognoscitiva cuando la memoria se volvió un tema integral dentro del enfoque del procesamiento de información.

SE produjo un aumento de su importancia, cuándo los ordenadores y las nuevas tecnologías comenzaban a despegar.

El clima comenzó a cambiar, Karl Lashley había demostrado que lesiones en la corteza cerebral tenían efectos predecibles sobre el comportamiento en animales.

Él quería determinar dónde era el lugar del cerebro que producían cambios y por tanto, era el responsable de la memoria o engrama. Experimentó con ratas en laberintos.

Las ratas aprendían a recorrer laberintos para alcanzar un premio en forma de comida. Después, a cada rata se le extirpaba quirúrgicamente una parte específica del córtex cerebral y se las devolvía al laberinto para poner a prueba su memoria y su capacidad de aprendizaje. Observando que, fuera cual fuera la parte del cerebro extirpado, la memoria y la capacidad de aprendizaje de estos animales para nuevas tareas quedaba limitada (Lashley 1950).

Donald Hebb en 1949, introdujo conceptos e ideas nuevas para explicar el funcionamiento cerebral a nivel neuronal. Que en la actualidad se siguen utilizando en la neurociencia moderna (Hebb 1949).

Los estudios de Scoville y Milner en 1957, dieron un nuevo punto de inflexión a este campo.

Se observó que existía pérdida severa de memoria en pacientes epilépticos después de una intervención quirúrgica en la formación del hipocampo y de las áreas del lóbulo temporal.

Con estos hechos, la investigación se inspiró en el estudio de la funcionalidad del hipocampo en memoria- memoria declarativa y cuales eran las células que se encontraban implicadas en estos procesos de conducta, aprendizaje y memoria (Squire and Zola-Morgan 1991, Squire 1992, Moser, Rowland et al. 2015).

### **1.2.2. TIPOS DE MEMORIA**

El recordar algo es lo que conocemos comúnmente como memoria. Pero es un concepto general, porque es la memoria a largo plazo a lo que nos referimos.

Existen otros tipos de memoria, a corto plazo y la sensorial, que participan en la formación de la memoria más duradera.

Los distintos tipos de memoria tienen su forma particular de funcionamiento. Aunque, todas cooperan en el proceso de memorización.

La memoria nos ayuda a adaptarnos al entorno y nos marca para definir quiénes somos; nuestra identidad. Sin ella, seríamos incapaces de aprender ni podríamos darle sentido a nuestro entorno.

Podemos encontrar diferentes fases en el proceso de almacenamiento de los conocimientos (codificación; almacenamiento y recuperación).

Ya que, la memoria no se encuentra en un lugar concreto del cerebro, si no que consiste en varios sistemas conectados como demostró, Brenda Milner en sus investigaciones con pacientes con trastornos de ésta (Penfield and Milner 1958, Milner and Klein 2016).

*La codificación*, es el proceso en el cual se prepara la información para poder ser almacenada. Es la primera fase de la memoria y aquí la concentración, la atención y la motivación son muy importantes.

*El almacenamiento* consiste en retener los datos en la memoria para una utilización posterior.

Y por último, *la recuperación* nos permite poder encontrar la información cuando la necesitamos es decir, recordar.

Richard Atkinson y Richard Shiffrin, desarrollaron la teoría multialmacén o “modal model” que indica que la información va pasando por diferentes compartimentos de memoria a medida que se procesa.

Así, contamos con tres tipos distintos de memoria: la memoria sensorial (MS), la memoria a corto plazo (MCP) y la memoria a largo plazo (MLP) (Atkinson and Shiffrin 1971, Ogmen and Herzog 2016).

### **1.2.2-1 MEMORIA SENSORIAL**

Es la capacidad de registrar las sensaciones percibidas a través de los sentidos.

Puede definirse como, la persistencia de un estímulo en el tiempo, más allá de su presencia física.

Es la memoria que permite que el efecto de un estímulo continúe, aunque éste haya desaparecido.

Esta memoria procesa gran cantidad de información a la vez. Aunque solo es durante un tiempo muy breve, porque dura entre 200 y 300 milisegundos e inmediatamente desaparece o se transmite a la memoria a corto plazo.

La MS es una capacidad mnésica que manifiesta la relación entre los sistemas perceptivos y los procesos cognitivos.

El aprendizaje y el funcionamiento cognitivo, resultaría imposible sin la captación de información y conocimiento nuevo del mundo exterior mediante los sistemas perceptivos.

Este tipo de memoria, procesa y almacena la información significativa. Pero también, interviene en el funcionamiento de procesos básicos de percepción como, la detección, la discriminación, el reconocimiento o la identificación (Vandenbroucke, Sligte et al. 2014).

La principal función de la MS, consiste en conservar la estimulación a pesar de que vaya desapareciendo.

De esta forma, aumenta las posibilidades de procesar la información aunque el estímulo sea de poca duración y ya no se esté visualizando.

Existe una serie de almacenes de información provenientes de los distintos sentidos que, prolongan la duración de la estimulación.

De este modo, la información puede ser de tipo visual, auditiva, olfativa, etc. Los almacenes más estudiados son los sentidos de la vista y el oído (Infanti, Hickey et al. 2015).

De forma general, se han establecido dos tipos principales de memoria sensorial: *la memoria icónica* (es un componente del sistema de memoria visual, se perciben estímulos a través de la vista) y *la memoria ecoica* (integrante de la memoria a corto plazo que se encarga de retener información auditiva, se pone en marcha cuando los estímulos son captados a través del oído).

### **1. MEMORIA ICÓNICA**

Es el registro de la MS relacionado con el dominio visual.

Este componente incluye tanto la memoria visual a corto plazo como la memoria a largo plazo.

Se caracteriza por un almacenaje memorístico de muy breve duración, alrededor de los 1000 milisegundos. Esta estructura, es capaz de mantener aproximadamente nueve elementos pero, sólo se transfieren a la memoria operativa aquellas piezas a las cuales el usuario preste atención.

Es un depósito de gran capacidad en el cual, la información almacenada es una representación isomórfica (con la misma estructura) de la realidad de carácter puramente físico y no categórico (aún no se ha reconocido el objeto).

Los dos factores principales de este tipo de memoria sensorial son, la persistencia visual y la persistencia informativa.

La primera es una representación visual de la imagen física creada por el sistema sensorial. Mientras que la segunda, conforma un almacén de memoria

de mayor duración que representa una versión codificada de la imagen visual (Álvarez 2015).

Una representación visual prolongada comienza con la activación de los fotorreceptores de la retina.

Los bastones y los conos experimentan una estimulación después de la supresión del estímulo.

La memoria icónica se encarga de proporcionar un flujo de información visual al cerebro, el cual puede ser recogido y sostenido en el tiempo (Bradley and Pearson 2012).

Uno de los papeles más importantes de la memoria icónica es su implicación en la detección de cambios en el ambiente visual:

1. **Integración temporal:** esta memoria activa la integración de la información visual y proporciona un flujo constante de imágenes en la corteza visual primaria del cerebro.
2. **Ceguera al cambio:** varias investigaciones ponen de manifiesto que la breve representación de la memoria icónica resulta especialmente relevante a la hora de detectar modificaciones en el entorno visual.
3. **Movimientos oculares sacádicos:** las investigaciones más recientes sugieren que la memoria icónica se encarga de proporcionar continuidad a la experiencia durante los movimientos oculares sacádicos.

## 2. MEMORIA ECOICA

Es uno de los registros de la MS que se encarga de retener la información auditiva.

Es capaz de almacenar grandes cantidades de información auditiva en un periodo de tiempo entre 3-4 segundos.

La estimulación sonora se mantiene activa en la mente y puede ser reproducida de nuevo durante ese breve periodo de tiempo.

Mantiene acumulados los estímulos auditivos hasta que el receptor haya recibido la suficiente información como, para poder procesarla definitivamente en la memoria operativa.

Los primeros trabajos sobre este tipo de memoria, fueron realizados por Baddeley en el modelo de la memoria de trabajo.

Este tipo de memoria se compone de un sistema ejecutivo y dos subsistemas:

\*\* *La agenda visoespacial* relacionadas con la memoria icónica.

\*\*El bucle fonológico que procesa información auditiva (ecoica).

Según este modelo, el bucle fonológico procesa la información de dos formas distintas.

La primera de ellas, consta de un almacén con capacidad para retener información durante tres o cuatro segundos como he indicado anteriormente.

La segunda, resulta ser un proceso de repetición sub-vocal que mantiene la huella de memoria mediante el uso de una voz interior (Ogmen and Herzog 2016).

### **1.2.2-2 MEMORIA A CORTO PLAZO**

La MCP es nuestra memoria activa, primaria, nuestra memoria de trabajo.

Contiene la información que usamos en este momento. El sistema dónde el individuo maneja la información a partir de la cual, está interactuando con el ambiente.

Cuando se ha seleccionado y atendido una información en la MS, pasa a la MCP también llamada *memoria operativa o memoria de trabajo* “*working memory*” (Torres 2006), por su importancia funcional en el procesamiento cognitivo.

Este tipo de memoria, permite el cumplimiento de tareas cognitivas como el razonamiento, la comprensión, la planificación del curso de acciones



futuras, la comprensión de mensajes lingüísticos y la resolución de problemas.

Mediante este concepto, se abandona la idea de que la MLP depende de la MCP.

Es una información mucho más duradera que la almacenada en la MS. Aunque, está limitada, alrededor de  $7 \pm 2$  elementos durante 10-30 segundos ("*span de memoria*").

Se verá más o menos limitada en relación con las capacidades de cada persona y el entrenamiento que haya realizado a lo largo de su vida.

Por un lado, la MCP mantiene la información en la mente aunque ésta no se encuentre presente en ese mismo instante. Por otro lado, puede manipular esa información permitiendo intervenir en otros procesos cognitivos superiores y por tanto, no se considera como un mero "cajón de recuerdos".

Este tipo de memoria funciona a partir de 3 principios muy sencillos:

\*\* El efecto de primacía, hace referencia al hecho de que las personas recuerdan mejor las cosas que suceden inicialmente (ya sean los primeros ítems de una lista o las primeras palabras de una conversación).

\*\* El efecto de recencia, se refiere a nuestra excelente memoria para los hechos o datos que se presentan al final de una lista o una situación.

Así, la tendencia de la MCP será la de transferir a la MLP los datos primeros o últimos; obviando buena parte de los hechos o datos intermedios.

\*\* La significatividad, cuando las informaciones intermedias tienen un gran significado emocional adquieren la primacía absoluta.

Las funciones generales de este sistema de memoria abarcan la retención de información, el apoyo en el aprendizaje de nuevo conocimiento, la comprensión del ambiente en un momento dado, la formulación de metas inmediatas y la resolución de problemas.

Debido a las limitaciones de capacidad cuando una persona realice una determinada función, las demás no se podrán llevar a cabo en ese momento.

Este tipo de memoria es concebida por Baddeley como un sistema múltiple fragmentado en cuatro subcomponentes:

1. **Bucle fonológico:** se encarga del almacenamiento pasivo y el mantenimiento activo de la información verbal. El primer proceso hace que la información se pierda en un breve lapso de tiempo mientras que el segundo el de la “repetición” permite refrescar la información temporal mantener el habla interna que está implicada en la MCP. El bucle fonológico intervendría en la lectura o en el aprendizaje de un número de teléfono.
2. **Agenda visoespacial:** opera de manera similar al bucle fonológico, su función es el mantenimiento activo de información, pero en este caso con un formato de imágenes viso-espacial. La agenda visoespacial intervendría por ejemplo en el aprendizaje de un itinerario.
3. **Almacén episódico:** Este sistema integra información procedente de una variedad de fuentes, de manera que se crea una representación multimodal (visual, espacial y verbal) y temporal de la situación actual.
4. **Sistema ejecutivo:** Su función es el control y la regulación de todo el sistema de memoria operativa (Connor, MacKay et al. 2000, Baddeley 2002, Baddeley 2003, Álvarez 2015).

Las variadas funciones de la MCP son el resultado de la actividad de numerosos sistemas cerebrales.

Distintos tipos de pruebas, señalan a la corteza prefrontal como parte fundamental de esos sistemas.

Debido a que, en diversos estudios de modelos animales, las células del córtex prefrontal manifestaban una actividad específica durante el tiempo de demora. En tareas en que el animal debía recordar durante unos segundos un estímulo recientemente presentado pero, actualmente no presente (Aguado-Aguilar 2001).

También depende de otras áreas primarias como el núcleo dorso-mediano del tálamo y el neocórtex.

### 1.2.2-3 MEMORIA A LARGO PLAZO

La MLP es la capacidad de mantener la información desde unos pocos días hasta décadas.

Es un almacén al que se hace referencia cuando comúnmente hablamos de memoria en general.

Puede acumular permanentemente la información. Es un tipo de memoria que presenta una capacidad ilimitada para la información ya que, su capacidad es desconocida.

Se puede retener los recuerdos vividos, nuestro conocimiento acerca del mundo, imágenes, conceptos, estrategias de actuación etc.

Se considera “la base de datos” y está estrechamente relacionada con la MCP, porque elementos que se almacenan por un corto período de tiempo pueden convertirse en recuerdos a largo plazo a través del proceso de ensayo y de asociación significativa.

Dentro de este tipo de memoria podemos encontrar varias divisiones: *memoria declarativa, procedimental, episódica, semántica, explícita e implícita* (Carrillo-Mora 2010).

- **Memoria declarativa:** se encarga de almacenar información sobre los acontecimientos; por ej: nombres, fechas, etc.
- **Memoria procedimental:** es la encargada en almacenar el conocimiento de las habilidades motoras y de los procedimientos realizados en el entorno.  
Nos muestra recuerdos que hemos almacenado mediante la práctica; por ej: cómo peinarnos, cómo escribir, etc.
- **Memoria episódica:** este tipo de memoria almacena (en ciertas ocasiones detalladamente) nuestras experiencias.  
Nos permite recordar vivencias y episodios ocurridos en un determinado lugar.  
Es la que nos permite tener consciencia de quienes somos y recuperar conscientemente lo acontecido en nuestra vida.

Gracias a esta memoria, conocida también como autobiográfica podemos viajar mentalmente hacia atrás en el tiempo vivido y anticipar de manera mental nuestro futuro con sus proyectos personales (García García 2009).

- **Memoria semántica:** este tipo de memoria almacena el conocimiento necesario para el uso del lenguaje, hechos relacionados con el mundo exterior (históricos, geográficos o científicos), conocimientos generales que no están basados en experiencias propias como, los nombres de las personas o las cosas y el significado que hemos ido aprendiendo a lo largo de nuestra vida.
- **Memoria implícita:** ésta, almacena información inconscientemente sobre hábitos, habilidades. Nos permite de esta forma aprender a hacer ciertas cosas sin estar consciente de ello. Por ej: andar en bicicleta.
- **Memoria explícita:** a diferencia de la memoria implícita, con este tipo de memoria, sí somos conscientes de que contamos con dicha información. La memoria explícita almacena información sobre hechos, aprendizajes y vivencias propias de las que somos totalmente conscientes.

Para muchos autores, esta clasificación se puede resumir en dos tipos de memoria que engloba a todas de manera alternativa.

Debido a que la MLP permite almacenar la información de forma duradera clasificándola en memoria implícita (procedimental) y explícita (declarativa) únicamente.

Esta distinción se basa fundamentalmente en estudios neuropsicológicos con pacientes amnésicos en los que se observa una disociación entre capacidades alteradas y conservadas de aprendizaje y MLP (Ballesteros 1999, Aguado-Aguilar 2001).

## 1. MEMORIA IMPLÍCITA (*procedimental*)

La memoria implícita (también llamada *procedimental*) se almacena de manera inconsciente.

Está implicada en el aprendizaje de diversas habilidades y se activa de modo automático.

Es la información que nos permite ejercer hábitos cognitivos y motores.

Montar en bicicleta o conducir un automóvil (aprendizaje motor); sobrecogernos cuando oímos ruidos intensos con los que ya estamos familiarizados (habitación); salivar ante la presencia de una comida apetitosa (condicionamiento clásico); comportarnos rutinariamente de forma socialmente aceptada (condicionamiento instrumental); reconocer inmediatamente a nuestros familiares y amigos (aprendizaje perceptivo), todos estos ejemplos no serían posibles sin este tipo de memoria (Morgado Bernal 2005).

Por tanto, es el tipo de aprendizaje y memoria sobre cómo se hacen las cosas que solemos hacer.

Se manifiesta conductualmente, sin que el sujeto sea capaz de describir la información que utiliza y sin necesidad de que deba ser consciente del hecho de que adquirió esa habilidad. Se adquiere gradualmente y se perfecciona con la práctica (Vogliotti and Macchiarola 2003).

Suele ser una memoria fiel, rígida y duradera, derivada de tipos de aprendizaje básico y filogenéticamente antiguos como la habitación y la sensibilización, el aprendizaje perceptivo y motor o, los condicionamientos clásico e instrumental.

Es influenciado por predisposiciones biológicas de cada especie, como las que permiten a determinados individuos la aptitud para un determinado deporte, percepción del espacio o habilidades acústicas o lingüísticas (Bernal 2005, Morgado Bernal 2005).

Prácticamente todas las formas de aprendizaje que dan lugar a memoria implícita están condicionadas por grados más o menos específicos de plasticidad cerebral.

Entre otros ejemplos tenemos: las abejas son capaces de establecer asociaciones con colores y olores; los pájaros que anidan tienen una excelente memoria espacial; las ratas son animales bien adaptados al aprendizaje en laberintos; los primates han desarrollado habilidades especiales para el aprendizaje de naturaleza social y los humanos son capaces de reconocer voces y rostros, incluso existen diferencias de género, los varones superan habilidades espaciales mientras que mujeres tienen capacidades analíticas superiores.

Su principal lugar de almacenamiento radica en estructuras subcorticales, como el neocórtex (caudado y putamen), también se encuentra implicado el hipocampo, los ganglios basales y el cerebelo (Eichenbaum 1997).

## **2. MEMORIA EXPLÍCITA (declarativa)**

Este tipo de memoria es el almacenamiento cerebral de hechos (memoria semántica) y eventos autobiográficos (memoria episódica).

Se expresa conscientemente y es fácil de declarar verbalmente o por escrito lo que le ha valido en humanos el nombre de memoria declarativa.

Este tipo de memoria puede adquirirse en uno o pocos ensayos. Tiene como particularidad poder expresarse en situaciones y modos diferentes a los del aprendizaje original.

Es una memoria de expresión flexible, promiscua y cambiante.

Resulta del aprendizaje relacional. Una forma de aprendizaje complejo que consiste en analizar, comparar y contrastar diferentes tipos de información, un ejemplo es el aprendizaje que nos permite orientarnos en el espacio.

Su adquisición se relaciona con el sistema hipocámpal y otras estructuras del lóbulo temporal medial del cerebro.

Aunque su almacenamiento definitivo parece radicar en diferentes áreas de la corteza cerebral.

Se han propuesto algunas estructuras neurológicas asociadas a esta memoria. A parte del lóbulo temporal, también está relacionados con este tipo

de memoria, la amígdala, el hipocampo como ya he indicado y la corteza rinal en el lóbulo temporal junto al córtex prefrontal.

Los núcleos del tálamo cerebral también se incluyen, debido a que existen muchas conexiones entre el córtex prefrontal y el córtex temporal que transitan a través del tálamo.

Las regiones que conforman el circuito de la memoria explícita reciben información del neocórtex y de los sistemas del tallo cerebral incluyendo los sistemas colinérgicos, serotoninérgicos y noradrenérgicos (Jódar-Vicente 2004).

Las memorias implícita y explícita no son siempre independientes una de la otra.

Por lo que debe tomarse con cierta precaución su distinción. Es probable que no existan tareas “puras” de memoria explícita o implícita.

En los organismos superiores, se observa una considerable influencia mutua.

Los recuerdos o conductas inconscientes (implícitas) pueden ser modulados y modificados por la memoria consciente (explícita).

Los recuerdos explícitos suelen tener muchos componentes de memoria implícita.

Una tarea se realiza paso a paso y de forma deliberada al principio de su adquisición, para llegar finalmente a ejecutarse de forma automática y sin necesidad de un control consciente continuo. La transición desde el control deliberado inicial hasta la ejecución automatizada final de una misma tarea, puede interpretarse como una transición desde el uso explícito al implícito de la información o la habilidad adquirida.

Un ejemplo sería cuando aprendemos a escribir a máquina, a nadar o a conducir un coche, nuestra conducta es consciente y explícita pero con la práctica se automatiza y se convierte en una rutina inconsciente.

Por esto, se piensa que lo más frecuente es que ambos tipos de memoria interactúen y se apoyen (Tulving 2002, Carrillo-Mora 2010, Loubon and Franco 2010).

### 1.2.3. MEMORIA EN EL HIPOCAMPO

Se conoce que el hipocampo tiene un papel crítico en el aprendizaje y la memoria.

La información que aflora de las zonas isocorticales se dirige hacia la CE y de allí al hipocampo como ya había mencionado en el apartado 2.1.3.

Siendo la CE a pesar de su pequeño tamaño, el principal aporte a esta zona. Así, la información recién adquirida cruza las vías de este órgano antes de ser fijada en la isocorteza y hace posible distinguir la memoria de elementos nuevos o recientes que depende del hipocampo (MCP).

El lóbulo temporal medial, en particular la CE y el hipocampo están implicados en todos los aspectos de la memoria declarativa en humanos (Bass, Nizam et al. 2014).

Es decir, en la memoria semántica. Estas partes cerebrales, se encuentran relacionadas en la memoria de hechos y concepto.

Al mismo tiempo que se ven envueltos en la memoria episódica. Permitiendo los recuerdos conscientes de los acontecimientos y las relaciones entre ellos.

A la vez que, se encuentran formando parte en la memoria espacial sobre todo en roedores, pero también, en el hombre (Vicens, Redolat et al. 2003, Addis, McIntosh et al. 2004, Carboni 2007), reconociendo la localización del espacio.

Debe de tenerse en cuenta que el hipocampo tiene funciones cognitivas muy altas. Además, sus neuronas tienen una notable plasticidad.

Las estimulaciones repetitivas producen una modificación persistente de su estado fisiológico pudiendo producir nuevas neuronas a lo largo de la vida.

Después de pasar a través del hipocampo, la información a memorizar se almacena en la corteza de asociación.

En la actualidad los mecanismos de almacenamiento son parcialmente desconocidos. Se piensa que, pueden implicar cambios persistentes en la estructura bioquímica de las neuronas, obtenidas a través de una cadena de modificaciones biológicas, a parte del órgano en sí.



A la vez que, ciertos neurotransmisores se encuentran implicados en estas modificaciones como la acetilcolina (Ach), arginina vasopresina (AVP), y endorfinas entre otras (Easton, Douchamps et al. 2012, Li, Zhang et al. 2017).

Si nos fijamos en las características neurofisiológicas del circuito hipocampal que median este tipo de memoria declarativa podemos destacar tres propiedades fundamentales provenientes de la región CA3:

- **Aferencias convergentes** desde todas las áreas de asociación cortical que se distribuyen en la población celular del hipocampo. De esta manera, las células principales de CA3 reciben información perceptual de alto nivel sobre el estímulo atendido como claves espaciales referidas al mismo.
- **Conexiones recurrentes** desde las áreas principales de CA3 a otras regiones de CA3 que se encuentran distribuidas en esa zona y envuelven las sinapsis excitadora de glutamato.
- **Potenciación a largo plazo**, caracterizado por la rápida plasticidad sináptica del hipocampo sobre todo en una forma de potenciación dependiente de los receptores N-metil D-aspartato (NMDA) muy asociada a la memoria.

Ciertas características específicas de CA3, como la escasez de sus conexiones recurrentes y su gran excitabilidad, combinadas con la rápida plasticidad sináptica.

Producen conexiones asimétricas, que pueden representar secuencias de entrada de información de un patrón único. Reproduciendo espontáneamente secuencias de aprendizaje (Levy 1996).

Para algunos autores, la hipótesis más aceptada actualmente es que el hipocampo es necesario para la fase inicial de adquisición del conocimiento explícito. Pero, no es sin embargo, un sistema de almacenamiento de la memoria.

El proceso de consolidación de la memoria explícita parece depender del intercambio entre el hipocampo y diversas zonas corticales, a través de sistemas bidireccionales de conexiones córtico-hipocampales.

Asimismo, parece que los sistemas de almacenamiento se localizarían a nivel cortical y de nuevo dependería del hipocampo, la reactivación y organización para la utilización de esa memoria (Aguado-Aguilar 2001).

La participación del hipocampo en la memoria explícita ha sido estudiada por medio de la memoria espacial.

### **MEMORIA ESPACIAL (ME):**

La ME, consiste en múltiples mecanismos especializados en codificar, almacenar y recuperar información acerca de rutas, configuraciones y localizaciones espaciales.

Es decir, es aquella parte de la memoria dedicada a retener los datos sobre una determinada localización. Como la información relacionada con la orientación en el espacio (Burgess, Maguire et al. 2002).

Esta característica de recordar detalles sobre diversos lugares, no es específico de los seres humanos.

Existen numerosos experimentos animales que lo demuestran, como comprobaremos a lo largo de este trabajo.

Diferentes investigaciones con ratas, han mostrado que las lesiones hipocampales afectan negativamente a la adquisición y retención del aprendizaje espacial cuando estos animales son entrenados en la búsqueda de una plataforma oculta a pocos centímetros por debajo del agua (laberinto acuático de Morris) (Morris, Garrud et al. 1982).

### 1.2.4. APRENDIZAJE

El aprendizaje es la modificación del comportamiento como resultado de una experiencia (De la Lengua Española 2001).

También se puede definir como, el proceso a través del cual se modifican y adquieren habilidades, destrezas, conocimientos, conductas o valores. Como resultado del estudio, la experiencia, la instrucción, el razonamiento y la observación.

Existen distintas teorías sobre el aprendizaje. Debido a que en él, intervienen diversos factores y es considerado como una de las funciones mentales más importantes en humanos y animales.

Es la habilidad mental por medio de la cual conocemos, adquirimos hábitos, desarrollamos habilidades, forjamos actitudes e ideales.

El aprendizaje supone un cambio conductual o un cambio en la capacidad conductual (este cambio es producido tras asociaciones entre estímulo y respuesta).

Debe de ser perdurable en el tiempo y ocurre a través de la práctica o de otras formas de experiencias.

Es vital para los seres humanos, puesto que nos permite adaptarnos motora e intelectualmente al medio en el que vivimos, por medio de una modificación de la conducta.

Pero, es una capacidad que en mayor o en menor medida es poseída por todas la especies animales y constituye un mecanismo fundamental de adaptación al medio ambiente (Aguado-Aguilar 2001, Puig 2009).

El aprendizaje posee bases neurofisiológicas y neurobiológicas. Puesto que el cerebro tiene una función en el desarrollo de la persona.

Se adquiere una determinada información y así, obtenemos el conocimiento sobre el mundo. Siendo esencial la atención, la memoria, motivación y comunicación.

En esta función intervienen varias áreas y núcleos encefálicos (Kandel 2001, i Massó 2009).

No se conoce demasiado sobre las bases neurofisiológicas del aprendizaje. Sin embargo, se tienen algunos indicios importantes de que éste, está relacionado con la modificación de las conexiones sinápticas.

En concreto se admite como hipótesis que:

- El aprendizaje es el resultado del fortalecimiento o abandono de las conexiones sinápticas entre neuronas.
- El aprendizaje es local. Es decir, la modificación de una conexión sináptica depende sólo de la actividad (potencial eléctrico), de la neurona presináptica y de la neurona postsináptica.
- La modificación de las sinapsis es un proceso relativamente lento, comparado con los tiempos típicos de los cambios en los potenciales eléctricos que sirven de señal entre las neuronas.
- Si la neurona presináptica o la neurona postsináptica (o ambas), estuvieran inactivas. Entonces la única modificación sináptica existente consiste en el deterioro o decaimiento potencial de la sinapsis que es responsable del olvido.

A lo largo del tiempo, ciertos investigadores han desarrollado distintas teorías del aprendizaje.

Con ellas, se pretende explicar los cambios que se producen en la conducta. Según la práctica, describen el proceso que permite a los seres humanos o a los animales aprender.

Estas teorías quieren entender, anticipar y regular la conducta a través del diseño de estrategias que faciliten el acceso al conocimiento.

Algunas de las más conocidas son:

### 1- **TEORÍAS CONDUCTISTAS:**

El nivel conductual se ocupa de descubrir relaciones entre variables ambientales y cambios observables en la conducta.

Son los “procesos generales de aprendizaje”. Se distinguen entre el aprendizaje asociativo (el cambio conductual se debe a la experiencia repetida de dos eventos que aparecen relacionados en el tiempo) y el aprendizaje no asociativo (la repetición de un único evento).

En referencia a estos tipos se describen diferentes teorías.

- La teoría del condicionamiento clásico, llevada a cabo por el fisiólogo ruso Pávlov.

Es una teoría muy conocida, la planteó a través de un caso con su perro, a quien enseñó que cada vez que sonaba una campana llegaba el momento de la comida.

Provocando la salivación del animal al oír tocarla, porque sabía que iba alimentarse.

De esta manera, deja patente que estímulos neutros que se producen de manera simultánea generan una respuesta después de que se asocia con un estímulo condicionado (Clark 2018).

- Teoría del condicionamiento operante o instrumental, desarrollada por B.F. Skinner.

Intenta explicar el aprendizaje a partir de unas leyes y mecanismos comunes para todos los individuos.

Comienza el estudio del comportamiento animal. Estableciendo que el aprendizaje, es un cambio en la forma de comportamiento en función de los cambios del entorno.

Así, este aprendizaje es el resultado de la asociación de estímulos y respuestas (Catania 1992).

El aprendizaje repetitivo provoca un reforzamiento mediante el cual, un estímulo aumenta la probabilidad de que se repita en el comportamiento anterior (Skinner 1964).

- La teoría del aprendizaje social, propuesta por Albert Bandura.

Es un aprendizaje observacional, en ausencia de reforzamiento directo. Se describe las condiciones en que se aprende a imitar modelos observando conductas en otros sujetos y las recompensas o castigos que los mismos obtienen (Bandura and Rivièrè 1982, Schunk 1997).

## 2- TEORÍAS COGNITIVAS:

El nivel cognitivo, considera el cerebro como un sistema de procesamiento de información.

Trata de indagar en las actividades de procesamiento que tienen lugar durante el curso del aprendizaje y del modo en que la información queda representada en la memoria.

- Aprendizaje significativo, postulado por D.Ausubel y J.Novak.

El aprendizaje debe ser significativo, no memorístico. Para ello, los nuevos conocimientos deben relacionarse con los saberes previos que ya se posea (Novak 2003).

- Aprendizaje por descubrimiento, de Bruner.

Cuya teoría, da gran importancia a la actividad directa de los estudiantes sobre la realidad.

Defiende el aprendizaje por recepción, donde los contenidos y las actividades a realizar se estructuran para que sean significativos (Ball and Deich 1972, Santander, Santander et al. 2012).

- Constructivismo, este enfoque es llevado a cabo por Jean Piaget.

El aprendizaje es un proceso de cambio en el que se va construyendo (reorganización; adaptación; asimilación; acomodación y equilibración).

El aprendiz es el agente que provoca su propio aprendizaje; maestros, familia, etc. son facilitadores de ese aprendizaje pero no la pieza principal.

Esta teoría, habla del conocimiento de las propias experiencias que siempre están sujetas a la interpretación del sujeto que aprende.

Piaget propuso que para el aprendizaje es necesario un desfase de los conocimientos que ya se poseen y del nuevo conocimiento que se propone (Seltzer 1977).

Si el conocimiento no presenta resistencias, el individuo lo podrá agregar a sus esquemas con un grado de motivación siendo el proceso de enseñanza-aprendizaje correcto .

- Socio-constructuivismo, basado en ideas de Vygotski.

Considera los aprendizajes como un proceso personal de construcción de nuevos conocimientos, a partir de los saberes previos pero inseparables de la situación en la que se producen.

Este proceso está íntimamente relacionado con la sociedad (Rodríguez Palmero 2004, Piaget and Vigotsky 2008).

### 3- **TEORÍA DEL PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN:**

Es una propuesta que se sustenta en el hecho de que recurre al empleo de metáforas y recursos similares para acometer la comprensión de cómo se resuelven ciertos problemas.

Es una teoría influida por los estudios cibernéticos de los años cincuenta y sesenta.

Presenta una explicación sobre los procesos internos que se producen durante el aprendizaje.

- Conectivismo, es un concepto que pertenece a la era digital. Desarrollado por George Siemens.

Basándose en el análisis de las limitaciones del conductismo, el cognitivismo y el constructivismo.

Así, explica los efectos de la tecnología sobre la manera en que actualmente vivimos, nos comunicamos y aprendemos (Aguado-Aguilar 2001, Siemens 2004).

#### 4- TEORÍAS A NIVEL NEURONAL:

El nivel neuronal tiene como objetivo final el descubrimiento de los procesos físico-químicos que suceden en el cerebro y que permiten a éste desarrollar la funciones de aprendizaje y memoria.

Este nivel, estudia cómo se concretan físicamente en el cerebro las representaciones mentales que constituyen la memoria.

En él, pueden distinguirse diferentes teorías para explicar dificultades en el aprendizaje.

- Teorías neurofisiológicas, conocida como teoría de la organización neurológica.

Indica que niños con deficiencias en el aprendizaje o lesiones cerebrales no tienen la capacidad de evolucionar con normalidad, debido a una mala organización en el SN.

Según Goldberg y Costa en su “modelo dinámico”, indican que el hemisferio izquierdo realiza el procesamiento unimodal y la retención de códigos simples.

Mientras que el hemisferio derecho está más capacitado para una integración intermodal y procesar las informaciones nuevas y complejas.

Por ello, se piensa que una disfunción cerebral en el aprendizaje no solo consiste en una alteración o deficiencia de las conexiones cerebrales, sino que se relaciona con la alteración de procesos y estrategias adecuadas para llevar a cabo el aprendizaje (Goldberg).

- Teorías genéticas, según Hallgren.

Pacientes con dislexia poseían deficiencias en la lectura, escritura y deletreo. Estas alteraciones podían estar relacionadas con factores hereditarios.

Por otro lado, Hermann realizó estudios en gemelos monocigóticos y dicigóticos. Encontrando que parejas de gemelos dicigóticos tenían problemas de lectura, mientras que los monocigóticos mostraban trastornos de lectura (Larsby Hällgren et al. 2005).



- Factores bioquímicos y endocrinos, según las investigaciones de Thiessen y Mills.

Ciertas deficiencias vitamínicas, dificultades de aprendizaje e hiperactividad no están relacionados, al no existir diferencias entre los grupos controles y de estudio.

Aunque sí descubrieron que existía un descenso en la conducta de hiperactividad y en algunas habilidades lingüísticas.

Al parecer, hiper e hipotiroidismo con la producción de tiroxina están relacionada con la hiperactividad, irritabilidad, pérdida de peso, inestabilidad emocional. Factores que se asocian con las dificultades del aprendizaje y el descenso en el rendimiento escolar (GODOY ACEVEDO et al. 2009, Ojeda del Valle 2012).

### **1.2.5. TIPOS DE APRENDIZAJE**

A lo largo del tiempo, numerosos estudios en diversos investigadores han permitido dar teorías variadas sobre el aprendizaje como he indicado en el apartado 1.2.4.

Estas investigaciones, han proporcionado datos sobre como es el funcionamiento de nuestra memoria y como influye la observación o la experiencia a la hora de construir conocimiento y cambiar nuestra manera de actuar.

Los seres vivos perciben y aprenden de forma distinta. A través de canales diferentes. Esto, implica algunos cambios en la representación o en la manera de recibir la información a través de los canales sensoriales.

Se han realizado estudios sobre los distintos tipos de aprendizaje, los cuales han determinado qué parte de la capacidad de aprendizaje se hereda y cuál se desarrolla.

Con los conocimientos actuales, se sabe que no existe un entorno de aprendizaje universal ni un método apropiado para todo el mundo. Cada persona o animal es diferente y por tanto, aprende de forma diferente.

Existen ciertas predominancias e inclinaciones según lo que se quiera aprender.

Por este motivo, se han establecido distintos tipos de aprendizaje relacionados con las teorías ya mencionadas.

- **APRENDIZAJE IMPLÍCITO**: es un tipo de aprendizaje no intencional y se obtiene como resultado de la ejecución de conductas automáticas como al hablar, moverse, caminar.

Aunque no lo notemos, estamos todo el tiempo siendo receptivos a nuevos conocimientos y este es un tipo de aprendizaje inconsciente.

- **APRENDIZAJE EXPLÍCITO**: se caracteriza porque el aprendiz tiene intención de aprender y es consciente de qué aprende.

Este tipo de aprendizaje nos permite adquirir información sobre personas, lugares y objetos.

Por ello, exige la utilización del área más evolucionada de nuestro cerebro es decir, requiere la activación de la corteza prefrontal.

- **APRENDIZAJE ASOCIATIVO**: Es un proceso por el cual, un individuo aprende la asociación entre dos estímulos o un estímulo y un comportamiento.

La asociación es, por una parte, un potente mecanismo para la modificación adaptativa de la conducta y por otra, la adquisición del conocimiento. Siendo un importante principio organizador de la memoria.

- **APRENDIZAJE NO ASOCIATIVO**: Se basa en un cambio en nuestra respuesta ante un estímulo que se presenta de forma continua y repetida.

Encontramos dos fenómenos: -La habituación, se entiende como la reducción de la eficiencia al estímulo que, por no ser significativo, conduce a ignorarlo.

-La sensibilización, es la intensificación de la respuesta en función de un fuerte estímulo capaz de producir incluso la percepción de estímulos que anteriormente al hecho en si se consideraban débiles.

- **APRENDIZAJE SIGNIFICATIVO:** El individuo recoge la información, la selecciona, organiza y establece relaciones con el conocimiento que ya tenía previamente.

Relaciona la información nueva con la que ya conoce dotándolos así de coherencia respecto a sus estructuras cognitivas.

- **APRENDIZAJE COOPERATIVO:** permite que la persona o el animal aprenda pero no solo, sino junto a sus compañeros.

- **APRENDIZAJE COLABORATIVO:** es muy similar al cooperativo pero se diferencian, en el grado de libertad con la que se constituyen y funcionan los grupos que están aprendiendo.

El grupo decide como abordar su propio aprendizaje.

- **APRENDIZAJE EMOCIONAL:** se aprende a conocer y gestionar las emociones de manera más eficiente.

Aporta beneficios a nivel mental y psicológico pues, influye positivamente en nuestro bienestar, mejora las relaciones interpersonales y favorece el desarrollo personal.

- **APRENDIZAJE OBSERVACIONAL:** o vicario por imitación o modelado.

Se basa en una situación social en la que al menos participan dos individuos: -El modelo, la persona o el animal del que se aprende.

-El sujeto que realiza la observación de dicha conducta, el que aprende.

- **APRENDIZAJE EXPERIENCIAL:** también se llama aprendizaje kinestésico.

Se produce fruto de la experiencia, se aprende de los errores que nos da la propia experiencia aunque hay que tener en cuenta que todos los sujetos no perciben el hecho de la misma manera.

Por lo tanto, lo que nos lleva de la simple experiencia al aprendizaje es la autorreflexión.

Perciben las cosas a través del cuerpo y de la experimentación. Es un aprendizaje muy intuitivo, valorando el ambiente y la participación.

- **APRENDIZAJE POR DESCUBRIMIENTO:** es un aprendizaje activo.  
La persona en lugar de aprender los contenidos de forma pasiva, descubre, relaciona y reordena los conceptos para adaptarlos a su esquema cognitivo.
- **APRENDIZAJE MEMORÍSTICO:** también llamado repetitivo.  
Aprender y fijar en la memoria distintos conceptos sin entender lo que significan o relacionarlos con sus conocimientos previos.  
No realiza un proceso de significación a los contenidos, es un proceso con una acción mecánica y repetitiva.
- **APRENDIZAJE RECEPTIVO:** con este tipo de aprendizaje, la persona recibe el contenido que ha de internalizar.  
Es impuesto, pasivo. Sólo se necesita comprender el contenido para poder reproducirlo pero no descubre nada.
- **APRENDIZAJE LATENTE:** aprendizaje en el que se adquiere un nuevo comportamiento, pero no se demuestra hasta que se ofrece algún incentivo para manifestarlo.
- **APRENDIZAJE INNOVADOR:** es aquel que puede soportar cambios, renovación, reestructuración y reformulación de problemas.  
Propone nuevos valores en vez de conservar los antiguos.
- **APRENDIZAJE VISUAL:** los sujetos que utilizan el sistema de representación visual ven las cosas como imágenes, ya que su representación de las cosas son con las propias imágenes o gráficos que les ayudan a recordar y aprender.
- **APRENDIZAJE AUDITIVO:** es un tipo de aprendizaje que aprovecha la interacción social.  
Se aprende escuchando y se presta atención al énfasis, a las pausas y al tono de voz, fijándose en los pequeños detalles (del Rosal, Alonso et al. 2006, Machado, Portella et al. 2008).

El aprendizaje y la memoria son procesos correlacionados capaces de sufrir modificaciones en función de los estímulos ambientales.

Ambos, son dos procesos cerebrales estrechamente unidos que originan cambios adaptativos en el comportamiento de los organismos.

El término “aprendizaje” comprende la adquisición de conocimientos y destrezas.

Mientras que el de “memoria”, es la retención de esa información.

Desde el punto de vista procedimental, no se consiguen separar ni resulta posible realizar distinción dentro del circuito neuronal (Poolton, Masters et al. 2005).

Ambos procesos, tienen una relación íntima. El aprendizaje y la memoria se incorporan durante toda la vida lo cual nos permite prepararnos para una situación de respuesta ante un estímulo anteriormente vivido (Levitt, Fugelsang et al. 2006).

## 1.3. PROLACTINA

La prolactina (PRL) es una hormona polipeptídica sintetizada principalmente por las células lactotropas de la adenohipofisis (Bernard, Lamothe et al. 2018).

El gen que codifica esta hormona se puede encontrar en todos los vertebrados.

Podemos considerarla como una hormona pleotrópica debido a su gran versatilidad funcional, ya que ejerce más de 300 funciones en diferentes tejidos y órganos (Marano and Ben-Jonathan 2014).

Además de su acción reguladora en la secreción láctea. La PRL modula múltiples funciones en el organismo como pueden ser, balances electrolíticos, crecimiento y desarrollo, endocrino y metabólico, funciones cerebrales como conducta, reproducción, inmunorregulación y protección son algunas de las funciones a las que se intentará dar significado más completo a lo largo de esta tesis (Bole-Feysot, Goffin et al. 1998, Pathipati, Gorba et al. 2011).

### 1.3.1. ESTRUCTURA GÉNICA Y PROTEICA DE PRL

La PRL comparte homología estructural con la hormona del crecimiento (GH) y con el lactógeno placentario humano (hPL). Derivan de la duplicación de genes ancestrales comunes, aunque solo comparte un 15% de su secuencia con ellas (Goffin, Bouchard et al. 1998).

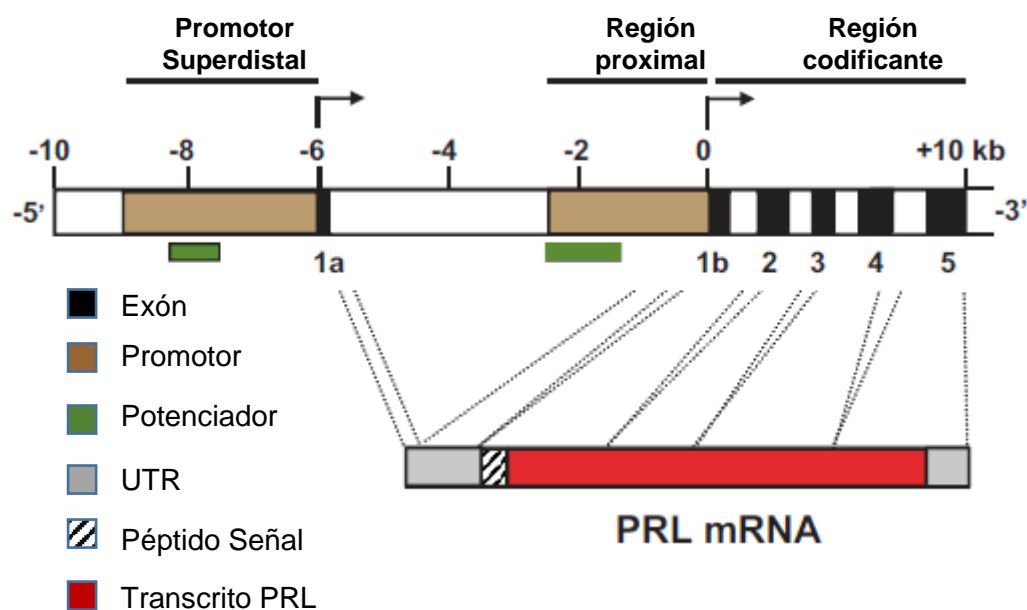
Se relaciona desde el punto de vista estructural y funcional, con la familia de citoquinas-hematopoyetinas (Sackmann-Sala, Guidotti et al. 2015).

El gen humano de la PRL, se encuentra en el cromosoma 6, en el 13 en ratones y en el cromosoma 17 en ratas. Tiene un tamaño de 10 kb y está formado por 5 exones y 4 intrones (Ocampo Daza and Larhammar 2018).

Su transcripción se encuentra regulada por dos regiones promotoras. La proximal de 5000 pb que controla la expresión hipofisaria, mientras que, la región promotora aguas arriba es responsable de la extrahipofisaria.

La expresión del gen de PRL extrahipofisaria (Figura I-9) es realizada por un promotor superdistal situado a 5.8 kb aguas arriba del sitio de inicio de la hipófisis, el sitio de inicio transcripcional se sitúa en el exón 1 llamado sitio decidual de inicio ahí, se produce una transcripción similar a lo que ocurre en la hipófisis, excepto por un 5'-UTR más largo.

El promotor superdistal se extiende -3000 pb aguas arriba del decidual después, existe una región proximal entre -350 y -60 pb y por último acontece una región potenciadora o codificante entre -2000 y -1500 pb.



**Figura I-9.** Esquema del gen que regula la PRL hipofisaria y extrahipofisaria, con sus promotores. Las transcripciones de PRL son idénticas excepto por una región no traducida a lo largo de 5'(UTR) en la transcripción extrahipofisaria (Diakonova 2015).

El cDNA de PRL humana contiene 914 nucleótidos y su ARN mensajero (ARNm) da origen a un polipéptido de 227 aminoácidos que contiene un péptido señal de 28 aminoácidos. Por lo que la proteína madura, tiene un tamaño de 199 aminoácidos.

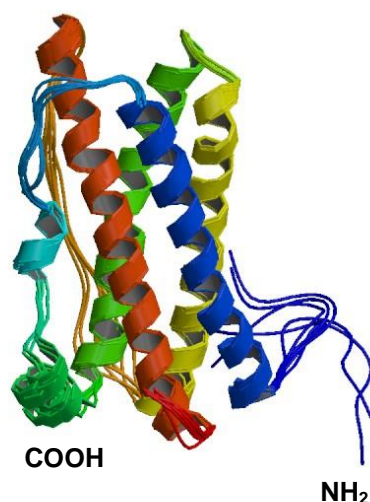
Por este motivo, forma una proteína monocatenaria con tres puentes disulfuros constituidos por seis residuos de cisteínas.

Es una hormona muy conservada con una homología de secuencia del 97% en primates y del 56% entre primates y roedores (Cooke, Coit et al. 1980, Goffin, Binart et al. 2002, California 2007, California 2009).

La PRL varía ligeramente de tamaño dependiendo de la especie en la que se encuentre. En ratas y ratones es de 197 aminoácidos, mientras que en ovejas, cerdos, bovinos y humanos es de 199 aminoácidos, con un peso molecular aproximado de 23 kDa.

Su estructura secundaria contiene el 50 % de sus regiones en hélices  $\alpha$ . El resto de la proteína parece doblarse en estructuras de bucles no muy bien organizadas, mientras que la terciaria aún no se encuentra resuelta.

Por la homología que presenta PRL con la GH, se le asigna cuatro largas hélices  $\alpha$  organizadas de manera antiparalela (familia de hormonas peptídicas tipo I empaquetadas en hélice) (Figura I-10).



**Figura I-10.** Estructura de la proteína PRL humana. Obtenido del RCSB PDB (Protein Data Base). (Teilum, Hoch et al. 2005).

Aunque la PRL hipofisaria tiene mayoritariamente 23 kDa. En diferentes estudios realizados tanto en humanos como en roedores, se han observado que existen otras formas moleculares que provocan modificaciones postraduccionales.



Detectando configuraciones de 14 kDa en hipotálamo, 16 y 24 kDa en hipófisis y plasma.

Incluso, en algunos casos de hiperprolactinemia se han detectado formas de “macroprolactina” que, consisten en complejos formados por la molécula de PRL unidas a inmunoglobulinas G (Cooke, Coit et al. 1981, Kawauchi, Yasuda et al. 1990, Bole-Feysot, Goffin et al. 1998, Freeman, Kanyicska et al. 2000).

### **1.3.2. SÍNTESIS Y SECRECIÓN DE PRL**

La síntesis de PRL, se produce principalmente a nivel hipofisario. En concreto en las células lactotropas. También llamadas mamotropas del lóbulo anterior de la pituitaria o adenohipófisis.

Ontogénicamente, las células lactotropas junto con las somatotropas y tirotropas proceden del linaje Pit-1 de las células hipofisarias.

La morfología de estas células varía, entre poliédrica y oval. Estando distribuidas en la región lateroventral del lóbulo anterior formando una banda adyacente al lóbulo intermedio de la hipófisis.

Este tipo de células presentan una heterogeneidad funcional, porque las células que se localizan en la zona más externa del lóbulo anterior responden mejor a la hormona liberadora de tirotrófina (TRH). Mientras que la respuesta a la dopamina, es mayor en las células que se localizan en la región más cercana al lóbulo intermedio.

Por otro lado, existen células en un estadio intermedio de diferenciación, llamadas células mamomasomatotropas. Capaces de secretar tanto PRL como GH. Estas son células bifuncionales, se diferencian de las lactotropas por acción de los estrógenos (Samson, Taylor et al. 2003, Marano and Ben-Jonathan 2014).

La síntesis de PRL adenohipofisaria muestra una secreción tónica controlada por múltiples factores tanto excitadores como inhibidores.

Algunas células lactotropas tienen actividad eléctrica espontánea, provocando la entrada de  $Ca^{2+}$  por mediación de *canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje* (VGCC “*voltaje-gated calcium channels*”) y estimulando la secreción

de PRL. Por este motivo, se puede explicar los niveles basales tan elevados de esta hormona (Dorkkam, Wongdee et al. 2013).

La síntesis de esta hormona tiene una vía de estimulación directa que provoca tanto la formación como la secreción de PRL a cargo de los estrógenos.

Al mismo tiempo que, posee una vía inhibidora como mecanismo regulador. Este procedimiento es realizado por la dopamina.

Esta molécula, se sintetiza por las neuronas dopaminérgicas que se encuentran en el núcleo arcuato del hipotálamo y es liberada a los terminales nerviosos de la eminencia media. Pasará al torrente sanguíneo viajando a través de los vasos portales, hasta las células lactotropas de la adenohipófisis.

Las células lactotropas contienen receptores para la dopamina tipo D2 y tipo D4. Cuando llega su ligando, éste se une a su receptor activando una cascada de señalización iniciada por la adenilato ciclasa y finalizando con la hiperpolarización de las células lactotropas que impiden la entrada de  $Ca^{2+}$  y como consecuencia, se produce la inhibición de la PRL (Ferraris, Bernichtein et al. 2013, Grattan 2015, Patil, Henry et al. 2016).

Se ha visto, que en las últimas etapas del embarazo e incluso en la lactación, este mecanismo de feedback se vuelve menos sensible a PRL, desarrollando un estado de hiperprolactinemia por el incremento en la síntesis de esta proteína en el hipotálamo (Kokay Bull et al. 2006).

Una vez que se secreta y se libera al torrente circulatorio esta hormona, viaja a través de la sangre hasta alcanzar los tejidos diana. Allí, se une a su receptor y actúa como una hormona moduladora endocrina clásica.

En ocasiones, puede actuar como si fuera un factor de crecimiento, un neurotransmisor o neuromodulador tanto de manera autocrina o paracrina.

De este modo, la PRL producida de manera local actúa sobre una célula adyacente (paracrina) o sobre la propia célula de secreción (autocrina).

Utilizando estos mecanismos, se activarán muchas de las acciones asociadas a esta hormona sin verse afectado la concentración circulante que exista de la misma.

Esta hormona, puede sintetizarse en otros tejidos dentro y fuera del SN. Se ha confirmado que la expresión de su gen de PRL, se encuentra en diferentes órganos.

Algunos de esos lugares son, la decidua (Alam, Konno et al. 2015), el miometrio, las glándulas lagrimales, el timo, bazo, en los linfocitos circulatorios, células de la médula ósea (Shelly Boaz et al. 2012), células epiteliales mamarias y tumores, fibroblastos cutáneos y glándulas sudoríparas (Marano and Ben-Jonathan 2014).

Lo que nos indica que también PRL puede encontrarse en varios compartimentos de diversos fluidos además del suero, como puede ser el LCR, el líquido amniótico y el sudor (Staley Ebbert et al. 2016).

Dentro del SN, esta hormona, se ha detectado en terminales axónicos del hipotálamo, telencéfalo, hipocampo, amígdala, septum, caudado, putamen, tronco cerebral, cerebelo, médula espinal y órganos circoventriculares (Costanza and Pedotti 2016)

**En el hipotálamo.** Se ha encontrado PRL inmunoreactiva en varias áreas hipotalámicas de mamíferos. Dentro del hipotálamo de rata, se ha observado en los núcleos dorsomedial, ventromedial, supraóptico y paraventricular.

Se piensa que la PRL encontrada en este órgano se sintetiza localmente, independientemente de su síntesis en la hipófisis. Dado que la hipofisectomía no tiene efecto sobre la cantidad de esta hormona inmunorreactiva en machos y sólo disminuye en hembras.

Aún así, su origen es dudoso. Aunque debe señalarse que el hipotálamo contiene las enzimas proteolíticas necesarias para convertir PRL de 23 kDa en fragmentos de 14 y 16 kDa.

No se conoce si la PRL neural tiene efectos como neurotransmisor, neuromodulador o regulador del crecimiento vascular porque es difícil diferenciar entre los efectos que produce la PRL en la hipófisis o en el hipocampo (DeVito 1988, Emanuele, Jurgens et al. 1992).

La principal función de **la placenta**, es el transporte metabólico fetomaternal. Aunque también, posee funciones endocrinas.

Es un órgano en el que se han encontrado moléculas muy similares a la PRL hipofisaria llamadas hormonas lactogenoplacentarias (PL) como puede ser la proliferina (Perimenis, Bouckenoghe et al. 2014).

**La decidua** (tejido estromal del endometrio resultante de la función secretora, que servirá para la implantación, formando parte de la placenta que participa en la acumulación de nutrientes, gases y desechos) produce una PRL que es indistinguible de la PRL sintetizada en la hipófisis de humanos, pero algo diferente en la rata.

También, pertenece a la familia de esta hormona pero se denominada proteína J de la PRL.

Se sintetiza durante el embarazo temprano y su secreción es regulada por factores de PRL locales deciduales pero no hipotalámicos.

Incluso, se ha detectado que la progesterona también es un estimulador en la síntesis de esta PRL decidual aunque inhibe la del miometrio (Jabbour and Critchley 2001).

Se conoce que la PRL decidual se propaga por el líquido amniótico por difusión.

La función de esta PRL amniótica no se conoce con seguridad, se ha sugerido que puede intervenir en la osmorregulación, en la maduración e inmunidad del embrión o del feto.

Sí, se ha demostrado que la PRL desempeña una función inhibidora durante el embarazo, referente a la expresión de la interleucina 6 (IL-6) y la 20 $\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (20 $\alpha$ -HSD) a nivel transcripcional. Estas enzimas, están implicadas en los niveles de progesterona antes del parto y es esencial que se encuentren inactivas durante el embarazo tanto en el ovario como en la propia decidua (Gellersen, Brosens et al. 2007).

Los niveles de PRL en el líquido amniótico, se comienzan a detectar a las 10 semanas de gestación y alcanza su máximo entre las semanas 20 y 24, llegando a alcanzar alrededor de 50 a 100 veces más que la de la sangre materna o fetal.

Estas cifras tan elevadas se deben a dos factores, al tamaño de la decidua (1µg de PRL/ g de decidua) y a la elevada vida media de la PRL en este compartimento ( 4,5h frente a los 15-20 minutos en sangre) (Maaskant, Bogic et al. 1996, Bao, Tessier et al. 2007, Eyal, Jomain et al. 2007).

**En el ovario** de diferentes especies, se han encontrado niveles de PRL y una alta expresión de su ARNm.

En ratón, los niveles de ARNm para la hormona muestran una disminución gradual a lo largo de la edad del animal.

Sucediendo lo mismo en la expresión de PRL ovárica para humanos. Incluso, se ha observado un descenso de 4 ó 5 veces en los niveles de esta proteína en mujeres postmenopáusicas, en relación con las premenopáusicas (Bouilly Sonigo et al. 2012).

El gen de PRL se encuentra presente en los folículos ováricos obtenidos de fecundaciones *in vitro*, teniendo mayor concentración en éstos que en el plasma (Phelps, Bugg et al. 2003).

Se piensa que la PRL folicular puede ser sintetizada de dos maneras, puede provenir de una síntesis local y de la liberación de folículos maduros, o puede derivar de la captación y absorción de PRL desde el torrente sanguíneo (Erdmann, Ricken et al. 2007).

Además de los folículos, también se expresa PRL en los cuerpos lúteos. Pero su regulación y liberación no está muy clara, no se conoce bien si es autocrina, paracrina o endocrina o si tiene que ver con el control de la esteroidogénesis o con la maduración folicular, la ovulación o con la función lutenizante (Shibaya, Murakami et al. 2006).

La proteína PRL ha sido encontrada en **el tejido mamario y en la leche** durante la lactación.

Se sabe que, un porcentaje de esta proteína que se manifiesta en la leche ha sido sintetizada por la hipófisis y a través de la sangre, ha llegado a la glándula mamaria (Nolin and Witorsch 1976).

Además de esta captación, las células mamarias de animales en lactación son capaces de sintetizar su propia PRL.

Ciertas investigaciones, indican que la PRL aparece en la leche porque ha sido sintetizada por las células epiteliales mamarias. Se une a proteínas transportadoras y se secreta por exocitosis por mediación, de la membrana apical hacia dentro del lumen alveolar (Grosvenor and Whitworth 1983).

En las células epiteliales, se observa diversas formas proteolíticas de PRL. Podemos encontrar de 11, 14 y 16 kDa, según su estructura tiene alguna función diferente.

La forma de 23 kDa, promueve la proliferación del epitelio mamario. Mientras que la de 16 kDa, está implicada en la inhibición de la angiogénesis local, siendo un dato importante para futuras investigaciones en cáncer de mama (Ollivier-Bousquet, Kann et al. 1993).

En la leche, también podemos localizar formas diferentes de esta hormona formando agregados, glicosiladas o fosforiladas. Se considera que esta PRL contenida en la leche interviene en la maduración del sistema inmunitario y neuroendocrino del neonato.

Su papel fisiológico en la leche, únicamente se ha descrito en rata, debido a que en esta especie durante un breve periodo de tiempo en la vida neonatal, el tracto gastrointestinal carece de la capacidad de digerir dicha proteína. Al mismo tiempo que, puede tener la capacidad de absorberla de manera intacta, siendo la hipófisis de rata relativamente inactiva durante este periodo.

Por estos motivos, es una posible ventana abierta, para la realización de futuros estudios (Goffin and Kelly 1996, Zinger, McFarland et al. 2003).

**En los órganos reproductores masculinos**, la hormona PRL y su receptor, también se encuentran presentes.

Se ha detectado RNAm en la próstata dorsal y lateral de ratas, a la vez que, se ha observado PRL en los gránulos secretores del citoplasma apical, en las células epiteliales secretoras de este órgano y en el músculo liso de próstata humana (Sackmann-Sala and Goffin 2015).

Uno de los experimentos realizado con ratas castradas (no producen PRL), demostró que la expresión de esta hormona fue activada cuando se sometía a un tratamiento con testosterona exógena, restaurando su producción y por lo tanto, la presencia de PRL (Cao, Wang et al. 2015).

No ocurrió lo mismo en células de cultivo prostático en humanos, que no se vio afectada la liberación de esta proteína, cuando se administraron hormonas sexuales esteroideas.

Quedando por demostrar, si PRL con síntesis autocrina, tiene un papel significativo en el crecimiento, la diferenciación y la actividad secretora de la glándula prostática.

Si comparamos los niveles de expresión en células germinales y de Leydig con los hipofisarios, son niveles más bajos. Pero en ambos sitios, la localización y el tamaño de esta PRL es muy diferente a lo que se encuentra para su ARNm (Liu, Su et al. 2016, Chapin, Ball et al. 2017).

Esta molécula, en testículo y en los espermatozoides se encuentra rota. Encontrándose algunas variantes, localizados tanto en el aparato de Golgi de las espermátidas como en la cola de los espermatozoides.

Se ha visto que, la longitud completa de esta hormona se encuentra ausente tanto en los testículos como en el espermatozoide. Influyen estas variantes en mecanismos de espermatogénesis y espermiogénesis. Al mismo tiempo que, se cree que tiene función inhibidora en la proliferación de células endoteliales (Nevalainen, Valve et al. 1997, Untergasser, Rumpold et al. 2001).

**El sistema inmunitario**, también, es una fuente de la hormona PRL, ciertas zonas del sistema inmunitario, como las células del timo, amígdala y ganglios linfáticos humanos (expresan RNAm de PRL en la corteza subcapsular, los septos y el endotelio de los vasos sanguíneos), el bazo (se encontró RNAm para esta proteína en la pulpa blanca, zona marginal, septum y áreas capsulares), médula ósea y linfocitos periféricos (Shelly Boaz et al. 2012).

Estos órganos, liberan PRL bioactiva muy similar a la hipofisaria pero con anomalías en su tamaño, porque no sólo se ha descrito la de 23 kDa, sino tamaños moleculares desiguales entre 60 y 11 kDa o PRL glicosilada de 25 kDa.

En los granulocitos, se ha percibido la transcripción de PRL pero como una proteína de alto peso molecular inmunoreactiva de 43 kDa.

La síntesis y secreción de PRL en los linfocitos, es diferente como sucede en la hipófisis.

Existen evidencias de que los linfocitos contienen receptores de dopamina que pueden estar implicados en la regulación de producción y liberación de PRL linfocitarias. A la vez que presentan, receptores dopaminérgicos de tipo D2 clásicos que se encuentran en células lactotropas o, el receptor D4 y el D5 que predominan en las células linfocitarias (Caronti, Calderaro et al. 1998).

Al mismo tiempo, se ha detectado RNAm para los receptores D1, D3 y D5 en linfocitos de rata.

Se conoce que, PRL hipofisaria y la PRL linfocitaria juegan un papel en la respuesta inmune. Aunque aún, no se sabe con exactitud y se requieren más investigaciones respecto a este tema.

Se ha puesto en evidencia que la administración de bromocriptina (agonista de dopamina) interacciona con los receptores dopaminérgicos D2 antes mencionados. Disminuyendo los niveles de PRL circulante, debido a que este fármaco tiene poco efecto directo sobre la secreción de PRL linfocítica (DiMattia, Gellersen et al. 1988, Montgomery Shen et al. 1992, Neidhart 1997, Xu, Lin et al. 2010, Marano and Ben-Jonathan 2014).



También se ha visto que existe síntesis de PRL en **células endoteliales**. Se sabía que en la hipófisis existía un fragmento de PRL de 16 kDa pero, no se conocía cual era su función exacta.

Actualmente, se ha visto que ese fragmento posee sitios de unión en las células endoteliales, lo que provoca que sea un fuerte inhibidor de la angiogénesis induciendo una vasoinhibición. A la vez que, es un inductor apoptótico a través de la activación de las caspasas (Yang and Friedl 2015).

Se ha observado PRL en distintas células endoteliales de diferentes especies, en células endoteliales de la vena umbilical en humanos; en células endoteliales capilares de la retina de rata y en células del endotelio vascular (Corbacho, Macotela et al. 2000, Martini, Piot et al. 2000, Clapp, Gonzalez et al. 2006).

La producción de PRL en **el tejido adiposo** humano, fue descubierta por casualidad. Al estudiar la liberación de esta molécula en explantes de mama, se quería usar este tejido como control negativo de la investigación pero, al realizar su estudio se descubrió que liberaba 10 ó 15 veces más de PRL que el tejido glandular (Barrett, Narasimhulu et al. 2018).

La secreción de PRL del tejido glandular fue inhibida con progesterona pero, no sucedió lo mismo en el tejido adiposo, ya que, ni los estrógenos ni la progesterona afectaron a la liberación de esta molécula. Lo que indicaba que existía una regulación diferente entre ambos compartimentos adyacentes (Ruiz-Herrera, de Los Rios et al. 2017).

La elaboración de PRL de novo sucedía en los depósitos de tejido adiposo visceral.

La liberación de PRL en pacientes de obesidad mórbida era menor que en pacientes delgados, sin existir diferencias entre hombres y mujeres.

Pero investigaciones posteriores, indicaron que la liberación de PRL adiposa al torrente sanguíneo estaba regulada. A medida que esta hormona se unía a la heparina, debido a que, la mayor parte de la PRL liberada era retenida

por proteoglicanos cerca de las células secretoras. Convirtiéndola en un verdadero factor autocrino/paracrino.

Estos datos insinúan que el tejido adiposo es la fuente de altos niveles séricos de PRL cuando existe obesidad (Zinger, McFarland et al. 2003, Brandebourg, Hugo et al. 2007, Ben-Jonathan and Hugo 2015).

Estudios actuales, han revelado que PRL también se encuentra en **los folículos pilosos y en la piel.**

La PRL sistémica es crítica para la regulación del ciclo del cabello en muchos animales que cambian su pelaje según la temporada en la que se encuentren, como ocurre en ovejas y visones.

Pero se conoce que esta hormona, se encuentra relacionada con la regulación de los ciclos de pelo en aquellos animales que, tienen independencia estacional como ocurre en el hombre y en ratones.

En estos últimos, esta hormona y su receptor se han localizado en el interior de queratinocitos y en la parte externa de los folículos pilosos (Langan 2018).

Estos estudios indican que PRL regula el momento del ciclo de crecimiento en el cabello de los ratones, a través de un efecto directo sobre la piel provoca una depresión del ciclo durante la fase de telogen (período terminal durante el cual el cabello todavía está en el folículo piloso pero las tareas vitales se detienen completamente). Aunque se produce un aumento de dicho ciclo en fases de anagen tardías (la primera fase de crecimiento del cabello).

A la PRL pilosa de 23 kDa también, se le añaden las funciones de estimulación de queratinocitos, proliferación y modulación en la producción de citoquinas en la queratinocitosis (Langan 2018).

En humanos la PRL se ha detectado en la piel del cuero cabelludo y en los folículos del pelo estimulando la expresión de fibroblastos de la dermis y de células inmunológicas de la piel (Craven, Nixon et al. 2006, Langan, Ramot et al. 2010).

**En la cóclea** de ratones recientemente, se ha visto que existe expresión de PRL y de su RNAm.

PRL está presente en el interior de células marginales de la estria vascular y dentro de las células del ganglio espiral coclear.

Existe diferencias entre género y entre edades, ya que, en ratones hembra de 6-12 meses de edad se encuentra presente, pero, no en los ratones machos de la misma edad.

La expresión de la PRL en la cóclea se relaciona con la pérdida de densidad ósea en la cápsula ótica y con la pérdida de audición. Un factor que indica que la presencia de esta hormona está relacionada con patologías auditivas, siendo una hipótesis reforzada por el hecho de que el receptor de PRL se encuentra en la mayoría de las células cocleares y también en relación de pérdida de captación de sonidos (Marano, Tickner et al. 2013, Marano and Ben-Jonathan 2014).

### **1.3.3. RECEPTOR DE PRL**

El receptor de PRL (RPRL) es monocatenario y por su homología estructural y funcional pertenece a la superfamilia de receptores de citoquinas tipo I de la que también forman parte los receptores de GH, de la leptina, del factor inhibidor de la leucemia y de la eritropoyetina. Distribuidos por diferentes tejidos en los mamíferos, incluido en el cerebro (Shi, Wang et al. 2012).

Formado por 590 aminoácidos en el humano y 303 en el ratón, con una masa de 90 kDa.

El gen que codifica el RPRL se encuentra en el cromosoma 5 en humanos, contiene al menos 10 exones y una longitud aproximada de 100 Kb. En ratón se localiza en el cromosoma 15 y en rata en el 2.

El gen se transcribe en la hipófisis, pero su regulación transcripcional es complicada, porque existen tres regiones promotoras específicas en tejidos diferentes. *El promotor I*, se encuentra en las gónadas; *el promotor II*, en el hígado y *el promotor III* se localiza tanto en tejido gonadales como no gonadales (Devi and Halperin 2014, Bugge, Papaleo et al. 2016).

El RPRL es una proteína anclada a la membrana, formada por tres regiones bien definidas. Posee un dominio de unión al ligando extracelular, una cadena transmembrana y un dominio intracelular responsable de la transducción de la señal (Cosenza, Iannaccone et al. 2018).

- **La región extracelular**, está formada por 210 aminoácidos.

Presenta dos dominios de homología de receptores de citosinas (CRH, *cytokine receptor homology región*) de unos 100 aminoácidos cada uno, llamados S1 o D1 (aminoterminal) y S2 o D2 (próximo a la membrana). Ambos, contienen módulos de tipo fibronectina tipo III.

El dominio S1, está formado por dos puentes disulfuro en el extremo amino-terminal con 4 residuos de cisteína.

Mientras que S2, contiene un pentapéptido llamado motivo WS (Trp-Ser-aminoácido-Trp-Ser) próximo a la membrana plasmática.

Ambas estructuras son típicas de la familia de receptores de citocinas tipo I y juegan un papel muy importante tanto en la estructura extracelular del receptor como en la unión al ligando.

Es destacable la existencia de tres residuos de asparagina susceptibles de ser glicosilados.

- **En la región transmembrana**, se destaca la aparición de 24 aminoácidos que traspasa la membrana celular como ocurre en todos los receptores de citosinas.

Siendo el nexo de unión entre los dominios extra e intracelulares.

- **La zona intracelular** de este receptor de citocinas es la más específica.

Representa la unidad de señalización del receptor. Está formada por dos regiones conservadas denominadas Caja I (BoxI) y Caja II (BoxII), separados por el dominio variable V-Box.

La primera, está localizada en la proximidad de la membrana plasmática y tiene una secuencia rica en prolina y aminoácidos hidrofóbicos

(en rata la secuencia es Pro-Pro-Val-Pro-Gly-Pro). Esta Caja I presenta un dominio de unión a *la proteína kinasa Janus 2* (JAK2).

El RPRL al igual que el de los otros miembros de la familia, contiene varios residuos de tirosina en el extremo C-terminal ( 10 residuos en humanos y 9 en roedores ) con capacidad para ser fosforilados.

Teniendo un papel en la señalización intracelular con el activador y transductor de la señal de transducción 5 (STAT5, *Signal transducer and activator of transcription 5*) como veremos más adelante en esta tesis (Freeman, Kanyicska et al. 2000, Horseman and Gregerson 2014, Morales, Lorensen et al. 2014).

Se han descrito varias isoformas de este receptor en diferentes tejidos, aunque todas ellas provengan de un único gen.

Estas isoformas surgen a partir de transcripciones con sitios de iniciación alternativos diferentes a los promotores del RPRL. También, influye el splicing de los transcritos en exones codificantes y no codificantes o pueden surgir otras variantes del receptor mediante la división postranscripcional (Schennink, Trott et al. 2015).

Así, se obtienen diversas isoformas diferentes que comparten gran parte de la estructura.

Suele variar en longitud y en la composición de sus dominios citoplasmáticos. Pero, en todas las isoformas se conservan los dominios extracelulares, por lo que su clasificación se realiza según la longitud del dominio variable intracelular (ICD).

Originando, isoformas largas, intermedias y cortas, con ciertas variables según la especie.

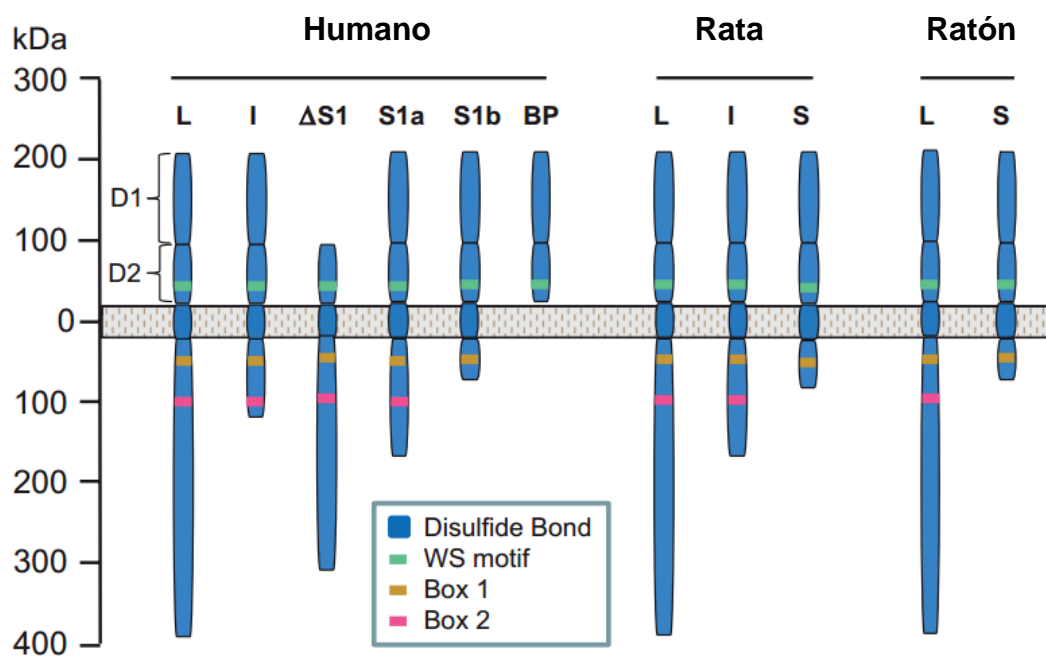
En humanos, se han descrito hasta 6 isoformas (Figura I-11), encontramos la forma larga (RPRL-L) de 85-90 kDa; la intermedia (RPRL-I) de 50 kDa; y tres isoformas cortas (RPRL-S) llamadas  $\Delta$ S1 de 70 kDa, S1a de 56 kDa y S1b de 42 kDa.

Con un poco de controversia entre los autores, se ha identificado una isoforma de 32 kDa en el dominio extracelular pero no se encuentra bien definida.

Para la mayoría de los investigadores, las diferentes isoformas presentan un dominio extracelular común pero que divergen en el dominio intracelular.

En los roedores por lo contrario, se han descrito menos isoformas, aunque las principales, la larga y la corta, sí se encuentran presentes.

En rata se ha observado 3 isoformas, RPRL-L (591 aminoácidos), RPRL-I (393 aminoácidos), RPRL-S (291 aminoácidos). Mientras que en ratón únicamente se han visto las isoformas RPRL-L y la RPRL-S (Bole-Feysot, Goffin et al. 1998, Meng, Tsai-Morris et al. 2004).



**Figura I-11.** Esquema comparando las isoformas del RPRL en roedores y en humano. El dominio extracelular D1 y D2 contiene enlaces disulfuro (en azul) y motivos WS (verde). También se muestran la Caja I (naranja) y la Caja 2 (rosa). Estos receptores son clasificados por la longitud de los dominios intracelulares, largo (L); intermedio (I) y corto (S). Además, en humanos existe un receptor al que le falta el dominio D1 ( $\Delta S1$ ) y otro que sólo contiene el dominio extracelular (BP) (Ben-Jonathan, LaPensee et al. 2008).

La expresión neuronal de RPRL-L y RPRL-S puede variar dependiendo de dónde se encuentren localizadas las neuronas, el sexo de los animales y otras condiciones sistémicas como, el ciclo astral que se encuentre el animal o el humano si está en etapa de embarazo o de lactancia.

Por ejemplo, el ARNm de RPRL-S era indetectable o se encontraba presente bajos niveles en las regiones hipotalámicas en ratas en fase de diestro. Sin embargo, sí se encontraba muy regulado en ratas lactantes (Belugin, Diogenes et al. 2013).

Como he indicado, la distribución de estas isoformas en los tejidos es asimétrica. Observándose una mayor expresión de la isoforma RPRL-L en el hipocampo y en ciertos tipos de cáncer.

Incluso, se ha visto una forma soluble del receptor en humanos, la proteína de unión a prolactina (RPRL-BP) que representa un dominio extracelular que circula libremente por la sangre y que puede unirse con PRL circulante, considerándole un antagonista natural de la propia hormona (Ben-Jonathan and Hugo 2015).

La distribución de este receptor es muy ubicua, podemos encontrarlo en algunos tejidos en mamíferos.

**En cerebro,** se encuentra en abundancia en el plexo coroideo (sobre todo el mRNA de la forma larga), la estría terminal, la amígdala, el mesencéfalo, tálamo, en regiones del hipotálamo es donde se ha observado mayor expresión de este receptor, hipófisis, corteza cerebral y bulbo olfatorio (Shi, Wang et al. 2012).

En rata, se han realizado investigaciones en fase de diestro demostrando que también se encuentra RPRL en el área postrema; en los núcleos supraópticos; supraquiasmático; en el preóptico ventrolateral y en el ventromedial y en los núcleos paraventriculares.

En el núcleo arcuato del hipotálamo de ratas en lactación se localiza este receptor (la expresión de la forma larga). A la vez que, se ha comprobado que estas neuronas son positivas a la tirosina hidroxilasa (TH), lo que sugiere una

acción directa de la proteína sobre las neuronas dopaminérgicas tuberoinfundibulares del hipotálamo (Pi and Grattan 1998, Grattan, Pi et al. 2001, Kokay and Grattan 2005).

**En tejidos periféricos**, se expresada las isoformas la larga y la corta.

La forma más predominante en hígado es la corta, es el órgano donde este receptor más se expresa y parece que actúa en transducir señales proliferativas en los ductos biliares a través de la activación de las ERK1/2.

También, podemos encontrarlo en ovario; útero; en glándulas mamarias de embarazadas, aunque en glándulas mamarias en lactación predomina la expresión del mRNA del RPRL-L.

La unión de PRL a este tipo de receptor en este tejido, provoca que intervenga en procesos de síntesis de leche, diferenciación y crecimiento alveolar.

Corazón, pulmón, timo y bazo son otros de los órganos donde se localiza. En riñón, se ha visto cantidades similares de ambas isoformas.

Glándula adrenal, músculo esquelético, piel y páncreas son otros de los sitios donde se ha encontrado. En este último, el RPRL se ha visto en los islotes pancreáticos regulando la sensibilidad de la insulina hepática (Pi and Grattan 1998, Yu, Xiao et al. 2013, Hu, Duggavathi et al. 2017).

La existencia de múltiples isoformas de este receptor en las diferentes especies y las variaciones en la expresión en los tejidos. Han sugerido que cada isoforma está involucrada en funciones específicas.

*La isoforma larga*, está relacionada en procesos de proliferación, supervivencia y expresión de genes asociados con fenotipos diferenciados como la  $\beta$ -caseína.

*La isoforma intermedia* ha sido relacionada con proliferación, pero sólo en concentraciones farmacológicas de PRL, ya que a condiciones fisiológicas no interviene en estos procesos. Por otro lado, *la isoforma corta* se ha observado que tiene poca afinidad por el ligando y se ha relacionado con procesos de proliferación celular en modelos celulares (Mathey Denes et al. 2009).



### 1.3.4. MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR DE PRL

Una vez que la PRL se une a su receptor, se produce un proceso de fosforilación y se activa, provocando que se active una gran variedad de proteínas intracelulares que, son las que finalmente traslocan al núcleo y realizan los efectos de PRL.

El receptor funcional de PRL se localiza en la membrana celular. Sin embargo, se ha visto que existe una gran porción de este tipo de receptores en el aparato de Golgi (AG), debido a que ahí, el óxido nítrico activa a la N-acetilglucosamina transferasa responsable de la glicosilación de la región extracelular del receptor y como consecuencia se transporta a la membrana celular.

El RPRL puede unirse y ser activado por lo menos por tres tipos de hormonas, la PRL, la lactógeno-placentaria y en primates, también la GH.

La interacción de la PRL con su receptor, provoca la dimerización del mismo y con ella la activación de una casacada de señalización intracelular.

La vía de señalización celular mejor caracterizada por la PRL está mediada al menos en parte por dos familias de moléculas de señalización:

➤ **Las Janus tyrosine kinasas (JAKs) y las signal transducers and activators of transcription (STATs).**

Esta vía, se activa cuando la PRL se une a la isoforma larga, pero no a la corta.

El RPRL como todos los receptores de citoquinas tipo I carece de actividad enzimática intrínseca. Sin embargo, su activación por la hormona provoca un aumento de la fosforilación en proteínas celulares.

La autofosforilación y la activación de estas quinasas es de manera muy rápida tras la dimerización del receptor y generan un receptor con múltiples residuos de fosfotirosina.

Estas fosfotirosinas y sus secuencias aminoacídicas adyacentes, son dominios de unión de proteínas cuyo entorno son SH2 presentes en las tirosinas quinasas.

Como proteínas implicadas en esta señalización intracelular de PRL se encuentran las STATs, en particular cuatro de sus miembros, STAT1; STAT3; STAT5a y las STAT5b y JAK2.

JAK2, es uno de los cuatro componentes de la familia de las JAKs, junto a JAK1; JAK3 y Tyk2 (JAK2 es el principal receptor asociado en esta vía, pero se conoce la participación de JAK1 en la transducción de la señal de PRL en células linfoides BAF/3, un dato importante implicado en su propiedad inmunomoduladora, también se ha sugerido la posible interacción entre JAK2 y JAK3 para la señalización pero son referencias que quedan por confirmar ya que JAK1 y posiblemente JAK3 pueden fosforilar a STAT5 en la tirosina) (Dusanter-Fourt, Muller et al. 1994, Bole-Feysot, Goffin et al. 1998).

Una vez fosforilado el receptor, las STATs (con tres de sus miembros identificados como moléculas transductoras como son, STAT1; STAT3 y STAT5) se asocian a los residuos de fosfotirosina del mismo a través de los dominios SH2 antes mencionados, forman un complejo junto con el receptor y JAK2.

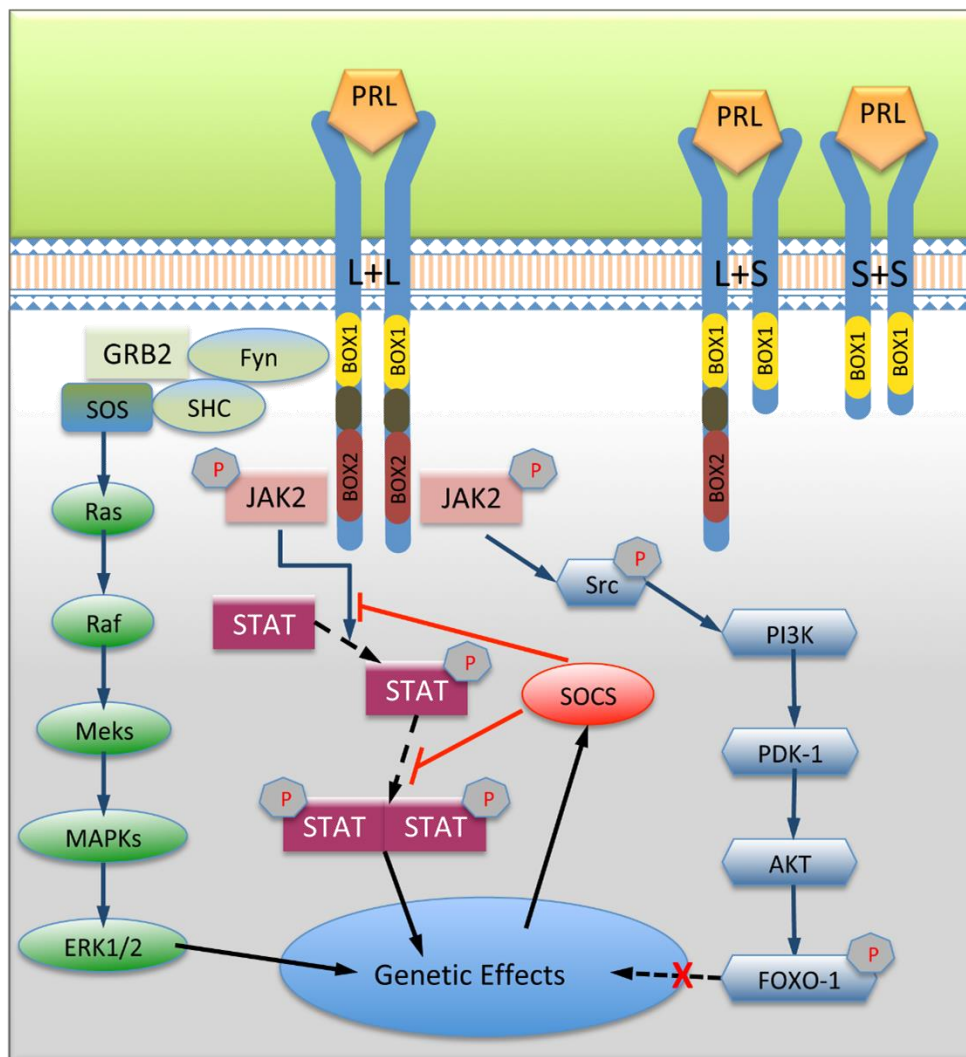
La proximidad de JAK2 a las STATs permite a la tirosina quinasa fosforilarlas para que una vez fosforiladas, las STATs se disocien del receptor y se homo o heterodimericen.

Estos heterodímeros formados, se traslocan al núcleo donde interaccionan con secuencias promotoras específicas facilitando la transcripción génica.

STAT5, originalmente fue clonado como un factor de transcripción inducido por PRL en la glándula mamaria de oveja e inicialmente fue denominado factor de glándula mamaria (MGF). Demostrándose que STAT5 activaba una gran variedad de receptores de citoquinas y requería la fosforilación de una tirosina, la Tyr 694, que a su vez, se encontraba mediada por JAK2 (Carretero, Sanchez-Robledo et al. 2018)(Figura I-12).

Sugiriendo que la fosforilación de tirosina en STAT5 era necesaria, pero no suficiente para la activación de la actividad transcripcional, porque se podían requerir modificaciones adicionales, tales como la fosforilación en residuos de serina/treonina para activar también la STAT5.

Se tienen dudas, referente a la implicación de STAT5 en propiedad inmunorreguladores de la PRL. Pero sí se conoce que este factor de transcripción es una parte integral de la vía de señalización usada por otra citosina inmunomoduladora, la IL-2.



**Figura I-12.** Imagen que muestra las vías de señalización intracelular típicas, activado por la unión de PRL a su receptor. Existiendo 3 rutas principales, MAPK, STAT y PI3K, a través de los cuales la PRL puede inducir una larga duración de respuestas genómicas. Además, hay tres formas de dimerización para las isoformas larga (L) y corta (S) del receptor: L + L, L + S y S + S (Carretero, Sanchez-Robledo et al. 2018) .

STAT1 y STAT3 también, son activados por el RPRL. Cuando son estimulados por el receptor  $\beta$  del interferón  $\alpha$  (IFN $\alpha$ ).

STAT1, forma parte del complejo ISGF3 que a su vez contiene STAT2 e interactúa con una proteína nuclear llamada P48 formando los homodímeros que se traslocan al núcleo.

STAT3, conocido como APRF (*Factor de respuesta en fase aguda*) se clonó por primera vez como factor de transcripción activado por IL-6. La activación de este miembro de las STATs no es del todo conocida, aunque se sabe se necesitan los 93 residuos próximos al dominio citoplasmático del RPRL para provocar su fosforilación.

No se conoce con certeza si la interacción de STAT1 y STAT3 es directa o indirecta. Aunque, se ha sugerido que la fosfotirosina de JAK2 podría unirse a STAT3 (Goffin, Bouchard et al. 1998, Hachim, Hachim et al. 2016).

Junto a este proceso, también existen una gran familia de proteínas con dominios SH2 que actúan como inhibidores de la vía JAK/STAT.

Estas proteínas son:

- *Las Cytokine-Inducible SH2-containing protein (CIS)*, proteínas SH2 inducibles por citosinas.
- *Las Supresor of Cytokine Signaling (SOCS)*, supresores de la señalización por citocinas.
- *Las JAK Binding protein (JAKB)*, proteínas de unión a la quinasa.
- *Las Stat-induced Stat Inhibition (SSI)*, proteínas inducidas por las STATs que inhiben a las propias STATs.

La inhibición principalmente sucede por la asociación con las proteínas SOCS o por competición por la unión al receptor de las STATs con las CIS (Heim 1999, Brown, Kokay et al. 2010, Brown, Piet et al. 2012, Yang, Meyer et al. 2013).

Otras vías de señalización que son activadas por la unión de PRL-RPRL y donde se encuentran implicadas otras quinasas, son:

➤ **La vía de las MAP kinasas (*Mitogenic Activated Protein Kinases* o proteínas kinasas activadas por mitógenos) y la vía de las AKT (Proteínas serina/treonina kinasas) con las Src quinasas.**

Las Src es una familia de tirosina quinasas que se diferencian de las JAKs por el hecho de que contienen un dominio SH2 y otro dominio SH3.

La activación del RPRL conlleva la dimerización de éste y el acomplamiento de estas Src quinasa y JAK2. Que a su vez, activan la vía PI3K(fosfatidil-inositol-3kinasa)/Akt encargada de algunas de las acciones antiapopticas y metabólicas de PRL promoviendo la supervivencia celular (Figura I-12).

En líneas celulares de Nb2 donde se han desarrollado estudios para comprender el mecanismo de señalización, se ha percibido que un miembro de esta familia Src, denominado Fyn se encuentran asociadas al RPRL. Activándose con la estimulación de PRL y participando en la vía de inmodulación mediada por PRL.

Se piensa que el papel de Src quinasa en la señalización de RPRL podría estar relacionado con el crecimiento celular (Carretero, Sanchez-Robledo et al. 2018).

Existen tres grupos principales de MAP kinasas en mamíferos, las ERK1/2; las SAPK y p38. De las cuales, las ERK1/2 responden a los mecanismos de proliferación celular en diversos tejidos.

La vía Ras-Raf-MAPK en muchas células, es activada por la intervención de PRL. Cuando JAK2 se fosforila puede atraer a proteínas adaptadoras como Shc; Grb2 y SOS al RPRL creando su unión y con ello la activación de Ras y Raf. Para que finalmente, estimulen a la vía de MAPK (Hennighausen and Robinson 2008, Swaminathan, Varghese et al. 2008, Ben-Jonathan and Hugo 2015).

Alguna bibliografía, ha sugerido que cada isoforma del RPRL es capaz de activar una vía de señalización diferente.

Así, mientras que el RPRL largo e intermedio activan las vías de las JAK/STAT y AKT, interviniendo en procesos de diferenciación, supervivencia y metabolismo celular. El RPRL corto, solo es capaz de activar la vía de las MAPK y participar en procesos de proliferación celular.

Otros estudios, proponen que la isoforma corta funciona como dominante negativo del RPRL-L. Ya que, cuando ambas isoformas se coexpresan, se produce una inhibición de la síntesis de leche debido a la formación de heterodímeros que esteroquímicamente son inactivos.

Sin embargo, actualmente se ha demostrado que ambas isoformas (RPRL-L y RPRL-S), pueden producir la activación de las ERK1/2 interviniendo en procesos de proliferación celular.

Al mismo tiempo que el RPRL-S, no sólo se encuentra involucrado en estos procesos de proliferación, sino que es capaz de actuar en procesos de diferenciación.

Porque se sabe, que ratones hembras modificadas genéticamente para no expresar la forma larga del receptor con deficiencias en el desarrollo alveolar y funcional, fueron capaces de reestablecer mamopoyesis. Gracias a la activación de la cascada ERK1/2 y de las JAK/STAT.

Con estos antecedentes, se piensa que cuando existe ausencia de alguna isoforma, otra actúa realizando los efectos de la que falta y dependiendo del tejido, del estado fisiológico o patológico del sujeto, los RPRL tiene la capacidad de activar vías de señalización específicas para llevar a cabo su función (Mathey Denes et al. 2009, Ferraris, Bernichtein et al. 2013, Devi and Halperin 2014).

No es una vía de señalización como tal, pero sí debemos tener en cuenta que PRL también influye en la **concentración de iones intracelulares**.

Cuando PRL activa a su receptor, se conoce que al menos dos regiones del RPRL se encuentran implicadas en cambios iónicos inducidos por PRL.

Box1 del dominio intracelular del receptor, se haya en la activación de los canales de K<sup>+</sup> dependientes de tirosina quinasa mediados por JAK2.

Mientras que el dominio intracelular COOH participa en la producción de mensajeros intracelulares como inositol 1.3.4.5-tetrakisfosfato [Ins (1,3,4,5)P<sub>4</sub>] e inositol hexakisfosfato (InsP<sub>6</sub>) que se encargan de abrir canales de voltaje independientes de Ca<sup>2+</sup> (Prevarskaya, Skryma et al. 1995, Ratovondrahona, Fahmi et al. 1998, Sorin, Vacher et al. 2000, Dorkkam, Wongdee et al. 2013).

### **1.3.5. FUNCIONES BIOLÓGICAS DE LA PRL**

La PRL es una hormona con funciones muy diversas, se la conoce principalmente por su desempeño en la lactancia y en la reproducción.

Pero, tiene muchas otras funciones biológicas diferentes, puede actuar sobre el sistema reproductor, el crecimiento y el desarrollo, en la osmorregulación, la regulación inmune y la modulación de funciones neuroendocrinas en el adulto, la remielinización estimulando la generación de oligodendrocitos para formar la vaina de mielina, respuesta al estrés, etc.(Grattan and Kokay 2008).

Una gran versatilidad de la que hablará en este apartado.

## **1- Reproducción**

La PRL juega un papel en el desarrollo morfológico y funcional de la glándula mamaria y en la actividad secretora del cuerpo lúteo.

Sucedan 3 etapas en **la glándula mamaria**:

- La mamogénesis que es el crecimiento y desarrollo de la propia glándula.
- La lactogénesis con la síntesis de leche
- La galactogénesis referida al mantenimiento y secreción de leche.

En estas etapas, influyen una serie de factores tróficos como, estrógenos, progesterona, insulina, glucocorticoides, GH, LP y PRL.

La PRL afecta a la morfogénesis mamaria. Esta hormona, controla el desarrollo del epitelio mamario, actúa en la elongación y arborización de las estructuras ductuales en la pubertad y en el desarrollo alveolar durante el ciclo estrual (Ishida, Maehara et al. 2014).

También, interviene en la activación lobuloalveolar durante el embarazo.

Tras el parto, se produce la lactogénesis y la galactogénesis dando a este epitelio mamario las propiedades funcionales de la secreción láctea (Oakes, Rogers et al. 2008).

A lo largo del proceso de la lactogénesis, se sabe que se requiere PRL hipofisaria, ya que, algunos estudios han demostrado que durante el embarazo en animales hipofisectomizados previene la lactancia.

En la lactogénesis la PRL estimula la captación de aminoácidos, la síntesis de caseína y lactoalbúmina, la captación de glucosa y la síntesis de lactosa, al igual que sucede con los ácidos grasos de la leche (Arendt and Kuperwasser 2015).

Esta función, está regulada por el promotor III del gen del RPRL, expresado principalmente en la forma larga de este receptor. Activando la ruta de las JAK2/STAT5 (Clapp, Thebault et al. 2008).

En referencia con la secreción del **cuerpo lúteo**, destaca la función que éste desarrolla en mamíferos.

Como sucede en la glándula endocrina temporal del ovario, encargada de producir la progesterona necesaria para la anidación del óvulo.

La formación del cuerpo lúteo, sucede tras el pico de secreción ovulatoria de la hormona luteinizante (LH) (Ginther and Beg 2012).



Las acciones de PRL sobre la función lútea dependen de la especie y la etapa del ciclo estrual. En roedores, esta proteína es esencial para el mantenimiento de este cuerpo lúteo durante la gestación, porque inicialmente es la PRL hipofisaria la responsable de mantener este mantenimiento, pero tras la implantación del óvulo, la decidua produce luteotropina (hormona con características biológicas similares a PRL) para estimular el propio cuerpo lúteo formado (Telleria, Zhong et al. 1998).

En humanos y en primates, el endometrio produce PRL tanto en la fase luteal como en la gestación.

De esta forma, activa la expresión de receptores de estrógenos y de LH, manteniendo los niveles de producción de andrógenos y estradiol a través de la estimulación de la expresión del citocromo P450 (aromatasa) en la gestación (Carretero, Lopez et al. 2016).

Al mismo tiempo que promueve la expresión de  $17\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa ( $17\beta$ -HSD), enzima encargada de catalizar la conversión de estrona en estradiol.

Además, PRL inhibe la enzima  $20\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa ( $20\alpha$ -HSD) y en consecuencia previene el catabolismo de la progesterona durante la gestación. Se disminuye los niveles de RPRL provocando el aumento de  $20\alpha$ -HSD y desencadenando el parto.

Por otro lado, en ocasiones existe un aumento drástico en las concentraciones de PRL circulante. Desatando una hiperprolactinemia (como sucede en la lactación) y en situaciones patológicas como los prolactinomas, inhibe la luteinización de las células foliculares, alterando la esteroidogénesis, generando infertilidad y amenorrea (supresión de la ovulación) (Bachelot, Carre et al. 2013, Anuradha and Krishna 2017).

La hiperprolactinemia es actualmente la patología mejor conocida que afecta a la fertilidad humana. Existe aumento de PRL próximo al 30% en las mujeres con amenorrea secundaria y el 75% en las mujeres con amenorrea y galactorrea (Johnston, Bu et al. 2018).

Esta hiperprolactinemia bloquea la ovulación e inhibe la liberación de GnRH. Algunos experimentos han demostrado que la administración de gonadotropina restaura el ciclo ovárico (Lynch, Brayer et al. 2009, Kaiser 2012, Devi and Halperin 2014).

El papel fisiológico que desempeña PRL en **funciones testiculares**, ha confundido a los investigadores a lo largo del tiempo.

Se encuentra presente en la hipófisis de machos y estimula las funciones testiculares de éstos en la mayoría de los mamíferos. Aunque en aves, causa un descenso en el tamaño gonadal.

Se sabe que, en las células de Leyding la PRL participa en el mantenimiento de su morfología, aumenta la cantidad de receptores de LH, disminuyendo la actividad de la aromatasa, aumentando la esteroidogénesis y por tanto, la producción de andrógenos.

En las células de Sertoli, aumenta el número de receptores de FSH.

Mientras que, en las células germinales, PRL incrementa la conversión de espermatocitos a espermatozoides incluyendo un aumento de calcio, un aumento en su metabolismo energético, un mantenimiento de su movilidad y la ayuda a la unión con el ovocito, para lograr la capacitación (Fukuda, Mori et al. 1989, Guillaumot, Tabone et al. 1996).

Un estudio muy reciente en pacientes con eyaculación precoz, ha determinado que PRL junto con otras hormonas, no pueden relacionarse con esta patología como indicaban los antecedentes (Abu El-Hamd and Farah 2017).

Relacionado con el papel que desempeña PRL en el sexo masculino, se ha percibido que provoca un aumento en el peso de la próstata y de la vesícula seminal. En consecuencia al aumento de andrógenos y a la estimulación en los niveles de la hormona IGF-I y su receptor.

En el epidídimo, PRL incrementa el metabolismo energético, al igual que los niveles de lípidos y de ácido siálico (Pratt, Calcaterra et al. 2015).

Se conoce que PRL también interviene en el **comportamiento reproductivo**.

En el núcleo ventromedial del hipotálamo se encuentra el RPRL, es un área encargado del comportamiento sexual femenino. Un dato que hace pensar que esta hormona participa en dicho comportamiento.

Al aumentar la secreción de PRL endógena en respuesta al antagonismo de la dopamina, se ha observado que no existe efecto en el apareamiento de las hembras en estudios con roedores. Pero por lo contrario, cuando la rata es sexualmente receptiva en la fase de proestro (es cuando los niveles de PRL sérica son más elevados), la supresión de la liberación espontánea de PRL con un agonista de la dopamina provoca la atenuación dramática de la receptividad sexual.

Se conoce que PRL suprime el comportamiento sexual masculino en ratas y en ovejas (Gloria, Regisford et al. 1994, Freeman, Kanyicska et al. 2000).

El comportamiento que mejor se encuentra caracterizado por esta hormona es el comportamiento de los padres. El materno, tanto de ratones, conejos, hámsters y ovejas suele ser el comportamiento principal y más estudiado.

Desde la construcción de nidos, como la recolección, agrupación, limpieza, la lactancia de los jóvenes etc. son comportamientos que se desarrollan gracias a la inducción de PRL.

Hay que destacar que, esta proteína multifuncional por sí sola no inicia la conducta materna, sino que, simplemente disminuye la latencia de inicio de la conducta en la madre.

La supresión de la liberación de PRL endógena con bromocriptina impide el inicio del comportamiento materno. Mientras que la superposición de PRL dentro del área preóptica medial del hipotálamo puede promover este comportamiento.

Aunque no está tan ampliamente estudiado, PRL también puede tener un papel en el cuidado paternal. Los datos para este papel son más convincentes

en los peces y las aves, pero algo menos en los mamíferos (Alexandre-Pires, Martins et al. 2017).

## 2- Crecimiento y desarrollo.

Otra de las funciones que se atribuyen a PRL están asociadas con el crecimiento y el desarrollo.

Tanto la PRL como GH que se producen en la hipófisis aparecen de una célula madre común. Aunque su origen es el mismo, ambas tienen funciones diferentes.

En los humanos que carecen de GH o poseen su receptor de manera no funcional, se observa enanismo, aunque la PRL hipofisaria sea activa.

Se ha observado que ratones con carencia en el gen RPRL o no es funcional dicho receptor, no existe modificación en la longitud del cuerpo o se ve afectado el crecimiento del animal. Indicando que PRL tiene un efecto directo sobre el crecimiento.

Ratones enanos que carecían de GH, PRL y TSH tenían una vida mucho más larga respecto a ratones normales, dando a pensar que también PRL puede estar implicada en envejecimiento.

En anfibios, la PRL se encuentra relacionada con efectos antimetamórficos. Aumenta el crecimiento de branquias y de la aleta caudal y se eleva la longitud de la cola.

En etapas premetamórficas, esta hormona reduce el crecimiento de las patas traseras e impide la resorción de la cola de los renacuajos e induce la activación de canales de sodio. En algunas especies de peces que sufren metamorfosis estas características se repiten (Hu, Meng et al. 2015).

En la proliferación celular y desarrollo, PRL también está asociada a diferentes efectos.

Sobretudo en piel, promueve la muda de la epidermis, estimula el crecimiento de melanocitos en mamíferos, peces y anfibios (Smiley and Adkins-Regan 2016).

Mientras que, en aves induce el desplume y la formación de la cáscara del huevo (Bhattacharya, Chatterjee et al. 2011). Involucrada en cambios estacionales de pelaje en algunos mamíferos como ciervos y cabras.

Aunque se conoce que PRL afecta a la proliferación celular de piel, se sabe que existen otros órganos donde esta hormona induce la proliferación de sus células. Como ocurre en músculo liso, en mucosa intestinal, células  $\beta$ -pancreáticas, células GH3 hipofisaria, próstata, astrocitos, células del sistema inmune, corazón, riñón, gónadas entre otros (Takada and Kasai 2003, Bu, Liang et al. 2015, Brelje, Bhagroo et al. 2017).

### 3- Homeostasis

PRL se encuentra relacionada en procesos de autorregulación, que conllevan el mantenimiento del medio interno en los seres vivos.

Tiene un papel inmunoregulador, implicada en el equilibrio osmótico y en la angiogénesis.

Es un mediador inmunoneuroendocrino, es muy importante la función que desarrolla en las **respuestas inmunes celulares**, tanto fisiológicas como en estados patológicos (enfermedades autoinmunes).

Se encuentra implicada en la maduración de las células del timo y de los órganos linfoides periféricos estimulando la mitogénesis de linfocitos T normales y de la línea celular de linfoma Nb2.

Se puede encontrar RPRL y PRL, en linfocitos ya que su activación por IL-2 requiere esta hormona. Dato que hace pensar que los propios linfocitos, son células con capacidad para producir y liberar PRL con características similares a la que liberan las células lactotropas adenohipofisaria.

Estudios in vitro e in vivo, han analizado el papel de esta proteína como función inmunomoduladora en el sistema inmune (Borba, Zandman-Goddard et al. 2018).

Se ha demostrado que PRL mantiene la actividad fagocítica e inflamatoria de los macrófagos, mejora la liberación de reactivos de oxígeno por los macrófagos humanos y apoya la actividad inmunitaria citotóxica en ratones con células tumorales (Pereira Suarez, Lopez-Rincon et al. 2015).

La administración de bajas dosis de PRL muestra la activación de vías de señalización como las MAPK y las STATs, produciendo grandes cantidades de óxido nítrico y citoquinas proinflamatorias como el TNF (factor de necrosis tumoral), IL-1, IL-12 e interferón gamma y beta.

Por otro lado, dosis muy altas mejoran la secreción de citocinas antiinflamatorias como IL-10 estimulando la liberación de macrófagos y la regulación positiva de genes relacionados con la inflamación como el iNOS (Síntasa del óxido nítrico inducido) y el IRF-1 (Factor regulador del interferón 1).

Últimamente, el aumento de trastornos autoinmunes en la población ha alentado a los investigadores a pensar que existe factores hormonales en la patología autoinmune.

Se conoce que estrógenos y leptina tienen un rol reconocido en autoinmunidad. Por ello, se pensó que PRL desempeña un papel patogénico en alguna de estas enfermedades autoinmunes debido a la observación de diferentes afecciones que se producen durante el embarazo, el parto o la reproducción que están relacionadas con dicha hormona.

La hiperprolactinemia se relaciona con enfermedades autoinmunes como el lupus eritomatoso sistémico (LES), esclerosis múltiple (EM) y artritis reumatoide (AR) (Vera-Lastra, Jara et al. 2002, Horseman and Gregerson 2014, Costanza, Binart et al. 2015).

Aunque una hiperprolactinemia provoca daños, concentraciones adecuadas de PRL tienen carácter inmunoprotector.

Aumenta la inmunidad celular, puede revertir la anemia, la leucopenia y trombocitopenia inducida por hipofisectomía, aumenta la formación de anticuerpos e induce la proliferación celular e inhibe la apoptosis de los linfocitos, reduce la migración de polimorfonucleares porque el efecto más inmunoprotector

es la inducción de la síntesis del factor de coagulación XII en el hígado y la regulación de la melanogénesis en peces (Capozzi, Scambia et al. 2015).

Esta hormona, se encuentra implicada **en la osmoregulación**, en el transporte de soluto y de agua a través de membranas celulares en mamíferos.

La regulación del balance de sal y de agua, es un aspecto esencial en la homeostasis para la mayoría de los organismos.

Se sabe que PRL está claramente implicada en el equilibrio de agua y de electrolitos en casi todas las clases de vertebrados.

Ejerce acción en el transporte de soluto de membranas en células epiteliales mamaria. Al observarse que PRL disminuye el transporte de sodio y aumenta el de potasio en estas células (Smirnova 2011).

En rata, estimula la captación tanto de aminoácidos como de productos no metabolizables en las glándulas mamarias. Mientras que, en cerdos y ovejas, promueve el transporte de agua en el amnio (Breves, McCormick et al. 2014).

También, regula la homeostasis controlando el transporte de iones de sodio, calcio y cloruro a través de las membranas epiteliales del intestino, como otros iones y agua en el riñón, provocando un aumento de la tasa de flujo de orina.

En muchos peces y anfibios, PRL controla el transporte de iones por absorción de agua o permeabilización de la misma por mediación de las branquias. Aumentando el volumen extracelular en el riñón o mejorando la reabsorción de sodio en la vejiga de estos animales (Breves, Serizier et al. 2013, Breves, McCormick et al. 2014).

Estas acciones periféricas regulan la homeostasis de la glucosa. La administración sistémica de esta hormona aumenta la ingesta de alimentos durante el embarazo y prepara al cuerpo para la lactancia (Grattan, Pi et al. 2001).

PRL es una hormona multifuncional, tanto es así que, desempeña funciones en **la angiogénesis**.

Junto con GH y hPL, esta molécula se encuentra involucrada en la formación de vasos sanguíneos. Una característica que puede llevar a pensar su posible beneficio terapéutico, por el uso de fragmentos de PRL como inhibidores de la tumorigénesis (Yang and Friedl 2015).

#### 4- Respuesta a estímulos externos

Otra de las funciones que desarrolla PRL, está relacionada con estímulos externos como puede ser, la luz y el momento del día que afecta a los ritmos circadianos, los sonidos o incluso el olfato.

PRL tiene una liberación circadiana como ocurre con GH y la corticotropina, generada por los núcleos supraquiasmáticos del hipotálamo.

Su secreción varía según **el momento del día** en el que nos encontremos. Suele ser tardía, entre la una y las cinco de la mañana, comienza a elevarse aproximadamente 60-90 minutos antes del inicio del sueño, llegando a ser máxima después de 2 ó 4 horas. Coincidiendo con periodos posteriores a los ciclos del sueño REM.

Así, existe una relación funcional entre una elevación nocturna de la concentración de esta hormona y el sueño REM.

Hay evidencias de que un péptido liberador de PRL como es el VIP (Polipéptido intestinal vasoactivo) está implicado en este tipo de sueño. Incluso el sueño de onda lenta se asocia con la secreción de PRL nocturna en humanos.

**La luz**, es un patrón circadiano en mamíferos fotoperiódicos, como es el caso de las ratas y un importante regulador en la secreción de PRL (Mastronardi, Walczewska et al. 2000).

Experimentos realizados con cambios en la fase de luz, eliminando el fotoperiodo en ratas ovariectomizadas y tratadas con estrógenos, modifican la secreción de PRL según la fase del ciclo en la que se encuentren, proestro o



estro. Incluso, se observaron cambios, cuando los animales fueron colocados en constante luz, las ratas se volvían acíclicas. Hechos que demuestran que PRL está relacionada con un ritmo circadiano endógeno regido por la iluminación (Stawerska, Smyczynska et al. 2008).

En relación con sus patrones circadianos, se suceden ciclos estacionales. La secreción de PRL, está relacionada con variaciones en la longitud del día de mamíferos estacionales (Stawerska, Smyczynska et al. 2014).

Se sabe que en hámsters machos, fotoperiodos cortos producen una caída en la liberación de PRL y con ella una regresión testicular.

En ovejas preñadas expuestas a días cortos de luz, se ha visto que sus corderos tienen niveles de PRL séricos mucho más bajos que las expuestas a largos días (Potter, Skene et al. 2016).

De todos los efectos ambientales que controlan la secreción de PRL, el efecto de **los sonidos** es el que más influye y el menos estudiado.

Tanto en ratas como en mujeres lactantes, ciertas grabaciones de ultrasonidos de cachorros hambrientos provocan una estimulación en la secreción de PRL de forma inmediata.

Es una respuesta a los ultrasonidos. Se conoce que ecografías inducidas por ultrasonidos, provocan una liberación de esta hormona y se piensa que puede ayudar a preparar a la glándula mamaria para la lactancia (Rey-Sanchez, Lavado-Garcia et al. 2009).

Otro factor externo que está vinculado con PRL es **el estímulo del olfato**. La secreción de feromonas por parte de un macho desconocido, provoca un efecto negativo en ratas hembras preñadas, haciendo que pierdan sus fetos. A este efecto, se le denomina “efecto Bruce” (Freeman, Kanyicska et al. 2000).

La señal feromonal se transmite al bulbo olfatorio por los nervios vomeronasales, que llegarán hasta las células mitrales que a su vez, excitarán las células de la amígdala y las células del área preóptica medial del hipotálamo, activando las neuronas TIDA del núcleo arqueado y en consecuencia, se

producirá la pérdida de los cachorros por una supresión de PRL inducida por los niveles de dopamina (Baum and Bakker 2013).

También, es conocido que el olor de las crías en la madre estimula la secreción de PRL y la secreción de leche (Baum and Cherry 2015, Corona and Levy 2015).

## 5- Endocrinología y metabolismo

PRL, está implicada en funciones endocrinas y metabólicas. Es el mejor ejemplo del papel pleiotrópico que desempeña esta molécula.

Existen muchos tejidos involucrados en esta función, incluyendo el tejido adiposo, el hígado, el páncreas y el cerebro entre otros.

Actúa en el metabolismo energético modulando la actividad de la ATPasa. En ATPasa dependientes de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , provoca su estimulación, mientras que en ATPasa dependiente de  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$ , reduce su actividad, tanto en células neuronales como en células gliales (Abramicheva, Balakina et al. 2017).

Se ha observado que PRL es esencial en la adipogénesis y en la diferenciación de adipocitos y tiene efectos en el metabolismo lipídico (Hugo, Borcharding et al. 2008).

En aves, provoca un aumento de la lipoproteína lipasa en los adipocitos. Este efecto no se ha visto en mamíferos, ya que los adipocitos de éstos no poseen RPRL. Pero, sí se ha encontrado que en mamíferos estimula la síntesis de fosfolípidos en el pulmón fetal, al igual que estimula la lipoproteína lipasa en el hígado (Carre and Binart 2014).

Es llamativo que esta proteína regula la secreción de varias adipocinas, incluida la estimulación de la leptina y la inhibición de la producción de adiponectina (Viengchareun, Bouzinba-Segard et al. 2004, Asai-Sato, Okamoto et al. 2006).

También, ayuda a compuestos orgánicos endógenos y exógenos como pueden ser, el colesterol, las sales biliares, algunos fármacos y metabolitos que no pueden ser eliminados por el riñón a que lo hagan a través de la bilis.

Facilitando el transporte activo de ácidos biliares hacia el canalículo biliar y contribuyendo a las funciones hepáticas (Weinhaus, Stout et al. 2007).

Se conoce que en muchos vertebrados, PRL afecta al metabolismo de los carbohidratos. Tanto en individuos con un comportamiento hiperglucémico como en diabéticos.

Afecta a la actividad de las enzimas de la ruta Embden-Meyerhoff y a la de las hexosas monofosfato, tanto en nervios como en células gliales

Además, provoca un aumento muy elevado a nivel fisiológico de la glucógeno fosforilasa en hepatocitos aislados.

Por último, se sabe que esta proteína tiene efectos directos en el desarrollo pancreático. Promueve el crecimiento de islotes durante el desarrollo, impulsa la secreción de insulina estimulada por la glucosa y mejora la actividad de la enzima glucoquinasa y el transportador de glucosa 2 (Weinhaus, Stout et al. 1996, Shao, Qiao et al. 2004).

Si esta función de PRL se viera alterada tendría como resultado una diabetes gestacional.

Entre otra de las funciones que se le aplican a esta hormona, es el estimular la síntesis de andrógenos como, dihidroepiandrosterona; cortisol y aldosterona (Mauvais-Jarvis 2016).

Incluso, estimula la actividad de la 21-hidroxilasa y la síntesis de catelolaminas suprarrenales de manera directa. Al igual que se ha demostrado que PRL aumenta la expresión del IV  $3\beta$ -hidroxiesteroides deshidrogenasa en la piel (Langan 2018).

## **6- Respuesta al estrés y ansiedad**

La respuesta al estrés adaptativo en mamíferos, es otro conjunto de respuesta de comportamiento inducidas por PRL.

Esta hormona posee efectos analgésicos, como ocurre con algunos neurotransmisores del SNC como son los opioides, el ácido aminobutírico y la acetilcolina entre otros (Torner, Toschi et al. 2001).

La ansiedad, es un rasgo complejo que ha evolucionado para ayudar a los animales a evaluar y sortear situaciones potencialmente peligrosas.

La base neurobiológica del comportamiento relacionado con la ansiedad, implica varios sistemas neuropeptidérgicos.

Se incluye, la hormona liberadora de corticotropina (CRH), el neuropéptido Y la sustancia P y vasopresina (Labad, Stojanovic-Perez et al. 2015).

En condiciones patológicas de hiperansiedad o en ratas con alto comportamiento innato relacionado con la ansiedad, se ha descrito una hiperactividad aberrante del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal (HPA), lo que indica una estrecha interacción entre la emocionalidad y los sistemas neuroendocrinos (Donner, Bredewold et al. 2007).

El estrés crónico indujo un aumento de la expresión del gen del RPRL-L en células del plexo coroideo (Torner, Karg et al. 2009).

La administración de PRL en ventrículos cerebrales evitó la formación de úlceras inducidas por estrés durante baños forzados, mostrando efectos andipresivos.

Al mismo tiempo que respuestas de estrés neuroendocrino fue atenuado en estados de hiperprolactinemia.

En las mujeres, los niveles elevados de PRL provocan reacciones psicósomáticas, incluyendo una forma de pseudo-embarazo. Esta hormona, puede ser la responsable de la disminución del líbido, el aumento de movimientos oculares rápidos en el sueño e incluso, puede alterar el ciclo sueño-vigilia (Roky Valatx et al. 1994).

## **7- Función de PRL en el cerebro**

El RPRL se encuentra muy extendido en diferentes partes del cerebro como hipotálamo, plexos coroideos, en el núcleo arcuato, neuronas de encefalina, etc.

Aunque existen evidencias de que la PRL es transportada al cerebro, también, el propio cerebro sintetiza esta hormona. Existiendo producción local en neuronas y en células gliales (Nogami, Hoshino et al. 2007).

Se piensa que PRL podría regular la producción de  $\beta$ -endorfina, pero la función que desempeña en esta regulación, es muy controvertida entre los diferentes investigadores (Jaworski, Callahan et al. 1997) .

En el cerebro, PRL actúa como neuropéptico, pudiendo considerarla como una hormona neuroendocrina. Activa neuronas dopaminérgicas, estimulando las neuronas de dopamina hipotalámicas para regular su propia secreción (Walker, Vukovic et al. 2012).

Se conoce que, la activación de STAT5 inducida por PRL se suprime durante la lactancia, conservando la capacidad de impulsar la expresión de la encefalina (Carretero, Blanco et al. 1992).

Otro de los papeles a desempeñar por esta hormona, es el efecto regulador de neuronas de oxitocina.

El RPRL se expresan en neuronas de oxitocina y la PRL regula de forma aguda la activación de este tipo de neuronas en hembras. Al mismo tiempo que en animales lactantes, estimula la secreción de oxitocina y la expresión de su ARNm (Augustine, Ladyman et al. 2017).

La señalización de PRL se encuentra envuelta en la neurogénesis del bulbo olfatorio y el hipocampo parental.

Por otro lado, PRL ha sido identificada como un regulador de la proliferación astrogliar, de progenitores de oligodendrocitos y de neuroesferas aisladas de la zona subventricular en el ratón.

Estudios recientes, indican que en ratones deficientes de PRL está reducido el número de precursores en el hipocampo y muestran alteraciones en las tareas relacionadas con la memoria y el aprendizaje (Fraga, Moura et al. 2011).

Estos estudios refuerzan el papel de PRL en la estimulación de la neurogénesis en el hipocampo adulto.

Otra función importante de esta hormona en el SNC, es la labor de neuroprotección y la disminución del daño celular en áreas del hipocampo en un modelo de epilepsia. Pudiendo jugar un papel en la modulación de señales de

entrada al hipocampo y regular la excitabilidad (Vergara-Castaneda, Grattan et al. 2016).

Por otro lado, otros estudios muestran que PRL no tiene capacidad para recuperar las neuronas dañadas en el cerebro. Sin embargo, es responsable de la producción de factores tróficos que promueven la proliferación de la glía en situaciones de isquemia cerebral e incluso, las situaciones de hipoxia inducen la síntesis de PRL.

Aunque esta hormona parece no promover la proliferación de nuevas neuronas, se destaca por ayudar en el proceso de migración de las células madre neuronales. Además, colabora con la migración celular regulando respuestas críticas según el tejido donde se encuentre (Mak and Weiss 2010).

También, se encuentra implicada en funciones de modulación de las propiedades electrofisiológicas de neuronas hipotálamicas y en la remielinización. Estimula la generación de oligodendrocitos que forman la vaina de mielina (Gregg, Shikar et al. 2007).

Podría proteger a las neuronas de la excitotoxicidad aunque sin modificar la viabilidad celular.

Se ha descrito que puede cruzar la barrera hematoencefálica por transporte mediado por receptor en el plexo coroideo, ejerciendo efectos centrales .

### **1.3.6. REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE PRL**

Los estímulos fisiológicos que regulan la secreción de PRL son muy numerosos.

Algunos de ellos, son la succión del pezón por parte de las crías en la lactancia, el estrés, el aumento de esteroides del ovario (en especial los estrógenos) etc.

Todos estos estímulos son recogidos por el hipotálamo que elaboran PRF (Factores liberadores de prolactina; *Prolactin Releasing Factors*) y PIF (Factores inhibidores; *Prolactin Inhibiting Factors*).

En mamíferos, el hipotálamo ejerce un efecto principalmente inhibitor sobre la síntesis y secreción de PRL, que a su vez, se encuentra influenciado por una regulación autocrina por factores liberados por células lactotropas de la adenohipófisis y una regulación paracrina por factores liberados por otras células hipofisarias.

La hipófisis, es capaz de liberar PRL de manera espontánea sin necesidad de una estimulación hipotalámica.

Por esto, el primordial control central de la secreción es por inhibición desde el hipotálamo.

### ➤ **Dopamina**

El principal factor inhibitor de la síntesis y secreción de PRL es un neurotransmisor catecolaminérgico conocido como **dopamina**.

Las neuronas dopaminérgicas del periventriculo y del núcleo arcuato del hipotálamo, son las que a través del tallo hipotálamo-hipofisario segregan dopamina hacia las células lactotropas de la adenohipófisis (Grattan and Selmanoff 1994).

Así, la dopamina tras interactuar con los receptores dopaminérgicos tipo 2 (D2) en la membrana de las células lactotropas, ejerce su función inhibitora.

Se ha demostrado que en ratones con disrupción génica del receptor D2 se produce la hiperplasia lactotropa hipofisaria y en el tiempo, adenomas, en consecuencia hiperprolactinemia (Lv, Mo et al. 2018).

La activación de receptores D2 en la membrana de la célula lactotropa provoca la modificación de al menos cinco canales de iones diferentes (Liang, Hsu et al. 2014).

Conlleva la activación de proteínas G inhibitoras ( $G\alpha$ ) que se encuentran asociadas a este tipo de receptores.

La  $G\alpha$ , inhibe a la adenilato ciclasa (cAMP) y excita canales de  $K^+$ . Acoplados a la proteína  $G\alpha$  son los causantes del bloqueo de canales de  $Ca^{2+}$  sensibles a voltaje y ocasionan la inhibición.

Pero la actividad de la dopamina, no es suficiente para determinar que sea el único PIF.

Algunas evidencias, sugieren que la secreción de PRL está regulada por 3 sistemas dopaminérgicos hipotalámicos:

- TIDA (neuronas tuberoinfundibulares).
- THDA (neuronas tuberohipofisarias arcuotas)
- PHDA (neurona de dopamina periventricular hipofisaria).

Las neuronas TIDA, surgen del núcleo arcuato dorsomedial y se proyectan hacia la zona externa de la eminencia media.

La dopamina de estas células, se difunde a través del sistema porta hipofisario, siendo transportada hasta la hipófisis anterior, donde actúa sobre los receptores D2 para inhibir la secreción de PRL de forma tónica.

Las neuronas THDA, se originan en el núcleo arcuato rostral y se proyectan a la vía intermedia del tracto hipotálamo-hipofisario y al lóbulo neural de la hipófisis.

Las neuronas PHDA, surgen en el núcleo periventricular y sus axones llegan hasta el lóbulo intermedio de la hipófisis.

La dopamina sintetizada en las neuronas THDA y en las PHDA, podrían colaborar en la regulación basal de secreción de PRL a través de los vasos portales de la neurohipófisis (Fitzgerald and Dinan 2008).

PRL se une a los RPRL de muchos tejidos. Una vez unida a su receptor actúa directamente en cualquiera de los sistemas dopaminérgicos de síntesis de dopamina, haciendo diferentes respuestas según los niveles de concentración que haya de dopamina en sangre.



Numerosos experimentos, indican el papel de la dopamina como inhibidor fisiológico de PRL.

Pero se ha visto que esta hormona no sólo estimula la síntesis de dopamina hipotalámica sino que también promueve la secreción de dopamina a la sangre.

Estas observaciones hicieron pensar que existe un mecanismo de retroalimentación que regula la secreción de esta hormona, habiendo una relación recíproca entre PRL y la secreción hipotalámica de dopamina (Nikishina, Sapronova et al. 2016).

Se sabe que una hipoprolactinemia da lugar a la supresión en la secreción de dopamina. Mientras que la síntesis o liberación de esta catecolamina, se incrementa en respuesta a los aumentos de niveles, tanto agudos como crónicos de PRL en sangre, manteniendo la homeostasis (Larsen and Grattan 2012).

Por otra parte, PRL estimula el gen de la tirosina hidroxilasa (TH) (la enzima limitante de la síntesis de dopamina) y por lo tanto, limita la síntesis de este neurotransmisor en neuronas neuroendocrinas.

Modula la fosforilación de TH cuando existe un aumento en la síntesis de dopamina.

Al mismo tiempo, la activación de estas neuronas por parte de la hormona requieren la estimulación de la vía de señalización JAK2/STAT5b. (McNeilly 1980, Freeman, Kanyicska et al. 2000, Grattan 2015, Brown, Kokay et al. 2016).

La mejor alternativa para que exista PRL es que se produzca una desinhibición. Para ello, se debería de suprimir la síntesis y/o liberación de dopamina.

Experimentos llevados a cabo en ratas lactantes, han demostrado que el contenido de dopamina en la zona del lóbulo anterior es reducido después de que se produjera el estímulo de succión, por parte de los cachorros durante 10 minutos.

Además, con este estímulo, existe una mayor capacidad de respuesta de otras moléculas implicadas en la secreción de PRL como son, la hormona liberadora de tirotrópina (TRH), angiotensina II (ANGII) o forskolina.

Varias observaciones sobre células de la hipófisis han indicado que el sistema dopaminérgico es capaz de estimular la secreción de PRL a muy bajas concentraciones (Burris, Stringer et al. 1991, Hofland, Feelders et al. 2010).

Hace más de dos décadas, el investigador Shin en uno de sus estudios in vitro, indicó que concentraciones muy bajas de dopamina podría estimular la secreción de PRL en células hipofisarias de ratas machos mucho más que, una eliminación completa de esta molécula (Shin 1978).

Asímismo, propuso al ácido ascórbico como producto para la protección, en la oxidación de dopamina. Debido a que, no es simplemente un antioxidante, sino que puede potenciar el efecto inhibitor de la dopamina, actuando como factor de respuesta al lactotropismo y sirviendo como un potente agente de inhibición de esta catecolamina. Ayudando de manera indirecta a la liberación de PRL.

Dopamina aunque es el más importante, no es el único PIF a tener en cuenta.

### ➤ **Norepinefrina y epinefrina**

Existen datos farmacológicos, indicando una influencia noradrenérgica mediada por receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos que influye en la secreción de PRL inducida por estrés como es el caso de la **norepinefrina y la epinefrina** (Terry Crowley et al. 1982, Gonzalez, Pinilla et al. 2000, Lv, Mo et al. 2018).

### ➤ **Acetilcolina**

Se conoce que la activación del receptor muscarínico de **acetilcolina** disminuye la secreción prolactinérmica. Debido a su papel neuroendocrino como regulador en la secreción.

La acetilcolina, actúa sobre los receptores colinérgicos estimulando las neuronas TIDA, favorece la secreción de dopamina y consigue la inhibición de la secreción de PRL.

Tanto acetilcolina como sus agonistas (nicotínicos y muscarínicos), influyen en el resultado estimulador de otra molécula como es la morfina, previenen que se produzca un aumento en su secreción y bloquean el efecto que posee la morfina (es conocido que este opioide disminuye la actividad de las neuronas TIDA) (Haskins, Gudelsky et al. 1981, Gudelsky Passaro et al. 1986).

### ➤ **Serotonina**

**Serotonina** es otra molécula implicada en la regulación de PRL.

Los receptores para la serotonina se encuentran presentes en el lóbulo anterior de la hipófisis.

El núcleo paraventricular del hipotálamo es el mediador de la acción de este neurotransmisor. Tanto el precursor de esta sustancia, el 5-hidroxitriptófano como ella misma, son un potente estimulador de la secreción de PRL (Lychkovq and Puzikov 2014).

En rata y en humanos, originan un aumento en plasma.

Un bloqueo en la síntesis de serotonina afecta a la secreción de PRL en ratas control y reduce la liberación de esta hormona en ratas estrogénicas e inhibe la liberación producida por la succión de la camada.

Su efecto no se encuentra asociado a una inhibición de la secreción de dopamina (Jorgensen 2007, Bakken, Kang et al. 2014).

### ➤ **Histamina**

**La histamina** actúa como un neurotransmisor en el SNC. Participa en la regulación neuroendocrina de la secreción de PRL.

Esta hormona tiene un efecto estimulador, a través de sus receptores H1 y H2 predominantemente. Afecta a la liberación de PRL por mediación de la activación de su receptor H1 (Lozeva, Anttila et al. 1999).

Su acción mediada por el SNC provoca la inhibición de la actividad del sistema dopaminérgico de las neuronas TIDA.

Además, la histamina a través de sus receptores presinápticos puede modular la liberación de vasopresina, norepinefrina, serotonina y opiáceos endógenos para influir en la regulación de PRL (Knigge 1990).

Los neuropéptidos, también juegan un papel muy importante en la regulación de la secreción hipofisaria de PRL tanto favoreciéndola como reprimiéndola.

### ➤ **Hormona estimuladora del tiroides (TRH)**

**La TRH** (Hormona estimuladora del tiroides; *Thyroid Stimulating Hormone*), además de su función específica sobre la glándula tiroides, a través de TRH, estimula la secreción de PRL.

TRH puede afectar a la secreción de PRL ya que, su receptor se encuentra presente en las células lactotrofas de la hipófisis.

Estos receptores, están acoplados a proteínas G, activando a la fosfolipasa C ligada a membrana, ésta a su vez, cataliza la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato generando inositol trifosfato y diacilglicerol (Takamizawa, Satoh et al. 2018).

El inositol trifosfato promueve la liberación rápida de calcio no mitocondrial, mientras que el diacilglicerol a través del calcio activa a la proteína quinasa C encargada de la fosforilación de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje, favoreciendo la entrada del calcio extracelular en las células lactotropas y así, incrementando la secreción de PRL (Freeman, Kanyicska et al. 2000, Spooov, Bredbacka et al. 2010, Duval, Mokrani et al. 2017).

## ➤ Oxitocina y vasopresina

Otros neuropéptidos relacionado con la secreción de PRL son **la oxitocina y la vasopresina**.

Ambas, se sintetizan en el núcleo supraóptico y en el paraventricular, almacenándose en los terminales axónicos de las neuronas paraventriculares de la eminencia media, hasta que se requiere su acción.

Varios estudios han involucrado estas moléculas como neurotransmisores en la estimulación de la secreción de PRL regulando a las neuronas TIDA entre otros efectos (Abdullahi, Eskandarian et al. 2018).

Por lo tanto, parece ser que pueden actuar como unos PRF bajo algunos estados fisiológicos.

Se ha visto que una gran dosis de oxitocina induce el aumento de PRL tanto en varones como en ratas hembras ovariectomizadas, pero no afecta a la secreción de PRL en ratas lactantes.

La vasopresina ejerce su efecto activando a dos receptores diferentes, V1 (que se acopla a la señalización de fosfoinositida y se encuentran en células musculares y hepatocitos) y el V2 (que se localiza en células epiteliales tubulares renales y activan la adenilato ciclasa) (Kombian, Hirasawa et al. 2002, Iovino, Giagulli et al. 2016, Augustine, Ladyman et al. 2017).

## ➤ VIP

**El VIP** (Péptido intestinal vasoactivo; *Vasoactive Intestinal Peptide*), se produce en el hipotálamo y en la hipófisis.

Al igual que varias especies biológicamente activas de esta familia como son, el PHI (péptido de histidina isoleucina) y el PACAP (El polipéptido activador de adenilil ciclasa). Actúa como regulador parautocrino en la secreción de PRL e inhibe la activación de las neuronas TIDA (Blanco, Carretero-Hernandez et al. 2013).

## ➤ Opioides

**Los opioides**, también tienen respuesta en la secreción de PRL.

Existen tres péptidos de la familia de los opioides, encefalinas, dinorfinas y endorfinas. Todos ellos, pertenecen a la superfamilia de los receptores acoplados a proteínas G.

Sus receptores tienen una amplia distribución a lo largo del hipotálamo afectando a las neuronas TIDA y por tanto a la secreción de PRL.

Los opioides endógenos, antagonizan el efecto de la dopamina en la hipófisis inhibiendo a las neuronas dopaminérgicas. La met-enkefalina, estimula la secreción de las células lactotrofas in vivo e in vitro, actuando sobre células previamente inhibidas por dopamina.

La mayoría de los estímulos estresantes activan a la vía de las neuronas inhibitoras produciendo la disminución de la actividad de las neuronas TIDA y como resultado, se produce un aumento en la secreción de PRL (Baranowska 1987, Mravian 1993, Volpi, Chiodera et al. 1994).

## ➤ Angiotensina II

Se conoce que la **Angiotensina II (ANGII)** es el principal efector del sistema renina-angiotensina.

Es producida localmente en muchos tejidos como pueden ser, el endotelio vascular, el corazón, el ovario, las glándulas suprarrenales, aunque también en cerebro e hipófisis.

Es una molécula que tiene funciones muy diversas, como la regulación de presión arterial, el tono vascular, la homeostasis, crecimiento celular, etc.

Se ha visto que influye en la regulación de PRL. Esta hormona peptídica posee dos tipos de receptores AT1 (con dos isoformas AT1A y AT1B) y AT2, ambos se han detectado en cerebro.

La presencia del número de receptores AT1 en el núcleo arcuato, se encuentra muy relacionada con los niveles de PRL. Son más bajos en el proestro y más altos en el estro.

El receptor AT1B es el que predomina en la glándula hipofisaria, mientras que, el AT1A está más presente en áreas del hipotálamo relacionadas con la regulación de funciones hipofisarias (Enjalbert, Sladeczek et al. 1986).

Por tanto, contribuye como PRF a la secreción fisiológica de PRL permitiendo la liberación de esta hormona.

Cuando se induce el receptor AT1 con ANGII, se ven afectadas las neuronas dopaminérgicas en el núcleo arcuato dorsomedial, aumentando la hidrólisis del fosfatidilinositol, que a su vez, activa la fosfolipasa C y moviliza el  $Ca^{2+}$  intracelular elevando la formación de AMPc para inducir a las proteínas quinasas en células lactotropas que estimularan la secreción de PRL.

La eficacia en experimentos in vitro de AGII sobre la secreción de PRL es mucho mayor que la que realiza TRH (Aguilera, Hyde et al. 1982, Robberecht, Andries et al. 1992, Becu-Villalobos, Lacau-Mengido et al. 1994).

### ➤ Somatostatina

La hormona inhibidora de la liberación de la hormona del crecimiento o como es conocida **la Somatostatina**, es una hormona que no solo inhibe la secreción de GH, sino que también la de PRL. Debido a que TSH y acetilcolina están afectando al sistema TIDA.

Se localiza tanto en el SNC como en el SNP e inhibe la formación de PRL. Pero es mucho menos eficaz que su acción sobre GH. Somatostatina impide la producción de galanina (Gruszka, Culler et al. 2012, Faron-Gorecka, Kusmider et al. 2013).

## ➤ Sustancia P, galanina, neurotensina y neuropéptido Y

Algunos péptidos que influyen en PRL son **la sustancia P, la galanina, la neurotensina y el neuropéptido Y**.

La sustancia P, es miembro de la familia de péptidos de taquiquinina, mejor conocidos como neuroquininas.

Se expresan en neuronas como neurotransmisores y sus receptores tienen un alto nivel de expresión en todas las áreas del hipotálamo. Indicios que hacen pensar que la sustancia P, actúa como neurotransmisor en el núcleo arcuato y en otras partes hipotalámicas, regulando la secreción de PRL, ya que puede modular la liberación de neurohormonas tanto de PRF como PIF en la eminencia media.

Tiene un efecto estimulante en el área preóptica medial.

Algunos experimentos muestran una influencia negativa, lo que sugiere que el efecto real de la sustancia P sobre la secreción de PRL depende de la concentración, las altas son estimulantes y las más bajas son inhibitoras (Aronin, Coslovsky et al. 1986, Duvilanski, Pisera et al. 2000, Langan, Vidali et al. 2013).

La galanina tiene una amplia distribución en todo el SNC y SNP. Es un péptido neuroendocrinoregulador.

Pertenece a la familia de los receptores acoplados a proteínas G.

La galanina es inhibidora de la estimulación muscarínica mediada por receptores de acetilcolina, activa canales de K<sup>+</sup> dependiente de ATP y activa a la fosfolipasa C, lo que provoca un aumento en los niveles de PRL, como se ha visto en líneas celulares hipofisarias GH3/B6.

Disminuye la concentración de dopamina y estimula la liberación de VIP en el hipotálamo (Ren, Koenig et al. 1999, Piroli, Cassataro et al. 2001).

La neurotensina es un péptido de 13 aminoácidos que se aisló en hipotálamo de bovinos.



Existiendo una amplia coexistencia entre esta molécula y la dopamina en las neuronas periventriculares y en el núcleo arcuato.

Aumenta la secreción de PRL en función de la concentración en la que se encuentre, como ocurre a altas concentraciones en la eminencia media.

Es un potencial PRF diferente al que puede ser el TRH o el VIP, aunque según el lugar donde se encuentre sus efectos son diferentes.

Una administración de este neuropéptido intracerebroventricular, disminuye la secreción de PRL, porque estimula a las neuronas TIDA. Pero, si se administra de manera periférica, aumenta esta secreción, realizando su acción fuera de la barrera hematoencefálica y existiendo una regulación a distintos niveles (Login, Kuan et al. 1990, Pan, Tian et al. 1992).

El polipéptico pancreático Neuropéptido Y. Modula la secreción de LH.

Se ha encontrado en muchas áreas del SNC y en SNP simpático. La presencia de neuropéptido Y disminuye la liberación de PRL inducida por TRH y aumenta el efecto inhibitor de la dopamina (Becu-Villalobos, Lacau-Mengido et al. 1994, Chen and Smith 2004).

### ➤ **Calcitonina**

El polipéptido **Calcitonina** se describió por primera vez, como hormona reductora de iones  $Ca^{2+}$ , en las células parafoliculares de la glándula tiroides.

Se ha demostrado que es capaz de inhibir la secreción de PRL actuando con dopamina y con otros PIF que activen el sistema TIDA.

Aunque, la glándula paratiroidea es la principal fuente de esta molécula también, se ha encontrado en el SNC y en las células lactotropas del lóbulo anterior de la hipófisis.

El efecto de calcitonina en la secreción de PRL es específico para esta hormona, porque se sabe que no influye en la secreción de GH, LH, FSH ni de TSH.

El efecto inhibitor que ejerce este polipéptido en PRL depende del estado tiroideo que se encuentre el animal (Tohei, VandeGarde et al. 2000, Gruszka, Culler et al. 2012).

### ➤ **Colecistoquinina**

**La colecistoquinina (CCK)** es una molécula que se describió como hormona gastrointestinal.

En su forma tirosina-sulfatada, es predominante en el SNC y actúa como un neurotransmisor en el hipotálamo.

Se localiza en el sistema dopaminérgico mesencefálico y produce una estimulación en la liberación de PRL.

Los receptores de CCK son de la familia de los receptores acoplados a proteína G. Sin embargo, la proteína G que media los efectos iónicos de CCK no son sensibles a la toxina pertussis (*toxina que se encarga de catalizar la ribosilación de ADP en la subunidad  $\alpha$  de proteínas G heterotriméricas. Así, impide que esta proteína G interactúe con el receptor acoplado en la membrana celular interfiriendo en la comunicación intracelular*) lo que indica que CCK no implica a la proteína G.

En el SNC la acción predominante de CCK es excitadora respecto a la liberación de PRL, porque causa despolarización en la membrana neuronal por su efecto directo dependiente del calcio extracelular.

Inhibe la conductancia del  $K^+$  y aumenta la afluencia de  $Ca^{2+}$  por mediación de canales catiónicos no selectivos (Moran and Schwartz 1994, Parrott, Ebenezer et al. 1995, Bechtold and Luckman 2006).

### ➤ Péptido natriurético atrial

También, **el Péptido Natriurético Atrial (ANP)** influye en la regulación de PRL.

Se han aislado tres miembros de esta familia, el tipo A, el B y el C. Todos ellos, tienen una estructura anillada de 17 aminoácidos unidos con un enlace disulfuro y dos residuos de cisteínas.

Este péptido neuromodulador se ha encontrado en el SNC y en la sangre portal hipofisaria.

En algunos experimentos, se ha visto que es capaz de inhibir la secreción de PRL in vitro. La administración de ANP disminuye PRL basal y PRL inducida por el estrés en ratas machos.

Lo que pone de manifiesto que ANP puede actuar centralmente, alterando la actividad neuronal responsable del control hipotalámico en la secreción de PRL y cuyos efectos, son sensibles a los antagonistas de dopamina. Lo que nos indica que emite sus consecuencias a través de la estimulación de neuronas hipotalámicas dopaminérgicas (Samson, Huang et al. 1995).

### ➤ Endotelinas

Otro neuropéptido que se encuentra implicado en la regulación de esta hormona son **las endotelinas**.

Son péptidos producidos por las células endoteliales, con actividad vasoconstrictora y con una amplia gama de funciones fisiológicas, entre ellas, la de modular funciones secretoras en tejidos endocrinos.

Tanto esta molécula como su receptor se encuentran ampliamente distribuidos por todo el hipotálamo y por la hipófisis.

Las endotelinas son reactivas ante neuronas catecolaminérgicas en todo el cerebro. Ellas actúan directamente sobre células lactotropas para disminuir o aumentar los niveles de PRL, dependiendo del ambiente fisiológico en el que se

encuentren. Juegan un importante papel en los mecanismos intrínsecos de la hipófisis, aunque los mecanismos no están aún claros (Kanyicska, Burris et al. 1991).

Por otro lado **los aminoácidos** también se encuentran implicados en la regulación de secreción de PRL.

El grupo de aminoácidos que forman los neurotransmisores más extendidos en el SNC incluye al glutamato, al aspartato, la glicina y el GABA, tal vez homocisteína y taurina.

Los que poseen acción excitadora son glutamatérgicos y los que tienen efecto inhibitor son mediados por GABA (ácido gamma aminobutírico).

La mayoría de estos aminoácidos pertenecen a la superfamilia de canales iónicos ligados a su ligando, también llamados receptores ionotrópicos.

Mientras que otros de ellos pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G conocidos como receptores metabotrópicos.

Podemos encontrar 3 receptores ionotrópicos de glutamato; AMPA (amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxasolepropionato; NMDA (N-metil-D-aspartato) y kainato.

Estos receptores responden al glutamato y a sus análogos mediante la activación de un canal catiónico que es parte del complejo receptor.

Los receptores AMPA y kainato son permeables a los cationes  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , mientras que, el NMDA tiene un sitio de unión al glutamato, otro a la glicina, otro a la poliamina y por último, otro sitio de unión a la fenciclidina (MK-801) siendo permeable al  $\text{Ca}^{2+}$ .

Al mismo tiempo, los receptores metabotrópicos de glutamato tienen como agonista el cAMP.

## ➤ **Glutamato y GABA**

El **glutamato** es el neurotransmisor que media las entradas excitadoras en las neuronas del núcleo arcuato. Desempeña un papel directo a nivel hipofisario excitando la secreción de PRL.

El receptor implicado en el efecto directo de glutamato en células lactotropas pertenece a la clase NMDA.

Al contrario pasa con **GABA**, se produce por descarboxilación del ácido glutámico y es rápidamente metabolizado por la acción de la GABA-transaminasa.

Es conocido por ser un potencial PIF dentro de las áreas hipotalámicas. Este aminoácido tiene una acción directa inhibitoria sobre las células lactotropas de la adenohipófisis.

GABA ejerce su efecto inhibitorio gracias a la activación de canales de  $\text{Cl}^-$  que causan una despolarización en la membrana celular, bloqueando así, la liberación de PRL (Lafuente and Esquifino 2002, Nakayama, Hattori et al. 2006, Kusakawa, Tohei et al. 2007, Caride, Fernandez-Perez et al. 2009, Jain and Zelena 2013).

## ➤ **Óxido nítrico y monóxido de carbono**

De igual modo, se ha demostrado que algunos gases desempeñan un papel regulador en la secreción de PRL, como son el caso del **Óxido nítrico (NO)** y el **Monóxido de carbono (CO)** en menor medida.

El NO no se almacena en vesículas sinápticas y por tanto, no interactúa con los receptores clásicos de proteínas. Sólo se difunde en las células cercanas donde realiza su función.

Se sintetiza a partir de L-arginina por la enzima óxido nítrico sintasa. Únicamente la neuronal es la que desempeña el papel de control en la secreción de PRL.

Esta enzima se encuentra a lo largo de todo el SNC y su bloqueo producido por estrés, inhibe la secreción de PRL.

El NO, emite un papel estimulante en el control de la secreción de PRL, disminuyendo la actividad de las neuronas TIDA a nivel hipofisario (Balci, Akgundar et al. 2009, Vega, Moreno-Carranza et al. 2010). También, se produce localmente en la hipófisis, por lo que podría desarrollar efectos paracrinos.

### ➤ **Prolactina**

Se encuentra establecido que **la Prolactina** puede inhibir su propia secreción mediante la activación neuroendocrina llevada a cabo por neuronas dopaminérgicas en el hipotálamo.

Se sabe que esta hormona polipeptídica puede actuar directamente en células lactotropas e inhibir su propia secreción de forma autocrina/paracrina, tanto en humanos como en hipófisis de rata (Freeman, Kanyicska et al. 2000).

### ➤ **Estradiol y progesterona**

A parte del SN, si nos fijamos en órganos periféricos como son los ovarios. Allí, se sintetiza unas moléculas que también regulan la secreción de PRL, como son **el estradiol y la progesterona**.

La extirpación de los ovarios provoca una disminución en el número de células lactotropas, afectado a los niveles de esta proteína.

El estradiol es la hormona ovárica que invierte estos efectos y estimula posteriormente la secreción de PRL en dos niveles.

Directamente en las células lactotropas hipofisarias, el estradiol modifica la actividad de las neuronas neuroendocrinas que llevan a cabo el control de PRL, y regula la expresión génica de esta proteína, activando su gen.

Progesterona o andrógenos al mismo tiempo, inhiben la PRL producida por la expresión génica de los estrógenos.

Progesterona estimula la liberación de dopamina en el torrente sanguíneo hipofisario, mejora la actividad de TH en las neuronas TIDA ayudando al bloqueo en la liberación de PRL.

La testosterona, puede desarrollar un efecto estimulador tras su aromatización hipofisaria a estradiol (Aquino, Araujo-Lopes et al. 2017).

### ➤ **Leptina**

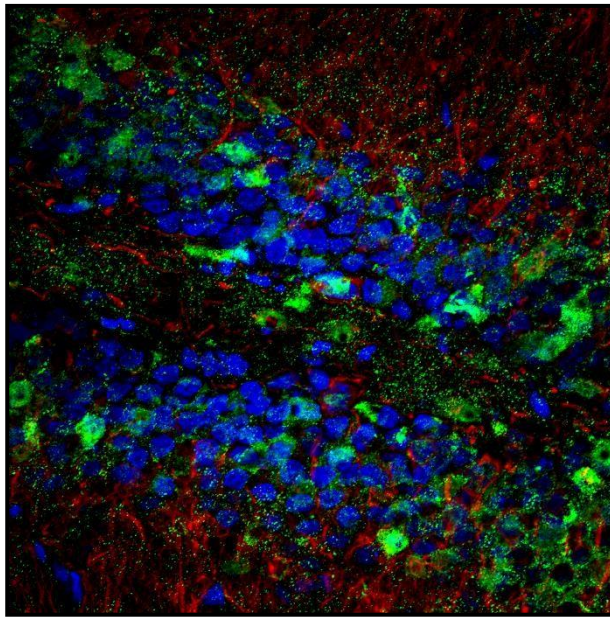
El tejido adiposo es otro de los órganos periféricos que influyen en esta regulación.

**La leptina** es una señal humoral secretada en el tejido adiposo para actuar en el SNC, para regular la ingesta de alimentos y el peso corporal.

La leptina estimula la secreción de PRL a partir de células aisladas desde el lóbulo anterior de la glándula hipofisaria.

La PRL es capaz de aumentar el ARNm de la leptina en el tejido adiposo blanco, de esta forma, ambas se encuentran involucradas en la regulación del balance energético y reproductivo.

La señalización intracelular de la leptina no es muy conocida pero sí se sabe que su receptor es miembro de los receptores de citoquinas actuando en la vía JAK/STAT (Carvalho, de Oliveira et al. 2015, Szczesna and Zieba 2015).



*"Solo el que sabe es libre, y más libre el  
que más sabe"*

Miguel de Unamuno

## 2. HIPÓTESIS-OBJETIVOS





## 2.1. HIPÓTESIS

Diversas discapacidades generadas en el desarrollo neurológico, incluidos los trastornos de espectro autista (TEA), el déficit de atención hiperactiva (TDAH), la esquizofrenia, problemas en el aprendizaje, alteraciones sensoriales, discapacidad intelectual o retraso mental, etc., afectan a más del 10-15 % de la población mundial, aunque se cree que en los últimos tiempos estas cifras van en aumento (Zuniga, Navarro et al. 2013, Guaiana, O'Reilly et al. 2018).

Son números extremadamente preocupantes para las autoridades sanitarias, existiendo una necesidad urgente de identificar y caracterizar los factores de riesgo que originan estas enfermedades, no sólo por el coste económico que exige al individuo afectado, a sus familias y a la sociedad, sino por el problema de bienestar personal, independencia e integridad que ocasionan al propio paciente (Bloom, Cohen et al. 2010, Grandjean, Pichery et al. 2012).

Los olvidos leves y los retrasos de memoria son a menudo parte del proceso de envejecimiento normal. Las personas de mayor edad, simplemente necesitan más tiempo para aprender un nuevo asunto o recordar uno viejo.

El problema se encuentra cuando esos síntomas progresivos aumentan con frecuencia y gravedad, interfiriendo en las actividades diarias.

El envejecimiento, no es la única situación que puede provocar problemas de memoria (Tromp, Dufour et al. 2015).

Las reacciones a una medicación, tumores cerebrales, enfermedades tiroideas, lesiones en la cabeza, fiebre alta, deshidratación, consumo de alcohol, deficiencia en vitamina B12 o escasa nutrición, entre otros, puede producir pérdida reversible de la memoria a corto plazo. Y dependiendo de la rapidez con la que se encuentre la causa, no se sufrirán problemas mayores.

Situaciones traumáticas o estresantes en la vida son circunstancias que pueden causar pérdida de memoria reversible (Vicens, Heredia et al. 2017).

La preocupación se origina cuando el daño es permanente e irreversible como sucede en los casos de demencia, un síndrome crónico y progresivo

caracterizado por el deterioro de la función cognitiva más que por el propio envejecimiento normal.

La demencia afecta a la memoria, al pensamiento, a la orientación, la comprensión y a la capacidad de aprendizaje. Cada persona lo sufre de una manera diferente, dependiendo del impacto de la enfermedad y de la personalidad de quien comienza a padecerla (Dening and Sandilyan 2015, Sandilyan and Dening 2015, Whitfield, Francis et al. 2018).

Es una de las principales causas de discapacidad y dependencia entre las personas mayores en todo el mundo.

Las formas o causas de la demencia son múltiples y diversas. El perfil más común y conocido es la enfermedad de Alzheimer (Yilmaz 2015, Song, Deng et al. 2018). Se ha considerado que representa entre un 60% y un 70% de los casos, seguida de demencia vascular, de demencia por cuerpos de Lewy (*agregados anormales de proteínas en el interior de las células nerviosas*) o de la demencia frontotemporal (*degeneración del lóbulo frontal del cerebro*) (Knochel, Oertel-Knochel et al. 2012, Gimenez-Llort, Ratia et al. 2017).

La demencia, según la Organización Mundial de la Salud (OMS) afecta a unos 47 millones de personas, de las cuales alrededor del 60% viven en países de ingresos bajos y medios. Aunque, cada año se registran cerca de 10 millones de nuevos casos (Salud 2013).

Incluso se calcula que entre un 5% y un 8% de la población general de 60 años o más, sufre síntomas de esta enfermedad en un momento determinado. Se prevé que el número total de personas con esta enfermedad se acerque a 75 millones en 2030 y que casi se triplique en 2050 (Maragall 2008).

Datos preocupantes que nos hicieron pensar y poner en manifiesto el desarrollo de algunos de los objetivos en esta tesis.

El aprendizaje y la memoria son dos procesos íntimamente relacionados, por lo tanto, es muy difícil separarlos (Reber 2013).

Gracias a ellos, adquirimos nuevos conocimientos, conductas y aptitudes. Además, no sólo aprendemos cosas nuevas si no que, somos capaces de

modificar lo aprendido para mejorarlo y adaptarnos de manera eficaz ante situaciones y momentos diferentes.

El aprendizaje está presente a lo largo de toda la vida, no es exclusivo sólo de etapas tempranas. Es esencial el conocer, ya que gracias a la experiencia se modifica la conducta, lo que favorecerá o dificultará el aprendizaje (Muñoz Marrón 2012).

Los modelos de ratón y de rata han sido muy utilizados para estudios en procesos normales y patológicos que estuvieran implicados en el aprendizaje y memoria.

Uno de los métodos más utilizados para evaluar los efectos que tienen estos roedores en las diferentes circunstancias ha sido el Morris Water Maze (MWM) o laberinto de agua. El empleo de esta técnica permite analizar el aprendizaje espacial (Barnhart, Yang et al. 2015).

Es una tarea desafiante para los roedores, debido a que éstos, emplean procesos mnemónicos\* en su comportamiento. (*\*conjunto de códigos simbólicos, cada uno de los cuales corresponden a una instrucción. También llamado "lenguaje de máquina"*). Estos procesos, abarcan la adquisición y localización espacial de señales visuales a lo largo de todo el laberinto, que posteriormente se procesan, se consolidan, se conservan y se recuperan con el fin de navegar con éxito y por tanto localizar una plataforma oculta para escapar del agua (Morris 1984, Terry 2009).

Estos experimentos desarrollados en ratas o ratones son equiparables a procesos cognitivos cotidianos en humanos. Por este motivo, es un modelo para estudios de enfermedades neurodegenerativas y neuropsiquiátricas donde la cognición se ve alterada.

Las deficiencias cognitivas (aprendizaje espacial y memoria), son confundidas por impedimentos motores o motivacionales (Gage, Dunnett et al. 1984).

Por ello, el primer paso de nuestro estudio será evaluar la capacidad sensitivo-motora, la inexistencia de sobresaltos acústicos y la motivación de nuestros roedores por medio de la natación en el laberinto de agua.

Estos parámetros, serán evaluados con la velocidad media que ha llevado el individuo durante el recorrido (cm/s); la distancia media recorrida (cm) y la línea de cruce (cm). Estos indicadores, dirán que los animales del estudio se encuentran en condiciones de lograr el aprendizaje (Block, Kunkel et al. 1993, Emerich, Cain et al. 1997, Vorhees and Williams 2014).

Los animales, humanos incluidos, son capaces de interactuar con ambientes cambiantes a lo largo de toda su vida, tienen que procesar la nueva información que ese entorno les proporciona.

Para conseguirlo, deben poder recordar la información obtenida durante las interacciones con ese ambiente y así poder crear situaciones de éxito si se encuentran de nuevo en una tesitura similar. Es decir, deben ser capaces de aprender y poder retener lo que han aprendido (Block, Kunkel et al. 1993, Emerich, Cain et al. 1997, D'Hooge and De Deyn 2001, Mulder and Pritchett 2003, Terry 2009, Vorhees and Williams 2014).

A lo largo de este trabajo, vamos a observar la conducta, el aprendizaje y la memoria en roedores. Pero también, se evaluarán factores que influyen en estos comportamientos, como agudeza, función motora y motivación.

Por ello, nos planteamos, conocer cuánto tiempo perduraba la consolidación de la memoria en ratas macho tras un proceso de aprendizaje en el MWM.

Existen numerosas evidencias de que el hipocampo desempeña un papel esencial en el aprendizaje local y en la memoria declarativa en humanos, al igual que realiza una importante labor en la memoria espacial de roedores.

O'Keefe y Nadel en el 1978, ya propusieron que el hipocampo podría ser la estructura cerebral a través de la cual se forma el mapa cognitivo que permite navegar en el espacio a los animales, postulando que es una estructura clave en la navegación cartográfica (O'Keefe and Dostrovsky 1971).

Estas hipótesis, han sido aclaradas en la actualidad con más exactitud. Estudios recientes indican que es cierto que el hipocampo y la CE soportan códigos espaciales tipo mapa, ambos se usan junto con los mecanismos del

lóbulo frontal para planificar las rutas durante la navegación (Epstein, Patai et al. 2017).

Los circuitos hipocampales son bastante plásticos, provocando que, esa plasticidad sináptica sea un paso hacia la formación de la memoria a largo plazo.

Se sabe que, una anomalía sufrida por alguna alteración puede crear un déficit de memoria cuando la edad avanza y las células del hipocampo descritas en ratas y en ratones se ven afectadas. Debido a que, estas células parecen codificar el entorno y las zonas donde se mueven estos animales en el aprendizaje espacial. Antecedentes que, apoyarían la hipótesis de que el hipocampo esté implicado en la formación del mapa cognitivo (Cho, Giese et al. 1998, Moser, Rowland et al. 2015, Schoenenberger, O'Neill et al. 2016).

Experimentos realizados con el laberinto de agua apoyan esta teoría. Se sabe que las lesiones del propio hipocampo y de otras estructuras de la formación hipocampal causan un grave deterioro en la tarea de nado en los animales en investigación (Knierim and Hamilton 2011, Hartley Lever et al. 2014, Barry Sakkaki et al. 2016).

El hipocampo, integra múltiples áreas corticales relevantes para la percepción y la memoria e interviene en la codificación de las asociaciones entre las características espaciales y temporales de algunos estímulos ambientales (Kessels, de Haan et al. 2001).

A la vez, diversos sistemas de neurotransmisión han sido estudiados en relación con el aprendizaje y la ME en el hipocampo.

Los sistemas neuroquímicos tanto agonistas como antagonistas poseen diferentes habilidades para influir en el aprendizaje y la memoria.

Los más investigados han sido la acetilcolina y el glutamato. Parece ser que, el sistema glutamatérgico interviene en el aprendizaje, porque los antagonistas de los receptores NMDA deterioran la adquisición de las tareas de forma específica (Lv, Feng et al. 2017, Marsman, Mandl et al. 2017).

Son de gran relevancia algunos estudios hechos con GABA, por el efecto que esta molécula causa en el deterioro en la capacidad espacial (Ebrahimi-Ghiri, Rostampour et al. 2017). Del mismo modo, otras investigaciones con

serotonina y norepinefrina (Myhrer 2003, Young, Norrholm et al. 2017) y con agonistas colinérgicos como la nicotina (Kutlu and Gould 2015) han tenido su importancia en este campo.

En los últimos tiempos, se ha evaluado el posible papel del sistema dopaminérgico en la memoria. Algunos estudios farmacológicos indican que los receptores similares a la dopamina D1 (D1 y D5) están críticamente implicados en la función cognitiva. Observándose que al inhibir la transmisión dopaminérgica mediante la administración de neurolépticos se impide el aprendizaje espacial (Moraga-Amaro, Gonzalez et al. 2016, Carr, Maltese et al. 2017).

Todos estos indicios sugieren que el estudio del hipocampo como estructura neural implicada en aprendizaje y memoria está plenamente justificado.

Nuestro laboratorio está implicado en los efectos neuroprotectores y quizás neuroregenerativos de las hormonas. Entre ellos la prolactina (PRL).

La PRL es una hormona con una localización muy amplia a lo largo de todo el organismo, incluido el cerebro. Con funciones muy diversas, aunque principalmente se haya estudiado en lactancia y reproducción (Bole-Feysot, Goffin et al. 1998, Pathipati, Gorba et al. 2011).

Algunos neurotransmisores implicados en el control de la secreción de esta molécula se describieron en el punto 1.3.6 de nuestra introducción. Son varias, las sustancias químicas relacionadas con el aprendizaje y memoria que habíamos nombrado con anterioridad, como es el caso de dopamina, GABA, nicotina etc. lo que nos hizo pensar en una posible implicación de PRL en la consolidación de la memoria tras un proceso de aprendizaje en el laberinto de agua.

Con estos precedentes, teniendo en cuenta que la localización de PRL endógena en hipocampo no se encuentra bien descrita en la bibliografía y dónde aún no se conoce con exactitud el papel fisiológico que juega esta hormona en esta zona encefálica, analizar si estaba o no implicada en el aprendizaje y consolidación de la memoria, adquiriría gran relevancia.

Planteándonos analizar la presencia de PRL en el hipocampo en ratas machos sanas entrenadas en el MWM cuya consolidación de la memoria ha perdurado a los 9, 16 y 25 días.

El mecanismo por el cual PRL cruza la barrera hematoencefálica y entra al cerebro no se conoce por completo.

El gen del RPRL se expresa en diferentes regiones del cerebro, con niveles muy altos en el plexo coroideo (Hirai, Nishita et al. 2013).

Diversos autores, han demostrado una alta expresión del RPRL en el plexo coroideo, formulando la hipótesis de que el receptor puede unirse a la PRL sanguínea y translocarse hacia la luz ventricular donde liberaría la PRL en el LCR. Pensando que es un sitio clave para el transporte de PRL mediada por el receptor, desde la sangre al fluido cerebroespinal.

Estos hallazgos, sugieren que PRL podría estimular la expresión del gen PRL a través de la activación transcripcional de su primer exón, provocando aumentos en las isoformas larga y corta del receptor en el plexo coroideo de roedores (Tabata, Kobayashi et al. 2012).

Parece ser que PRL puede ser producida localmente por el SNC. Siempre se pensó que PRL ingresaba en el cerebro a través de transportadores específicos localizados en las membranas del plexo coroideo. Sin embargo, estudios realizados en ratones knockout para el receptor demostraron que PRL seguía presente en el LCR, lo que sugiere que no es este el mecanismo de transporte (WALSH, SLABY et al. 1987).

Un estudio reciente, informó que el transporte de PRL en el cerebro del ratón es independiente del RPRL y requiere un transportador que aún no se haya identificado (Brown, Wyatt et al. 2016).

Por los años 80, ya se estudió el destino de PRL en el LCR, mediante el uso de PRL marcada con fluorescína. Encontrando fluorescencia de alta intensidad, en el epéndimo del área postrema, acueducto cerebral dorsolateral rostral cerca del órgano subcomisural y en algunas células del piso del acueducto cerebral.



Aunque esta distribución, no se observaba cuando se inyectaba PRL en exceso. Por esta razón, estos investigadores sugirieron la captación de PRL del LCR en sitios específicos (Landas, Thompson et al. 1982, Thompson 1982). A la vez que, se mostraba una secreción de PRL en el neuropilo circundante (Bjelke, Fuxe et al. 1988, Bjelke, Fuxe et al. 1989).

Investigaciones mucho más recientes manifiestan que, la administración periférica de PRL en ratones hembra con presencia y ausencia del RPRL, provocaba la activación de las neuronas del cerebro. Debido a que PRL, inducía la fosforilación del transductor de señal y activaba pSTAT5 en las neuronas en los primeros 30 min de su administración.

Se observó que el transporte de PRL al cerebro era saturable y regulado, cuando éste se encontraba bloqueado. Aumentando la tasa de PRL en el cerebro que tenían RPRL, pero, no se observó ningún cambio, en aquellos que carecían de RPRL. Indicando que el transporte es independiente del RPRL. Sugiriendo que el transporte de PRL en el cerebro implica otra molécula transportadora aún no identificada.

Debido a que los niveles de PRL en el LCR fueron muy bajos, incluso hasta 90 min después de la administración de PRL, se pensó que, el LCR no es la vía principal por la cual PRL sanguínea obtiene acceso a las neuronas en el cerebro (Brown, Wyatt et al. 2016).

Estas discrepancias no concluyentes, en el caso de que pudiéramos demostrar la presencia de PRL en el hipocampo, se hacía interesante profundizar en el estudio de la síntesis de la hormona, analizando la expresión del ARNm de PRL en las regiones hipocampales de las ratas del estudio, con el fin de investigar más a fondo la presencia e importancia del RPRL en posibles cambios en la síntesis de PRL. Y el posible papel que desempeñan ambas moléculas en aprendizaje y memoria.

En resumen, con nuestro estudio trataremos de demostrar si la PRL endógena se localiza y sintetiza en el hipocampo, junto a su receptor, y que desarrolla un papel relevante en los procesos de aprendizaje y consolidación de la memoria.

## 2.2. OBJETIVOS

Enmarcado en un proyecto global sobre hormonas y neuroprotección en el que está inmerso nuestro laboratorio, este trabajo de Tesis Doctoral fijó su atención en la prolactina y el hipocampo.

Su **objetivo general** es analizar si la prolactina en el hipocampo guarda relación con el aprendizaje y la memoria a corto y largo plazo.

Para ello, planteamos unos objetivos específicos:

**Objetivo primero:** Análisis del comportamiento y aprendizaje de ratas machos sanas tras un test conductual en el Morris Water Maze.

Estudiando su implicación en la memoria espacial y en la consolidación de memoria a corto y largo plazo. Para conocer así cuánto tiempo se precisa y cuánto perdura la consolidación de la memoria en estos animales.

**Objetivo segundo:** Analizar la presencia de PRL en el hipocampo en ratas machos sanas entrenadas en el MWM, y sus modificaciones relacionándolas con la posible consolidación de la memoria a 9,16 y 25 días.

**Objetivo tercero:** En el caso de que PRL esté presente en el hipocampo y se relacione con la consolidación de la memoria, estudiar la expresión de ARNm de PRL en las diferentes regiones del hipocampo de ratas machos sanas entrenadas en el MWM.

**Objetivo cuarto:** Si en ARNm de PRL se expresa en el hipocampo, analizaremos su relación con la presencia del receptor de PRL en las mismas zonas del hipocampo.

## 2.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para alcanzar el **primer objetivo**, realizamos un estudio en el MWM con ratas machos adultas sanas.

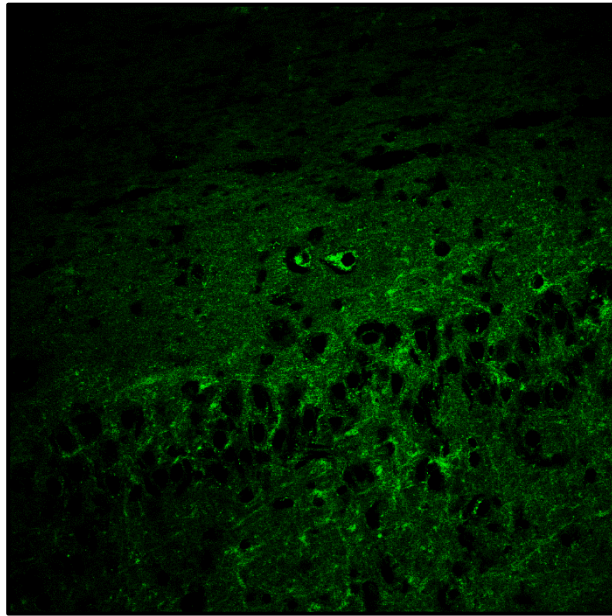
Para alcanzar el **segundo objetivo**, desarrollaremos un análisis del hipocampo y el giro dentado, estudiando mediante inmunocitoquímica y Western blotting la presencia de PRL en los cerebros de los animales en los que se hizo el test MWM.

Para alcanzar el **tercer objetivo**, sobre muestras de los mismos animales se determinará la expresión del RNAm de PRL mediante hibridación "*in situ*" que nos permitirá ver la expresión, si la hubiera y dónde se localiza.

Para alcanzar el **cuarto objetivo**, sobre muestras de los mismos animales se realizará un doble marcaje detectando mediante hibridación "*in situ*" el ARNm de PRL y mediante inmunocitoquímica la localización del receptor de PRL.

Todos estos estudios morfológicos se realizarán con microscopía láser confocal y después se desarrollará un análisis densitométrico y morfoplanimétrico de las fotografías obtenidas.

Finalizando con el tratamiento estadístico de los resultados obtenidos.



*“El amor nace del recuerdo, vive de la  
inteligencia y muere por olvido”*

Pablo Neruda

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS



## 3.1. MATERIALES

### 3.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO.

#### 3.1.1-1 ANIMALES

Para la realización del test en el Morris Water Maze (MWM) se utilizaron ratas machos de la raza Wistar entre 280-300 g procedentes del Animalario Central de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, Santiago-Chile y del Servicio de Experimentación Animal (SEA) de la Universidad de Salamanca, España.

Los animales tenían libre acceso tanto a la bebida como al pienso granulado comercial y se mantuvieron en habitaciones a temperatura (20°C) y humedad relativa controladas, dotadas de un sistema de iluminación regulable que establecía un ciclo de luz/oscuridad (12 h/12 h) constante.

Los animales procedentes de la Universidad de Salamanca fueron manipulados según las especificaciones de la Comunidad Europea (86/609/EEC y 2003/65/EC) y la normativa española vigente para el uso y cuidado de animales utilizados en experimentación (RD 1201/2005, BOE 252/34367-91, 2005). A su vez, los animales procedentes de la Universidad de Chile se encontraban en concordancia con la ley N°20.380 sobre protección de animales (publicada el 3/10/09) y a las normas técnicas NCh285672 de 2004 sobre “Evaluación Biológica”, requisitos de bienestar para los animales de experimentación NCh3244 sobre “Animales de Laboratorio- Técnicas de Eutanasia” y NCh3239 “Manejo y Mantenimiento de Ratones de Laboratorio” (INN).

Todos los protocolos experimentales empleados durante la realización de este trabajo fueron aprobados por el comité de Bioética para el uso de animales de laboratorio de la Universidad de Salamanca y el Comité de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Chile (CICUA).

### 3.1.2. MEDIOS INSTRUMENTALES

Para la realización del estudio de aprendizaje y memoria se utilizó un *Morris Water Maze* o laberinto de agua, diseñado y cedido por el grupo de la Dra. Cecilia Hidalgo de la Universidad de Chile.

Los animales fueron dormidos en cámara de inducción de anestesia veterinaria para la experimentación con animales (Referencia RWD-R520IP, Patterson Scientific). Las bombas peristálticas utilizadas fueron del tipo Microperpex 2132, de LKB Instruments (Farmacia España). Los vasos sanguíneos se canularon con catéteres Braun de tamaño 0,5 mm x 0,9 mm y de FepTeflon de 0,7 mm x 16 mm (B. Braun Sugical GMBH, Melsungen).

Los cortes histológicos de las muestras se realizaron en un microtomo de congelación (Thermo Fisher Scientific, HM430) y en un criostato (Microm HM5000M).

Para visualizar la fluorescencia se utilizó un microscopio Nikon Eclipse TE 2000-S (Nikon, Duerolab) o un microscopio confocal modelo TCS SP2 (Leica) perteneciente al Instituto Interuniversitario de Neurociencias de Castilla y León (INCyL) o un microscopio láser confocal modelo Leica DMIRE2 prestado por la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Para la cuantificación espectrofotométrica se utilizó un espectrofotómetro Asys UVM340 (Biochrom), para su uso se utilizaron placas de Elisa para 96 pocillos (Prosisa).

Las homogeneizaciones se realizaron con un homogeneizador Polytron Typ PT 10/35 Kinemática GMBH (Lucerna) o con homogeneizador douncer vidrio-teflón. Las muestras se sonicaron con un sonicador tipo baño Ultrasonic Cleaner 400 W, 30 kHz (Fungilab S.A).

La electroforesis de proteínas se llevó a cabo en un sistema de electroforesis modelo Mini-Protean II Cell con fuente de alimentación modelo PowerPac 300. La transferencia electroforética a membranas de PVDF se realizó en un sistema Trans-Blot Turbo utilizando para ello la misma fuente de alimentación, todo procedente de la casa comercial Bio-Rad.

Las incubaciones se llevaron a cabo en un baño termostatzado LAUDA Ecoline StarEdition RE 106 y en un bloque térmico QBA2 Grant (Thermo Fisher).

Para la visualización de la fluorescencia de los geles de la luminiscencia de las membranas de Western Blot se empleó un equipo de análisis de imagen Fujifilm LAS-4000 (TDI) y otro equipo de imágenes Gel Doc™ XR+Gel Documentation System (BioRad). La captura de imágenes se llevó a cabo con una cámara refrigerada del equipo, sin filtros y con una apertura del diafragma del objetivo de f 0,8 cuando se trataba de quimioluminiscencia. Las imágenes se analizaron con el programa informático MultiGauge v3.0 (Fujifilm) y por el programa Image Lab 5.2.1 (BioRad).

Las muestras se hibridaron con la sonda en un termociclador Hybaid OmniSlide Thermal Cycler System (Fisher).

Las pesadas se realizaron en balanzas electrónicas digitales Precisa 125 A y Sartorius BL 150S (Grupo Taper). El pH se midió con un electrodo Crison PH BASIC 20 (Crison Instruments).

Las centrifugaciones se realizaron en las centrífugas refrigeradas Eppendorf 5417R (Thermo Fisher) y 5810R marca Eppendorf (Hamburgo), Beckam Avanti J-20 y L8-M Ultracentrifuge, rotor 70.1 Ti (Beckman). Para la agitación de tubos se utilizaron agitadores Vortex de Ika Works (Wilmington). También, se utilizaron picofugas Stratagene (VWR International Eurolab).

Para la esterilización de materiales sólidos y líquidos se empleó un autoclave modelo Tuttnaver 2340 M (Duerolab).

Se utilizó una estufa termostatzada a 37°C modelo S-20 (Selecta).

Se utilizaron equipos de purificación de agua por ósmosis inversa Milli-Ro10 Plus y Milli-Q185 Plus para obtener agua destilada y ultrapura respectivamente (Millipore).

Las muestras se conservaron en congeladores de -20°C y -80°C (Grupo Taper) o en contenedores de nitrógeno líquido (Thermo Fisher).



Además, se contó con un pequeño equipamiento como agitadores magnéticos Selecta (DureoLab), agitadores Vortex de Ika Works (Wilmington) y micropipetas Gilson (Prosisa).

Todo el material de vidrio utilizado para las síntesis químicas procedía de Afora (Madrid). Cuando era utilizado en biología molecular se trataba mediante calor seco, durante un mínimo de 4 h, en una estufa termostatzada a 180°C, modelo S-20 (Selecta).

## 3.2. MÉTODOS

### 3.2.1. WATER MAZE DE MORRIS O LABERINTO DE AGUA

#### 3.2.1-1 FUNDAMENTO

El laberinto de agua o Morris Water Maze (MWM) fue diseñado por R.G. Morris para evaluar la memoria espacial en ratas (Morris, Garrud et al. 1982, Morris 1984).

Es una prueba de aprendizaje espacial para roedores. Consiste en una piscina circular llena de agua que depende de señales distales (externas) para navegar desde ubicaciones de comienzo, considerado como punto de inicio, hasta la localización de una plataforma sumergida en el agua que debe ser visualizada y emplazada por el animal (Vicens, Redolat et al. 2003).

Con este test es posible valorar la memoria de referencia si la plataforma permanece en el mismo lugar durante los ensayos, para que posteriormente se determine la preferencia del animal por el área que ocupaba ésta cuando se encuentra ausente; y la memoria de trabajo cuando se cambia la plataforma de posición en cada experimento.

Así, la memoria de referencia es independiente de los ensayos y permite aprender el procedimiento general para la ejecución de la tarea, al contrario que la memoria de trabajo que es una memoria temporal que depende de cada entrenamiento (Vorhees and Williams 2006, Vorhees and Williams 2014).

El aprendizaje espacial en el laberinto acuático se usa comúnmente y es muy confiable para evaluar la función cognitiva dependiente del hipocampo en roedores, esto es probablemente porque los laberintos de agua no requieren restricción de alimentos o agua para motivar el aprendizaje, lo que pudiera ocasionar un estrés fisiológico añadido hacia los animales del estudio.

El aprendizaje en el MWM posee una serie de ventajas, debido a que la tarea sucede de una manera rápida, confiable y eficiente dado la facilidad de la prueba, ya que requiere relativamente pocos ensayos considerando que los animales aprenden rápido guiándose de claves externas. Además, existe una insensibilidad a las diferencias de peso corporal y apetito de los roedores.

Pero, la mayor desventaja en la realización de esta tarea es la preocupación por el estrés al que se someten los animales con referencia al cambio de medio, al esfuerzo físico etc. Se conoce que el hecho de que la inmersión en el agua puede aumentar el nivel de estrés de los mismos, siendo una variable importante a considerar a la hora de aplicar este modelo y a tener en cuenta en los resultados.

También, la interacción humana y los factores ambientales físicos son parte de los estímulos a los que se encuentran a diario los animales de laboratorio, lo que puede influenciar en su comportamiento y fisiología contribuyendo a su bienestar.

Algunas condiciones ambientales y procedimientos rutinarios en el alojamiento del animal pueden inducir respuestas de estrés y cuando el animal no es capaz de mantener su homeostasis en presencia de un determinado factor estresante, su bienestar se ve amenazado (Castelhana-Carlos and Baumans 2009).

Teniendo en cuenta estas características, los animales estaban distribuidos en jaulas individuales, sin restricción de agua y comida, con una humedad y temperatura óptima en la sala, siempre era el mismo investigador quien realizaba la tarea y su cuidado, realizando el experimento siempre a la misma hora las 8 a.m, tras haber invertido el ciclo de sueño-vigilia de los roedores porque los

animales eran más activos en el paso de diurno a nocturno (Hemsworth, Mellor et al. 2015, Kappel, Hawkins et al. 2017).

Sin embargo, el laberinto de agua ha demostrado ser una prueba robusta y confiable que está fuertemente correlacionada con la plasticidad sináptica del hipocampo y la función del receptor NMDA (Kubie, Sutherland et al. 1999, D'Hooge and De Deyn 2001, Vorhees and Williams 2014, Singh, Kaur et al. 2016).

### **3.2.1-2 DESCRIPCIÓN Y FUNCIONAMIENTO**

Para llevar a cabo la tarea conductual, se diseñó el laberinto de agua siguiendo los protocolos descritos por R. Morris en 1981 para evaluar la memoria espacial en ratas (Morris, Garrud et al. 1982).

Dichos protocolos ya se encontraban instaurados y puestos a punto en el laboratorio para otros estudios (Adasme, Haeger et al. 2011) pero, establecimos algunas modificaciones a la hora de llevar la evaluación de los resultados como se describirá a continuación.

Las ratas fueron entrenadas en un laberinto circular de agua de 1.33 m de diámetro con 75 cm de profundidad de color negro, siguiendo el tamaño más óptimo recomendado en la bibliografía para una mejora del rendimiento (Van Dam, Lenders et al. 2006); con cuatro claves visuales externas en blanco y negro distribuidas circularmente y rodeando a toda la piscina, por el motivo de que las ratas tienen visión dicromática (Magani, Damianich et al. 2013) (Figura MM-1).

El agua del aparato oscilaba a una temperatura de  $20-25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , calentando el medio con calefactores especiales con resistencia acuática, eran retirados una hora antes de la realización de la prueba.

A la vez que existía una purificación, filtrado e higiene básica que garantizaba lo máximo posible la calidad del agua y las zonas húmedas para evitar alguna infección. Por eso, el agua debía ser renovada cada cierto tiempo al término del experimento.

Las paredes de la sala donde se llevaba a cabo el experimento se encontraban pintadas de color negro.

Rodeando al Water Maze se localizaban unas cortinas de tela negra para que el animal no pudiera estar influenciado por agentes ni estímulos externos que pusieran en peligro la veracidad de la prueba (Figura MM-1).

Todo el proceso experimental y la realización de las tareas por parte de los animales del estudio fueron grabados por una cámara de video (HVS Imagen) situada en el techo de la sala y enfocada hacia el centro de la piscina haciendo un plano capaz de grabar toda la superficie del laberinto.



**Figura MM-1.** Fotografía real del laberinto de agua. En verde se indica las 4 claves distales externas en blanco y negro, en rosa se representa las cortinas que rodean al MWM, en rojo se indica el diámetro de la piscina.

Todos los registros e imágenes eran recogidos por un software informático conectado a la cámara y recopilados en un ordenador (Lenovo ideapad 100) para su posterior valoración.

Cuando el nado del animal fue capturado y rastreado por el software y la cámara, los datos para todos los grupos establecidos en esta investigación se analizaron en un programa informático especializado en seguimiento llamado ANY-maze 5.1 (Stoeling Co) que permitía visualizar y dibujar los trazos realizados por los animales y el análisis de diferentes parámetros.

El primer paso a seguir fue crear los diferentes grupos de nuestro estudio de forma aleatoria, con 10 animales en cada grupo. Dividimos el experimento en tres partes, los grupos control; el grupo aprendizaje y, por último, el grupo memoria.

#### **a) GRUPOS CONTROL**

Se establecieron dos grupos control, denominados Control Nado Libre (Ctr NL) y Control Plataforma Invisible Movable (Ctr Ptlm).

#### **► Control Nado Libre**

Con el grupo Ctr NL queremos valorar como se encuentran influenciados los animales al cambio de medio; la posible existencia de deficiencias cognitivas en el aprendizaje y memoria espacial debido a problemas sensitivo-motores.

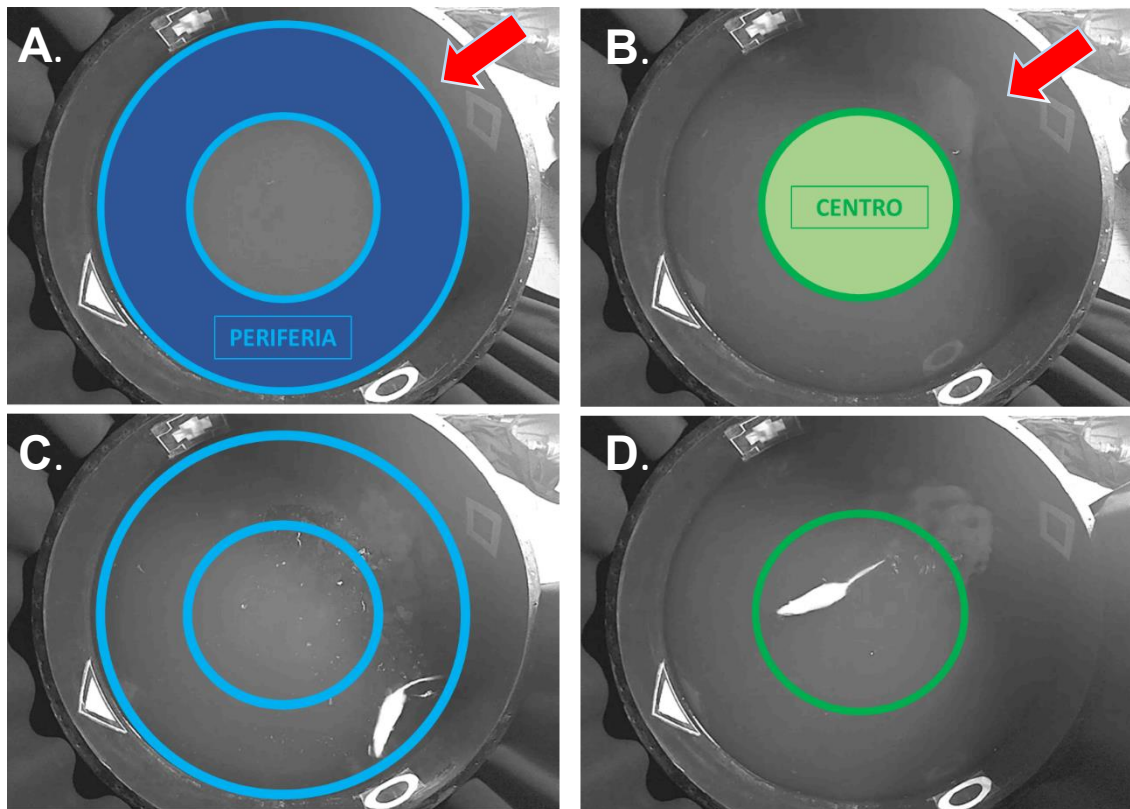
Con ese fin, se analizó la velocidad promedio del nado (cm/s); la línea de cruce (cm); distancia promedio (cm) y tiempo de permanencia en cada área (s).

La piscina donde se realizó la prueba se dividió en zonas circulares imaginarias. Una primera zona más externa, denominada zona de la periferia y otra área más concéntrica, llamada zona centro (Figura MM-2).

Estos sectores se seleccionaron para poder evaluar el grado de estrés que presentaban los animales y los niveles motores de los roedores (Anisman and Zacharko 1992, Francis, Zaharia et al. 1995).

Por la zona Q1 se introdujo al animal NL, dejándolo nadar libremente por toda la superficie del laberinto acuático sin plataforma durante 60 segundos de sesión, transcurrido ese tiempo el investigador retiró a la rata macho del lugar donde se encontraba en la piscina, secándola y acariciándola con una toalla seca a modo de recompensa para tranquilizarla.

Se depositó de nuevo en su jaula con cuidado, estimando un tiempo de reposo entre sesión y sesión 20-45 minutos. Se realizó 3 sesiones por día durante 3 días con tiempo de recuperación adecuado entre sesiones.



**Figura MM-2.** Imágenes reales del MWM para el grupo Control Nado Libre. (A) y (C) en azul representa las líneas circulares imaginarias para la zona periférica. (B) y (D) en verde se indica el área imaginario para la zona centro. Con una flecha en rojo representa la posición de lanzamiento del animal, Q1.

### ► **Control Plataforma Invisible Movable**

El grupo Ctr Ptlm se creó para poder valorar la memoria de trabajo, la influencia de la plataforma en los animales, el estrés creado por el ejercicio de la tarea y al igual que en el caso anterior, la capacidad locomotora y motivacional en el pre-entrenamiento previo.

Se evaluó la velocidad promedio (cm/s); distancia promedio recorrida (cm); la distancia a la plataforma (cm) y tiempo de permanencia en cada cuadrante (s).

El MWM se dividió en 4 cuadrantes formados por líneas imaginarias en forma de cruz, llamados cuadrante 1 (Q1), cuadrante 2 (Q2), cuadrante 3 (Q3) y cuadrante 4 (Q4) (Figura MM-3).

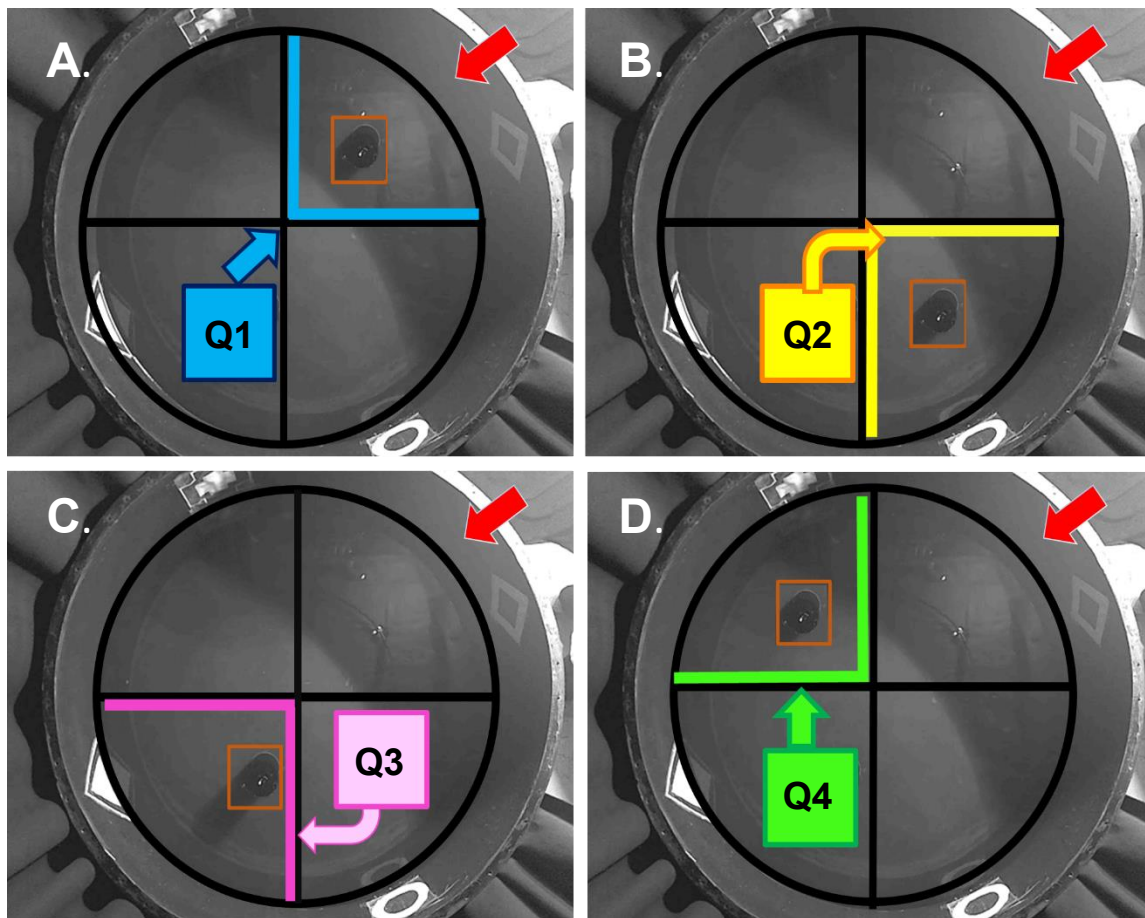
Se ubicó una plataforma de escape de 19 x 42 cm, sumergida por debajo del agua 10 cm en uno de los cuadrantes (objetivo), la localización de la plataforma variaba diariamente, estando cada día en un cuadrante distinto.

El animal era introducido en la piscina por el Q1, navegaba libremente durante un tiempo máximo de 60 segundos dentro de la piscina. La prueba se detiene después de que el tiempo hubiera expirado o después de que el animal alcanzara la plataforma.

Si el roedor no era capaz de ubicar la plataforma por si mismo en el tiempo asignado, de manera suave, a través del investigador era conducido a la plataforma permitiéndole permanecer allí durante 30 segundos para indicar su orientación por mediación de las señales distales dispuestas a lo largo de todo el laberinto.

Una vez realizada la tarea el animal era retirado de la piscina, secado con una toalla e introducido en su jaula.

Se realizó 3 sesiones por día, durante 4 días con reubicaciones de la plataforma en cada día, con un tiempo de espera entre sesión y sesión de 20-45 minutos.



**Figura MM-3.** Imágenes reales del laberinto de agua para el grupo Control Plataforma Invisible Movable. (A) En azul, representa la plataforma cuando se localiza en el Q1, (B) en amarillo, indica las líneas imaginarias para acotar la región del Q2, (C) en rosa, muestra la posición del Q3 y (D) en verde, ubica el área imaginaria con plataforma para la zona del Q4. En todos los casos la flecha en rojo, muestra la posición de lanzamiento del animal Q1 y el recuadro naranja la posición de la plataforma invisible movable según el día que corresponda a la realización del test.

### ***b) GRUPO APRENDIZAJE***

Con este grupo, realizamos el test de aprendizaje. Valorando la capacidad de aprendizaje que poseen las ratas machos de nuestro experimento a lo largo de un entrenamiento continuado y la memoria de referencia.



Este grupo es denominado **Ratas aprendizaje 6 días**.

Se analizó la velocidad promedio (cm/s) de nado; la distancia recorrida (cm) en la prueba y la latencia de escape (s).

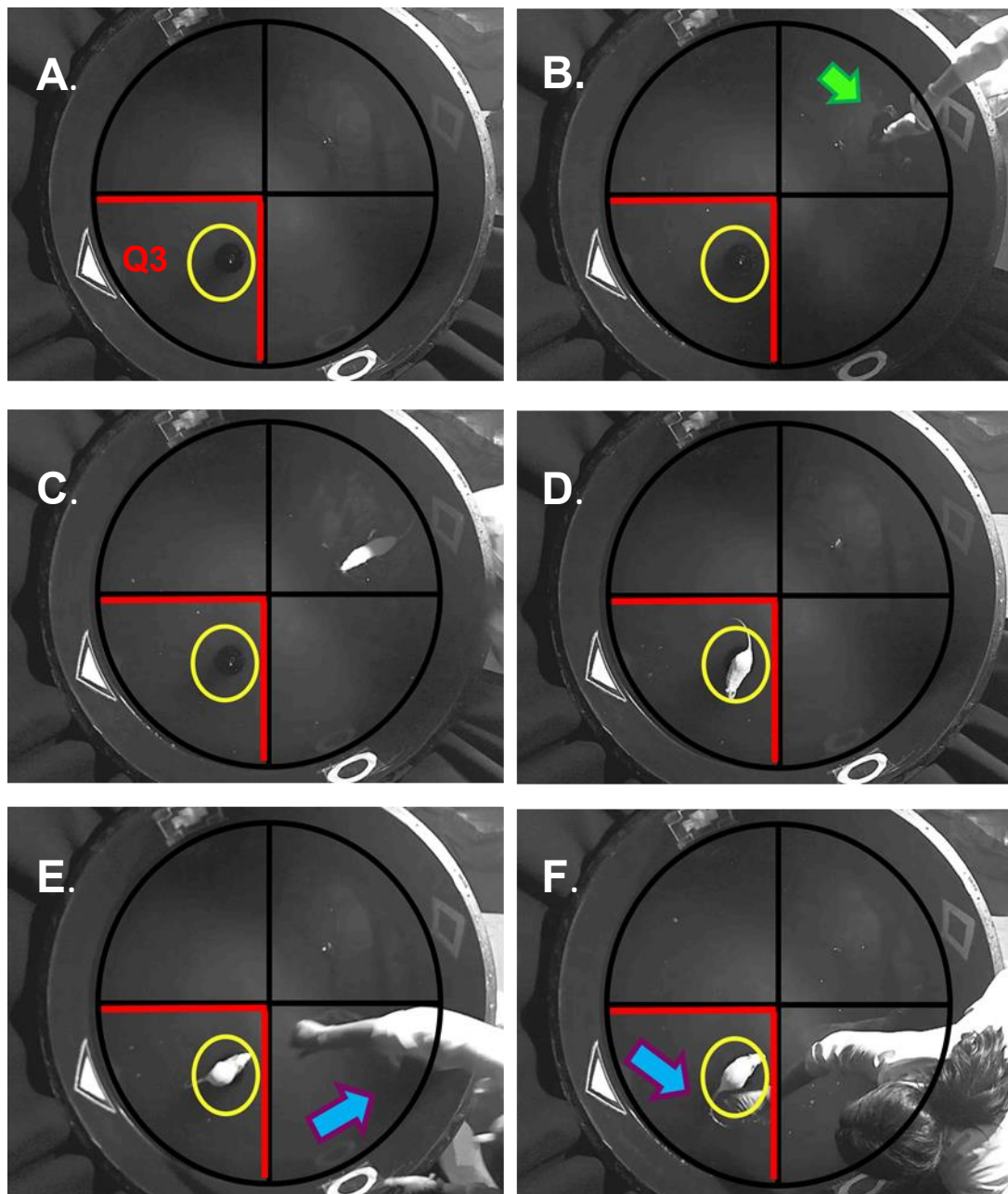
Al igual que en el caso de control plataforma el laberinto de agua se divide en 4 cuadrantes imaginarios, colocando una plataforma oculta sumergida en un lugar fijo, el cuadrante 3 durante todo el transcurso del aprendizaje.

Se sumerge al animal por el Q1 permitiéndoles nadar por toda el área de la piscina un máximo de 60 segundos para encontrar la plataforma en el Q3.

Las ratas incapaces de encontrar la plataforma dentro ese periodo de tiempo fueron guiadas por el investigador, que consumo cuidado las deposito encima de dicha plataforma durante un lapso de tiempo de 30 segundos para que los animales pudieran ubicarse a través de las señales externas en blanco y negro localizadas a lo largo del perímetro en el maze.

Terminado el ejercicio fueron sacadas del agua, se secaron con una toalla y se devolvieron a sus jaulas.

Los animales fueron entrenados durante 6 días consecutivos, 3 sesiones por día con un tiempo de reposo de 20-45 minutos entre sesiones (Figura MM-4).

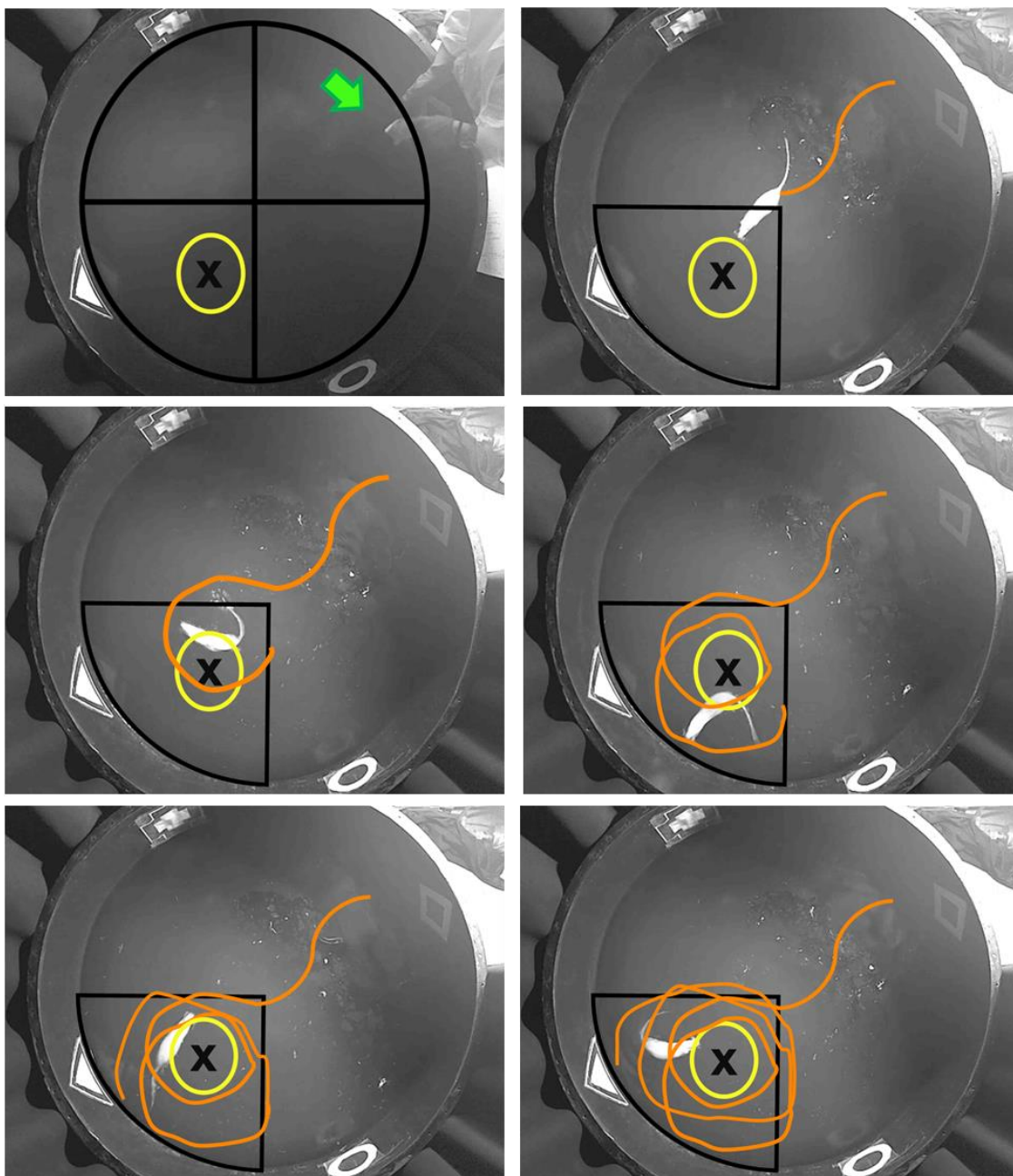


**Figura MM-4.** Imágenes reales de la realización de la tarea para el grupo Aprendizaje en el MWM. (A) Representa las líneas imaginarias de división y el Q3; (B) con flecha verde, punto de inicio del test por el Q1; (C) trayecto seguido por el roedor, (D) Imagen que indica que el animal ha encontrado la plataforma invisible sumergida; (E) y (F) Imagen de la extracción del animal por parte del investigador representado en flecha azul.

### c) GRUPO MEMORIA

Después de la fase de adquisición o aprendizaje, se realiza una prueba final de retención para estimular la consolidación de la memoria. Hacemos unos

subgrupos para evaluar la memoria a los 9 días (**Memoria 9 días**), a los 16 días (**Memoria 16 días**) y a los 25 días (**Memoria 25 días**) tras el comienzo del entrenamiento.



**Figura MM-5.** Imágenes de secuencias reales de la realización del test de memoria. (A) se observa la piscina separada con los cuatro cuadrantes imaginarios, el Q3 representado en color negro, con una X y rodeado de amarillo la simulación de dónde se encontraba la plataforma en la prueba de aprendizaje. Una flecha verde que marca el punto inicial de nado. (B-F) Imágenes de la trayectoria que ha realizado el roedor durante la prueba. En naranja se muestra el recorrido realizado por el animal.

Se analizó la velocidad promedio (cm/s); la distancia recorrida (cm); la distancia a donde se encontraba la plataforma (cm); y el porcentaje de permanencia en los cuadrantes (%)

Consiste en una prueba de preferencia espacial en el cual, si el animal ha aprendido la tarea nadará más tiempo en el Q3, donde previamente estaba situada la plataforma (Figura MM-5).

Se realizó una única sesión para cada subgrupo extrayendo la plataforma sumergida. Se depositó al animal en el agua por el Q1, dejándolo nadar libremente por el aparato durante 60 segundos y registrando el trayecto de nado.

Pasado el tiempo de duración del test se sustrajo al roedor de la piscina, con esmero cuidado se le secó y se le tranquilizó depositándolo en su jaula.

#### **d) GRUPO NAIVE**

Es un grupo de ratas machos sanas, sacadas del animalario sin someterles a ningún tipo de test.

Se utiliza este grupo, como medida de control para estabilizar los niveles proteicos de PRL respecto a los diferentes grupos, en técnicas como el Western blotting.

### **3.2.2. SACRIFICIO Y EXTRACCIÓN DEL ENCÉFALO**

Tras llevar a cabo los test de conducta, aprendizaje y memoria. Cada animal de su grupo fue sacrificado a las 6 h después de la última sesión según la tarea a la que estaban expuestos. Los roedores fueron eutanasiados utilizando diferentes técnicas de sacrificio (Amparan, Djoufack-Momo et al. 2014, Valentim, Guedes et al. 2016), según el propósito y uso para el que se iban a utilizar las diferentes muestras de tejido neuronal. Se empleó: perfusión y sacrificio por decapitación.

### 3.2.2-1 TÉCNICA DE PERFUSIÓN INTRACARDÍACA

Esta técnica es un método básico de fijación, muy efectivo y rápido. La solución fijadora debe llegar a todas las partes del tejido lo más rápidamente posible a través del sistema circulatorio.

Así, se puede fijar a un animal completo o sólo un órgano si se introduce el fijador en la arteria principal que irriga dicho órgano (Matryba, Bozycki et al. 2017, Schmitt, Csiki et al. 2017).

Para llevar a cabo esta técnica, se seleccionaron 5 animales de cada condición. El objetivo de emplear este método era con el fin de realizar estudios inmunohistoquímicos posteriores, de esta manera nos asegurábamos la preservación tanto de la estructura anatómica del encéfalo como que la señal de fluoróforos proteicos fueran compatibles con la tinción de anticuerpos en cortes histológicos.

Los animales fueron adormecidos en cámara de inducción de anestesia veterinaria para la experimentación con animales (Referencia RWD-R520IP, Patterson Scientific) con una dosis de Isoflurano al 3% (Abbot Laboratorios, Forane®) por mediación de un sistema de anestesia especializado con reinhalación (Referencia AS010529-01, Patterson Scientific) por un periodo de 3-7 minutos.

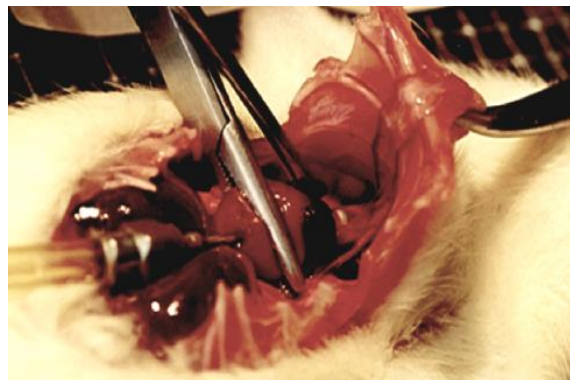
Una vez anestesiado el animal, se le puso en posición de decúbito supino sobre una bandeja con rejilla dentro de la campana extractora de gases (Waldner, Secuflow EN7) y se comenzó el proceso de perfusión intracardíaca.

Para la perfusión intracardíaca, se rasura la zona de pelo que puede molestar para la intervención.

Se practicó toracotomía abriendo la caja torácica del animal, dejando al descubierto el corazón. Seguido se separa el pericardio ayudándonos con pinzas, se secciona el ápice del ventrículo izquierdo con unas tijeras de punta fina, en éste, se introduce una cánula rígida que se conecta a la bomba por gravedad, variando la altura a la cual se coloca la solución fijadora respecto a la del animal. De esta manera, nos aseguramos que las soluciones alcanzarán

todas las partes de la estructura sin provocar roturas en los vasos sanguíneos ni colapso, produciendo un flujo continuo de líquido al nivel de la aorta ascendente. Dicha cánula se ajusta al ventrículo ayudándonos de unas pinzas planas (Figura MM-6).

Una vez comenzada la perfusión se facilita la evacuación de los fluidos administrados mediante una incisión en la aurícula derecha, con mucho cuidado debido a la cantidad de sangre que puede fluir en la realización del corte.



**Figura MM-6.** Imagen de cirugía de rata en la técnica de perfusión intracardiaca. Se puede observar el proceso de las diferentes incisiones en el ventrículo izquierdo y en la aurícula derecha que requiere la técnica, con su posterior fijación a través de pinzas de la cánula-aguja que conecta con la bomba de gravedad (Ibarra, Funes et al. 2007).

El primer fluido que se perfunde son 200 mL de una solución de salino (NaCl), al 0.9 % (Scharlau Chemie) al que se le añadió heparina sódica (10.000UI de heparina y 1 gr de procaína/litro (Sanofi-Aventis, Clexane®) durante 20-30 minutos.

Sirve para hacer un lavado y eliminar los elementos sanguíneos y el exceso de sangre. Si no se llevase a cabo este proceso la interacción directa con el fijador produciría trombos que impediría la fijación de determinadas zonas del animal o del órgano.

A continuación, se pasaron 200 mL de la solución fijadora de paraformaldehído 4% en tampón fosfato (PBS) 1M pH 7.3 (Sigma-Aldrich), según el peso y volumen sanguíneo del animal durante 1h aproximadamente.

Ambas soluciones deben de ser administradas con flujo muy bajo (gota a gota) y con una velocidad media constante. Cuidando al máximo la osmoralidad, el PH y los tiempos de fijación.

Posteriormente, se da paso a la realización de una craneotomía. Se extrae el encéfalo con mucho cuidado de no romperlo ayudándonos de material quirúrgico y se somete a un periodo de postfijación en la misma solución fijadora durante 4 horas a 4°C.

Transcurrido ese tiempo, se traspasa a un vial con solución tampón de sacarosa al 30% con azida de sodio al 0.2% (Sigma-Aldrich) por un periodo mínimo de 48h a 4°C. Se observará que según va transcurriendo el tiempo el encéfalo precipita pasando de la parte superior del vial al fondo del mismo.

La muestra se reserva a 4°C en este buffer tampón hasta su uso. Con esta solución evitamos que durante la congelación para la obtención de cortes histológicos se formen cristales de hielo grandes que puedan dañar las estructuras celulares, a la vez que su conservación por un tiempo.

#### **SOLUCIONES UTILIZADAS:**

- **Solución de salino al 0.9%:** NaCl 150 mM, pH 7.8
- **Solución Fijadora:** Paraformaldehído 4% (p/v) disuelto en Tampón Fosfato Salino (PBS1x) NaCl 137 mM, KCl 3 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>· 12H<sub>2</sub>O 0.5 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 mM, pH 7.3
- **Solución de sacarosa:** 15 gr de sacarosa, 10 mL azida de sodio 1% (p/v), 40 mL de PBS1x, pH 7.4

### 3.2.2-2 EUTANASIA POR DECAPITACIÓN

Es un método de sacrificio que se utiliza para animales grandes que puedan manejarse con facilidad y con un cráneo relativamente fino como es el caso de nuestros roedores.

Con esta técnica se pretende que el sufrimiento del animal sea mínimo y que su muerte sea rápida, de este modo, la angustia, el estrés y el dolor del roedor será ínfima.

Con la decapitación se consigue una falta de riego sanguíneo en el cerebro de forma inmediata, con su posterior anoxia (disminución de oxígeno en las células) que provocará una insensibilidad de la cabeza de forma rápida y duradera (Derr 1991, van Rijn, Krijnen et al. 2011).

El objetivo del uso de esta técnica fue la obtención de tejido nervioso sin fijar. Obtendríamos hipófisis y los dos hipocampos frescos para su posterior empleo en diversas técnicas como Western-Blotting, determinación de proteínas, etc.

Se sacrificaron 5 animales de cada grupo seleccionado. Los animales no se encontraban presentes durante la eutanasia de otros, para que no sufrieran alteraciones ni estrés añadido.

Previo al sacrificio, el animal fue anestesiado por inyección intraperitoneal con pentobarbital sódico (50 mg/Kg) (Nembutal N.R®, Abbot Laboratorios), dado que actúa de manera rápida y humanitaria para minorar el estrés que puede sufrir el animal.

Se hizo uso de este barbitúrico porque deprime el sistema nervioso central y provoca la pérdida de consciencia de manera progresiva de ligera a profunda, deprimiendo los centros respiratorios, provocando apnea y fallo cardiaco de manera efectiva y rápida, consiguiendo que la técnica de decapitación sea menos aprehensiva y presente una ansiedad mínima para el animal (Shekarforoush, Fatahi et al. 2016).

Cuando la rata se encontraba dormida se sujetó al animal de forma segura y se introdujo la cabeza en la guillotina, exponiendo la región cervical en la zona



de corte, con tenacidad y sin vacilar se bajó la palanca de la guillotina con cuidado, decapitando al roedor de nuestra investigación.

El cráneo se depositó en hielo, de forma apresurada y ágil se practicó una craneotomía dejando al descubierto el encéfalo y la hipófisis, se extraen y se introducen en un vaso de precipitado con solución ASCF (líquido cefalorraquídeo) en continua gasificación (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) que con anterioridad se había colocado en hielo.

Con esta solución simularemos las condiciones óptimas de equilibrio que tenía el encéfalo cuando el animal estaba vivo hasta su consecutiva disección (Figura MM-7).

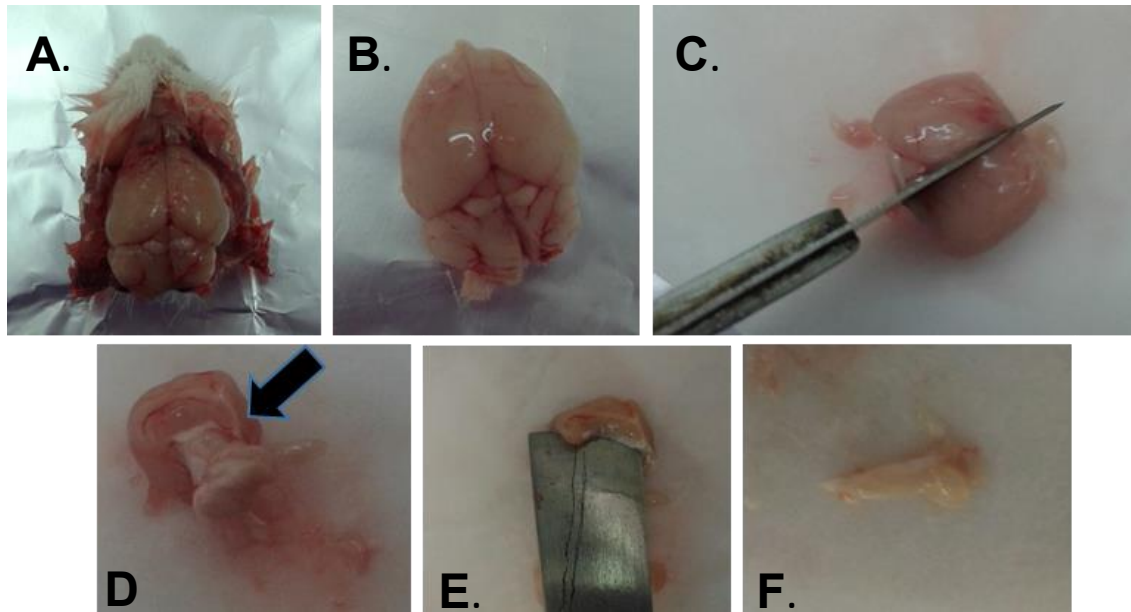
Extraído el encéfalo y mantenido en la solución ASCF, se traslada hasta una placa Petri con solución de disección donde se desarrollará un corte longitudinal dividiendo al encéfalo en dos, derecho e izquierdo.

Se toma una de las partes y se devuelve al vaso de precipitados con solución ASCF y se reserva.

La otra fracción se disecciona extrayendo el hipocampo. Éste es depositado en un tubo Eppendorf que contiene 1mL de Trizol (Invitrogen) y con premura el tubo se congela en nitrógeno líquido (Air Liquide) y se almacena a -80°C hasta su posterior utilización.

Se repite el proceso con la otra parte del encéfalo reservada, teniendo hipocampo derecho e izquierdo.

En todo momento de la disección la muestra se encontraba embebida en solución de disección, el Trizol se utilizó como reactivo de protección y preservación para proporcionar ARN, ADN y proteínas de alta calidad tras el proceso de congelación.



**Figura MM-7.** Imagen de cirugía de rata en la técnica eutanasia por decapitación para la extracción del hipocampo. Se puede apreciar (A) craneotomía, (B) encéfalo extraído, (C) División de los hemisferios encefálicos, (D) con flecha negra se indica el hipocampo, (E) y (F) extracción del hipocampo.

#### **SOLUCIONES UTILIZADAS:**

- **Solución ASCF:** Se prepara un stock, NaCl 124 mM, KCl 3 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.25 mM, NaHCO<sub>3</sub> 28 mM. Se toman 400 mL de la solución en Stock de ASCF, se burbujea por 1 minuto y se le agrega, 0.72 gr dextrosa (glucosa anhidra), MgCl<sub>2</sub> 1M, CaCl<sub>2</sub> 1M, piruvato 600 mM, pH 7.4 (Sigma-Aldrich, Madrid; Merck).
- **Solución de disección:** Se hace un stock, KCl 3 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.25 mM, NaHCO<sub>3</sub> 28 mM. Se toman 200 mL de solución en stock de disección, se gasifica por 1 minuto y se agrega, 14.56 gr sacarosa, 0.36 gr dextrosa (glucosa anhidra), MgCl<sub>2</sub> 1M, CaCl<sub>2</sub> 1 M, piruvato 600 mM, pH 7.4

### 3.2.3. REALIZACIÓN DE CORTES HISTOLÓGICOS

Después de haber realizado la técnica de perfusión intracardiaca y habiendo extraído el encéfalo. Se dio paso a la realización de cortes histológicos con un microtomo de congelación (Thermo Fisher Scientific, HM430).

#### 3.2.3-1 FUNDAMENTO

El microtomo de congelación se fundamenta en la obtención de cortes histológicos de tejidos por congelación de una manera rápida sin necesidad de inclusión.

Esto tiene una serie de ventajas, asegurándonos que la preservación molecular es máxima, a la vez que las muestras congeladas pueden cortarse en secciones finas de 5-25  $\mu\text{m}$  e incluso del orden de cientos de  $\mu\text{m}$ , pudiendo tener buenas slices sin depender del tejido y sin necesidad de parafinar, debido a que el corte es inmediato como si se tratase de biopsias.

El mayor inconveniente y cuidado a la hora de realizar esta técnica es que para conservar correctamente la estructura del tejido ha de ser una congelación muy rápida para evitar la formación de cristales de hielo que deterioren las estructuras celulares (De Lillo 1959, Carlo and Stevens 2011, Li, Lu et al. 2017).

Este instrumento consiste en una plataforma que se enfría a bajas temperaturas sobre la que se coloca la muestra.

Tras cada corte la pletina se eleva un espacio correspondiente al grosor del slice seleccionado.

En los micrótomos de congelación antiguos se producía la congelación mediante gas carbónico que había que suministrar regularmente. Actualmente, se produce la congelación aproximadamente a  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  con un sistema de refrigeración externo pero que está conectado al propio microtomo, congelando la muestra por contacto directo con la plataforma. Siendo constante su temperatura durante todo el tiempo del proceso.

Las muestras se añaden a un recipiente con tampón de trabajo y se trabaja con ellas en flotación.

Los cortes congelados son útiles para la inmunolocalización o estudios de localización de enzimas (Morphew, Giddings et al. 2017).

### **3.2.3-2 DESCRIPCIÓN Y PROCEDIMIENTO**

Antes de comenzar con los cortes, debemos de asegurarnos de que toda la superficie de trabajo y del criotomo estén bien limpios.

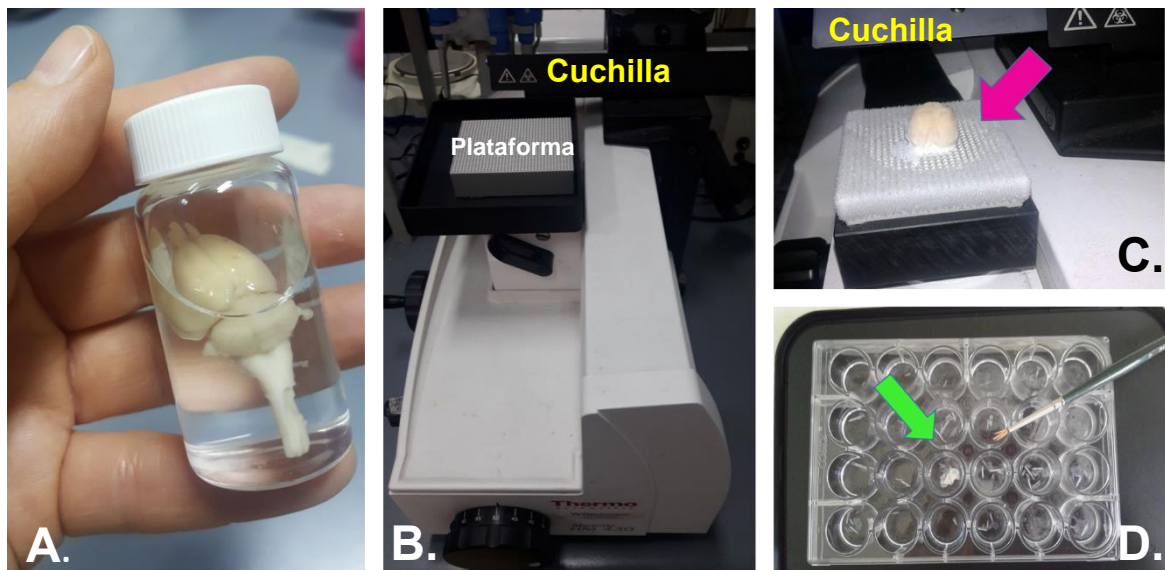
Acondicionamos la cuchilla y la ajustamos a la máquina por mediación de los tornillos, dejando que quede bien equilibrada en el portacuchillas.

Preparamos el encéfalo, con una cuchilla fría tallamos la muestra en forma de bloque cuadrado o trapezoide amplio, eliminando los ápices superiores e inferiores para facilitarnos el montaje sobre la pletina del microtomo. Recordando que lo interesante para nuestros experimentos en referencia a nuestras rebanadas es la obtención del hipocampo.

Transferimos el bloque tallado a la pletina del microtomo, ajustándolo con una gota de adhesivo de soporte resistente a altas temperaturas (Referencia 7209036, Ceys), dejando asentada la pieza.

Enfriamos la escena de montaje a  $-37\text{ }^{\circ}\text{C}$  presionando el botón de “enfriamiento rápido” que se encuentra en el criotomo. Esperamos 10-15 minutos para alcanzar la temperatura adecuada y provocar la congelación de la plataforma junto con la muestra. Hay que asegurarse que el bloque se encuentra bien congelado antes de comenzar a cortar.

Durante el tiempo de espera de la congelación, se ajusta la placa de la plataforma, subiéndola y bajándola, garantizando que la muestra toque la cuchilla del microtomo. Si no fuera así, mientras que el encéfalo se está congelando se puede manipular cuidadosamente para corregir la orientación y la posición correcta, siempre debe de estar ajustada cara a la cuchilla y ligeramente bajo el margen de ésta (Figura MM-8).



**Figura MM-8.** Fotografías de algunos pasos de la obtención de cortes histológicos de tejido nervioso por mediación del microtomo de congelación. (A) Vial con encéfalo de rata macho entrenada en el MWM en tampón e sacarosa. (B) Imagen de criotomo, en amarillo se puede observar la posición de la cuchilla de corte con su protector de seguridad. En azul se muestra la posición de la plataforma oscilante donde será colocada la muestra para su congelación. (C) Imagen demostrativa de cómo es la colocación de la pieza (flecha rosa) y cómo se congela todo el bloque a bajas temperaturas. (D) Visualización de placa de 24 pocillos con pincel para la recogida de muestras de forma seriada (flecha verde).

A continuación, se realizan los cortes de 20  $\mu\text{m}$  de grosor. Ayudados de un pincel se recogen los slices, depositándolos en placas de 24 pocillos cuyo contenido es PBS 1x con azida sódica.

Las láminas se depositan de forma seriada, comenzando con el primer pocillo y continuando al siguiente hasta rellenar toda la placa, el proceso se vuelve a repetir hasta 3 veces, quedando 3 cortes de tejido en cada pocillo.

Las placas se guardan y se reservan hasta su uso a 4  $^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.4. LOCALIZACIÓN Y DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR INMUNOFLUORESCENCIA

#### 3.2.4-1 FUNDAMENTO

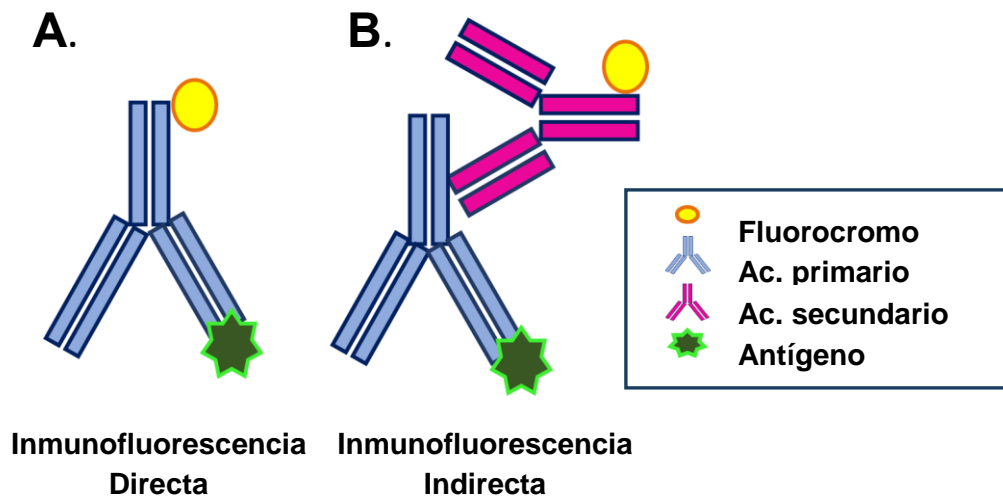
La inmunofluorescencia es una técnica de inmunomarcación de gran utilidad para la detección y localización de estructuras subcelulares a través del uso de anticuerpos (Ac) marcado con fluorocromos.

Es un método muy utilizado en biología molecular, histología, patología y microbiología, que consiste en incubar la muestra con un anticuerpo que detecte la molécula o componente que queramos detectar.

Si este anticuerpo lleva unido una molécula fluorescente, estaremos hablando de *inmunofluorescencia directa*, o bien, si es reconocido por un segundo anticuerpo marcado fluorescentemente, sería el caso de la *inmunofluorescencia indirecta* (Figura MM-9).

Cuando toda la muestra se expone a luz ultravioleta (UV), tendrá una reacción positiva cuando se produzca luminiscencia al observarse al microscopio de inmunofluorescencia. Debido a que, ha existido un acople del anticuerpo a un fluoróforo o a una enzima catalizando una reacción, por la cual, se ha excitado y emitido luz de una longitud de onda específica.

Esta luz es enfocada por la lente del objetivo sobre la muestra y la mayor parte de ella, pasa a través del filtro dicromático del microscopio y no se refleja, a la vez que, un filtro de barrera final bloquea toda la luz residual con la frecuencia de la radiación de excitación, permitiendo que se visualice la imagen (Parra-Medina and Polo 2017, Li, Yu et al. 2018, Salameh, Nouel et al. 2018).



**Figura MM-9.** Esquema representativo de inmunofluorescencia directa (A) e inmunofluorescencia indirecta (B).

Esta técnica, siempre presenta unos pasos claves para su realización, basándose en, fijación; permeabilización; bloqueo e inmunodetección (inmunofluorescencia directa o indirecta).

- **La fijación**, pretende preservar la localización, composición y estructura del material biológico a analizar, manteniendo lo más fielmente posible la situación que existe *in vivo*.
- **La permeabilización**, permite el ingreso de los anticuerpos a la célula, produciendo poros en las membranas celulares.
- **La función del bloqueo** es impedir interacciones inespecíficas de los anticuerpos con el material biológico a analizar y así reducir el marcaje inespecífico mediante el uso de soluciones proteicas concentradas como albúmina bovina sérica, gelatina de pescado etc.

El anticuerpo primario debe unirse a su epítipo y así detectar la estructura de interés.

- Por último, es muy importante el paso de **inmunodetección**, ya que es el reconocimiento específico y la unión del anticuerpo a otras moléculas llamadas antígenos. Cada antígeno al menos, tiene una región de reconocimiento por el anticuerpo llamado epítipo.

No todos los anticuerpos funcionan de manera óptima en todas las técnicas. A la hora de elegir un anticuerpo para realizar inmunofluorescencia, debemos tener en cuenta, la correcta elección del antígeno que se utilizará en la fase de inmunización.

También, hay que considerar que los anticuerpos se utilizan para teñir secciones de tejidos. El proceso al que se someten estos tejidos (fijadores, formaldehído, embebidos en parafina etc.), suelen alterar la conformación del antígeno e influir en la reactividad. Por todo ello, los antígenos recomendados en este caso son péptidos, proteína recombinante y fragmentos de proteína (Perkel 2016).

No hay que olvidar la influencia que existe en la eficacia según el tipo de anticuerpo que utilizemos.

Un *anticuerpo monoclonal* (aquel que está producido por un único clon de linfocitos, es una población de anticuerpos homogéneos que reconocen el mismo epítipo de un antígeno), posee una fuerza de la señal regular o baja, pero con una especificidad excelente, aunque exista la posibilidad de reacción cruzada.

Mientras que un *anticuerpo policlonal* (obtenidos de diferentes clones de linfocitos cuya población es heterogénea para reconocer distintos epítopos de un mismo antígeno), presenta una excelente señal, junto con una especificidad buena, pero en ocasiones su background es alto (Berry 2017, Li, Yang et al. 2017, Sun, Ip et al. 2017, Yeung, Gabardi et al. 2017).

Aunque el procedimiento es relativamente sencillo, incluyendo los pasos claves, en muchos casos el éxito del ensayo puede depender del correcto ajuste.



### 3.2.4- INMUNODETECCIÓN

Las muestras se depositaron en placas de cristal de 9 pocillos, 5 muestras por cada condición y una slice por pocillo. El método de trabajo siempre fue por flotación de los cortes en el medio.

Se añadió 250  $\mu$ L de buffer borohidruro en cada pocillo 24h a 4°C, siguiendo el protocolo establecido con anterioridad en nuestro laboratorio (Munoz, Estay et al. 2016), así se conseguía eliminar la auto-inmunofluorescencia que presenta el propio tejido.

A continuación, se realizaron 3 lavados con PBS 1x, tras retirar el tampón, se añadió la solución de bloqueo durante 30 minutos a temperatura ambiente (RT).

Pasado el tiempo, se incubó 200  $\mu$ L/pocillo de anticuerpo primario a 4°C overnight. La tabla MM-9 muestra las diluciones de los anticuerpos utilizados en este estudio. Todos los anticuerpos se encontraban diluidos en solución de bloqueo.

Tras 5 lavados de 5 minutos cada uno con PBS 1x filtrado, las muestras se incubaron con 200  $\mu$ L de anticuerpo secundario apropiado, durante 2 h en oscuridad a RT.

Después de 3 lavados con PBS 1x de 10 minutos en agitación suave, se añadió Hoechst (Sigma-Aldrich, Ref.33258) para teñir los núcleos, a dilución 1:1000 durante 10 minutos en continuo movimiento a RT.

Seguido de 5 lavados de 10 minutos con PBS1x a RT. Se añadió medio de montaje (Fluoroshield, Sigma-Aldrich), se colocó el cubreobjetos y se selló con esmalte de uñas. La visualización del marcaje se realizó con microscopio confocal.

### ANTICUERPOS PRIMARIOS

Antígeno	Referencia	Especie de origen	Dilución	Casa comercial
<b>Prolactina de rata (PRL)</b>	ab19386	Conejo (Monoclonal)	1:100	Abcam
<b>MAP2</b>	M4403	Ratón ( Monoclonal)	1:400	Merck
<b>Receptor de PRL (RPRL)</b>	Ab170935	Conejo (Monoclonal)	1:250	Abcam
<b>Biotina</b>	M0743	Ratón (Monoclonal)	1:300	Dako

### ANTICUERPOS SECUNDARIOS

Antígeno	Referencia	Especie de origen	Dilución	Casa comercial
<b>Alexa Fluor 488</b>	ab150077	Cabra anti-conejo	1:400	Abcam
<b>Alexa Fluor 647</b>	ab150115	Cabra anti-ratón	1:400	Abcam
<b>Alexa Fluor 488</b>	ab150113	Cabra anti-ratón	1:600	Abcam
<b>Cy3</b>	Ab6939	Cabra anti-conejo	1:1000	Abcam

**Tabla MM-9.** Anticuerpos utilizados para la realización del estudio Inmunohistoquímico.

#### SOLUCIONES UTILIZADAS:

- **Buffer Borohidruro:** Suero de burro al 10% (p/v), Tritón X-100 al 20% (p/v) (Surfact-Amps™ ,ThermoFisher Scientific), Borohidruro de sodio al 0.1% (p/v) (BH<sub>4</sub>Na, TNJ® Chemical Industry), PBS1x.
- **Solución de bloqueo:** Suero de burro al 10% (p/v), Tritón X-100 al 20% (p/v), PBS1x.

### **3.2.5. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOTTING**

#### **3.2.5-1 FUNDAMENTO**

El Western blotting, Inmunotransferencia o Inmunoblot, es una técnica analítica, rápida y muy sensible, utilizada para localizar una proteína en una muestra que contiene varias proteínas.

Este método, permite separar las proteínas bajo un campo eléctrico. Las proteínas de interés se separan mediante electroforesis en gel en función de su peso molecular.

Después, son transferidas a una membrana adsorbente (típicamente de nitrocelulosa o de PVDF), para poder detectarlas con anticuerpos específicos contra ella.

Finalmente, se identifica la unión antígeno-anticuerpo específicos por actividad enzimática o por fluorescencia entre otros métodos.

Así, se podrá estudiar la presencia de la proteína de nuestro estudio en el extracto y analizar la cantidad relativa en la muestra respecto a otras proteínas (Towbin, Staehelin et al. 1992, MacPhee 2010, Hnasko and Hnasko 2015).

#### **3.2.5-2 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS**

##### **HOMOGENIZADO DE TEJIDO CEREBRAL DE RATA**

Tras el sacrificio por decapitación del animal y haber extraído los hipocampos. Los fragmentos de tejido cerebral (entre 50-60 mg) almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$ , son procesados como un pool.

A cada muestra, se le adiciona 5 volúmenes de buffer de homogenización o lisis. Además, a este buffer de homogenización se le suplementa con un cóctel de inhibidores de proteasas al 1% (v/v) (leupeptina:pepstatina)(Thermo Fisher Scientific).

Al cóctel, se le suma un contenido de BAPTA 10% (Invitrogen), por ser un quelante muy permeable en las células y altamente selectivo para  $\text{Ca}^{2+}$  (EDTA y

EGTA), su unión a metales es menos sensible a cambios en el pH y nos permite ver el receptor de nuestra proteína de estudio (Galloway, Alemán et al. 2003).

Se extrae el tejido cerebral (hipocampo) almacenados en el  $-80^{\circ}\text{C}$ , se mantiene en un recipiente con nitrógeno líquido y se homogeniza con un douncer vidrio-teflón durante 30 pasadas con descanso de 30 segundos en hielo cada 10 pases o con un politron durante 1 min a mínima potencia a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Se traspasa el homogenizado a un tubo eppendorf y se sónica 4 veces por 20 segundos con intervalos de 10 segundos manteniéndolos en hielo, para evitar que el tubo se caliente y se rompa la cadena de frío.

Seguido, se incuba el tubo eppendorf en hielo durante 10 minutos. Si se observasen fragmentos insolubles, sería necesario centrifugar 20 minutos a 4000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$ .

A continuación, se alicuotó, se congela en nitrógeno líquido, almacenándose a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

#### **SOLUCIONES UTILIZADAS:**

- **Buffer de homogenización o lisis:** 20 mM MOPS-Tris pH 7.0, 0.3M Sacarosa, 2mM EDTA, 2 mM EGTA, 1% NP-40, 0.1% SDS (Merck, Sigma-Aldrich, WWR International Eurolab).
- **BAPTA:** El Bapta se disuelve en 0.3N  $\text{NaHCO}_3$  (Scharlau Chemical).
- **Buffer MOPS-Tris pH 7.0:** A este buffer de lisis se le añade PMSF (etanol/isopropanol) 100 mM,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  200 mM, NaF 0.5M,  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  100 mM (Merck, Sigma-Aldrich).

#### **DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS**

Debido al uso de BAPTA, la concentración de proteínas de las muestras se determinó mediante el método de turbidimetría ácido sulfosalicílico.

Las muestras de homogenizado se diluyeron 1:4 con buffer de lisis. Una vez diluidas, se agregó 3  $\mu\text{L}$ /pocillo de cada muestra en una placa de Elisa de 96

pocillos, se añadió 100  $\mu\text{L}$  ácido sulfosalicílico al 5% y se completó con agua destilada hasta obtener un volumen final de 150  $\mu\text{L}$ .

Se agitó suavemente y se dejó en reposo durante 5 min. Transcurrido ese tiempo se procedió a la lectura espectrométrica de la absorbancia a una longitud de onda de 420 nm.

Para calcular la concentración de proteínas presente en las muestras, se elaboró una recta patrón utilizando una solución madre de BSA con un rango de concentración final de 5, 10, 20, 40 y 80  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

La concentración final de proteínas, una vez tenidas en cuenta las diluciones realizadas, se expresó en  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

### **3.2.5-3 ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE EN GEL DE POLICRILAMIDA**

#### **PREPARACIÓN DE LOS GELES**

La electroforesis vertical se llevó a cabo en geles de poliacrilamina. Estos geles, poseen dos concentraciones diferentes de acrilamida en Tris-acetato: el tercio inferior al 15% y los dos tercios superiores al 4.5%. No se usa gel concentrador o stacking en este caso. Se utilizan este tipo de geles porque nos permiten localizar proteínas de alto peso molecular.

Para preparar los geles de 15% y 4,5% de 1 mm de espesor, se mezclaron buffer acetato 4x, acrilamida 30% (p/v), glicerol 87% (p/v), TEMED, persulfato de amonio (APS) 10% (p/v) y agua destilada (AppliChem, Bio-Rad, Invitrogen, Merck, Sigma-Aldrich). Las cantidades de los productos según el requerimiento de la concentración del gel.

La mezcla del gel de 15% se depositó en el soporte previamente montado del sistema "Mini-Protean II Cell" y se dejó polimerizar durante aproximadamente 1h a temperatura ambiente.

Se protegió del aire añadiendo isopropanol (Merck) o agua para cubrir la acrilamida una vez vertida entre los cristales.

Una vez polimerizado el gel, se retiró el isopropanol y la superficie del gel en contacto con el aire se lavó con agua destilada. Se prepara el gel de 4.5% y se vertió sobre el de 15%, se introdujo el peine separador de carriles, evitando crear burbujas, según el número de muestras que se deseara cargar en él.

Se dejó polimerizar a RT durante 30 min.

#### **SOLUCIONES UTILIZADAS:**

- **Buffer acetato 4x:** Tris-Base (Trishidroximetil aminometano, Trizma®) 0.5M, Ácido acético glacial 2.5% (p/v) pH 7.0, completar con agua hasta el volumen requerido (Merck, Sigma-Aldrich).
- **Solución de Acrilamida 30%:** Acrilamida 29% (Sigma-Aldrich A8887), bis-acrilamida 1% (Sigma-Aldrich M7279).

#### **PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS**

La concentración de proteínas de las muestras se había determinado por el método del ácido sulfosalicílico (apartado 3.2.5-2).

Las muestras se trataron añadiendo un volumen de buffer de carga 2x (SB2x), más DTT (ditiotreitól) que se incorpora en el momento. Se incubaron durante 3 min en un baño maría.

Los lisados proteicos se cargan en las calles del gel, 40 µg por calle.

El SDS se encarga de desnaturalizar la proteína en su estructura primaria y la recubre de cargas negativas, a la vez que el DTT es un agente reductor que rompe los puentes disulfuro.

Todo ello, permite que las proteínas se separen en función del peso molecular, a la vez que la reducción y la desnaturalización permiten la accesibilidad del anticuerpo a su sitio de unión.

**SOLUCIONES UTILIZADAS:**

- **Buffer de carga 2x (SB2x):** 0.125M Tris-HCl pH 6.8, SDS al 4.6% (p/v), 0.5M EDTA, 0.05 volúmenes de glicerol y azul de bromofenol al 4%. (Merck, Sigma-Aldrich).

**CONDICIONES DE LA ELECTROFORESIS Y DE LA TRANSFERENCIA**

Se realizó la electroforesis, en una cubeta con tampón de migración Tris-Tricina (Buffer para electroforesis 1x, a partir del 10x), a una corriente constante de 10 mA para el comienzo, incrementándose a 20 mA según va transcurriendo el proceso, aproximadamente 2h.

La transferencia de las proteínas a la membrana de PVDF (Milipore ISEQ0010) se realizó utilizando un equipo de transferencia Trans-Blot Turbo (Bio-Rad), siguiendo las especificaciones del fabricante (Tutorial: <https://youtube.com/watch?v=isr1ZQKWUQU>), mediante el método de cassette sumergido con tampón de transferencia 1x (a partir del 10x).

El montaje de la membrana en la cubeta de transferencia es en forma de sándwiches (esponja; papel filtro; membrana activada con etanol; gel; papel de filtro: esponja).

Para comprobar que las proteínas se encontraban en la membrana tras la transferencia, ésta se tiñó con el colorante rojo ponceau durante 5 min. Esta tinción también permite valorar la carga de proteínas en cada calle.

**SOLUCIONES UTILIZADAS:**

- **Buffer de electroforesis 1x:** 50 mM Tris, 50 mM Tricina (US Biological T8400), SDS 1% (p/v) pH 8.5
- **Buffer transferencia 1x:** 12.5 mM Tricina, 12.5 mM Bis Tris Propano (Sigma, B6755), 1mM EDTA, Metanol 10% (p/v) pH 8.2-8.5
- **Rojo ponceau:** 0.1% (p/v) en ácido acético al 5%

### 3.2.5-4 INMUNODETECCIÓN

La membrana se sometió a diferentes procedimientos a temperatura ambiente. El primer paso, fue la realización de bloqueo durante 1h con leche descremada al 5% (p/v) en TBS-Tween 0.2% (p/v) (TBS-T), en continua agitación.

Acto seguido se lavó la membrana con TBS-T en agitación durante 5 min, y se incubó durante 2h con el anticuerpo primario correspondiente, también en agitación continua.

Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios diluidos en leche descremada al 1% (p/v) en PBS-T (Tabla MM-10).

ANTICUERPOS PRIMARIOS				
Antígeno	Referencia	Especie de origen	Dilución	Casa comercial
<b>Prolactina (PRL)</b>	ab183967	Conejo (Monoclonal)	1:1000	Abcam
<b><math>\beta</math>-actina</b>	A5316	Ratón (Monoclonal)	1:5000	Sigma-Aldrich
ANTICUERPOS SECUNDARIOS				
Antígeno	Referencia	Especie de origen	Dilución	Casa comercial
<b>Anti-conejo IgG HRP</b>	211-032-171	Ratón anti-conejo	1:5000	Jackson ImmunoResearch
<b>Anti-ratón IgG HRP</b>	115-035-174	Cabra anti-ratón	1:5000	Jackson ImmunoResearch

**Tabla MM-10.** Anticuerpos utilizados para la detección de proteínas por Western blot. (IgG, Inmunoglobulina G; HRP, peroxidasa de rábano picante).



Tras lavar la membrana con TBS-T (4 lavados de 15 min, en agitación), se incubó durante 2h en agitación con el anticuerpo secundario adecuado (Tabla MM-9) marcado con peroxidasa y diluido en leche descremada al 5% (p/v) en TBS-T según las indicaciones del proveedor.

A continuación, se procedió de nuevo a 3 lavados de la membrana en TBS-T de 10 min cada uno y se procedió a la detección mediante quimioluminiscencia, se incubó la membrana durante 1 min, sin agitación, con los reactivos comerciales de detección ECL 1 y 2 mezclados a partes iguales (volumen requerido, 0.125 mL/cm<sup>2</sup>) (RPN2019, Sigma-Aldrich).

Se eliminó el exceso de reactivos 1+2, se envolvió la membrana en papel de plástico y se analizó con el equipo de análisis de imagen (LAS-4000 Luminiscence Image Analyzer, FujiFilm®), procesando las imágenes con su programa específico (Image Reader LAS-4000, FujiFilm®).

Al finalizar se realizaron un par de lavados con TBS-T, y se almacenaron a 4°C.

Las imágenes obtenidas tras el revelado fueron procesadas con el programa Image Lab 5.2.1 (BioRad), donde se igualaron los niveles de grises para una correcta interpretación.

El propio programa hacía dos tipos de mediciones. Por un lado, midió el área de las bandas (píxeles<sup>2</sup>) y, por otro, su intensidad mediante una escala de grises, ajustando estas variables a su respectivo control de carga ( $\beta$ -actina).

### **3.2.6. CUANTIFICACIÓN Y LOCALIZACIÓN DE LOS NIVELES DE ARNm POR HIBRIDACIÓN “In Situ”**

#### **3.2.6-1 FUNDAMENTO**

La técnica de hibridación *in situ* es un método que permite detectar secuencias de ácidos nucleicos en células, cromosomas o tejidos preservados. Se realiza directamente sobre el tejido, situado en un soporte sólido que generalmente es un portaobjetos. Su visualización puede realizarse por medios

isotópicos, enzimáticos o con fluorescencia, siendo evaluada en un microscopio en los dos últimos casos.

La detección *in situ* deja percibir una localización espacial directa de secuencias génicas específicas. Así, su objetivo es determinar la presencia o ausencia de secuencias de ADN o ARN de interés (Neumann and Eggers 1988).

El fundamento principal de esta técnica se encuentra basada en la complementariedad de los ácidos nucleicos (ADN o ARN), a través de puentes de hidrógenos que se forman entre las bases: adenina-timina (ADN) o uracilo (ARN) y citosina-guanina (en ADN como en ARN).

Este apareamiento da lugar a una doble cadena en la cual una de ellas tiene la orientación opuesta a la otra con respecto al esqueleto azúcar-fosfato. La secuencia es leída de 5' a 3'.

Por lo tanto, este método parte de dos moléculas de ácidos nucleicos, una homogénea de secuencia conocida que actúa como sonda y la otra heterogénea de secuencia desconocida, la cual contiene la secuencia diana que se quiere detectar. Una de las dos cadenas debe de estar marcada.

Si se marca la sonda, la hibridación es estándar. Por el contrario, si se está marcada la molécula diana, la hibridación es reversa (Nouri-Aria 2008, Jensen 2014).

La hibridación *in situ* fluorescente (FISH), es una técnica que emplea sondas de oligonucleótidos marcadas con fluorocromos, las cuales van dirigidas hacia secuencias específicas del ácido ribonucleico (ARN), lo que permite la identificación rápida y específica de éste (Neil and Mowry 2018, Yoshimoto, Ludkovski et al. 2018).

### **3.2.6-2 DISEÑO DE SONDAS TaqMan®**

Se diseñaron oligonucleótidos sondas TaqMan con el programa OligoAnalyzer 3.1 (<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/Oligoanalyzer>) (Integrated DNA Technologies, Coralville, EE.UU.). Su especificidad se chequeó con el programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) para evitar que la sonda se una a alguna

otra cadena con la misma secuencia que no sea objeto de estudio (Altschul, Madden et al. 1997). El programa busca cebadores teniendo en cuenta:

- La especificidad, la sensibilidad, la facilidad de la sonda para penetrar en los tejidos, aplicación y la reproducibilidad del método.
- El tamaño óptimo de la sonda es entre 50-150 pb.
- Mantener el contenido de G-C en el rango de 20-80 %.
- Evitar varios nucleótidos idénticos seguidos, especialmente guaninas (<4G).
- La temperatura de desnaturalización debe de estar entre 58-60 °C.
- Los últimos cinco nucleótidos en el extremo 3' no deben tener más de 2 G y/o C.

El primer paso fue diseñar la cadena sencilla de nucleótidos específicos o sonda específica marcada con biotina, complementaria al ARN mensajero que codifica la proteína de interés. Se diseñó el oligonucleótido sonda (sonda anti-sense), teniendo en cuenta la cadena de ribonucleótidos del ARN mensajero. A continuación, se creó la cadena complementaria (sonda sense), que servirá como control negativo (Tabla MM-11).

**Tabla MM-11.** Secuencia de las sondas para Hibridación *in situ* de PRL rata

Sonda	Secuencia (5'-3')
<b>Anti-sense</b>	CTCAGTTCCATCCAGGCAGATTCAGGC
<b>Sense</b>	GCCTGAATCTGCCTGGATGGAAGTGG

Una vez diseñadas las sondas, éstas fueron suministradas liofilizadas por la casa comercial (Sigma-Aldrich). Antes de su uso, se solubilizaron en agua ultrapura y se valoraron por espectrofotometría UV a una longitud de onda de 260 nm.

### 3.2.6-3 INMUNODETECCIÓN

Las muestras ya cortadas por el microtomo se depositaron con sumo cuidado en portaobjetos, ayudándonos de un pincel.

El primer paso para llevar a cabo la hibridación *in situ*, fue tratar los cortes con paraformaldehído 4% PBS 0.1M (Panreac Química SA), pH 7.4 durante 30 min a 39 °C para la fijación, seguido se hizo un lavado de 10 min con PBS 0.1M, pH7.4 a RT.

Las muestras fueron tratadas con tampón acetilado a RT por 10 min para evitar enlaces no específicos de la sonda con grupos amino cargados positivamente.

A continuación, se realizaron 3 lavados en agua con DEPC 70 µM (Diethyl pirocarbonato, Sigma) para eliminar restos de tampón acetilado.

Las muestras se dejaron secar en estufa a 39°C durante aproximadamente 1 hora, teniendo en cuenta que la humedad en el tejido debía desaparecer por completo.

Una vez seca, las muestras se incubaron en buffer de hibridación (OmniBuff, WAK-Chemie®) durante 1 hora en estufa a 39°C.

Transcurrido este tiempo, se añadió la sonda anti-sense teniendo en cuenta una concentración final de 25 ng/µL de buffer de hibridación. Las muestras se hibridaron con la sonda en un termociclador durante 24 horas a 55 °C.

Posteriormente, se realizaron los lavados astringentes para eliminar los restos de sondas inespecíficas.

En primer lugar, se lavaron los portaobjetos con tampón citrato sódico (SSC) 4x durante 10 min a 30 °C, seguido de otros lavados de 5 min cada uno a RT en SSC de concentraciones decrecientes (2x; 1x; 0.5x y 0.1x), para finalizar con agua destilada y con una serie de tratamientos de 3 min en alcoholes, etanol 70%, 96%, 100%,96% y 70%, todo ello a temperatura ambiente.

De nuevo, las muestras se sometieron a 3 lavados de 5 min cada uno con agua destilada, seguido de un lavado con tampón TrisEDTA salino con

ribonucleasas durante 30 min a 39°C. Después de esto, se realizaron 2 lavados con tampón TBS 0.05x de 5min cada uno a RT.

A partir de este punto, el proceso y fundamento fue similar al de la inmunohistoquímica.

Se bloquearon las inmunoglobulinas endógenas del tejido con suero de cerdo no inmune (1:30 en TBS 0.05x) durante 30 min a RT.

Tras eliminar el suero de cerdo, las muestras se incubaron con anticuerpo primario anti-biotina (Tabla MM-8) durante 24 h a 4 °C.

Después de los lavados con TBS 0.05x, se añadió el anticuerpo secundario correspondiente durante 60 min a RT, acto seguido se llevó a cabo 2 lavados de 5 min con agua destilada.

Se añadió Hematoxilina de Mayer para poder visualizar los núcleos, se volvieron a lavar con agua destilada y se comenzó a realizar el montaje de los portas con Fluoroshield, colocando el cubreobjetos y sellándolo con esmalte de uñas.

La visualización del marcaje se realizó con microscopio de fluorescencia.

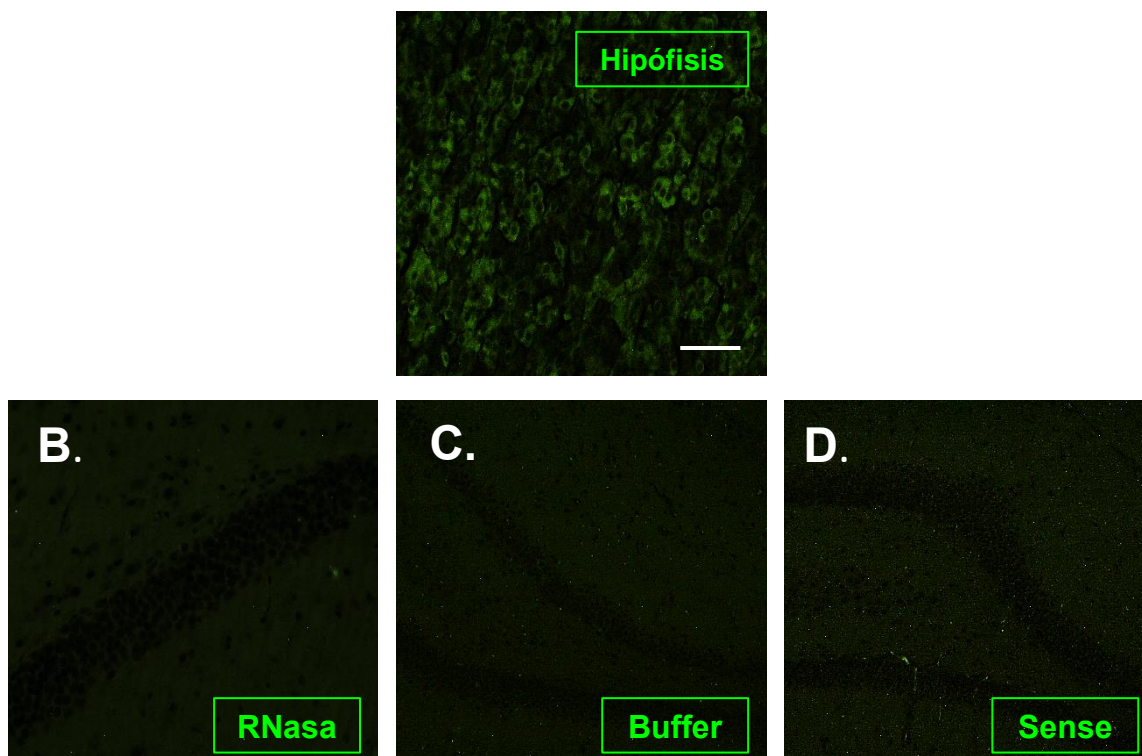
Para saber que la técnica de hidridación *in situ* está realizada correctamente, se hicieron tres controles de la misma (Figura MM-12).

En todos ellos, no debía observarse fluorescencia en ningún caso, así, otorgamos a la prueba como correcta.

El primer control, fue tratar a la muestra previamente con tampón citrato sódico 2x con RNasa A al 1% durante 5 horas a 37 °C, antes de realizar la hibridación con la sonda anti-sense, después se siguió desarrollando el protocolo.

El siguiente control fue seleccionar otra muestra de estudio, a la que se sustituyó la sonda anti-sense por buffer de hibridación, continuando el protocolo.

Por último, en otra muestra, se utilizó la sonda sense en lugar de la antisense.



**Figura MM-12.** Imágenes de GD a microscopio de fluorescencia de los controles de la técnica de hibridación *in situ* para la localización del ARNm de PRL. (A) control positivo de hipófisis de rata referente a la inmunofluorescencia, (B) Muestra tratada previamente con RNasa A, (C) Sustitución de la sonda anti-sense por buffer de hibridación (D) Hibridación realizada con la sustitución de la sonda anti-sense por la sonda sense. La barra de escala representa una distancia de 20  $\mu\text{m}$ .

#### **SOLUCIONES UTILIZADAS:**

- **Tampón acetilado:** Trietanolamina 1.5% (p/v), anhídrido acético 25 mM, DEPC 70  $\mu\text{M}$ , NaCl 0.9% (p/v), en agua destilada, pH 7.5 (Sigma).
- **Tampón citrato sódico (SSC) 20x:** NaCl 0.6M,  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  0.007M, DEPC 1.5 mM, en agua destilada, disolver y autoclavar.
- **TrisEDTA salino para RNasa:** NaCl 0.5M, Trizma Base 15.5 mM, EDTA 1mM, RNasa A al 2% (Roche®), en agua destilada, pH 8.0

- **Solución TBS 0.05x:** Trizma base 0.5M, NaCl 9% en agua destilada, pH 7.4
- **Hematoxilina de Mayer:** Hematoxilina 1g (Merck), NaIO<sub>3</sub> 0.2 g (Merck), alumbre potásico o amónico 50 g (Panreac), ácido cítrico 1 g (Sigma), hidrato cloral 50 g (Scharlau), añadir 1L de agua

### **3.2.7. DOBLE MARCAJE PARA LA CUANTIFICACIÓN Y LOCALIZACIÓN DE LOS NIVELES DE ARNm POR HIBRIDACIÓN “*In Situ*” Y LA DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR INMUNOFLUORESCENCIA**

Basándonos en el fundamento para la detección de proteínas por inmunofluorescencia y la técnica de hibridación *in situ*, se combinaron ambos métodos para poder determinar y localizar el ARNm y la posición de proteínas de nuestro estudio en una misma muestra.

Con ello, podemos determinar si existe relación entre ellas o hacer otros estudios.

El primer paso a seguir fue la realización de la hibridación *in situ*, siguiendo el protocolo establecido en el punto 3.2.6-3.

Las muestras cortadas se depositaron en unos portaobjetos, fijamos, se trataron con tampón acetilado, se hicieron los lavados correspondientes, se secaron en estufa y se hibridó con la sonda correspondiente.

Tras los lavados con tampón trisEDTA salino con ribonucleasas, se comenzó la realización de la técnica de inmunofluorescencia, con modificaciones del protocolo establecido en el apartado 3.2.4-2, ya que las slices no se encuentran en flotación sino fijadas en los portas.

Se llevó a cabo un bloqueo con suero de cerdo no inmune y acto seguido se incubaron los anticuerpos primarios tanto anti-biotina como el anticuerpo

correspondiente para la detección de la proteína de estudio, la incubación se realizó durante 24 h a 4 °C.

Pasado ese periodo, se hicieron 2 lavados de 5 min con TBS 0.05x a RT y se procedió a la incubación de los anticuerpos secundarios a lo largo de 60 min a temperatura ambiente.

Después de esto, se realizaron 2 lavados con agua de 5 min cada uno y se utilizó hematoxilina de Mayer para poder visualizar los núcleos.

Por último, se montaron los portaobjetos con un medio de montaje para fluorescencia y se sellaron los cubres con pintañas.

### **3.2.8. TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS**

#### **3.2.8-1 ANÁLISIS DE LAS IMÁGENES**

Para el análisis de las imágenes se determinó el grado de intensidad de reacción con el programa ImageJ.

El primer paso fue definir los parámetros base que se aplicarían a todas las imágenes para seleccionar las zonas consideradas reactivas. Teniendo en cuenta el método de revelado utilizado, a través de la herramienta Threshold Color especificamos la región positiva mediante tres parámetros:

- ✦ Hue (tono de color) entre 0 y 30.
- ✦ Saturation (saturación) entre 0 y 255.
- ✦ Brightness (brillo) entre 0 y 100.

De esta manera, sólo se seleccionaban las zonas marcadas de color pardo, indicando la región considerada positiva. Siguiendo este protocolo, se analizó el resto de las imágenes, midiendo el área reactiva ( $\mu\text{m}^2$ ) y el gris medio (escala entre 0, representando el negro absoluto, y 255, indicando el blanco absoluto), para después comparar los diferentes grupos del estudio.

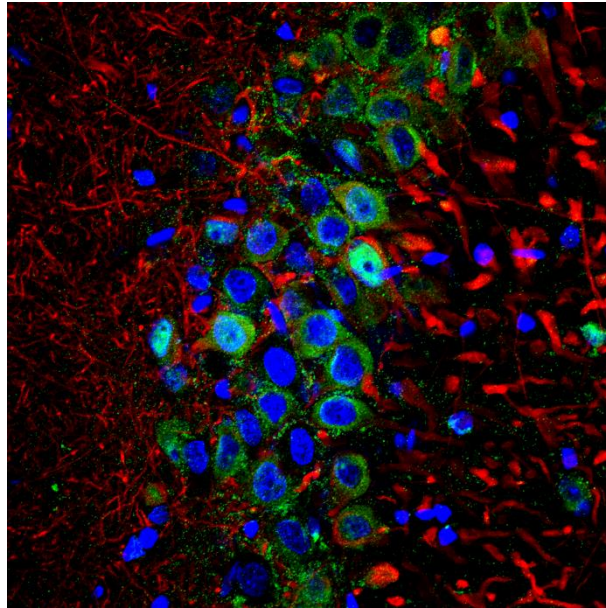


Así, tendríamos valores como la intensidad de fluorescencia, porcentaje de área reactiva (%), número de moléculas por área total ( $\text{pix}^2$ ) si asumimos arbitrariamente que 1 molécula son 9  $\text{pixeles}^2$  y el gris medio (UA).

### **3.2.8-2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Para la expresión de los resultados se ha calculado la media y el error estándar de la media (EEM). Para calcular la significación estadística de las diferencias al comparar dos medias se utilizó el test de la t de Student de valores apareados o no apareados, según el caso.

Para las comparaciones entre varios grupos se utilizó el test de comparaciones múltiples de Bonferroni o el de Tukey por ANOVA.



*“Lo que puede el sentimiento, no lo ha podido el saber, ni el más claro proceder, ni el más ancho pensamiento”*

Violeta Parra

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN



## 4.1. DETERMINACIÓN DE LA CONDUCTA, APRENDIZAJE Y MEMORIA

### 4.1.1 CONDUCTA DE LOS ANIMALES EN NADO LIBRE Y EN PLATAFORMA INVISIBLE REMOVIDA

Para evaluar la capacidad sensitivo-motora, las deficiencias cognitivas y la inexistencia de impedimentos emocionales por parte de los animales, para llevar a cabo el aprendizaje y memoria.

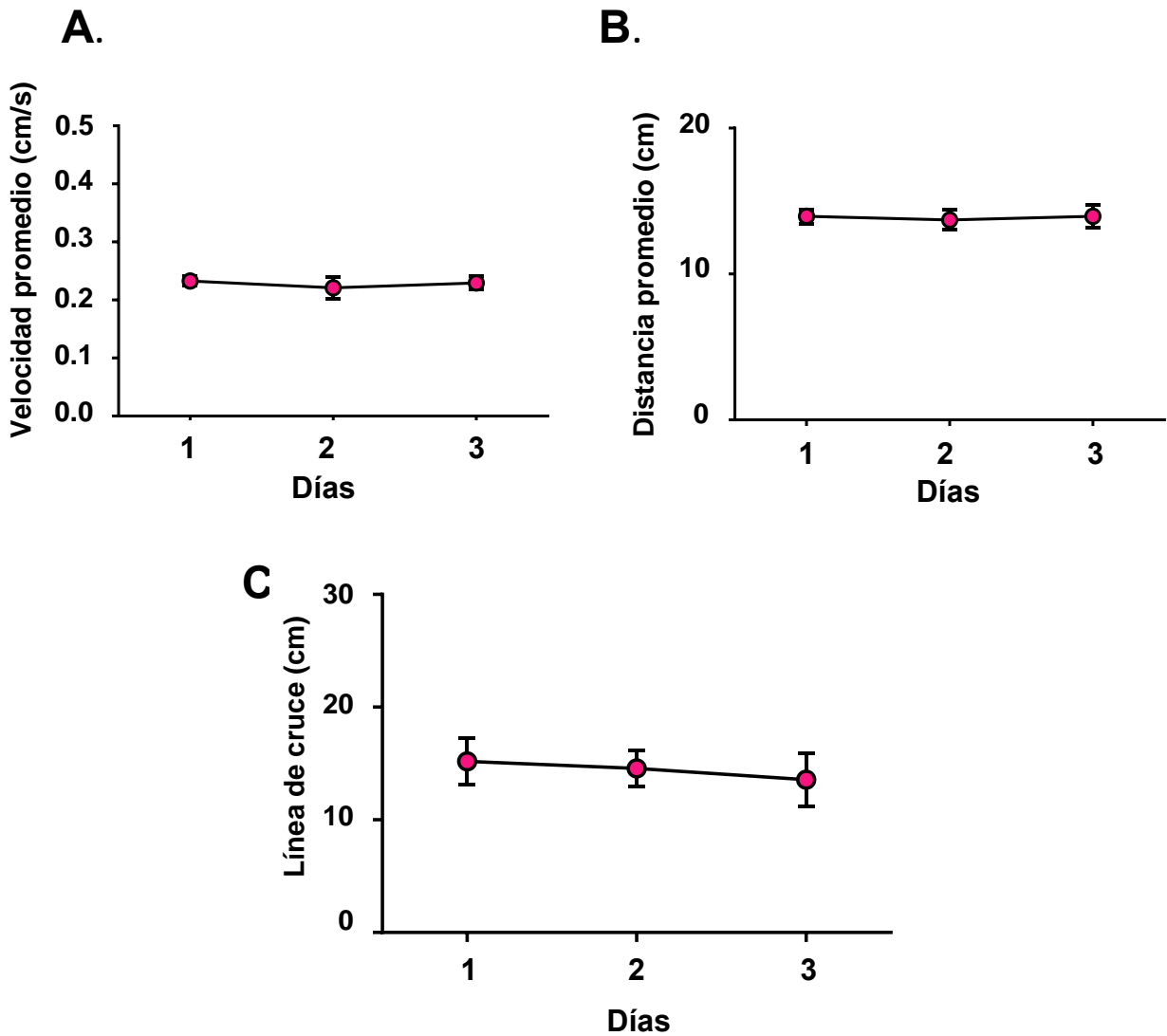
Se analizó, la velocidad media (cm/s) de los individuos en el MWM; la distancia media recorrida (cm) y la línea de cruce (cm), y el tiempo de permanencia en la periferia y en el centro (Tabla RD-1).

Las ratas machos que han desempeñado esta función se denominaron control nado libre (Ctr NL), fueron sometidas a 3 sesiones por día durante 3 días.

Los resultados obtenidos en este grupo de animales, se resume en la Tabla RD-1 y las gráficas de la Figura RD-1.

Control Nado Libre			
PARÁMETROS	Día 1	Día 2	Día 3
Velocidad promedio (cm/s)	0.23 ± 0.01	0.22 ± 0.02	0.23 ± 0.01
Distancia promedio (cm)	13.95 ± 0.53	13.71 ± 0.75	13.96 ± 0.80
Línea de cruce (cm)	15.19 ± 2.22	14.57 ± 1.70	13.57 ± 2.54
Permanencia en periferia (s)	47.53 ± 1.95	46.67 ± 3.25	41.54 ± 3.41
Permanencia en el centro (s)	9.9 ± 1.97	12.37 ± 2.13	19.05 ± 3.94

**Tabla RD-1.** Análisis de la capacidad sensorio-motora de las ratas machos controles NL. Todos los valores fueron expresados como la media ± EEM.



**Figura RD-1.** Análisis de la capacidad sensitivo-motora en ratas machos control NL. Durante 3 días se sometieron a 3 sesiones de natación diarias en el MWM sin plataforma, la duración de cada sesión fue de 60 segundos con un tiempo de descanso de 20 minutos entre las diferentes sesiones. Como indicadores de la actividad motora de dichos animales (A) velocidad promedio medida en cm/s; (B) distancia promedio de la nadada en cm; (C) línea de cruce (cm). Los valores se determinaron con ANOVA, representan la media  $\pm$  EEM de  $n= 10$  animales, no se observan diferentes significativas en ninguno de los tres parámetros medidos.

La velocidad promedio (cm/s) llevada a cabo por los animales (Figura RD-1A) se mantuvo constante a lo largo de los 3 días de duración del test ( $0.23 \pm 0.01$ ).

Como era de esperar, la distancia media recorrida (cm) por los mismos animales (Figura RD-1B) también, se mantiene constante, a lo largo de los días de nado ( $13.95 \pm 0.53$ ). Signos que han aportado la idea de que no existe ningún problema locomotor en los animales del estudio.

La línea de cruzamiento (cm) (Figura RD-1C), aunque se mantuvo constante durante el tiempo, se observó una leve disminución de la misma a lo largo del día 2 ( $14.57 \pm 1.70$ ), siendo más pronunciada en el día 3 ( $13.57 \pm 2.54$ ).

Datos que reflejaron que los animales ya se habían acostumbrado al medio y estaban preparados para la siguiente fase, el aprendizaje.

Estos tres parámetros, revelaron la inexistencia de deficiencias sensitivo-motoras significativas o déficits motivacionales.

Otra señal para medir la salud de nuestros sujetos experimentales, fue el tiempo de permanencia (s), tanto en la periferia como en el centro. Es decir, debíamos de considerar la tigmotaxis\* (Van Dam, Lenders et al. 2006).

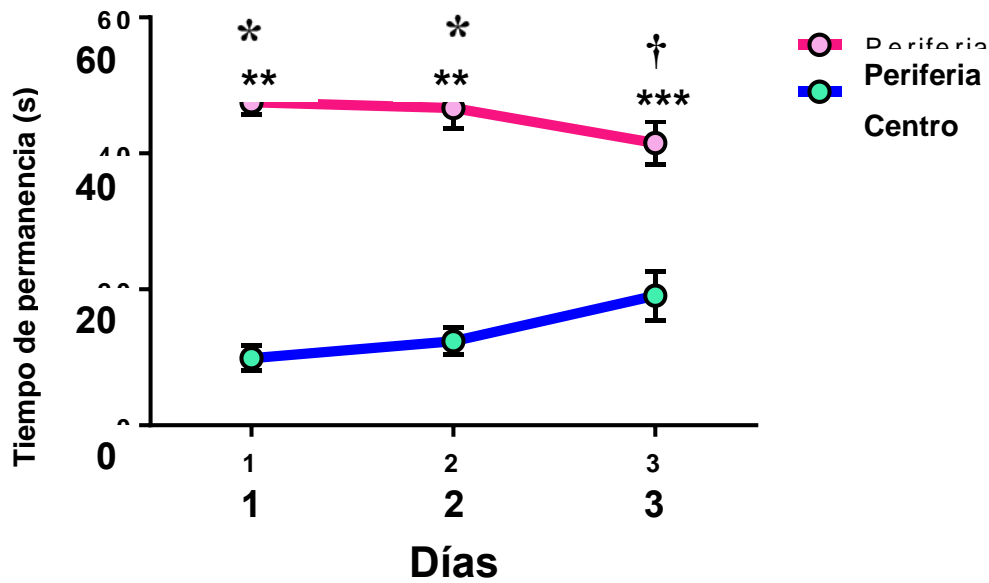
Las ratas del estudio, nadaban libremente a lo largo de todo el MWM sin plataforma, durante los 60 segundos que duró la sesión.

Se ha descrito que el nado por parte del individuo en las inmediaciones de la periferia era un signo de estrés y ansiedad para el animal (Francis, Zaharia et al. 1995). Mientras que el acercamiento al centro de la piscina se consideraba como una adaptación correcta de percepción hacia el medio donde se desarrolla el test.

Parámetros conductuales que se han tomado como prueba para la validación sensitivo-motriz y una adecuada función cognitiva, desde el inicio de los ensayos hasta el final. Asegurándonos, que no existen daños que puedan influir en la capacidad de adquisición en la formación de memoria y aprendizaje por parte de nuestros individuos de estudio.

No existiendo déficit en los procesos sensoriales, motores, acústicos, motivacionales y de recuperación (McNamara and Skelton 1993).

\***Tigmotaxis.** Comportamiento de búsqueda de pared o la predilección a permanecer en contacto cercano con la pared de MWM debido a una tendencia subyacente a evitar lugares abiertos, desconocidos y potencialmente peligrosos.



**Figura RD-2.** Evolución temporal del tiempo de permanencia medido en segundos de las ratas machos control NL. En azul, se representó el tiempo que perduró el animal en el centro de la piscina; en rosa, se visualizó el tiempo que permaneció en la periferia durante el nado. Los valores corresponden a la media  $\pm$  EEM de  $n = 10$  animales en 3 sesiones por día para cada animal. Fueron analizados por ANOVA, mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni respecto a la permanencia en el centro (\*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$ ).

Como se esperaba, la evolución en el tiempo de permanencia (s) (Figura RD-2) por parte de los individuos, fue diferente si nos referíamos a la periferia o al centro.

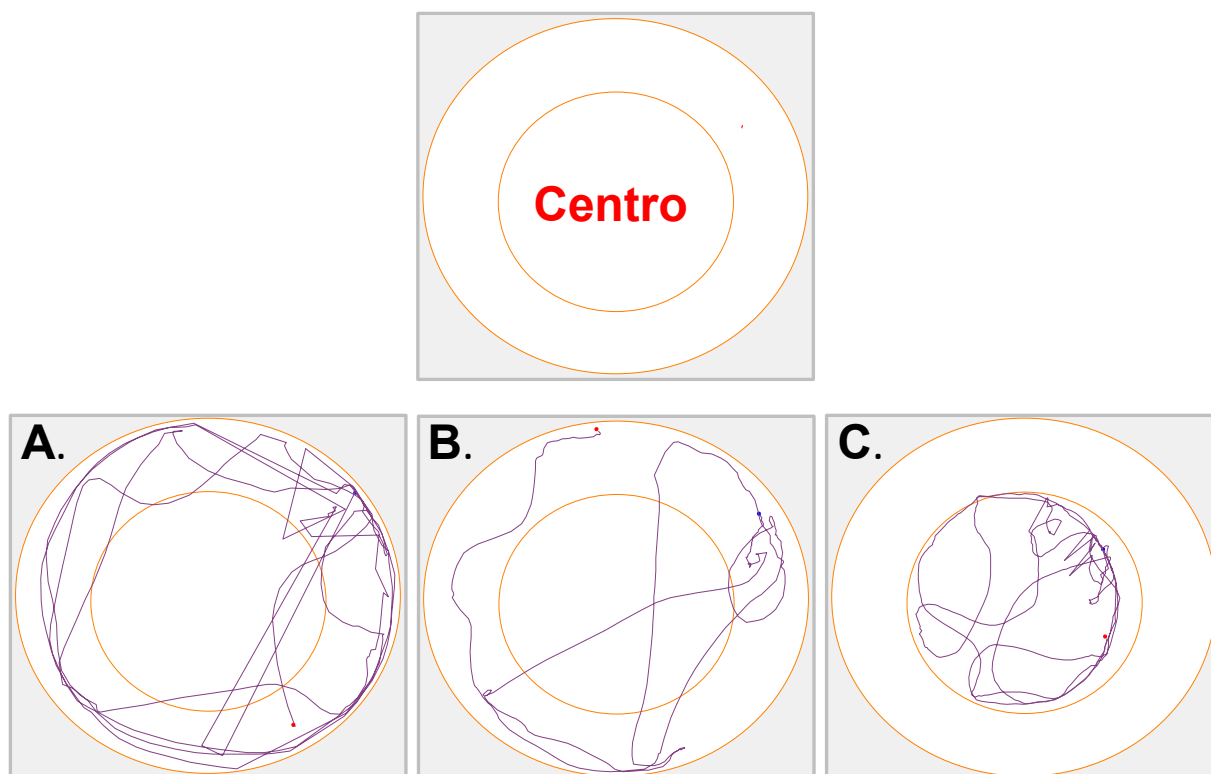
En el primer día de nado, el animal se encontró significativamente (\*\* $p < 0.001$ ) mucho más tiempo en la periferia ( $47.53 \pm 1.95$ ) respecto al centro ( $9.9 \pm 1.97$ ). Se pudo deber, al desconocimiento de la prueba a la que se le está sometiendo, al cambio de medio y temperatura, características que suponen un estrés y una incomodidad.

Problemas que van a minorando a lo largo de los días de exposición, ya que en el día 2 se observa una leve disminución significativa (\*\* $p < 0.001$ ) en el tiempo de periferia ( $46.67 \pm 3.25$ ) y un aumento de permanencia en el centro ( $12.37 \pm 2.13$ ) en comparación con el día 1.

Este aumento, se ha prolongado en el día 3. El animal perduró alrededor de los 20s en la zona central ( $19.05 \pm 3.94$ ). Mientras que, disminuyó

significativamente ( $***p < 0.0001$ ) la permanencia en el área más periférica de la piscina ( $41.54 \pm 3.41$ ).

*Estos resultados, sugieren la acomodación de los individuos hacia el test conductual. Así, los animales eran aptos para realizar correctamente la tarea, al no percibir ningún problema motor, ni motivacional que hiciera pensar que no se pudiera lograr el aprendizaje.*



**Figura RD-3.** Pictograma que representó la ruta llevada a cabo por las ratas machos control NL, para determinar la conducta. La primera imagen, indicó la localización del centro y de la periferia en el MWM. A, B y C, mostraban la ruta seguida en cada día de la prueba. Han sido imágenes elaboradas por el programa ANY-maze®.

Se simbolizó un esquema representativo de la ruta que siguieron algunas de las ratas a lo largo de la prueba (Figura RD-3). En el día 1, se pudo ver el nado en la periferia mucho más prolongado respecto al centro, siendo el número de pases por las inmediaciones centrales casi nulos.



Según pasaron los días, existió un relajo por parte de los animales. Se ha observado en el centro, un nado más continuado al finalizar el periodo del experimento.

Además, de valorar la capacidad motora y la motivación mediante el estudio conductual en el grupo control NL sin plataforma.

Se evaluó, la influencia que tendría la plataforma en los animales antes de realizar la tarea de aprendizaje. Para ello, se utilizó otro grupo control, denominado control plataforma invisible movable (Ctrl. Plataforma).

Con este conjunto, se pudo tasar la agudeza visual de los individuos para el correcto reconocimiento de claves visuales a lo largo de la superficie de la piscina, su capacidad locomotora (posibilidad de nadar) y motivacional.

Fue un primer paso antes de realizar la prueba de entrenamiento conocido como pre-entrenamiento. De este modo, se disminuyeron los efectos de confusión por estrés en el animal y se evitaron problemas que podían hacer que las ratas no fueran adecuadas para realizar el trabajo adicional. Estas bases, afianzaron el conocimiento de que la cognición no se vio alterada.

En los roedores, se interpreta como aprendizaje espacial cuando requieren menos tiempo para encontrar la plataforma de escape escondida y pasan más tiempo en el cuadrante donde se encuentra situada la misma.

Es un factor que indica que ha aprendido la tarea y la ubicación de la plataforma en relación con las señales visuales externas que se encontraban situadas a lo largo del perímetro de la piscina. La realización de la prueba se basa en los principios básicos de que, los roedores están altamente motivados para escapar de un medio acuático por la ruta más rápida y directa (Lindner 1997, D'Hooge and De Deyn 2001, Van Dam, Lenders et al. 2006, Adasme, Haeger et al. 2011).

Como en el caso anterior, la velocidad promedio (cm/s) y la longitud de la trayectoria de natación (cm) (Tabla RD-2), fueron parámetros utilizados para determinar la capacidad sensitivo-motora y motivacional durante el nado.

Además, añadimos la distancia a la plataforma (cm), para conocer si los animales han aprendido la tarea mediante el uso de claves visuales. La

plataforma, debía ser encontrada por las ratas, aunque fuera movida durante los días del test.

De esta manera, indicaría que los animales no tenían déficit visual ni falta de atención. Garantizando que las funciones cognitivas no se ven comprometidas.

La Tabla RD-2, resume los resultados obtenidos a lo largo de los cuatro días de duración del test.

Control Plataforma				
PARÁMETROS	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
Velocidad promedio (cm/s)	0.22 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.19 ± 0.02	0.17 ± 0.01
Distancia promedio (cm)	11.95 ± 0.87	10.70 ± 0.96	7.26 ± 1.65	5.80 ± 1.68
Distancia plataforma (cm)	0.59 ± 0.2	0.58 ± 0.03	0.60 ± 0.03	0.54 ± 0.04

**Tabla RD-2.** Análisis de la velocidad promedio (cm/s); distancia promedio (cm) y distancia recorrida hasta la plataforma (cm) de las ratas machos control plataforma. Todos los valores fueron expresados como la media ± EEM.

Los animales control plataforma invisible movida, fueron sometidos a 3 sesiones de natación diarias en el MWM, en un periodo de 4 días.

La duración de cada sesión, fue de 60 segundos con un tiempo de recuperación entre sesión y sesión de 20 minutos.

La plataforma fue cambiada de posición cada día, pasando por el cuadrante número 1, el cuadrante número 2, el cuadrante número 3 y, por último, el cuadrante número 4.

La Figura RD-4A muestra como los animales han llevado una velocidad más o menos constante durante la tarea ( $0.19 \pm 0.01$ ), sin diferencias significativas. Indicativo de que las ratas no tenían ninguna descoordinación motora.

En referencia a la distancia recorrida (cm) (Figura RD-4B), sí encontramos alguna diferencia significativa ( $*p < 0.05$ ) en el día 4 respecto al día 1.

Al principio del experimento, los individuos nadaron un promedio de 12 cm a lo largo de todo el MWM ( $11.95 \pm 0.87$ ), distancia que fue disminuyendo a lo largo del pre-entrenamiento hasta alcanzar valores próximos a 6 cm ( $5.80 \pm 1.68$ ).

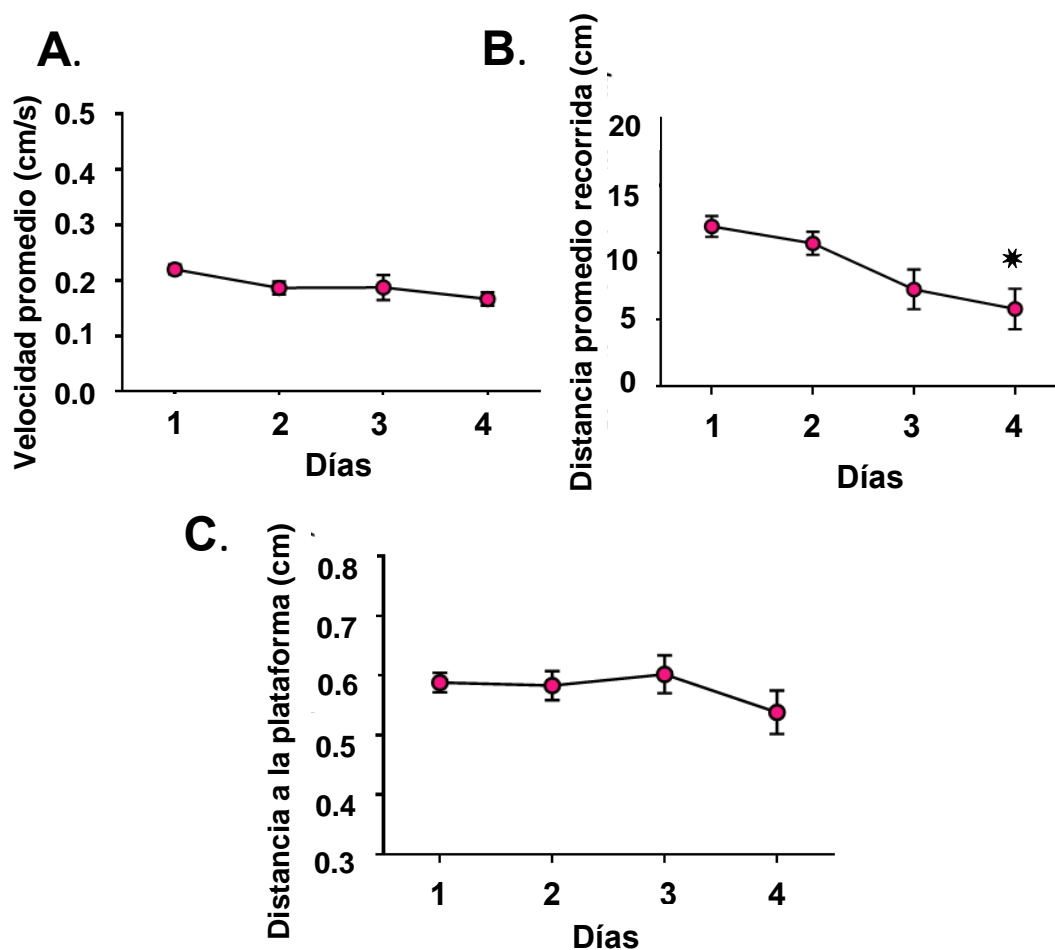
Estos resultados, sugirieron algo lógico. El acortamiento de la distancia, se debió a que los animales, a lo largo del periodo que duraba la prueba encontraban antes la plataforma y se subían a ella.

Lo que sugiere que, sí existe aprendizaje, que no había problemas visuales ni motivacionales y que este grupo después de la repetición de las sesiones durante los días, aunque se reubicó la posición de la plataforma, era capaz de encontrarla en menor tiempo.

Algo similar pasaba con la distancia a la plataforma (cm) (Figura RD-4C), se mantuvo constante y ligeramente menor en el último día de entrenamiento ( $0.54 \pm 0.04$ ) en comparación al día 1 ( $0.59 \pm 0.2$ ).

Debido a que los animales del estudio se habían adaptado correctamente al medio acuático y no presentaban problemas locomotores ni visuales.

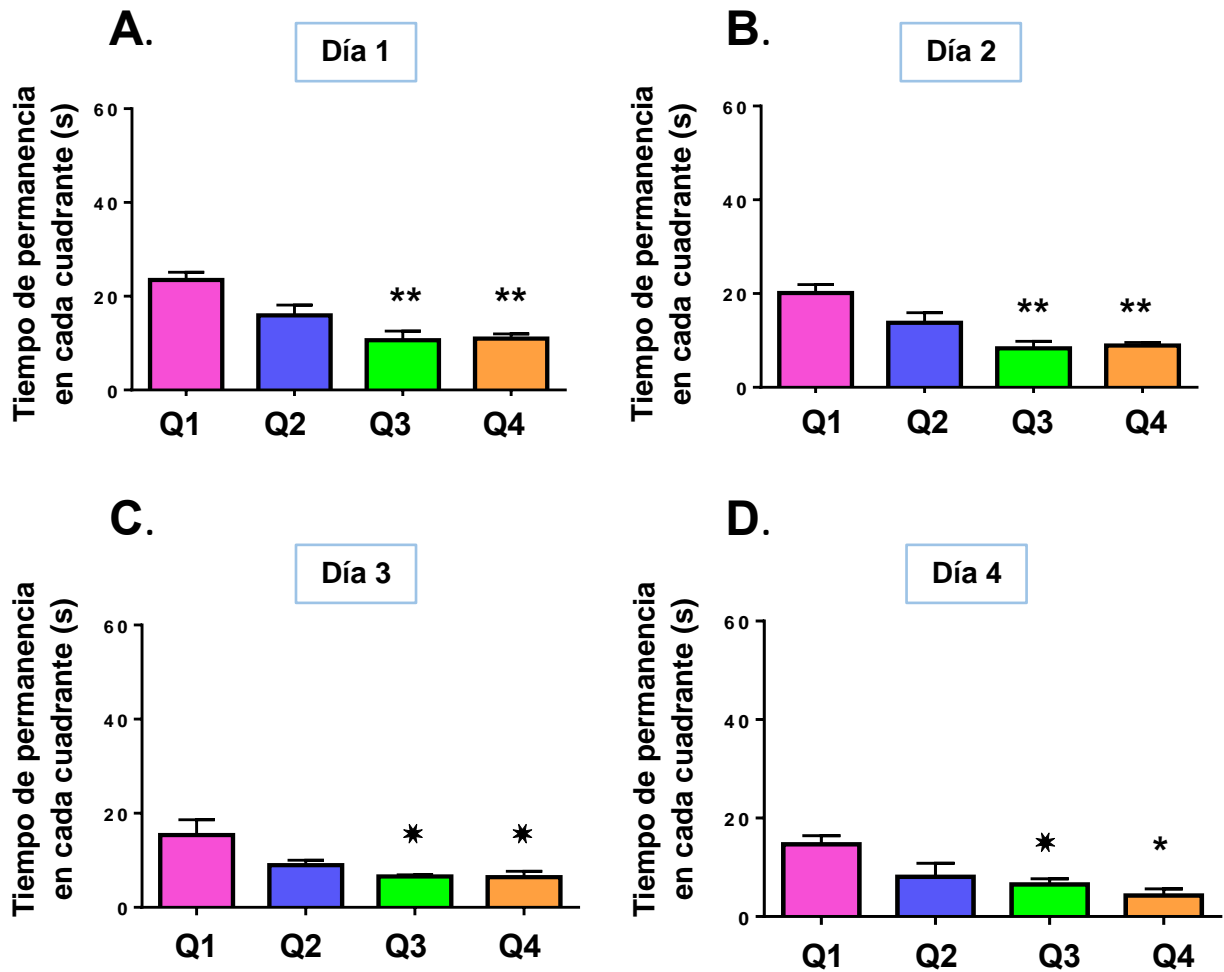
Todo ello, indicaba que la distribución de la plataforma en diferentes partes de la piscina no era un motivo, ni ha diferido significativamente en las ratas para que no se desarrollara el aprendizaje y pudiera existir el afianzamiento de un posible recuerdo.



**Figura RD-4.** Evaluación de la capacidad sensitivo-motora y visual de las ratas machos control plataforma invisible movida. Como indicadores de la actividad locomotora de dichos animales (A) velocidad promedio medida en cm/s; (B) distancia promedio de la nadada en cm; (C) distancia de la plataforma en cm, como señal de vigor de los movimientos en la natación y aprendizaje por el uso de claves visuales. Los valores representan la media  $\pm$  EEM de n= 10 animales. El nivel de significación estadística se realizó en comparación al día 1, mediante ANOVA por el test de Bonferroni (\* $p < 0.05$ ).

Otro dato interesante de analizar, fue el tiempo de permanencia (s) (Tabla RD-3) en cada uno de los cuadrantes imaginarios en los que hemos dividido la piscina.

De este modo, se ha conocido si los animales tuvieron algún tipo de tendencia por algún cuadrante o por otro. Cada día, la plataforma se encontraba en un cuadrante diferente.



**Figura RD-5.** Tiempo de permanencia de las ratas control plataforma invisible movida en cada cuadrante (s), cuadrante 1(Q1) en rosa; representado en azul el cuadrante 2(Q2); en verde el cuadrante 3(Q3) e identificado en naranja el cuadrante 4(Q4). Para los días 1(A), día 2(B), día 3(C) y día 4(D). Los valores representan la media  $\pm$  EEM de  $n=10$  animales. Fueron analizados por ANOVA comparados con Q1 mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni (\* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ ).

En el día 1, la plataforma invisible se encontraba situada en el cuadrante 1 (Q1), con un aumento significativo (\*\* $p<0.001$ ) en la permanencia en ese cuadrante ( $23.45 \pm 1.84$ ), respecto al Q3 ( $10.60 \pm 2.20$ ) y Q4 ( $10.97 \pm 1.14$ ) (Figura RD-5A).

Sin embargo, los otros tres cuadrantes, no presentaron mucha diferencia entre ellos.

Ligeramente, obtuvo valores más altos el cuadrante 2 ( $15.94 \pm 2.45$ ), pero no es significativo respecto a los otros dos. Fue el primer día de entrenamiento y el nado era similar en casi todos los cuadrantes.

	Control Plataforma (Tiempo de permanencia (s))			
	Q1	Q2	Q3	Q4
<b>DÍA 1</b>	$23.45 \pm 1.84$	$15.94 \pm 2.45$	$10.60 \pm 2.20$	$10.97 \pm 1.14$
<b>DÍA 2</b>	$20.13 \pm 2.00$	$13.79 \pm 2.38$	$8.35 \pm 1.67$	$8.91 \pm 0.76$
<b>DÍA 3</b>	$15.40 \pm 3.59$	$8.99 \pm 1.16$	$6.60 \pm 0.34$	$6.44 \pm 1.37$
<b>DÍA 4</b>	$14.66 \pm 1.98$	$8.09 \pm 3.05$	$6.52 \pm 1.32$	$4.28 \pm 1.48$

**Tabla RD-3** Cuantificación del tiempo de permanencia de las ratas control plataforma movida, en los cuadrantes imaginarios del MWM. Todos los valores fueron expresados como la media  $\pm$  EEM.

En el segundo día (Figura RD-5B) y en el tercero (Figura RD-5C), la plataforma estaba alojada en el cuadrante 2 (Q2) y en el 3 (Q3) respectivamente.

Los resultados fueron equiparables para ambos días. Siguió existiendo una tendencia por parte de los animales a seguir en el Q1.

En el día 2, la permanencia en Q2 ( $13.79 \pm 2.38$ ) fue levemente mayor que en el día 3 ( $8.35 \pm 1.67$ ). En el resto de cuadrantes el resultado fue similar.

Algo análogo sucedió en el día 4, se volvió a verificar que la permanencia en Q1 era mayor significativamente ( $*p < 0.01$ ) al resto de cuadrantes, aunque, la plataforma no se encontraba ubicada allí.

Al comparar los otros cuadrantes del estudio, el resultado fue bastante homogéneo. Incluso, se vio que el tiempo en Q4 era significativamente ( $*p < 0.01$ ) menor. Valores que se correspondieron a que el animal había encontrado con mayor rapidez la plataforma situada en ese cuadrante y, por tanto, finalizaba la sesión.

En consiguiente, los resultados referentes al tiempo de permanencia en el proceso del test, fueron decreciendo en el transcurso de los días, porque los animales encontraban antes la plataforma y se subían a ella.

En relación a todos los días en su conjunto, se podía determinar que, los resultados mostraban una gran tendencia por parte de los nadadores a permanecer en el Q1 con o sin plataforma.

Por esta razón, se pensó en la existencia de un apego por parte de los animales referente a la zona de lanzamiento. Este lugar era reconocido por los individuos del estudio y lo consideraban como punto principal de fuga y escape. De este modo, tenían más afinidad por ese cuadrante.

A la vez, en el análisis no se observaron diferencias significativas entre Q2; Q3 y Q4. El tiempo de permanencia en estos cuadrantes fue semejante con o sin plataforma.

No obstante, aunque se consideró que el periodo de permanencia era más o menos similar en todos los cuadrantes. No se ha podido dejar de paso que, sí se observó un mínimo incremento en el Q2 respecto a los otros dos. Este suceso, llevó a considerar que podía ser debido a la cercanía de Q2 hacia Q1, o también, se valoró como dato conseguido en las inmediaciones más próximas a la linde entre Q1 y Q2. Ya que, los animales nadaban cercanos en esas áreas.

*Los resultados obtenidos en el pre-entrenamiento previo al aprendizaje. Determinaron, la habilidad que tenían los animales para encontrar la reubicación de la plataforma.*

*No se percibió déficit que impidiera una buena natación por parte de los animales, ni problemas visuales, ni acústicos que pudieran derivar a efectos negativos.*

*Se observó una buena adaptación al medio acuático, a minorando el estrés que pudiera ser causado por la propia prueba.*

*No se mostró gran influencia por la presencia o la ausencia de plataforma. Con una tendencia por el Q1 que tendremos en cuenta en resultados posteriores.*

#### 4.1.2 VALORACIÓN DEL APRENDIZAJE POR PARTE DE LOS ANIMALES EN EL MWM

Habiendo descartado en el pre-entrenamiento anomalías que pudieran afectar a las funciones cognitivas y conociendo la destreza de los animales en encontrar la plataforma.

El siguiente paso, fue realizar el test de aprendizaje, durante un intervalo de tiempo de 6 días. En este apartado, los animales que realizaron este ejercicio se denominaron Aprendizaje 6 días.

La realización del test, estuvo basada principalmente en el tiempo que tardó el animal en encontrar la plataforma objetivo. Es decir, utilizando la latencia de escape (s) como parámetro de cuantificación de la memoria espacial y el aprendizaje.

Sin embargo, en algunas ocasiones, el término “latencia de escape” puede ser confundida con la velocidad de natación, aunque es más apropiado, utilizar la longitud de la trayectoria como factor cognitivo, al ser más confiable para estimar el aprendizaje espacial (Mulder and Pritchett 2003, Barnhart, Yang et al. 2015).

Se analizó, velocidad promedio (cm/s), distancia recorrida por el animal durante la prueba (cm) y latencia de escape (s) (Tabla RD-4).

<b>Aprendizaje 6 días</b>			
<b>GRUPO</b>	<b>Velocidad promedio (cm/s)</b>	<b>Distancia recorrida (cm)</b>	<b>Latencia de escape (s)</b>
<b>DÍA 1</b>	0.21 ± 0.008	10.92 ± 0.65	49.44 ± 2.23
<b>DÍA 2</b>	0.17 ± 0.006	6.60 ± 0.71	38.74 ± 2.56
<b>DÍA 3</b>	0.15 ± 0.008	3.81 ± 0.50	28.65 ± 2.71
<b>DÍA 4</b>	0.15 ± 0.007	3.21 ± 0.45	20.52 ± 2.01
<b>DÍA 5</b>	0.15 ± 0.005	2.51 ± 0.37	14.48 ± 1.41
<b>DÍA 6</b>	0.15 ± 0.006	2.36 ± 0.33	10.40 ± 1.13

**Tabla RD-4.** Análisis de los parámetros que evaluaron el aprendizaje. Todos los valores fueron expresados como la media ± EEM.



Como muestra la Figura RD-6, se evaluó la capacidad de aprendizaje de los individuos del estudio.

En referencia a la velocidad promedio del nado (cm/s) (Figura RD-6A), se observó que fue constante a lo largo de los días de entrenamiento.

El primer día, los animales se encontraban más excitados, provocando un aumento significativo ( $***p<0.0001$ ) en la velocidad del nado ( $0.21 \pm 0.008$ ) respecto a todo el periodo. Estos valores cambiaron según fue transcurriendo la prueba, se originó una disminución significativa ( $***p<0.0001$ ), debido a un relajamiento de las ratas por acomodación al agua.

De esta manera, los animales llevaban una velocidad monótona durante todo el entrenamiento. Manifestaban que no existían alteraciones en la función motora, ni problemas de tipo sensorial que necesitasen una atención especial. Por lo tanto, la realización del test no afectó al rendimiento.

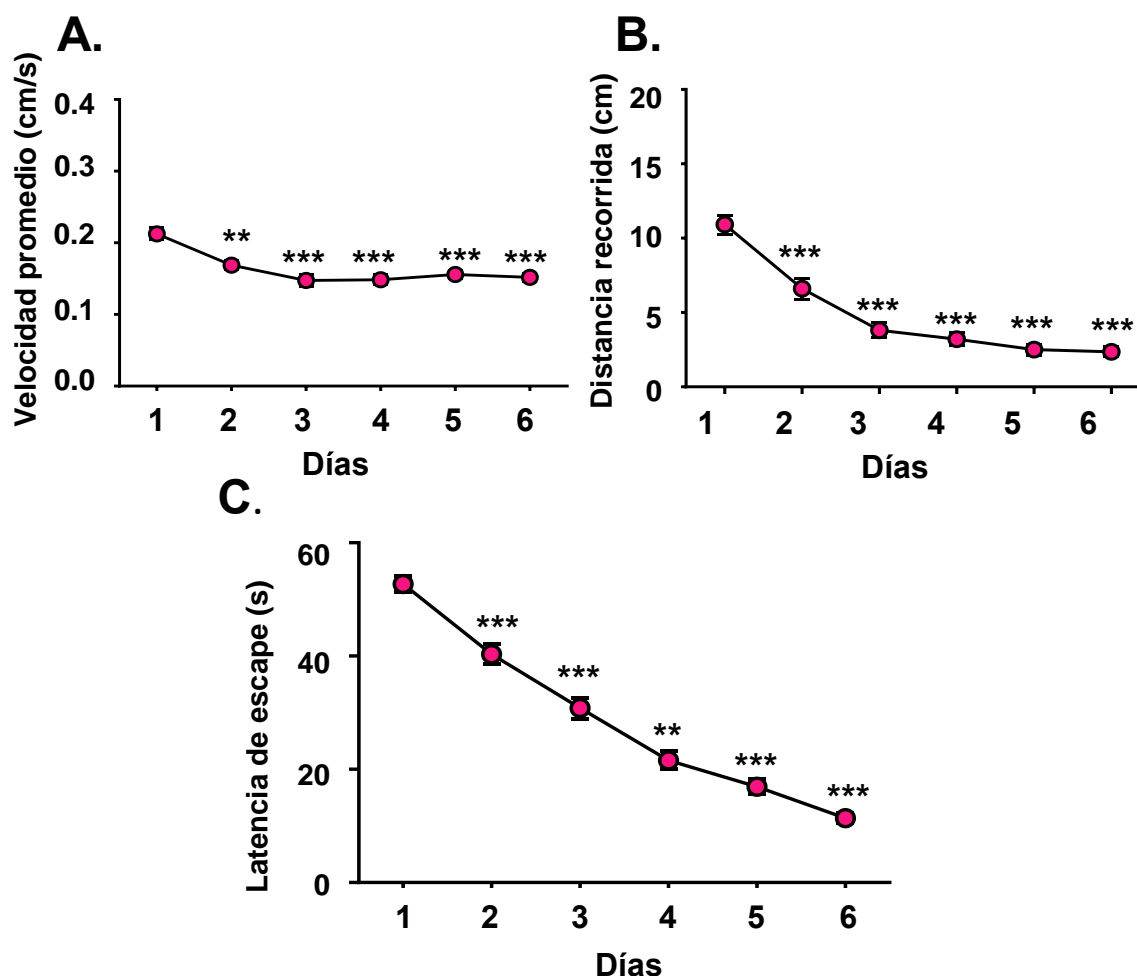
La distancia recorrida (cm) (Figura RD-6B) en el área de la piscina, fue decreciendo significativamente ( $***p<0.0001$ ) a lo largo de la capacitación.

El día 1 de entrenamiento, los animales recorrieron cifras cercanas a 11 cm ( $10.92 \pm 0.65$ ), esta referencia fue disminuyendo llegando a valores próximos a 2 cm ( $2.36 \pm 0.33$ ) en el último día. Este dato era esperado, porque los individuos según pasaba el tiempo cada vez aprendían antes dónde estaba alojada la plataforma y se subían con mayor rapidez a ella, haciendo la longitud del recorrido menor.

Como se indicó anteriormente, el parámetro más fiable para la determinación del aprendizaje espacial, era la latencia de escape (s) (Figura RD-6C).

Este resultado junto con el tiempo transcurrido en cada cuadrante del tanque de agua (Figura RD-7) indicaban la capacidad de aprendizaje espacial en el experimento.

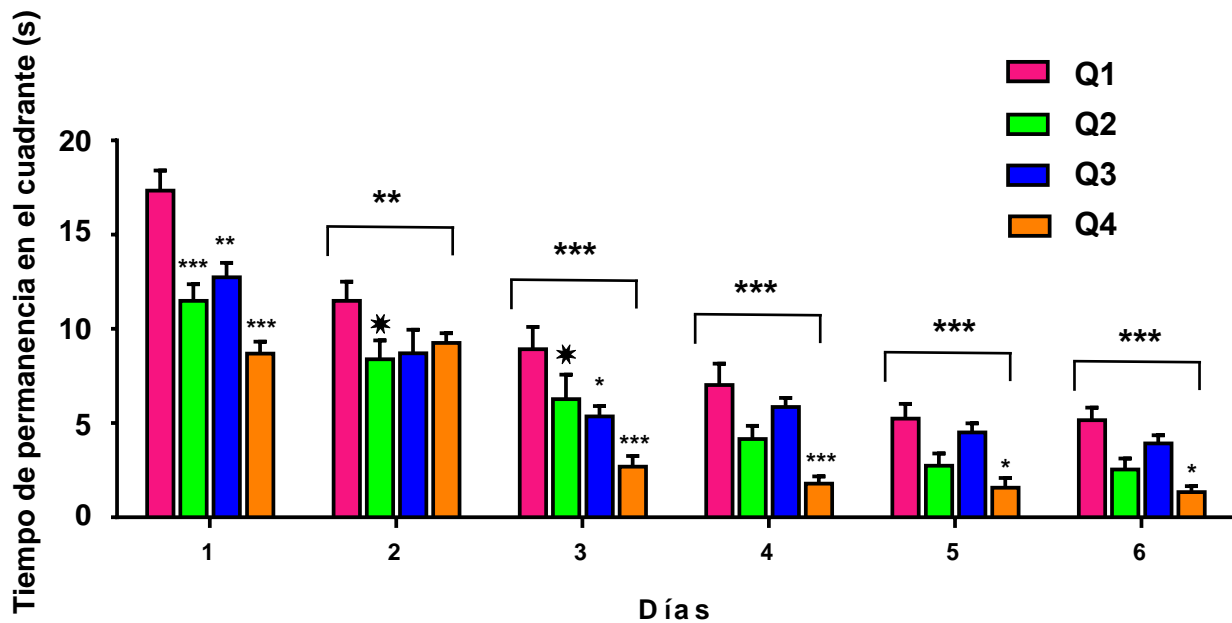
Ambos fueron importantes, porque evaluaban la cantidad de tiempo transcurrido antes de que el animal se subiera a la plataforma para su escape. Al unísono que, mostraban el tiempo que pasaba alojado el individuo del estudio en el cuadrante objetivo (lugar dónde se encontraba la plataforma).



**Figura RD-6.** Evaluación de la capacidad de aprendizaje en ratas machos aprendizaje 6 días, sometidas a 3 sesiones por día en la prueba de nado con un tiempo de recuperación de 20 minutos entre sesión. Como indicador de la actividad motriz (A) velocidad promedio (cm/s); como evaluador del aprendizaje espacial (B) distancia promedio recorrida (cm) y (C) Latencia de escape (s). Los valores mostraban la media  $\pm$  EEM de  $n=10$  animales, fueron analizados por ANOVA comparados con el día 1 mediante el test de Bonferroni (\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*  $p < 0.0001$ ).

A medida que los animales han aprendido la localización de la plataforma, el tiempo empleado en la natación (latencia de escape) descendió significativamente (\*\* $p < 0.0001$ ), al igual que ocurrió con la distancia hasta la plataforma (Figura RD-6C).

En el día 1, los animales del experimento, nadaban unos 50 s ( $49.44 \pm 2.23$ ), tiempo que fue atenuándose hasta alcanzar los 10s ( $10.40 \pm 1.13$ ) en el último día del entrenamiento.



**Figura RD-7.** Tiempo de permanencia en cada cuadrante (s), en ratas machos aprendizaje 6 días del test aprendizaje. En rosa, se representó el cuadrante 1 (Q1); en verde, el cuadrante 2 (Q2), el cuadrante 3 (Q3) representado en azul y en naranja el cuadrante 4 (Q4). Los valores se mostraban mediante la media  $\pm$  EEM de  $n = 40$  animales, fueron analizados por ANOVA comparados con Q1 dentro de cada día, y comparado con el día 1 entre los días, mediante el test de Bonferroni (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

Por otro lado, la Figura RD-7 representa el tiempo de permanencia en cada cuadrante durante el test (s) (Tabla RD-5).

En los primeros días, los animales nadaban y supervisaban todos los cuadrantes, especialmente el Q1 ( $17.34 \pm 1.10$ ), existiendo similitudes entre el Q2 ( $11.49 \pm 0.91$ ), el Q3 ( $12.74 \pm 0.78$ ) y el Q4 ( $8.68 \pm 0.65$ ).

Según iba pasando el periodo de entrenamiento, se observó una disminución significativa (\*\* $p < 0.0001$ ) entre los días, del tiempo que pasaba el animal nadando en el MWM.

A partir del día 4, el Q3 ( $5.86 \pm 0.49$ ) que era la zona donde se encontraba alojada la plataforma, fue el más visitado por las ratas. Los animales, ignoraban el paso por los otros dos cuadrantes, Q2 ( $4.15 \pm 0.72$ ) y Q4 ( $1.79 \pm 0.40$ ).

Al mismo tiempo, en los días 5 y 6, se observó un nado creciente significativamente (\*\*p<0.0001) en el cuadrante objetivo (Q3) (día 5:  $4.50 \pm 0.51$ , día 6:  $3.93 \pm 0.43$ ) respecto al Q2 (día 5:  $2.74 \pm 0.67$ , día 6:  $2.54 \pm 0.60$ ) y Q4 (día 5:  $1.58 \pm 0.53$ , día 6:  $1.35 \pm 0.32$ ).

Aprendizaje 6 días (Tiempo de permanencia (s))				
	Q1	Q2	Q3	Q4
DÍA 1	$17.34 \pm 1.10$	$11.49 \pm 0.91$	$12.74 \pm 0.78$	$8.68 \pm 0.65$
DÍA 2	$11.49 \pm 1.03$	$8.39 \pm 1.02$	$8.71 \pm 1.26$	$9.26 \pm 0.53$
DÍA 3	$8.93 \pm 1.20$	$6.27 \pm 1.34$	$5.35 \pm 0.57$	$2.70 \pm 0.58$
DÍA 4	$7.03 \pm 1.15$	$4.15 \pm 0.72$	$5.86 \pm 0.49$	$1.79 \pm 0.40$
DÍA 5	$5.24 \pm 0.80$	$2.74 \pm 0.67$	$4.50 \pm 0.51$	$1.58 \pm 0.53$
DÍA 6	$5.15 \pm 0.69$	$2.54 \pm 0.60$	$3.93 \pm 0.43$	$1.35 \pm 0.32$

**Tabla RD-5.** Cuantificación del tiempo de permanencia de las ratas Aprendizaje 6 días, en los 4 cuadrantes imaginarios del MWM. Todos los valores fueron expresados como la media  $\pm$  EEM.

*Estos resultados, fueron un signo de que los animales han aprendido la tarea y la ubicación de la plataforma de escape.*

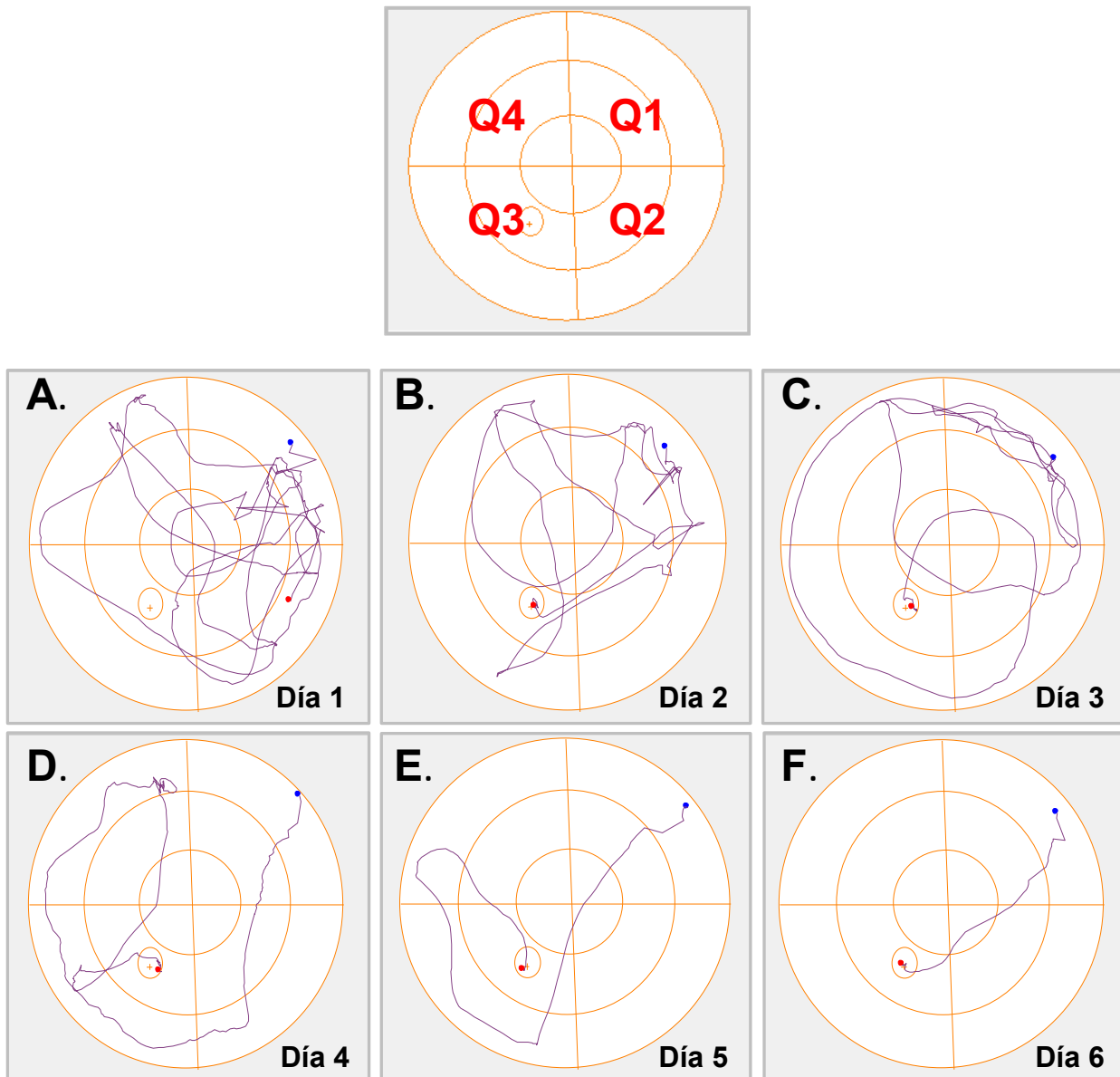
Estos valores, pudimos verlos reflejados en el esquema de la Figura RD-8. En forma de pictograma, se representó el trayecto realizado por los animales a lo largo de toda la superficie del tanque de agua, durante un periodo de tiempo de 1 minuto, que era la duración del test.

Mediante trazos y líneas, el programa informático ANY-maze® de forma cualitativa, dibujó el trayecto llevado a cabo por los animales.

Así, se pudo tener un esquema desde el inicio de la sesión hasta su final.

De manera semejante a los resultados cuantitativos que se habían obtenido en este trabajo. El mapa reveló en el primer día de la prueba, que las ratas paseaban de manera indistinta por todos los cuadrantes.

Al mismo tiempo, se observó que era el Q3 con algunas pasadas por Q4 y Q2 el tramo más común realizado por los animales durante el 2º, 3º y 4º día. Pero al final, en el último día de la prueba, las ratas terminaban con un nado directo y lineal desde el punto de inicio (Q1) hasta la posición de la plataforma (Q3). Haciendo la tarea en unos pocos segundos.



**Figura RD-8.** Pictograma que representa la ruta llevada a cabo por las ratas machos aprendizaje 6 días a lo largo de todo el periodo de aprendizaje espacial. La primera imagen indica la localización de cada cuadrante en color rojo en el laberinto de agua. Son imágenes elaboradas por el programa informático ANY-maze®.

Lo que estaba ocurriendo en el Q1, no se pasó por alto. Durante todo el análisis se vio una alta inclinación por parte de los animales a permanecer en ese lugar, como ya se había indicado.

De forma muy clara, existía una tendencia a permanecer en ese cuadrante. Por ese motivo, fue un dato que no descartábamos del todo, pero, sí hemos considerado de menor valor.

Esta explicación, se justificó dado que el Q1 era el lugar de tirada de los animales al comienzo de la prueba. Esta zona, hacía que los sujetos del estudio, siempre estuviesen más tiempo ahí para querer huir.

Por ello, provocó que viésemos más afinidad por ese sitio que por otro. Además, todos los animales debían atravesar ese cuadrante para acceder a cualquier otro.

El análisis cuantitativo del tiempo de permanencia tuviera valores más altos en Q1.

En consecuencia, el valor de Q1 no se tuvo en cuenta para obtener una conclusión veraz de los datos muestrados.

Una vez que habíamos solventado y tenido en cuenta el problema del Q1 y a la vista de los resultados de este trabajo.

*Podemos decir que, el periodo de formación y aprendizaje en nuestro experimento, causó una disminución significativa en la latencia de escape y un aumento significativo del tiempo de permanencia en el cuadrante diana (Q3).*

*Todo ello, se relacionó con un buen rendimiento en el test de aprendizaje, respecto al entrenamiento durante el periodo que duró el mismo.*

*Se aseguró que, las ratas machos habían conseguido aprender la ubicación de la plataforma para poder subirse a ella y así escapar.*

*Colectivamente, estos resultados se han podido interpretar como aprendizaje espacial, dado que, se ha requerido menos tiempo para encontrar la plataforma, mediante una velocidad constante. Parámetro indicador de la inexistencia de alteraciones en la función motora.*

Los resultados obtenidos son comparables con otros estudios que se han llevado a cabo para demostrar alteraciones en el rendimiento cognitivo y conductual por valoraciones en el MWM.

A ratas Sprague-Dawley se las inyectaron de manera intraperitoneal un fármaco anticolinérgico, el trihexifenidilo (THP), asociado a enfermedad de Alzheimer y de Parkinson. Quisieron determinar si THP podía o no acelerar la progresión neurodegenerativa similar a la que se produce en estas enfermedades. Y así, poder estudiar los posibles mecanismos involucrados.

Además, estos investigadores, llevaron a cabo pruebas de comportamiento para evaluar el rendimiento cognitivo en ratas tratadas de 3 (jóvenes) y 9 meses (mayores).

Se observó, una reducción típica de los valores en latencia de escape, como signo de aprendizaje espacial en los jóvenes, pero deterioro cognitivo con latencias más largas para encontrar la plataforma en las ratas viejas tratadas.

Sin embargo, tras la repetición del entrenamiento en los ensayos posteriores a los 4 y 6 meses las ratas tratadas con THP mostraron una reducción progresiva en el tiempo para alcanzar la plataforma de escape. Con la latencia de escape disminuida al mismo nivel que las ratas controles.

Al final del entrenamiento de navegación, la velocidad de la natación no fue significativamente diferente entre los grupos y el tiempo transcurrido en la zona del cuadrante objeto fue mayor a lo largo del tiempo (Huang, Zhao et al. 2016).

En concordancia con el análisis y los resultados de este trabajo. Otras investigaciones previas, también, han indicado mejoras significativas en el aprendizaje espacial durante el período de entrenamiento en ratones destetados en el día postnatal 24 (Barnhart, Yang et al. 2015), en el postnatal 35 (Huang, Zhao et al. 2016) y en ratones adultos (Varvel and Lichtman 2002).

También, el MWM ha sido utilizado para evaluar diferentes efectos del alcohol y el plomo en el aprendizaje y en las funciones cognitivas de ratas con alteraciones genéticas (Goodlett and Peterson 1995, Jett, Kuhlmann et al. 1997).

### **4.1.3 ESTIMACIÓN DE LA MEMORIA A LOS 9, 16 Y 25 DÍAS DESPUÉS DEL ENTRENAMIENTO EN EL MWM**

La memoria espacial (ME) en la psicología cognitiva y en la neurociencia es la parte de la memoria responsable de registrar la información sobre el entorno y la orientación espacial, se resume en la creación de un mapa cognitivo. Tiene representaciones de memoria a corto y a largo plazo (Kessels, Jaap Kappelle et al. 2002).

Es un sistema que admite almacenar temporalmente y administrar la información necesaria para completar tareas cognitivas complejas. Permite recordar diferentes lugares, al mismo tiempo que, las relaciones espaciales entre objetos.

Entre las tareas que emplean ME se incluyen, el aprendizaje y la comprensión. Esta memoria es particularmente frágil y se ve muy afectada en pacientes con la enfermedad de Alzheimer (Han, Wang et al. 2017).

Como hemos explicado a lo largo de este trabajo. Este tipo de memoria puede ser evaluada mediante modelos animales, en los que la solución de la tarea depende de la información espacial disponible a través de una fase previa de aprendizaje.

Las tareas del laberinto de agua diseñadas principalmente para medir el aprendizaje espacial y el recuerdo, se han vuelto bastante útiles para evaluar los efectos del envejecimiento, las lesiones experimentales y el impacto de diferentes fármacos especialmente en roedores (Terry 2009).

Se han ido adaptando el uso de ratones y ratas de laboratorio para elucidar procesos normales y patológicos que influyen en el aprendizaje y la memoria. Entre los modelos animales más utilizados podemos citar el modelo de ratón ciervo (*Peromyscus maniculatus*), el ratón de la pradera (*Microtus pennsylvanicus*), los jerbos mongoles (*Meriones unguiculatus*), la zarigüeya gris de cola corta (*Monodelphis domestica*) y la rata Wistar que es la especie que se ha elegido para llevar a cabo, estos experimentos.

Estos tipos de roedores son aplicados a modo de modelos de enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson o presentan modificaciones



genéticas que ayudan a ciertas investigaciones (Santín-Núñez, Rubio et al. 2017).

Las estrategias de navegación espacial, parecen depender de distintos sistemas de memoria.

Como sucede en nuestro caso, las ratas, tras un proceso de entrenamiento en el laberinto de agua tienden a aproximarse a la plataforma sumergida desde una dirección conocida, reconociendo su localización y así, establecen relaciones entre distintos estímulos.

Después de esta fase de adquisición o aprendizaje que dura varios días se realiza una prueba final de retención o de “ensayo de prueba” sin plataforma durante 60 segundos. Ésta es una prueba de preferencia espacial en la que, si el animal ha aprendido, nadará más tiempo en el cuadrante meta. Donde previamente estaba situada la plataforma y ahora se encuentra eliminada (Morris 1984, Wang and Spelke 2002, Vicens, Redolat et al. 2003).

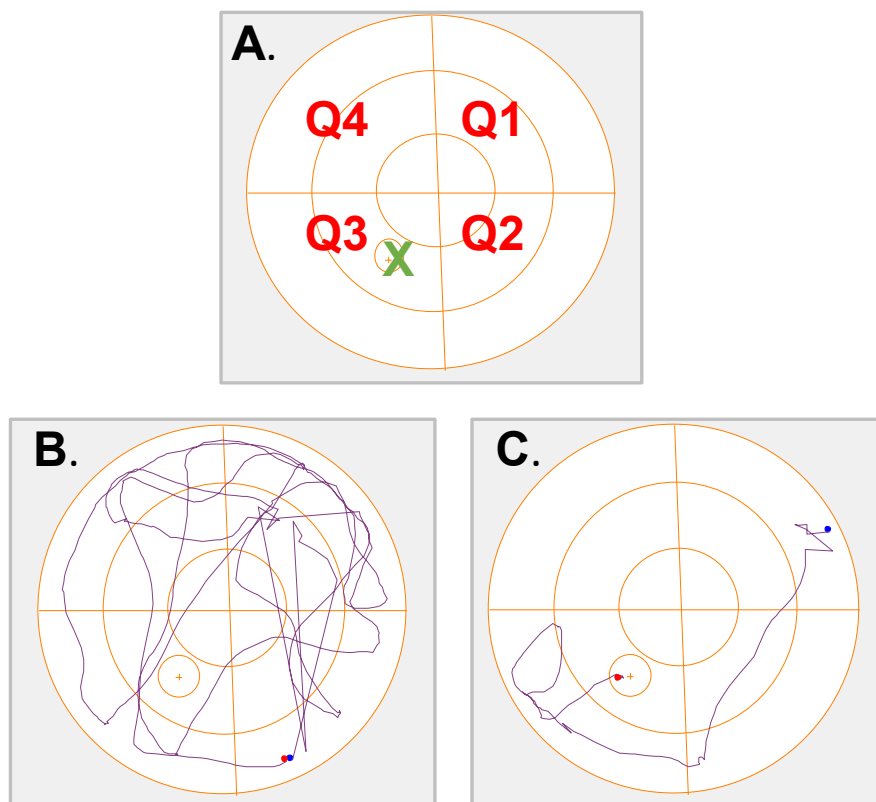
Con todos estos antecedentes previos. Se comprobó, si se encontraba consolidada la memoria en los animales de nuestro estudio.

Para llevar a cabo esa comprobación, lo primero que realizamos fue, hacer grupos una vez que finalizó el entrenamiento a los 6 días. Sometiéndolos a un estado de reposo y cese de todo tipo de test.

El primer grupo, se denominó, ratas machos memoria 9 días, otro grupo, fue ratas machos memoria 16 días y, por último, ratas machos memoria 25 días.

Cada categoría se correspondió con la fecha en que se realizó la prueba de memoria a partir del comienzo del entrenamiento, como habíamos explicado con anterioridad en materiales y métodos.

En una única sesión para cada animal de su grupo, se registró la ruta que seguían los roedores en el tanque de agua. En éste, se había eliminado la plataforma (Figura RD-9).



**Figura RD-9.** Registro del mapa de la ruta que siguieron los animales durante el test de memoria. (A) Representa la posición de los cuadrantes en el MWM, en rojo se disponen los cuadrantes y en verde con una X la localización ficticia que debería tener la plataforma si se encontrara ubicada. (B) Pictograma de la ruta realizada por uno de los animales que no ha retenido lo aprendido. (C) Esquema del recorrido llevado a cabo por una de las ratas que sí ha consolidado la memoria. Las imágenes son obtenidas por el programa informático ANY-maze®.

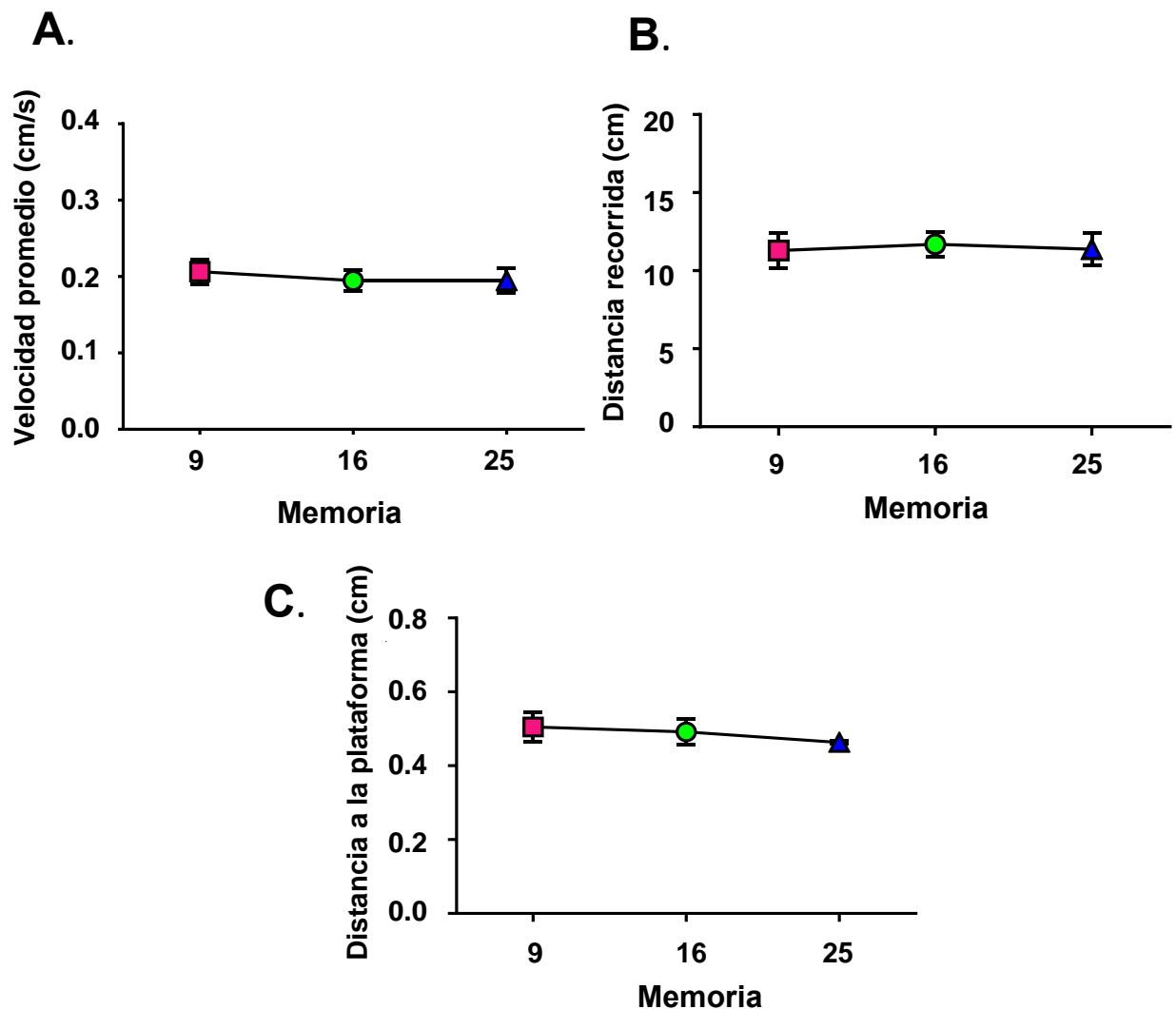
En el mapa de ruta se muestra de manera visual como fue la prueba de memoria de un modo muy general en los grupos de estudio (Figura RD-9).

En RD-9B, se observó como el animal recorrió toda la piscina sin centrarse en ningún cuadrante. Nadó libremente durante los 60 segundos que duraba la prueba sin hacer discriminación en ninguna zona. Indicativo de que este animal no recordaba lo aprendido en los días de entrenamiento.

Sin embargo, RD-9C mostró la ruta de otra rata que sí recordó lo practicado en los 6 días de aprendizaje. Se visualizó perfectamente como realizaba un trazo claro en el Q3 (zona dónde se encontraba ubicada la plataforma), haciendo giros selectivos en esa superficie. Determinando, que esos animales sí, han consolidado la memoria.

Conociendo como debía de ser el mapa ideal del recorrido llevado a cabo por los animales.

Se evaluaron otros parámetros: velocidad media de nado (cm/s), distancia de recorrido (cm) y la distancia hasta la plataforma (cm) (ubicación ficticia, debido a su retirada. Mediante el software de análisis, pudimos localizar la posición correcta que tuvo la plataforma en el estudio de aprendizaje) (Tabla RD-6 y Figura RD-10).



**Figura RD-10.** Evaluación de la consolidación de la memoria a 9 (en rosa), 16 (en verde) y 25 días (en azul) desde el inicio del aprendizaje en una sola sesión para cada animal. Como indicador de la actividad locomotora (A) velocidad promedio en cm/s; (B) distancia promedio recorrida en cm y (C) distancia hacia la plataforma (cm). Los valores representan la media  $\pm$  EEM de  $n=10$  animales en cada grupo, fueron analizados por ANOVA y no presentan diferencias significativas.

Memoria			
PARÁMETROS	Memoria 9 días	Memoria 16 días	Memoria 25 días
Velocidad promedio (cm/s)	0.21 ± 0.02	0.19 ± 0.01	0.19 ± 0.03
Distancia promedio (cm)	11.30 ± 1.15	11.69 ± 0.81	11.63 ± 1.83
Distancia a la plataforma (cm)	0.50 ± 0.19	0.46 ± 0.17	0.47 ± 0.18

**Tabla RD-6.** Análisis de los parámetros evaluados en el test de memoria. Todos los valores fueron expresados como la media ± EEM.

Como se aprecia en los parámetros resumidos en la Figura RD-10 y la Tabla RD-6, los mismos mostraban el mantenimiento a lo largo del tiempo de las condiciones óptimas, tanto motoras como motivacionales de los animales en la realización de la prueba de aprendizaje.

Se observó que, la velocidad promedio (cm/s) (Figura RD-10A) fue constante, alrededor de 0.2 cm/s ( $0.21 \pm 0.02$ ), en todos los grupos de memoria. Indicador del buen mantenimiento locomotor por parte de los animales del estudio.

En referente a la distancia recorrida (cm) (Figura RD-10B), se mantuvo continua y firme tanto en Memoria 9 días ( $11.30 \pm 1.15$ ), como en Memoria 16 ( $11.69 \pm 0.81$ ) y 25 días ( $11.63 \pm 1.83$ ).

De igual modo, los resultados fueron similares para la distancia a la plataforma (cm) (Figura RD-10C). Los sujetos, tuvieron un recorrido de manera constante hasta el lugar donde estuvo la plataforma. No hubo diferencias significativas entre Memoria 9 ( $0.50 \pm 0.19$ ), 16 ( $0.46 \pm 0.17$ ) y 25 ( $0.47 \pm 0.18$ ) días.

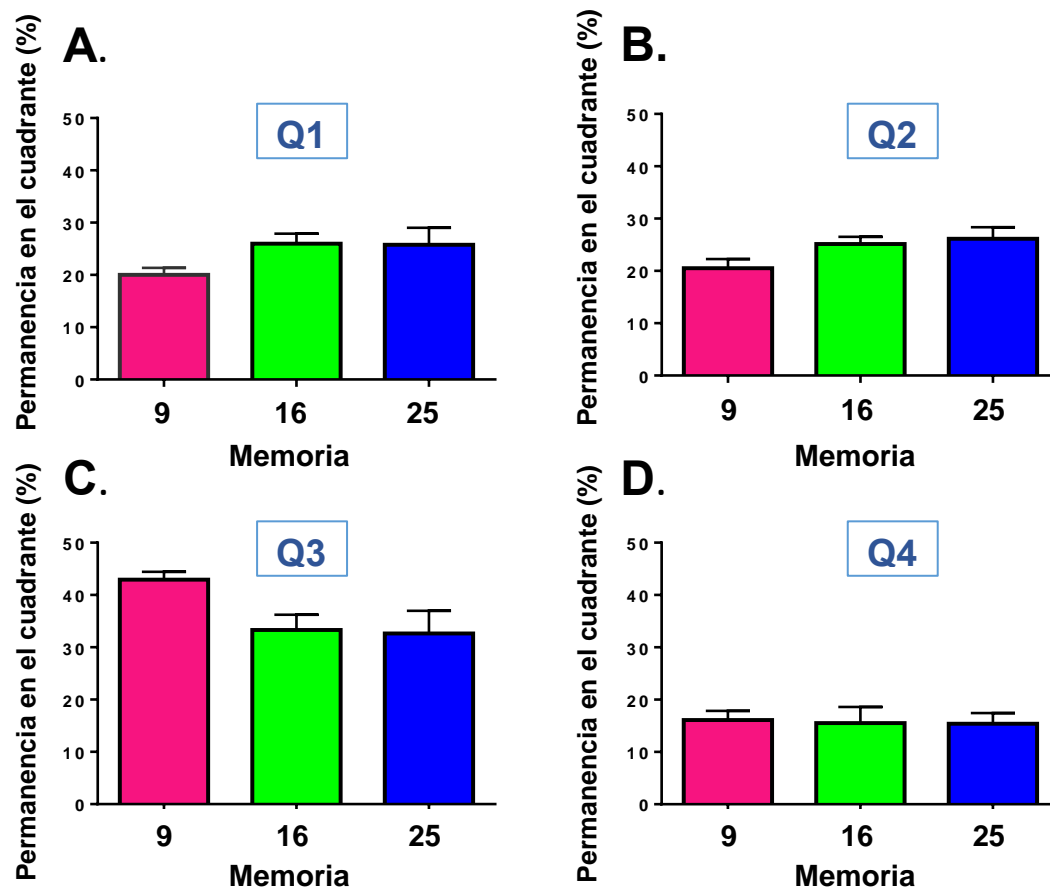
El análisis de estos parámetros, revelaban la inexistencia de déficit locomotor, emocional o problemas en la visión, que descartarán la posibilidad de que la memoria no se encontraba reforzada en estos grupos.

Por otro lado, otro elemento a evaluar, fue el porcentaje de permanencia en cada cuadrante (%) (Tabla RD-7).

Esta medida, nos sugirió y nos reafirmó la existencia de memoria espacial en el transcurso del tiempo.

Lo ideal en este tipo de estudios, era que las ratas formasen un mapa orientativo, marcando un trayecto continuo alrededor del cuadrante meta (Q3, donde estaba alojada la plataforma en la fase de aprendizaje) y que el tiempo de estancia en ese cuadrante fuera mucho mayor respecto a los otros.

Eso nos indicaría que, el animal aún recordaba la posición de la plataforma tras el aprendizaje y, por tanto, existiría la consolidación de la memoria espacial (Gerlai, McNamara et al. 2001, Vicens, Redolat et al. 2003).



**Figura RD-11.** Consolidación de la memoria respecto al % de permanencia en los cuadrantes. Caracterizado en rosa memoria 9 días; en verde, memoria 16 días y en azul, memoria 25 días. (A) representa el cuadrante 1, (B) la permanencia en el cuadrante 2, (C) cuadrante 3 y (D) el cuadrante 4. Los valores representan la media  $\pm$  EEM de  $n=10$  animales para cada grupo, fueron analizados por ANOVA y no presentan diferencias significativas.

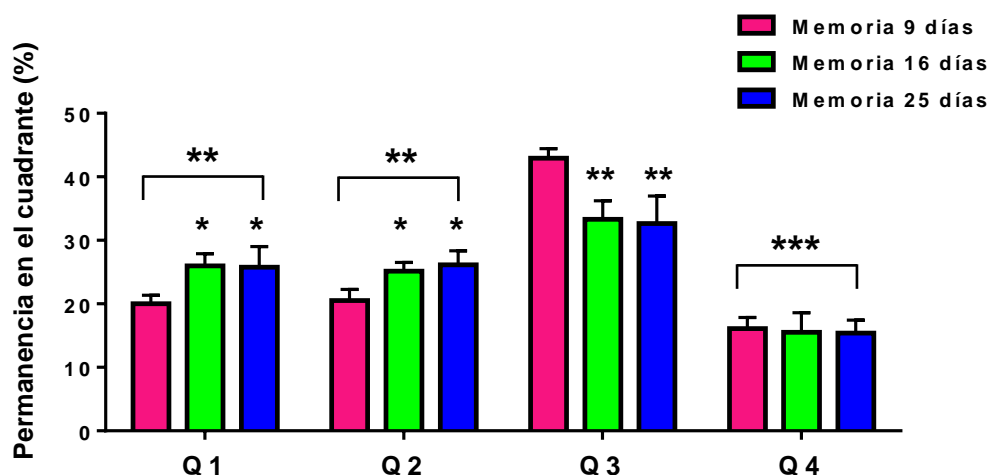
	Memoria (% permanencia cuadrante)			
	Q1	Q2	Q3	Q4
<b>MEMORIA 9 días</b>	20.02 ± 1.42	20.52 ± 1.73	42.93 ± 1.49	16.09 ± 1.74
<b>MEMORIA 16 días</b>	25.99 ± 5.48	25.60 ± 1.30	32.14 ± 2.66	14.07 ± 3.48
<b>MEMORIA 25 días</b>	25.76 ± 3.21	26.23 ± 2.23	32.64 ± 4.34	15.40 ± 2.04

**Tabla RD-7.** Análisis del porcentaje de permanencia en los cuadrantes para la condición Memoria. Todos los valores fueron expresados como la media ± EEM.

Como se aprecia en la Figura RD-11 no había diferencias significativas al comparar los grupos Memoria. Se apreció un aumento en el porcentaje de permanencia sobre el Q3 en Memoria 9 (42.93 ± 1.49), 16 (32.14 ± 2.66) y, 25 días (32.64 ± 4.34) respecto a los otros cuadrantes.

La consolidación de la memoria queda reflejada en la Figura RD-12. En esta gráfica similar a la anterior, se representan los tres grupos Memoria junto con el porcentaje de permanencia en cada cuadrante, para tener una valoración global en su conjunto.

Se observó, un aumento significativo del Q3 (cuadrante objetivo) en Memoria 9 días, 16 y 25 comparado con el resto de cuadrantes. Ese incremento, fue mayor en Memoria 9 días que en el resto de grupos. El nivel de significancia varió, al analizar estadísticamente los valores dentro de cada cuadrante.



**Figura RD-12.** % permanencia en cada cuadrante. Se representó, la media ± EEM de n= 10 animales para cada grupo, fueron analizados por ANOVA con el test de Bonferroni, comparando los grupos memoria con 9 días y los cuadrantes con el Q3 \*p<0.01, \*\*p<0.001, \*\*\*p< 0.0001).

En Q1, se originó un incremento significativo ( $*p < 0.01$ ) en Memoria 16 ( $25.99 \pm 5.48$ ) y 25 días ( $25.76 \pm 3.21$ ) respecto a 9 días ( $20.02 \pm 1.42$ ). Con semejanza para el Q2. Mientras que el Q4 mostraba datos similares para los tres tipos de memoria (9 días:  $16.09 \pm 1.74$ , 16 días:  $14.07 \pm 3.48$ , 25 días:  $15.40 \pm 2.04$ ).

Sin embargo, el Q3, no sólo fue el cuadrante con mayor porcentaje de permanencia por parte de los animales, sino que también, fue el que tuvo valores similares para 16 y 25 días. Estos dos grupos de animales, pasaron mayor tiempo en este cuadrante respecto a los otros, pero con una menor permanencia que en Memoria 9 días.

Tras los resultados obtenidos durante todas las pruebas en el laberinto de agua a lo largo de este estudio, en su conjunto, comprobamos:

*Que los animales los animales utilizados en el estudio no presentaban ningún tipo de problema en la coordinación motora ni motivacional, los grupos fueron iguales en capacidad de natación, y tuvieron una adaptación muy óptima a todo el proceso de aprendizaje.*

*Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que todos los grupos del estudio, poseen ME a los 9, 16 y 25 días. Con consolidación de la memoria en todas las ratas que realizaron el test.*

*También, se evidenció que la consolidación de la memoria fue disminuyendo según transcurrió el tiempo de espera para la realización del test. Pero ese descenso fue similar a los 16 y 25 días respecto a los 9 días. Sugiriendo que los sujetos consolidan la memoria a largo plazo de forma parecida.*

*Las ratas recuerdan dónde se encontraba el cuadrante meta, memorizando la posición de la plataforma.*

*Todas estas evidencias sugieren que sí perdura y sí existe consolidación de ME a lo largo del tiempo, manteniendo el recuerdo por lo menos hasta el día 25 desde su entrenamiento en ratas machos jóvenes adultas sanas. Dando así respuesta al primer objetivo planteado en el trabajo.*

En los últimos años otros investigadores, han utilizado el MWM para estudiar las bases neuroquímicas del aprendizaje y la memoria. Sobre todo, en lo que respecta a la capacidad para disociar los déficits en la formación de la memoria por problemas sensitivos, motores, motivacionales y de recuperación (Bannerman, Good et al. 1995).

El MWM ha demostrado ser una prueba robusta y confiable que está fuertemente correlacionada con la plasticidad sináptica del hipocampo y la función del receptor NMDA (Parsaei, Torkaman-Boutorabi et al. 2016).

La navegación, es la capacidad de los organismos para aprender a encontrar su camino a través del medio ambiente sin perderse, lo que requiere memoria para ubicarse y realizar rutas. Sin esta habilidad, ningún ser vivo podría sobrevivir. Por este motivo, esta capacidad se ha desarrollado en casi todas las especies (Vorhees and Williams 2014).

Los estudios de comportamiento para humanos, monos y ratas han demostrado que, al atravesar un entorno, tienden a utilizar diferentes marcos de referencia y cambian de manera frecuente de uno a otro.

Aportaciones neurofisiológicas, realizadas en ratas, han indicado que el hipocampo, la corteza retrosplenial y la corteza parietal posterior contribuyen a la formación de estrategias de navegación espacial y, con ello, se encuentran implicados en la memoria (Oess, Krichmar et al. 2017).

Así, experimentos realizados en el MWM como el de este trabajo, pueden demostrar y utilizarse como modelo de hallazgos conductuales tanto en humanos como en ratas.

La memoria consciente para una nueva experiencia, depende inicialmente de la información almacenada tanto en el hipocampo como en la neocorteza, como ya hemos comentado. Por eso, hay autores que consideran la consolidación como el proceso por el cual, el hipocampo guía la reorganización de la información almacenada en esta neocorteza volviéndose ésta, independiente del propio hipocampo (Wiltgen and Tanaka 2013).

Esta consolidación, se refiere al proceso mediante el cual, una memoria temporal y lábil se transforma en otra más estable y duradera. Lo aprendido,



permanece durante un tiempo después del aprendizaje (Lechner, Squire et al. 1999).

Se ha observado que, los recuerdos recientes son más vulnerables a lesiones o a enfermedades en comparación con los recuerdos más remotos. Pacientes con lesiones en el lóbulo temporal medio y en el hipocampo veían afectada su memoria del pasado, estas personas recordaban sucesos de sus primeros años de vida, aunque no ubicaban su pasado absoluto, sí sabían que había sucedido (Bayley, Hopkins et al. 2006).

Al igual que ha sucedido con nuestros resultados. En roedores, podemos conocer como ha perdurado la memoria a lo largo del tiempo, a la vez que, existen estudios que evalúan el comportamiento humano y como se encuentra afianzada la ME en ellos.

Estudiar la navegación en roedores es homóloga al estudio no solo del descubrimiento de rutas, sino también, de la memoria implícita en los seres humanos. Abarcando, el aprendizaje procedimental y la memoria, incluyendo comportamientos habilidosos como, conducir un automóvil, andar en bicicleta, lanzar y atrapar una pelota y otras actuaciones altamente entrenadas que se vuelven semiautomáticas (Vorhees and Williams 2014).

Se conoce que la misma red que proporciona información espacial en roedores, se encuentra implicada en la memoria semántica y episódica en humanos (Bicanski and Burgess 2016).

Los pacientes con perturbaciones memorísticas, se evalúan de múltiples maneras: se les vendan los ojos, se les guía en rutas, se les examina si poseen daños en el hipocampo o en la CE, se les enseñan operaciones de aprendizaje. Y curiosamente, la mayoría recuerdan lo sobreaprendido, de tal manera que, lo convierten en hábitos. Debido a que la ubicación de la memoria, se desplaza dentro del cerebro y se reclasifica como memoria implícita, según el comportamiento habilidoso y automático no consciente. Lo que demuestra que esta capacidad se debe a la navegación espacial o ME (Paquette, Franzen et al. 2011, Buzsaki and Moser 2013, Fouquet, Babayan et al. 2013).

En el mismo sentido, se han llevado a cabo estudios que provocan déficit en el MWM. Lesiones hipocampales y septohipocampales en ratas, inducen hiperactividad y deficiencias en la memoria.

En el polo opuesto, los tratamientos que inducen hipoactividad pueden disociarse de los déficits de aprendizaje y memoria en el laberinto de agua. Por ejemplo, se ha demostrado que las deficiencias de aprendizaje de MWM son independientes de los efectos locomotores, puesto que, las reducciones en tierra no afectaron a la velocidad de natación (Rodríguez Palmero 2004).

Algunos estudios en consolidación de la memoria en animales, han querido establecer si la memoria se estabiliza a lo largo del tiempo en individuos a los que se les practicó técnicas quirúrgicas invasivas, provocando lesiones neurotóxicas en hipocampo y, por tanto, una amnesia retrógrada. Las investigaciones manifestaron que existen cambios dependientes del tiempo en aspectos de la consolidación de la memoria, provocando una disminución de la misma cuando existe un bloqueo reversible crónico de los receptores GluR en el hipocampo tanto a los 16 como a los 28 días de la intervención (Riedel, Micheau et al. 1999, Remondes and Schuman 2004).

Otros investigadores, comprobaron cómo afecta el estrés sobre la ME y las funciones cognitivas en el MWM de diferentes maneras. Desde la separación de la vía materna en la infancia (Banqueri, Mendez et al. 2017), la ansiedad producida por un sobre ejercicio con ratas corredoras (Botha, Grace et al. 2012), los efectos de la edad como desórdenes neurodegenerativos (Haider, Batool et al. 2017), o la administración de ciertos fármacos, tanto en ratas sanas como en ratas con amnesia (Batool, Sadir et al. 2016).

Todos estos experimentos, conducen a una disminución de la ME durante la natación de los animales. Lo que nos lleva a pensar, la importancia de cómo afectan factores externos en los diferentes grupos de estudio.

Existen evidencias que sugieren que los animales estresados tienen un desempeño más pobre en el MWM. Por lo tanto, los factores ambientales que pueden causar estrés, como la temperatura, la luz y el ruido, deben ser monitorizados y mantenidos constantes durante la tarea (Bromley-Brits, Deng et al. 2011).

Nuevas investigaciones en este campo, han revelado, el impacto de la privación del sueño en el aprendizaje y la memoria, mediado por el hipocampo en ratas (Saygin, Ozguner et al. 2017).

La eficacia protectora de algunos fármacos en alteraciones de ME producidas por trombosis, por estrés, por lesiones motoras y neurodegenerativas (Geddes, Hayashi et al. 2017, Jiao, Zhou et al. 2017).

Se han evaluado los beneficios de nuevas terapias para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, utilizando el MWM en diferentes cepas de roedores con edades diversas y con patologías severas (Adasme, Haeger et al. 2011, Bromley-Brits, Deng et al. 2011, Webster, Bachstetter et al. 2014, Foley, Ammar et al. 2015).

Pero en ningún caso, esos estudios se han realizado para memorias superiores a 9 o 10 días desde su aprendizaje.

Por este motivo, nuestros resultados son novedosos, al comprobar que la ME aún perdura a los 16 y a los 25 días desde el comienzo del aprendizaje.

Siendo este trabajo, el primero en demostrar que la ME en ratas machos sanas entrenadas en el MWM consolidan la memoria a largo plazo, tras un proceso de entrenamiento previo.

*Estos hallazgos nos permiten tener un modelo procedimental y un buen diseño experimental para analizar cambios neuroquímicos en el hipocampo durante el aprendizaje y la consolidación de la memoria a corto y largo plazo.*

Basado en ello, analizamos a continuación la presencia y síntesis de PRL y sus receptores en hipocampo en dichos procesos de aprendizaje y memoria.

## 4.2. PROLACTINA EN EL HIPOCAMPO

### 4.2.1 DETERMINACIÓN DEL PATRÓN DE DISTRIBUCIÓN DE PRL EN HIPOCAMPO DE RATAS EN APRENDIZAJE

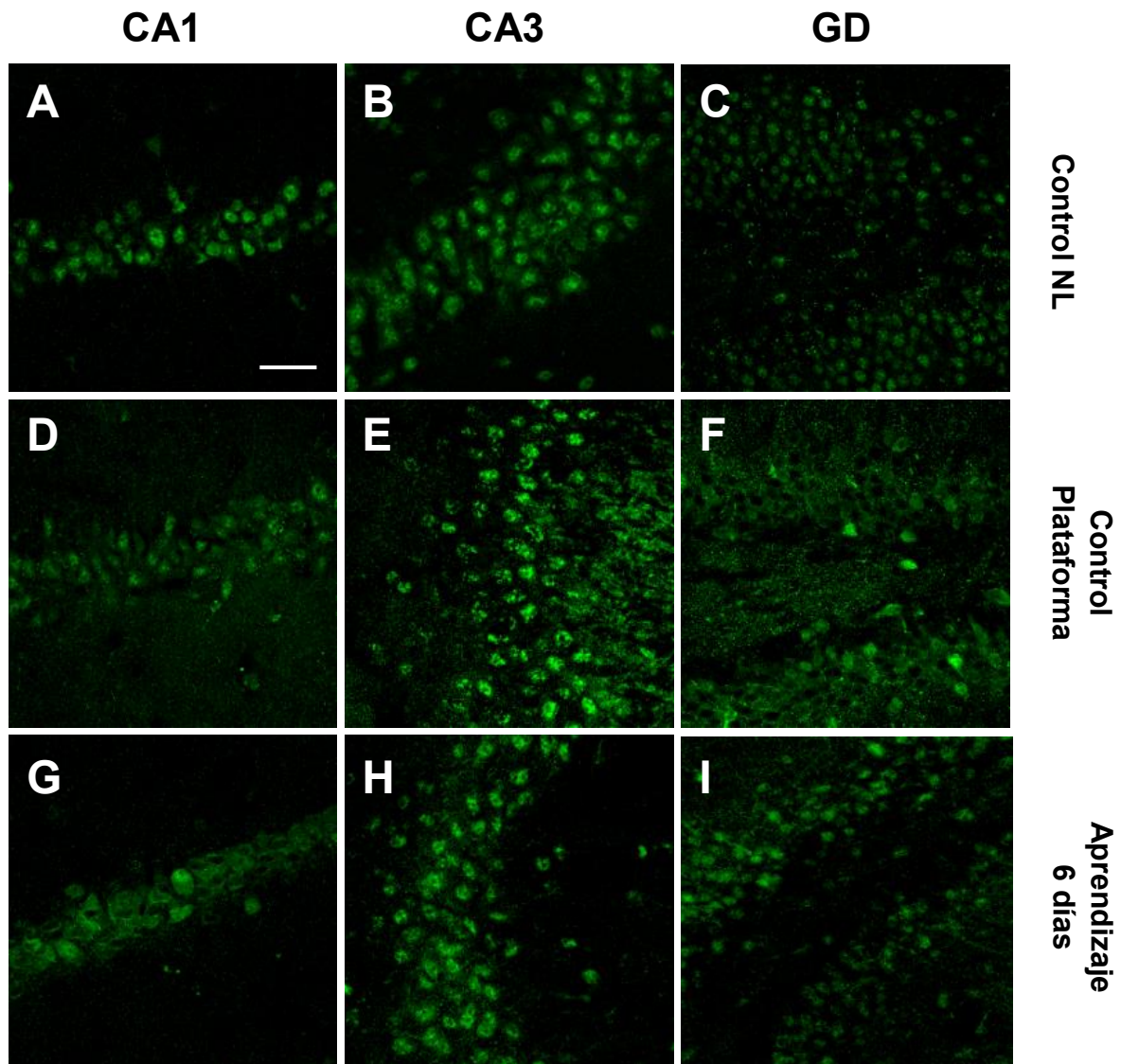
El hipocampo es una estructura anatómica compleja. Se compone de un área formada por **el Giro Dentado** (GD). Integrado por, una banda festoneada de corteza, cóncava dorsomedialmente, formada por una corteza trilaminar: *capa molecular; capa granular y capa polimórfica*.

Otra parte es **el Cuerno de Amón** (CA), a su vez está constituido por una arquicorteza trilaminar. Una sola capa de células, las células piramidales con capas plexiformes por encima y por debajo, *alveus, estrato oriens; estrato piramidal; estrato radiado y estrato lacunoso-molecular*.

Este CA se divide en tres campos anatómicos distintos, CA1, CA2 y CA3. En ocasiones, también, se tiene en cuenta otra área llamada CA4. Aunque para algunos autores, no existe una evidencia clara de su existencia (Standring 2015, Zeidman and Maguire 2016, Abu El-Hamd and Farah 2017).

Para evaluar de manera más precisa las diferentes zonas del hipocampo. Se analizaron y se observaron al microscopio confocal, las áreas, CA1, CA3 y GD, de los cerebros de los mismos animales que fueron empleados para analizar aprendizaje y consolidación de la memoria (Figura RD-13).

Se analizó la intensidad de fluorescencia en cada imagen (Figura RD-14). Este parámetro, es un tipo de luminiscencia que caracteriza a las sustancias que son capaces de absorber energía, emitiendo parte de la misma en forma de longitud de onda visible. Al ser proporcional a la absorción, es un método óptimo e indirecto para ser utilizado como medida de cuantificación arbitraria de la cantidad de PRL que podemos llegar a tener en las imágenes correspondientes a las condiciones del estudio (Britten, Archer-Hall et al. 1978, Renschler and Harrah 1983, Kim, Kang et al. 2016).

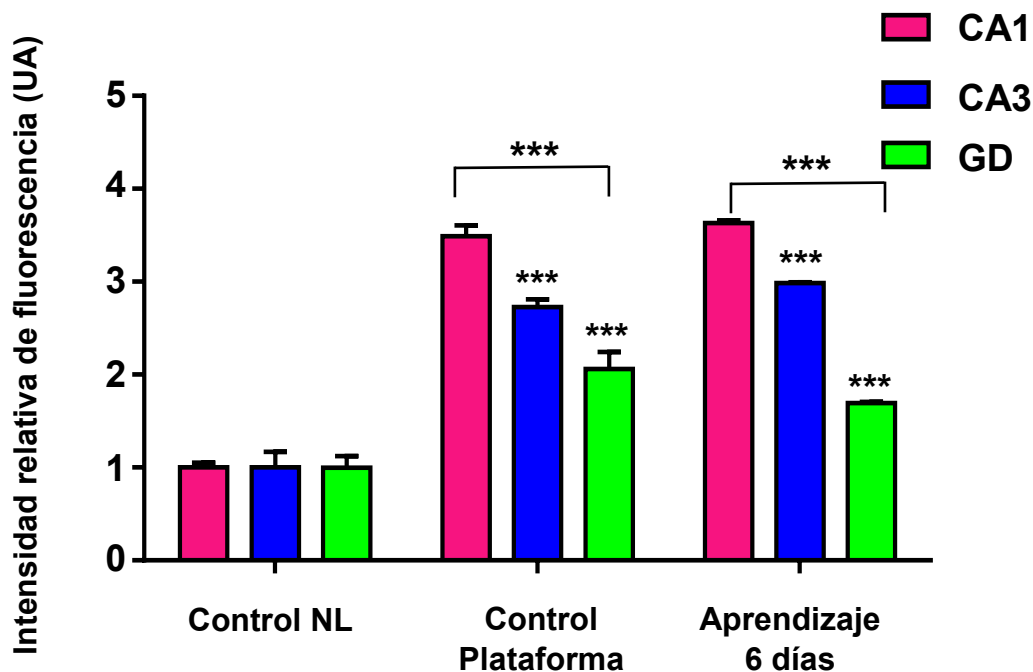


**Figura RD-13.** Inmunolocalización de PRL (en verde) en cortes de hipocampo en ratas machos adultas entrenadas en el MWM. Los cortes son secciones de las zonas CA1, CA3 y GD de los grupos Control NL (A, B y C); Control Plataforma movida (D, E y F) y Aprendizaje 6 días (G, H e I). Barra de escala, 20  $\mu$ m.

La inmnofluorescencia observada de la hormona PRL en cortes histológicos de las tres áreas del hipocampo estudiadas (Figura RD-13). Puso de manifiesto, que en todos los grupos del estudio, la PRL estaba presente en las células piramidales hipocampales, de la zona CA1, CA3 y en las células glomerulares del GD.

La intensidad de positividad a PRL no fue igual en cada área (Tabla RD-8), presentando diferencias entre los grupos.

A modo de recordatorio, cada categoría del estudio había tenido un tipo diferente de entrenamiento. Lo que nos hizo pensar que, la presencia de PRL podría estar influenciada por las condiciones a las que habían estado sometidos los animales.



**Figura RD-14.** Intensidad relativa de fluorescencia de cortes histológicos de hipocampo de la zona CA1 (rosa), CA3 (azul) y GD (verde). Se representó la media  $\pm$  EEM de  $n=5$  animales por condición. Normalizado por el grupo control NL. El nivel significativo fue por ANOVA (test Bonferroni) comparando con CA1 entre las regiones y, con el Ctrl NL entre los (\*\*\*) $p<0.0001$ .

La positividad a PRL y la intensidad de la misma, varió de unos grupos a otros (Figura RD-14).

Las zonas CA1( $1.00 \pm 0.05$ ), CA3 ( $1.00 \pm 0.17$ ) y GD ( $1.00 \pm 0.12$ ) en el control NL, no sufrieron diferencias significativas entre ellas.

Los niveles de intensidad fueron menores que en los otros dos grupos de estudio, que presentaron un aumento significativo (\*\*\*) $p<0.0001$  de la intensidad de marcaje a PRL, en las tres regiones estudiadas, tanto en control Plataforma (CA1:  $3.49 \pm 0.11$ , CA3:  $2.72 \pm 0.09$  y GD:  $2.06 \pm 0.18$ ) como en Aprendizaje 6 días (CA1:  $3.63 \pm 0.03$ , CA3:  $2.99 \pm 0.01$  y GD:  $1.70 \pm 0.02$ ) respecto a control NL.

En ambos casos, la intensidad de fluorescencia para células positivas, fue mayor para la región CA1, que para CA3 y GD. Disminuyendo significativamente (\*\*\*) $p < 0.0001$ ) en el GD.

Intensidad de fluorescencia (UA)			
GRUPOS	CA1	CA3	GD
CONTROL NL	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.17	1.00 ± 0.12
CONTROL PLATAFORMA	3.49 ± 0.11	2.72 ± 0.09	2.06 ± 0.18
APRENDIZAJE 6 DÍAS	3.63 ± 0.03	2.99 ± 0.01	1.70 ± 0.02

**Tabla RD-8.** Cuantificación del nivel de intensidad de fluorescencia en los grupos de aprendizaje en MWM. Todos los valores fueron expresados como la media ± EEM.

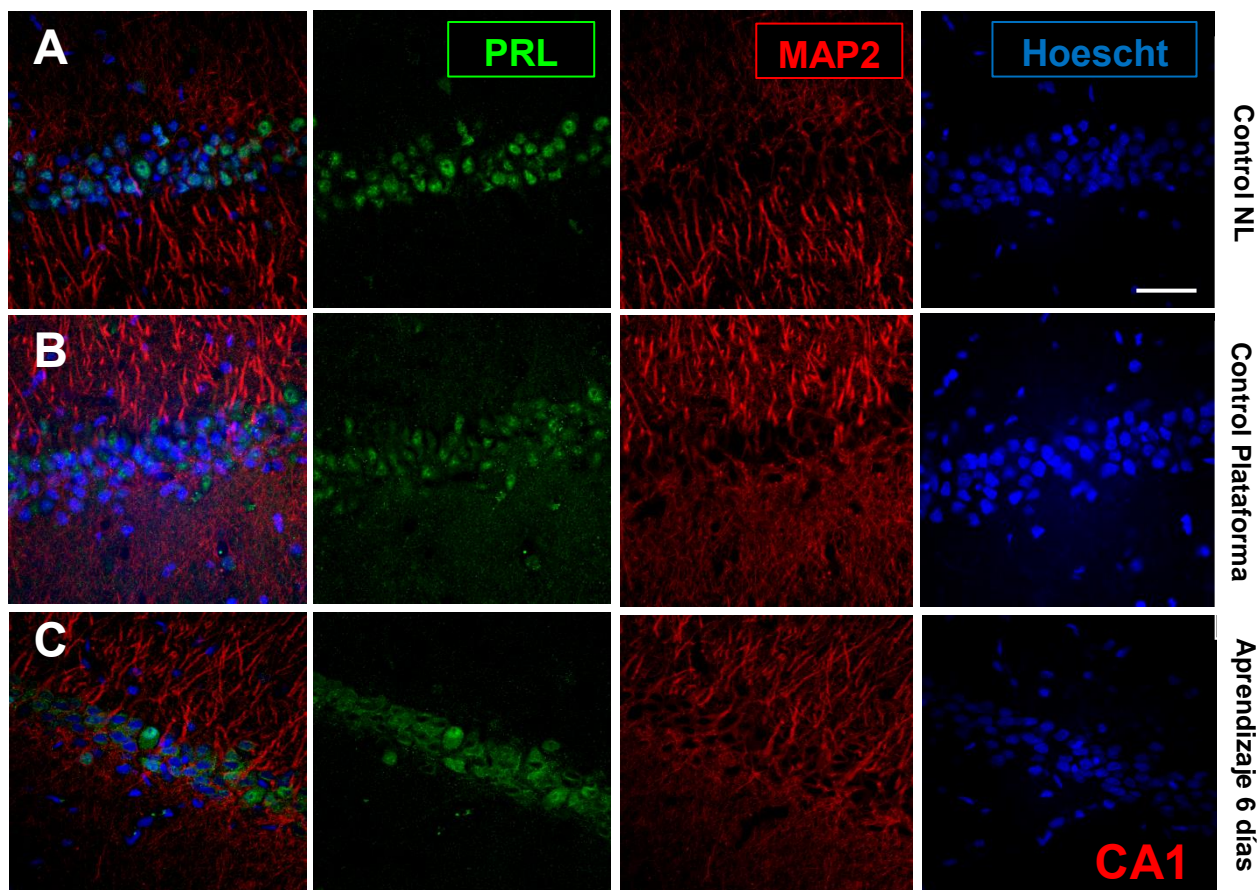
*Los resultados cuantitativos y cualitativos en la intensidad de fluorescencia, mostraban la presencia de PRL en secciones de hipocampo en todos los grupos pre-entrenados en MWM. La presencia de la proteína de estudio, no fue uniforme, ni similar en todas las zonas hipocampales.*

Por ello, se planteó evaluar la posible relación de semejanza sobre esta hormona, en los diferentes estratos de cada región del hipocampo estudiada.

#### **4.2.1-1 CUANTIFICACIÓN DE LA POSITIVIDAD A PRL EN LOS ESTRATOS DE LA ZONA CA1 DEL HIPOCAMPO**

Tras cuantificar un total de 800 células, para conocer cuántas eran positivas a PRL. Se realizó un cálculo del porcentaje de células positivas y negativas para cada región estudiada.

El estudio, se completó haciendo un análisis de positividad en los estratos de esta región del hipocampo.



**Figura RD-15.** Inmunofluorescencia confocal de la región CA1 del hipocampo en ratas machos entrenadas en el MWM. En verde, se observó la localización de la hormona PRL. En rojo, las proteínas asociadas a microtúbulos con MAP2 y los núcleos se mostraban en azul, teñidos con Hoescht. (A) condición control NL, (B) Control plataforma y (C) Aprendizaje 6 días, en todos los casos se aprecia el merge de las fotografías. Barra de escala, 20  $\mu$ m.

En las imágenes obtenidas con el microscopio (Figura RD-15). Se observaron los núcleos de las células teñidos en azul por Hoescht. Éstos, se distribuyeron por todos los estratos de CA1, y más compactados en el estrato Piramidal.

Presentaban una morfología similar en todas las condiciones del estudio. Por consiguiente, estas observaciones originaron una idea en el número de células que podemos encontrar en las imágenes.

Al mismo tiempo, en color verde, se mostró la presencia de la proteína PRL. La distribución de esta molécula no fue uniforme, no se encontraba en todas las



situaciones por igual. En algunas células, su aparición fue inexistente, mientras que, en otras, estaba presente de manera muy contundente como se pudo ver en las imágenes.

La fluorescencia de MAP2, dio una idea de cómo se encontraba caracterizado la morfología del árbol dendrítico en nuestras piezas. Ya que, mostró el citoesqueleto neuronal.

MAP2, es una proteína específica involucrada en el ensamblaje de los microtúbulo. Actúa como estabilizador en el crecimiento de los mismos, debido a que provoca un entrecruzamiento entre filamentos intermedios y otros microtúbulos (Izant and McIntosh 1980).

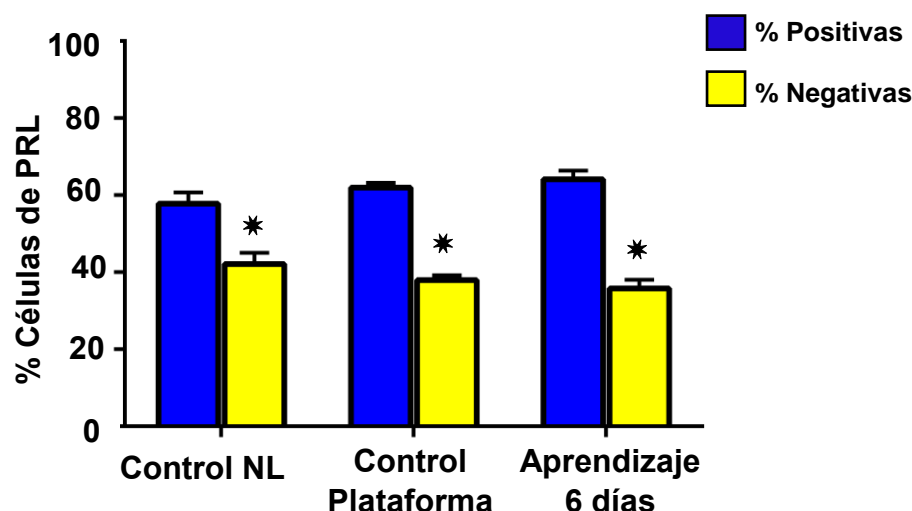
Una vez que se conoció la morfología celular. Se analizó el porcentaje de positividad y negatividad (Tabla RD-9).

REGIÓN CA1		
GRUPOS	Positividad (%)	Negatividad(%)
CONTROL NL	57.90 ± 2.90	42.10 ± 2.90
CONTROL PLATAFORMA	61.94 ± 1.25	38.06 ± 1.25
APRENDIZAJE 6 DÍAS	64.15 ± 2.19	35.85 ± 2.19

**Tabla RD-9.** Análisis del porcentaje de células positivas a proteína PRL, en la región CA1 del hipocampo. Todos los valores fueron expresados como la media ± EEM.

Se muestra un aumento significativo (\* $p < 0.05$ ) observado en el porcentaje de células positivas en todos los grupos: control NL (57.90 ± 2.90), control Plataforma (61.94 ± 1.25), y en Aprendizaje 6 días (64.15 ± 2.19) respecto al porcentaje de células negativas (*Control NL*: 42.10 ± 2.90, *Control Plataforma*: 38.06 ± 1.25 y *Aprendizaje 6 días*: 35.85 ± 2.19) (Figura RD-16).

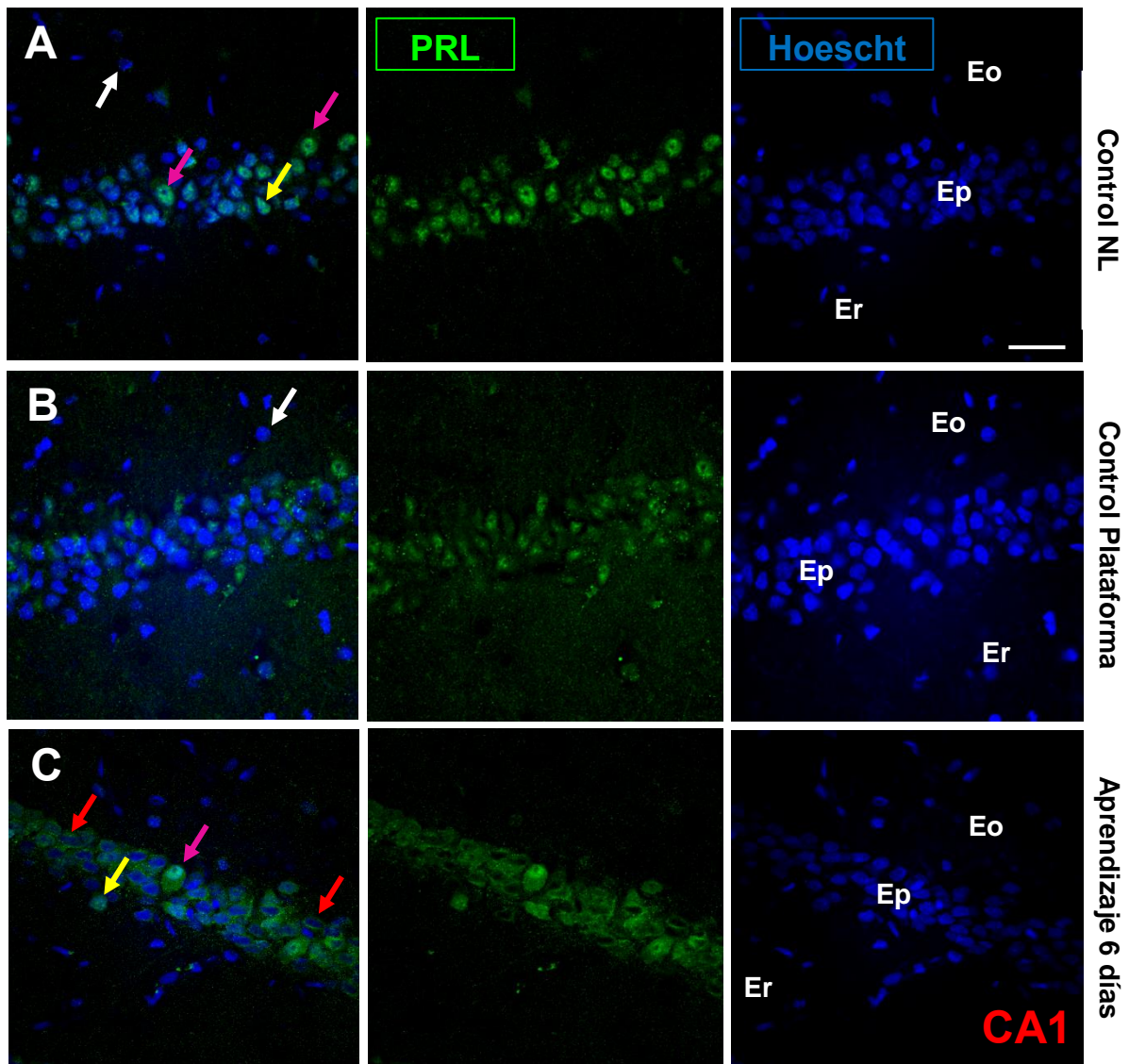
Se observó un ligero incremento de positividad en la condición Aprendizaje 6 días, respecto a los otros dos grupos, sin nivel estadísticamente significativo.



**Figura RD-16. Porcentaje** celular de la positividad a PRL en la región CA1, en cortes histológicos de hipocampo. En azul, se observó el porcentaje de células positivas a PRL. Mientras que, en amarillo, se analizó las negativas. Los valores representaban la media  $\pm$  EEM de 800 células contadas por grupo. El estudio estadístico se llevó a cabo por ANOVA, mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni (\* $p < 0.05$ ), comparando la negatividad con el porcentaje positivo y los grupos con el control NL (no se vieron diferencias significativas entre ellos).

Los resultados, han revelado la existencia de un mayor número de células positivas que negativas en la región CA1 del hipocampo.

Como puede apreciarse en las imágenes de la Figura RD-17, la positividad a PRL dentro de la célula, no se localizaba en la misma posición. Células positivas en el núcleo, otras que eran positivas en el citoplasma y, en algunas ocasiones, en ambos lugares a la vez.



**Figura RD-17.** Imágenes de microscopía confocal sobre cortes histológicos en cerebros de ratas machos entrenadas en el MWM. Se mostró la localización por inmunofluorescencia de la proteína PRL en la región CA1 de hipocampo. Con Hoescht, se tiñeron los núcleos de las células neuronales (azul), en verde se visualizó el marcador a PRL. (A) correspondió a la condición control NL, (B) Control plataforma y (C) Aprendizaje 6 días. En todos los grupos, se realizó el merge de las fotografías. Se utilizaron las siglas, Eo, Estrato Oriens; Ep, Estrato piramidal y Er, Estrato radiado para indicar la zona de CA1. Las flechas blancas hacían referencia a células negativas, las rojas a células positivas sólo en el citoplasma, las amarillas a positividad en el núcleo y, por último, las flechas rosas, indicaban células con doble positividad, tanto en el núcleo como en el citoplasma. Barra de escala, 20  $\mu$ m

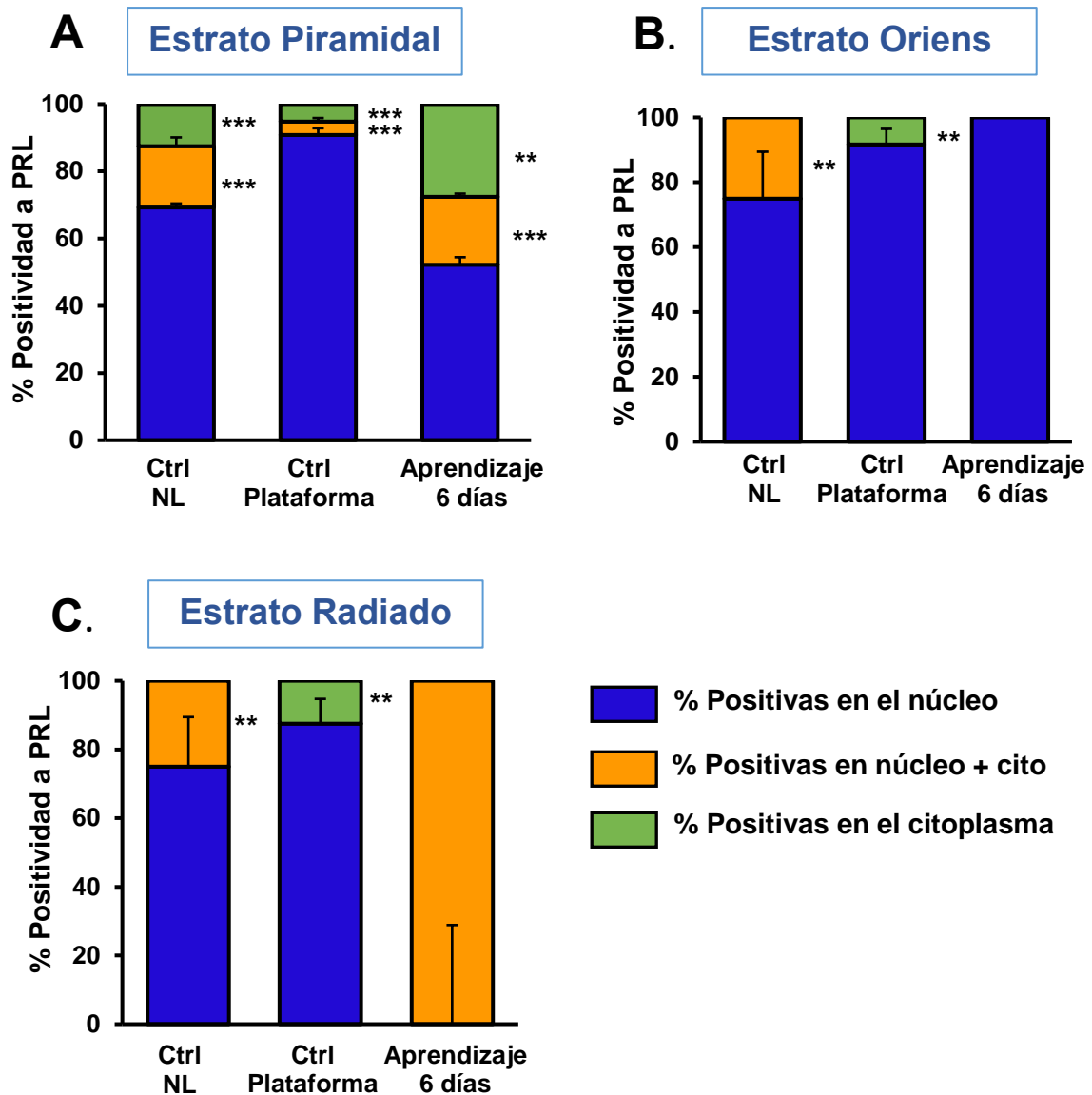
Positividad del estrato Piramidal de la región CA1 (%)			
GRUPO	Núcleo	Núcleo +Citoplasma	Citoplasma
CONTROL NL	69.26 ± 1.16	18.22 ± 2.60	12.51 ± 1.44
CONTROL PLATAFORMA	90.79 ± 2.24	4.01 ± 1.05	5.19 ± 0.99
APRENDIZAJE 6 DÍAS	52.22 ± 2.23	20.20 ± 0.94	27.57 ± 3.18
Positividad del estrato Oriens de la región CA1 (%)			
GRUPO	Núcleo	Núcleo +Citoplasma	Citoplasma
CONTROL NL	75.00 ± 14.43	25.00 ± 14.43	0.00 ± 0.00
CONTROL PLATAFORMA	91.67 ± 4.81	0.00 ± 0.00	8.33 ± 4.81
APRENDIZAJE 6 DÍAS	100 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Positividad del estrato Radiado de la región CA1 (%)			
GRUPO	Núcleo	Núcleo +Citoplasma	Citoplasma
CONTROL NL	75.00 ± 14.43	25.00 ± 14.43	0.00 ± 0.00
CONTROL PLATAFORMA	87.50 ± 7.22	0.00 ± 0.00	12.50 ± 28.87
APRENDIZAJE 6 DÍAS	0.00 ± 0.00	100 ± 0.00	0.00 ± 0.00

**Tabla RD-10.** Análisis del porcentaje de las células positivas a proteína PRL de ratas entrenadas en MWM, en los diferentes estratos de la región CA1 del hipocampo. Todos los valores fueron expresados como la media ± EEM.

La localización de PRL, no sólo mostraba diferencias dentro de las células neuronales. Al mismo tiempo, se encontraron cambios de positividad según el estrato de la región CA1 que estuviéramos observando.

Tras considerar estas evidencias. Se decidió analizar el porcentaje de positividad celular en cada estrato de la región CA1 por separado (Tabla RD-10).

Así, se conoció la localización células positivas en el núcleo, en el citoplasma o, en contraposición, si dicha positividad a la proteína PRL se encontraba en ambos lugares a la vez.



**Figura RD-18.** Porcentaje de positividad a PRL en cada estrato de la zona CA1 del hipocampo. (A) Estrato Piramidal, (B) estrato Oriens y (C) estrato Radiado para las condiciones Control NL, Control plataforma y Aprendizaje 6 días. Se representó la media  $\pm$  EEM de 800 células contadas. Se realizó ANOVA (test de Bonferroni) comparando los datos estadísticamente con % positividad en el núcleo (\*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$ ).

En todos los estratos predominó la localización nuclear para la positividad a PRL (Figura RD-18) frente a la localización en el citoplasma o la conjunta núcleo y citoplasma.

El análisis de comparación para los grupos, reveló la inexistencia de diferencias significativas entre ellos, para los tres estratos estudiados.

En el estrato Piramidal, la positividad nuclear a PRL fue significativamente (\*\*\*)  $p < 0.0001$ ) más alta en el grupo control Plataforma ( $91.67 \pm 4.81$ ) que en el grupo NL ( $69.26 \pm 1.16$ ) y un éste fue mayor que en el de Aprendizaje 6 días ( $52.22 \pm 2.23$ ).

También, fue relevante el porcentaje de células positivas, marcadas conjuntamente en el núcleo y el citoplasma, en el grupo control NL ( $18.22 \pm 2.60$ ) y en Aprendizaje 6 días ( $20.20 \pm 0.94$ ). En comparación con el aumento de células positivas, únicamente en el citoplasma, que presentó la condición Aprendizaje 6 días ( $27.57 \pm 3.18$ ).

La distribución del patrón de positividad en el estrato Oriens (Figura RD-18B) y en el estrato Radiado (Figura RD-18C) fue muy semejante en control NL y control Plataforma, pero no el grupo Aprendizaje 6 días.

En este último grupo, se observó un porcentaje del 100% de células positivas para el núcleo en estrato Oriens ( $100 \pm 0.00$ ). En contraposición al 100% de células positivas en núcleo y citoplasma del estrato Radiado ( $100 \pm 0.00$ ).

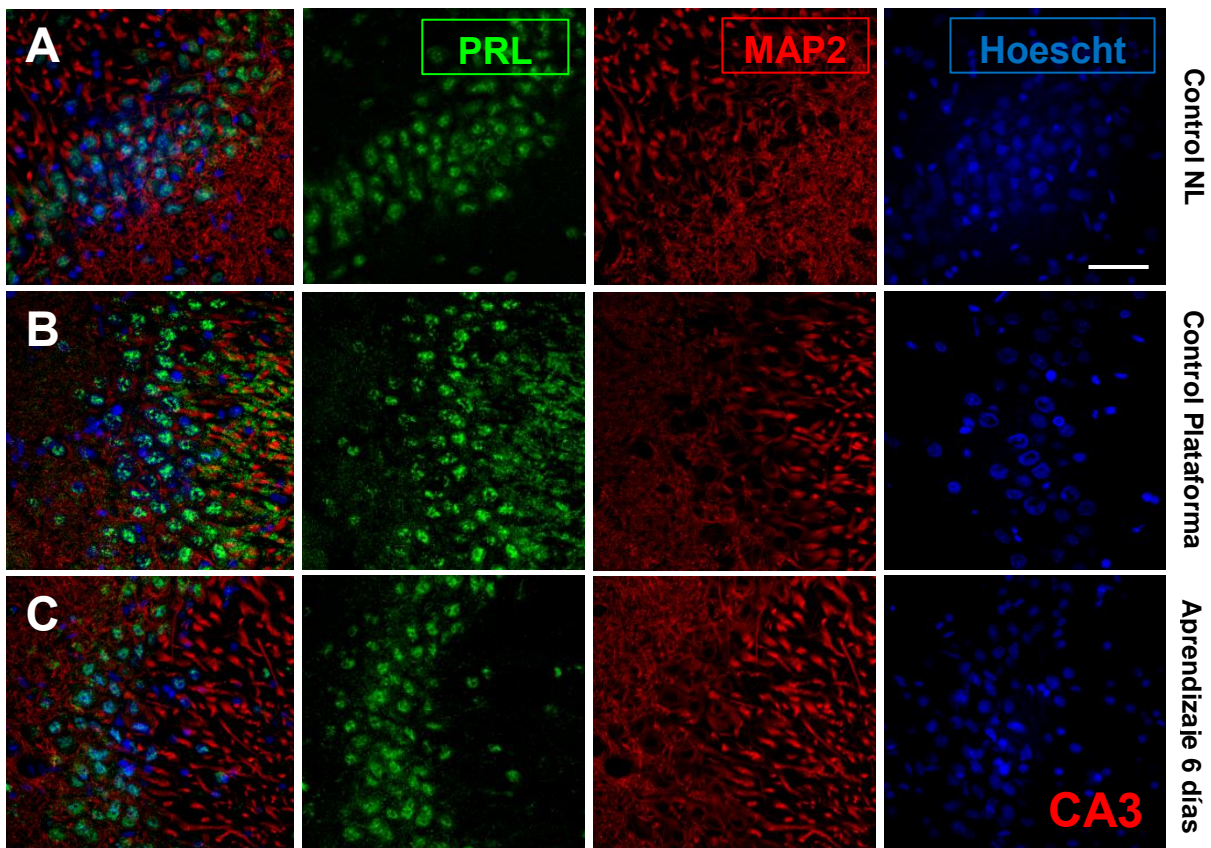
*Los resultados, han mostrado que en todos los estratos existió mayor marcaje positivo a PRL en la zona del núcleo, exceptuando la condición Aprendizaje 6 días en el estrato Radiado.*

*El estrato Piramidal, presentó positividad en los compartimentos celulares analizados: células positivas en el núcleo, en el citoplasma y en ambos a la vez, para todos los grupos del estudio.*

*Por otro lado, los resultados para los estratos Oriens y Radiado fueron similares para todos los grupos, excepto para el Aprendizaje 6 días, que solo tuvo positividad en el núcleo en el Oriens o, núcleo y citoplasma conjuntamente en el Radiado.*

#### 4.2.1-2 CUANTIFICACIÓN DE LA POSITIVIDAD A PRL EN LOS ESTRATOS DE LA ZONA CA3 DEL HIPOCAMPO

La positividad a PRL en la región CA3 la hemos analizado siguiendo un diseño semejante al descrito para CA1.



**Figura RD-19.** Imágenes de Inmunofluorescencia confocal de la región CA3 de hipocampo en ratas machos entrenadas en el MWM. La hormona PRL se representó en color verde, MAP2 en rojo para observar la red de microtúbulos y con Hoescht se tiñeron los núcleos en azul. (A) condición control NL, (B) Control plataforma y (C) Aprendizaje 6 días. En todos los casos se apreció el merge de las fotografías. Barra de escala, 20  $\mu$ m.

La región CA3 de todos los animales de control o de aprendizaje (Figura R-19) presentó positividad a PRL.

La morfología celular, se presentó de forma uniforme. Las células del estrato Piramidal, guardaban una apariencia redondeada.

En la red de microtúbulos, se observó un árbol dendrítico estable, que ponía en contacto las diferentes estructuras de la región CA3.

Por otro lado, los merges de las imágenes, mostraban que PRL no se encontraba ubicada en todas las células por igual, a la vez que no todas esas células eran reactivas a esta hormona. Caso similar a lo que se vio en la región CA1.



**Código QR** de la región CA3 de ratas machos Ctrl NL. Para poder tener acceso a este enlace se debe descargar en el móvil o en otro dispositivo cualquier, la aplicación que permita escanear códigos QR. Los más usuales son UpCode (URL de descarga: <http://www.upcode.fi>) directa desde el móvil; I.nigma (URL de descarga: <http://www.i-nigma.com/Downloadi-nigmaReader.html>, App Store, Android Market, BlackBerry App World); Beetag Reader (URL de descarga: <http://get.beetagg.com>) directa desde el móvil.

Como efecto de curiosidad, se desarrolló un código QR, que le llevará a descubrir una imagen en 3D de la región CA3 en la condición Ctrl NL.

Esta imagen, se realizó con el microscopio confocal. Se pudo apreciar, cómo estaba localizada PRL (en verde) en tres planos. Cómo se caracterizaban tanto el citoplasma como en el núcleo en el espacio.

A la vez que, se ha podido observar los filamentos axonales (en rojo) y los núcleos (en azul).

Con este código QR, se ha querido mostrar cómo estaba compuesta la región del SNC que se estaba analizando en este estudio, desde un punto de vista molecular y de forma tridimensional.

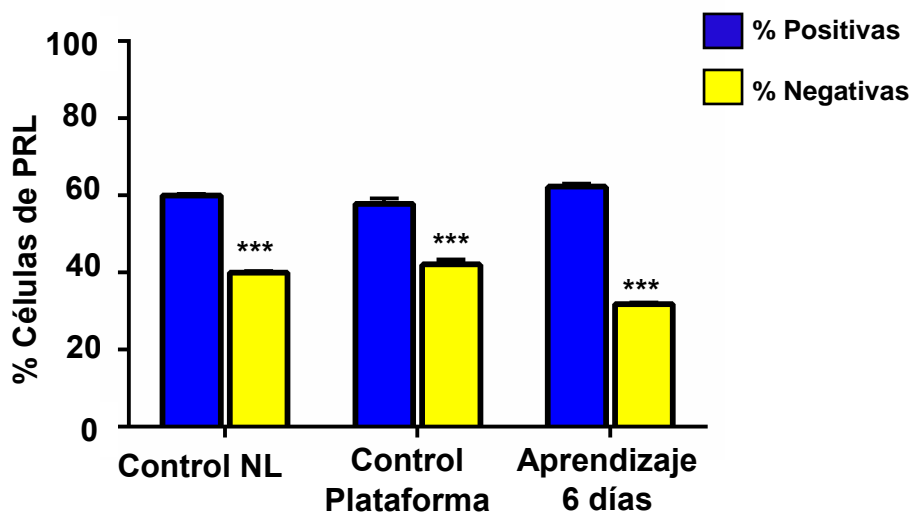
De este modo virtual, podíamos conocer cómo estaba localizada PRL en el espacio.



Siguiendo las mismas pautas que para la región CA1, se analizó el grado de positividad a PRL en CA3 (Figura RD-20), mediante el cálculo del porcentaje de células positivas y negativas (Tabla RD-11).

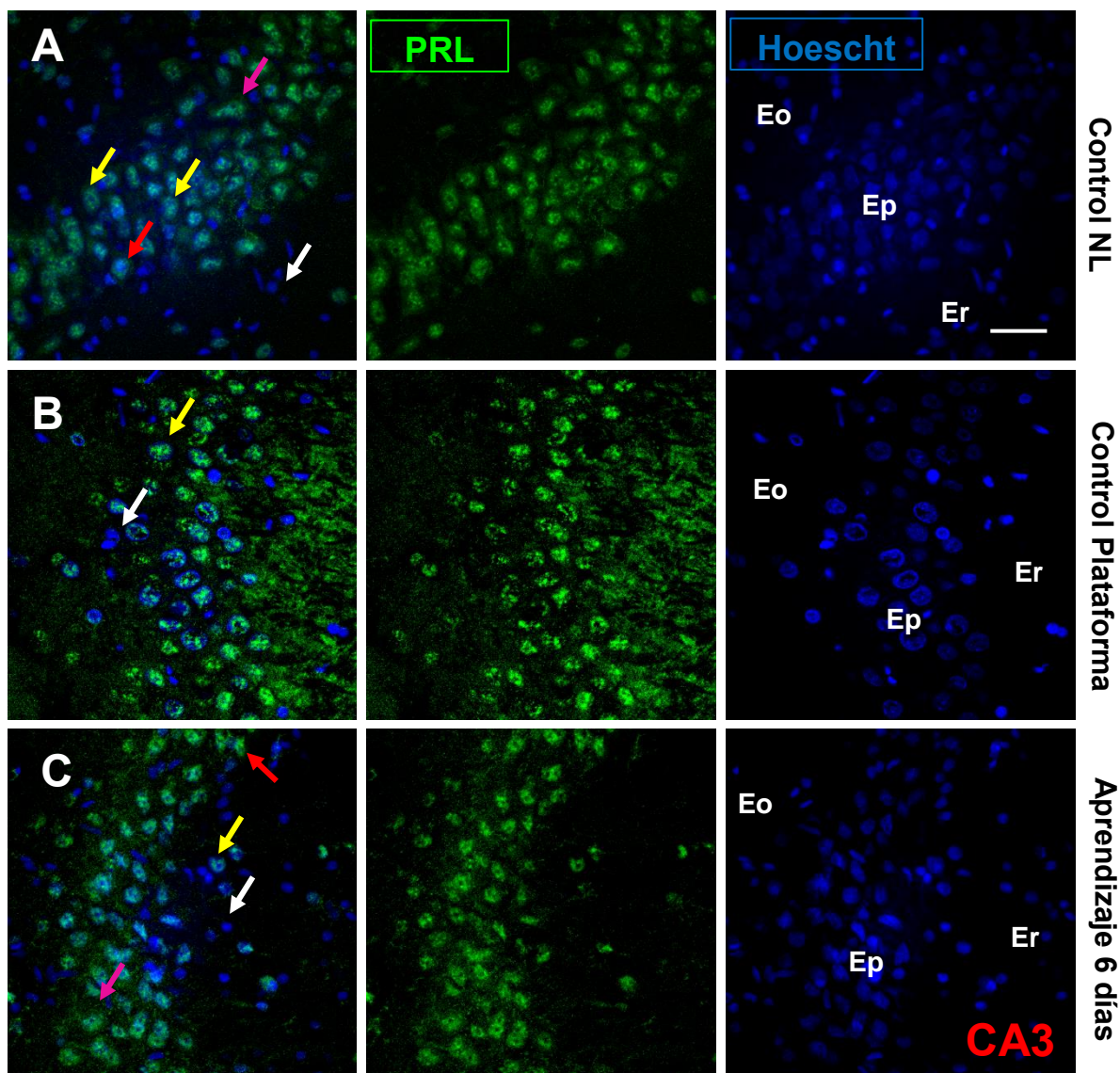
REGIÓN CA3		
GRUPOS	Positividad (%)	Negatividad(%)
CONTROL NL	60.02 ± 0.38	39.97 ± 0.38
CONTROL PLATAFORMA	57.89 ± 1.37	42.11 ± 1.37
APRENDIZAJE 6 DÍAS	62.26 ± 0.77	31.91 ± 0.39

**Tabla RD-11.** Análisis del porcentaje de células positivas a proteína PRL, en la región CA3 del hipocampo. Todos los valores fueron expresados como la media ± EEM.



**Figura RD-20.** Porcentaje celular de la positividad a PRL en cortes de la región CA3 del hipocampo. En azul, porcentaje positivo y en amarillo el negativo. Los valores representaban la media ± EEM de 800 células medidas. Fueron analizados por ANOVA, comparados con el porcentaje de células positivas para los dos porcentajes y con el grupo control NL para comparar las condiciones (no se vieron diferencias significativas entre grupos), mediante el test de Bonferroni (\*\*p < 0.0001).

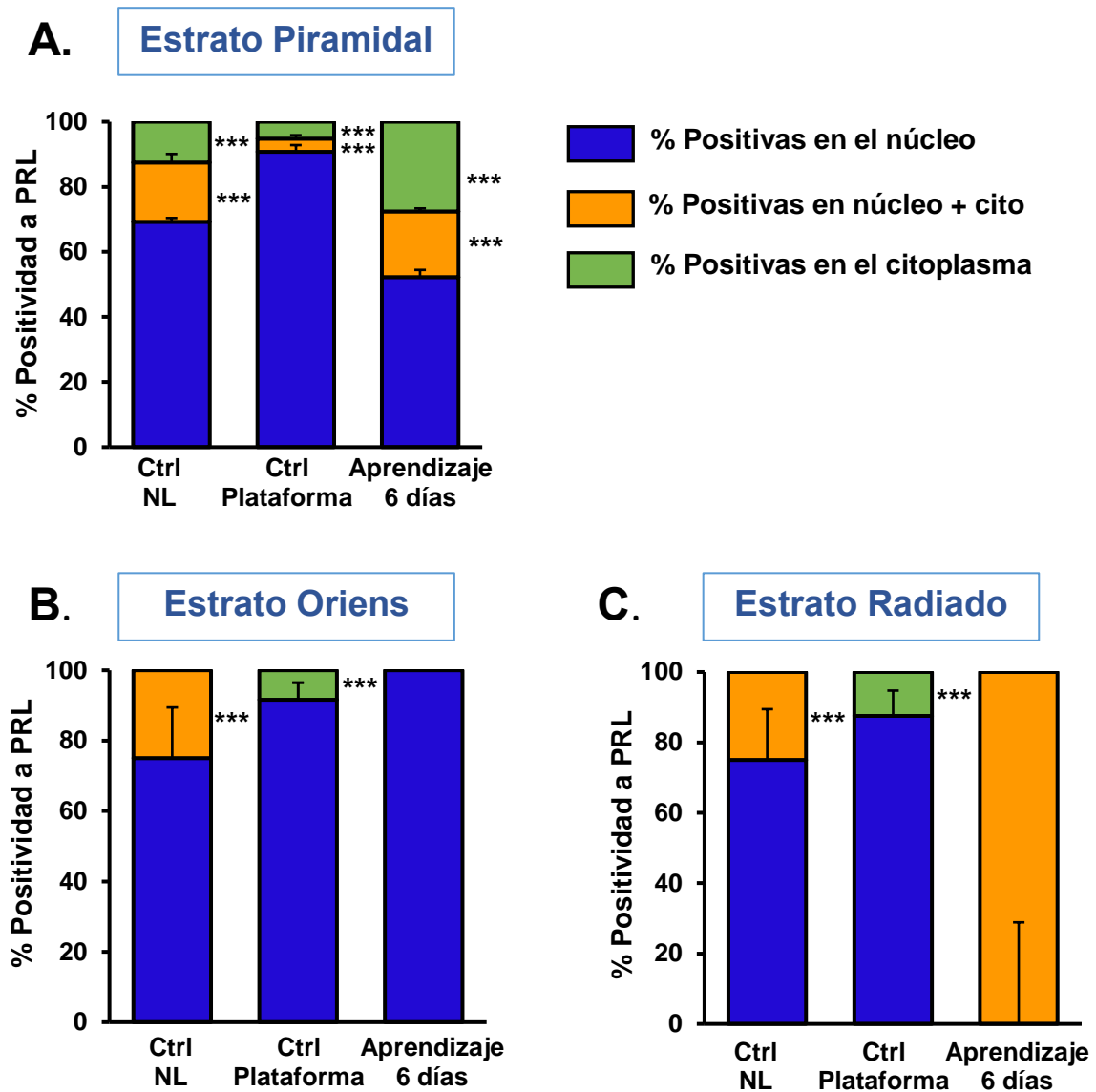
El porcentaje de células positivas a PRL fue significativamente más elevado (\*\*p < 0.0001) que el de negativas (Figura RD-20). Se observó un ligero aumento no significativo para la condición Aprendizaje 6 días (62.26 ± 0.77). Por lo que, la cantidad de positividad en las tres condiciones fue semejantes.



**Figura RD-21.** Imágenes a microscopía confocal de inmunofluorescencia a PRL en la zona CA3 del hipocampo, en cortes de ratas entrenadas en el MWM. Se presentó, los núcleos en azul teñidos por Hoescht y el marcador de PRL en verde. Se apreció el merge de las fotografías. Eo, Estrato Oriens; Ep, Estrato piramidal y Er, Estrato radiado. Las flechas blancas señalaban células negativas, las rojas células positivas sólo en el citoplasma, las amarillas positividad en el núcleo y las rosas doble positividad (núcleo +citoplasma). Barra de escala, 20  $\mu$ m.

En lo que se refiere al patrón intracelular de marcaje, se localizó presencia de PRL (Figura RD-21), en núcleo, en citoplasma y en ambos lugares a la vez (núcleo + citoplasma) con diferencias en los distintos estratos de la región CA3.

Las diferencias entre los estratos se muestran agrupadas en la Figura RD-22 y la Tabla RD-12. Como puede verse en las gráficas, no existieron diferencias significativas entre los grupos en ninguno de los tres estratos comparados y en todos ellos, existió un aumento significativo (\*\*\*) de las células positivas en el núcleo respecto a las otras dos situaciones analizadas.



**Figura RD-22.** Porcentaje de positividad a PRL en cada estrato de la región CA3 del hipocampo, para los grupos pre-entrenados en el MWM. Los valores representan la media  $\pm$  EEM de  $n=10$  imágenes confocales y 800 células contadas por grupo. Se analizó por ANOVA los niveles estadísticamente significativos, mediante el test de Bonferroni, comparando el porcentaje de positividad con las células positivas en el núcleo. (\*\*\*) $p < 0.0001$ .

El estrato Piramidal (Figura RD-22A), presentó positividad en los tres compartimentos analizados. No obstante, existió una distinción entre los grupos control NL y Aprendizaje 6 días, respecto a control Plataforma.

El porcentaje de células positivas en el núcleo fue mayor en control Plataforma ( $83.48 \pm 1.13$ ) que en NL ( $71.30 \pm 3.40$ ) o Aprendizaje ( $66.33 \pm 0.00$ ). Siendo estos dos últimos, los que presentaban mayor porcentaje de células positivas en citoplasma (NL:  $11.34 \pm 1.00$ , Aprendizaje:  $6.63 \pm 1.53$ ) o en núcleo+ citoplasma (NL:  $17.35 \pm 2.40$ , Aprendizaje:  $27.04 \pm 1.53$ ).

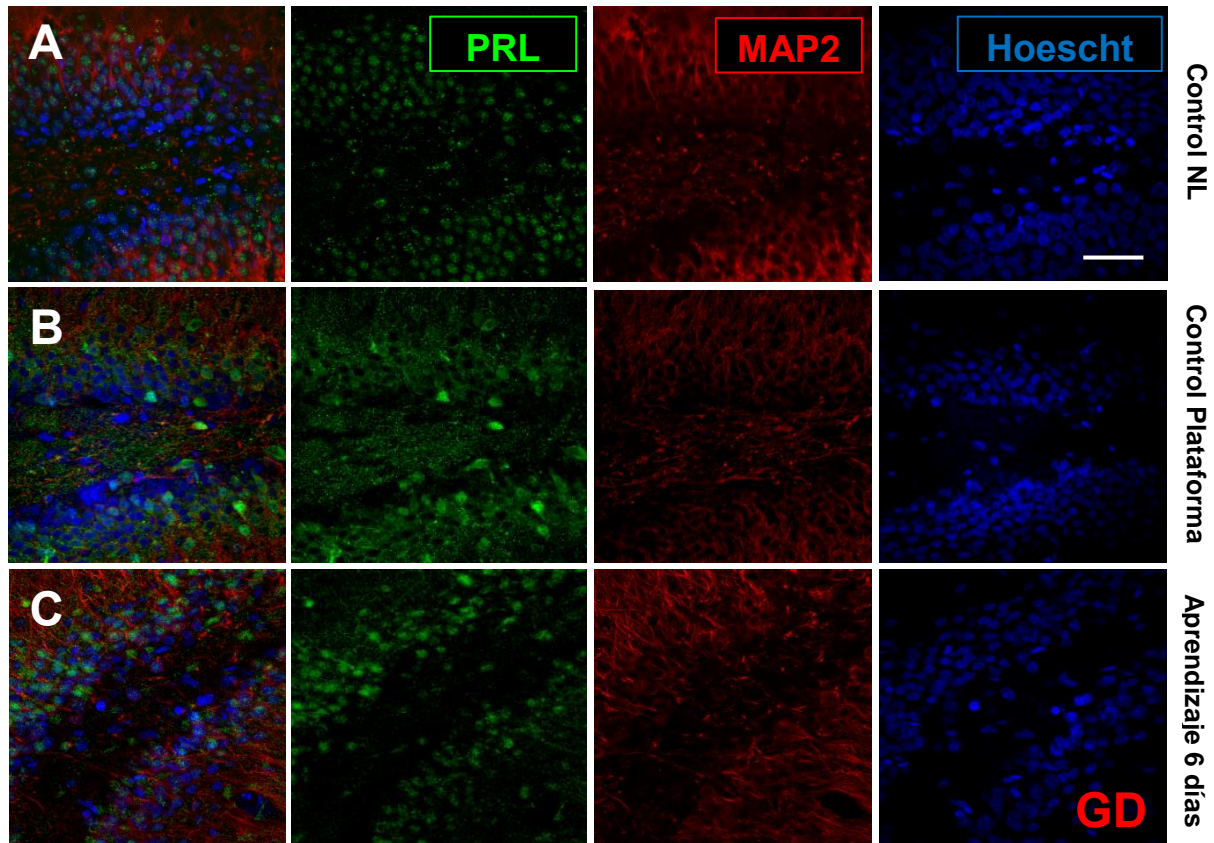
Referente al estrato Oriens (Figura RD-22B) y al Radiado (Figura RD-22C), el porcentaje de positividad fue similar para ambos casos en los grupos controles. Únicamente se distinguió, la condición Aprendizaje 6 días. Puesto que hubo un 100 % de células positivas en el núcleo para Oriens, en contraposición al Radiado que su 100% de positividad, se observó en un marcaje conjunto de núcleo + citoplasma.

Positividad del estrato Piramidal de la región CA3 (%)			
GRUPO	Núcleo	Núcleo +Citoplasma	Citoplasma
CONTROL NL	$71.30 \pm 3.40$	$17.35 \pm 2.40$	$11.34 \pm 1.00$
CONTROL PLATAFORMA	$83.48 \pm 1.13$	$8.07 \pm 2.19$	$8.45 \pm 3.32$
APRENDIZAJE 6 DÍAS	$66.33 \pm 0.00$	$27.04 \pm 1.53$	$6.63 \pm 1.53$
Positividad del estrato Oriens de la región CA3 (%)			
GRUPO	Núcleo	Núcleo +Citoplasma	Citoplasma
CONTROL NL	$90.00 \pm 8.00$	$10.00 \pm 6.50$	$0.00 \pm 0.00$
CONTROL PLATAFORMA	$100 \pm 0.00$	$0.00 \pm 0.00$	$0.00 \pm 0.00$
APRENDIZAJE 6 DÍAS	$56.25 \pm 6.25$	$43.75 \pm 6.25$	$12.50 \pm 4.25$
Positividad del estrato Radiado de la región CA3 (%)			
GRUPO	Núcleo	Núcleo +Citoplasma	Citoplasma
CONTROL NL	$100 \pm 0.00$	$0.00 \pm 0.00$	$0.00 \pm 0.00$
CONTROL PLATAFORMA	$45.00 \pm 8.20$	$5.00 \pm 1.00$	$0.00 \pm 0.00$
APRENDIZAJE 6 DÍAS	$53.33 \pm 8.33$	$26.67 \pm 6.67$	$53.33 \pm 13.33$

**Tabla RD-12.** Análisis del porcentaje de las células positivas a proteína PRL de ratas entrenadas en MWM, en los diferentes estratos de la región CA3 del hipocampo. Todos los valores fueron expresados como la media  $\pm$  EEM.

#### 4.2.1-3 CUANTIFICACIÓN DE LA POSITIVIDAD A PRL EN LAS CAPAS DE LA REGIÓN GD DEL HIPOCAMPO

Siguiendo con el mismo diseño que hemos realizado para CA1 y CA3. Se analizó la región del GD y sus capas.



**Figura RD-23.** Inmunolocalización de la hormona PRL (verde) del GD en hipocampo de ratas machos entrenadas en el MWM. MAP2 en rojo para observar la red de microtúbulos, los núcleos en azul teñidos con Hoescht. (A) condición control NL, (B) Control plataforma y (C) Aprendizaje 6 días. En todos los casos se realizó el merge de las fotografías. Barra de escala, 20  $\mu$ m.

Las imágenes de la Figura RD-23 muestran la presencia de PRL en el GD de las condiciones de pre-entrenamientos.

Como se ha venido describiendo hasta ahora, la morfología de las células no fue tan homogénea como en los casos anteriores.

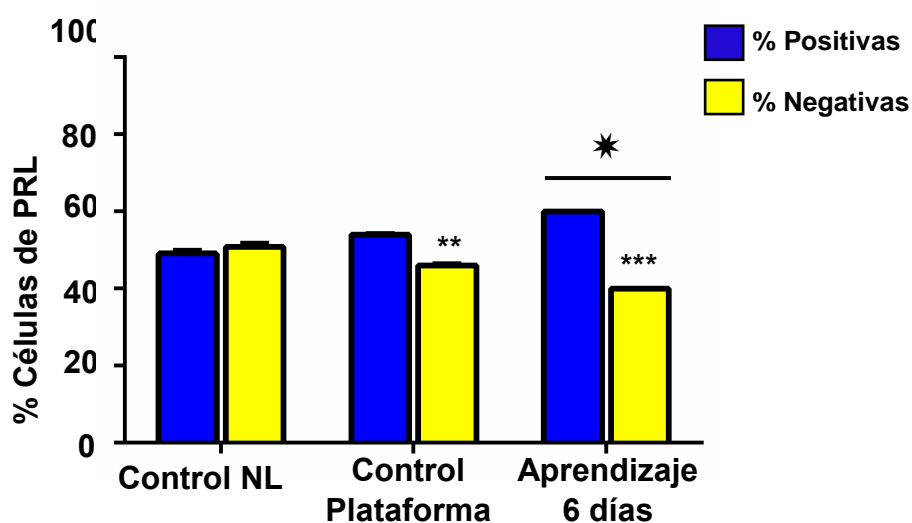
GD mostró una morfología diferente. Los núcleos eran menos redondeados, con una forma más ovalada, más numerosos y apelmazados.

Haciendo un símil a estudios previos, se observó positividad en diferentes zonas de las células como en la región CA1 y CA3. Se encontró reacción en el núcleo, en el citoplasma e incluso en ambos a la vez (núcleo + citoplasma).

Por esta razón, se estudió la positividad celular en esta región (Figura RD-24 y Tabla RD-13), de una forma parecida a la del asta de Amón.

REGIÓN GD		
GRUPOS	Positividad (%)	Negatividad(%)
CONTROL NL	49.10 ± 1.07	50.90 ± 1.07
CONTROL PLATAFORMA	53.93 ± 0.53	46.07 ± 0.53
APRENDIZAJE 6 DÍAS	60.03 ± 0.17	39.97 ± 0.17

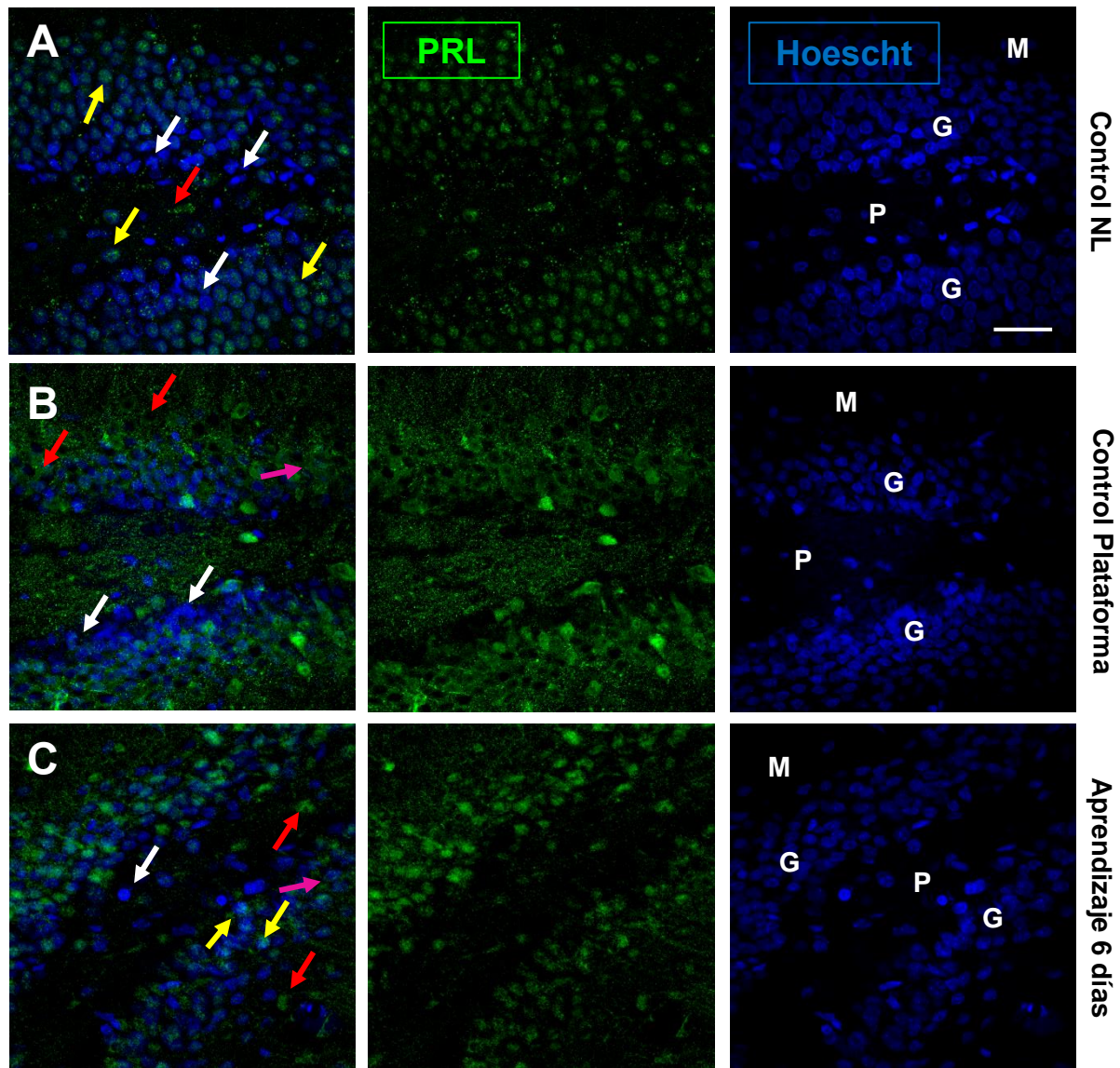
**Tabla RD-13.** Análisis del porcentaje de células positivas a proteína PRL, en la región GD del hipocampo. Todos los valores fueron expresados como la media ± EEM.



**Figura RD-24.** Porcentaje celular de la positividad a PRL en de la región GD del hipocampo. Se representó media ± EEM de 800 células contadas. Se analizó ANOVA (test de Bonferroni), comparando el porcentaje de negativas respecto al positivo y los grupos con el control NL (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$ ).

La condición aprendizaje 6 días (60.03 ± 0.17), mostraba un aumento significativo (\* $p < 0.05$ ) del porcentaje de células positivas, respecto a los grupos controles (NL: 49.10 ± 1.07, Plataforma: 53.93 ± 0.53) (Figura RD-24).

Existió mayor número de células positivas (\*\*\*) $p < 0.0001$ ) en comparación con el porcentaje de células negativas en los tres grupos del estudio. Aunque, se observaba un crecimiento continuado desde el grupo NL ( $49.10 \pm 1.07$ ), al control plataforma ( $53.93 \pm 0.53$ ), para ver que el aumento de positividad más alto, se daba en el grupo Aprendizaje 6 días ( $60.03 \pm 0.17$ ).



**Figura RD-25.** Microscopía confocal de la localización de PRL de la región GD de hipocampo en ratas machos entrenadas en el MWM. Los núcleos se tiñeron de azul por Hoescht, el marcador de PRL en verde. En todos los casos se realizó el merge de las imágenes. M, capa Molecular; G, capa Granular y P, estrato Polimorfo. Las flechas blancas señalan células negativas, las rojas positivas en citoplasma, las amarillas positividad en el núcleo y, por último, las flechas rosas doble positividad, tanto en el núcleo como en el citoplasma. Barra de escala, 20  $\mu\text{m}$ .

El siguiente paso a seguir, fue estudiar la distribución de las células positivas a PRL en el GD y analizar cómo se encontraba presente en las diferentes capas de esta región mediante microscopía confocal (Figura RD-25)

En ellas, se observó un ligero marcaje para las células de la capa granular del GD del grupo control NL, siendo esa intensidad mayor en las células de control Plataforma y Aprendizaje 6 días.

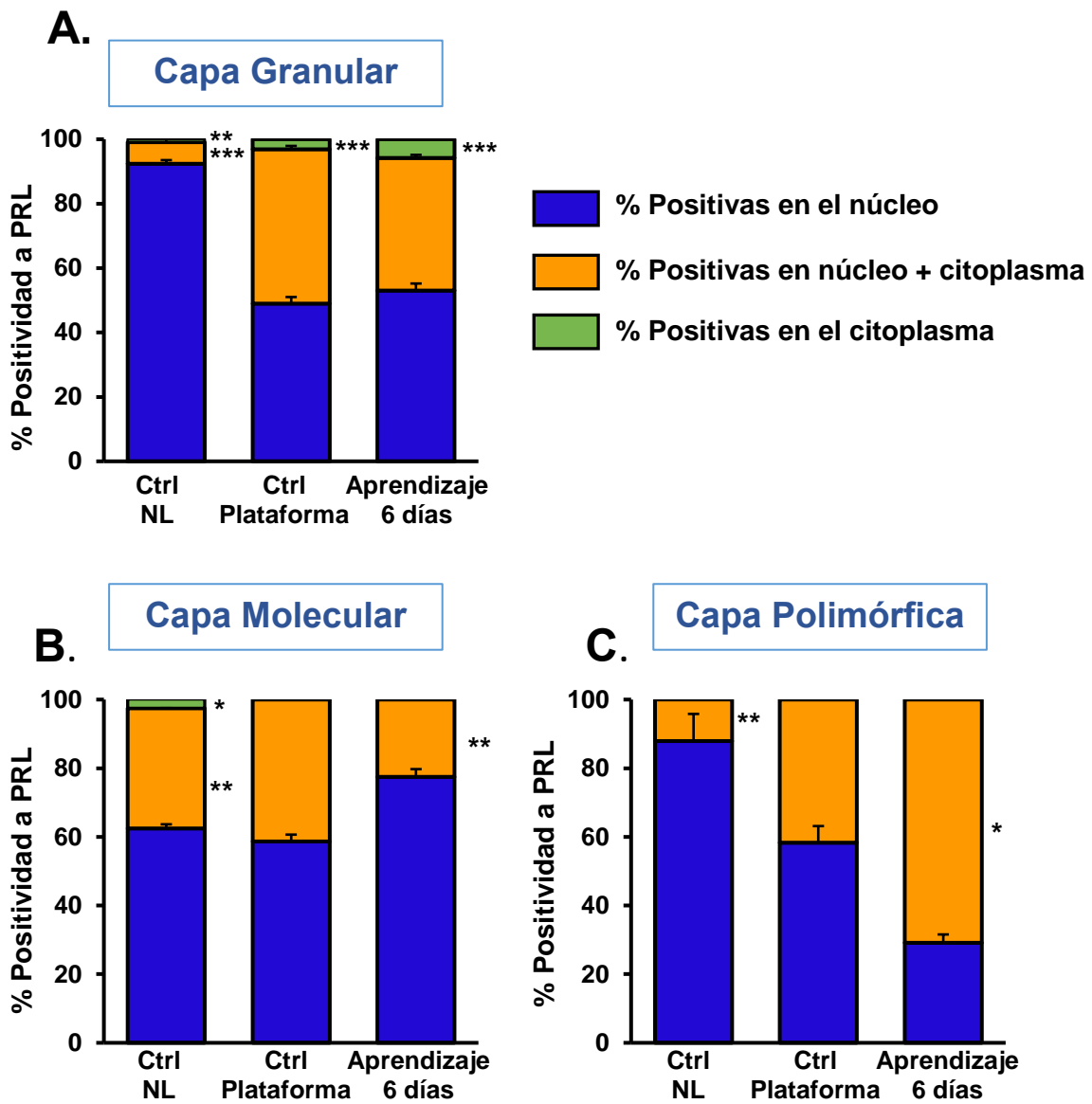
Como se esperaba y haciendo una similitud a los resultados obtenidos para CA1 y CA3. La ubicación de PRL en las células neuronales, no se producía de manera uniforme. Es decir, esta proteína no estaba presente en todas las capas del GD de forma similar.

Si nos referimos únicamente a la morfología que presentaban las células. Existió de forma cualitativa y visual, mayor presencia de PRL en el núcleo de las células de la capa granular, especialmente en la condición NL. Para confirmar estos hallazgos subjetivos, se analizó la positividad en las capas de GD (Tabla RD-14).

<b>Positividad de la capa granular de la región GD (%)</b>			
<b>GRUPO</b>	<b>Núcleo</b>	<b>Núcleo +Citoplasma</b>	<b>Citoplasma</b>
<b>CONTROL NL</b>	92.35 ± 3.53	6.71 ± 2.60	0.93 ± 0.01
<b>CONTROL PLATAFORMA</b>	48.97 ± 5.32	47.90 ± 4.47	3.13 ± 0.84
<b>APRENDIZAJE 6 DÍAS</b>	52.97 ± 2.37	41.22 ± 2.23	5.80 ± 0.15
<b>Positividad de la capa molecular de la región GD (%)</b>			
<b>GRUPO</b>	<b>Núcleo</b>	<b>Núcleo +Citoplasma</b>	<b>Citoplasma</b>
<b>CONTROL NL</b>	62.50 ± 12.50	25.00 ± 12.50	2.67 ± 0.01
<b>CONTROL PLATAFORMA</b>	58.62 ± 3.45	41.38 ± 3.45	0.00 ± 0.00
<b>APRENDIZAJE 6 DÍAS</b>	77.50 ± 2.50	22.50 ± 2.50	0.00 ± 0.00
<b>Positividad de la capa polimórfica de la región GD (%)</b>			
<b>GRUPO</b>	<b>Núcleo</b>	<b>Núcleo +Citoplasma</b>	<b>Citoplasma</b>
<b>CONTROL NL</b>	77.92 ± 15.12	4.93 ± 1.73	6.25 ± 0.18
<b>CONTROL PLATAFORMA</b>	58.33 ± 8.33	41.67 ± 8.33	0.00 ± 0.00
<b>APRENDIZAJE 6 DÍAS</b>	29.17 ± 4.16	70.83 ± 4.17	0.00 ± 0.00

**Tabla RD-14.** Análisis del porcentaje de las células positivas a proteína PRL de ratas entrenadas en MWM, en las diferentes capas de GD del hipocampo. Todos los valores fueron expresados como la media ± EEM.





**Figura RD-26.** Porcentaje de positividad a PRL en cada capa, (A) Capa Granular, (B) Capa Molecular y (C) Capa Polimórfica de la región GD del hipocampo, para las condiciones Control NL, Control plataforma y Aprendizaje 6 días. Se representó el % de células positivas en el núcleo a PRL en azul, en naranja el % de células positivas al marcador PRL tanto en el núcleo como en el citoplasma y en verde el porcentaje de células positivas en el citoplasma. Los valores representan la media  $\pm$  EEM de  $n=10$  imágenes al microscopio confocal de cada grupo, midiendo 800 células por condición. El estudio estadístico se realizó por ANOVA con el test de comparaciones múltiples de Bonferroni, comparando con % positividad en el núcleo para las capas ( $*p<0.01$ ,  $**p<0.001$ ,  $***p<0.0001$ ).

En la capa Granular del GD (Figura RD-26A) de los animales del grupo control NL ( $92.35 \pm 3.53$ ), la reacción fue principalmente nuclear, con un porcentaje significativamente mayor ( $***p < 0.0001$ ) que en los otros compartimentos.

Mientras que, en control Plataforma y Aprendizaje 6 días hubo mucha similitud entre las células con marcaje nuclear (*Plataforma*:  $48.97 \pm 5.32$ , *Aprendizaje*:  $52.97 \pm 2.37$ ), y las células positivas en núcleo y citoplasma a la vez (*Plataforma*:  $47.90 \pm 4.47$ , *Aprendizaje*:  $41.22 \pm 2.23$ ).

En referencia al porcentaje positivo citoplasmático de la capa Granular, se encontraron valores significativamente menores ( $***p < 0.0001$ ) en los tres grupos del estudio, si se comparan con los porcentajes de positividad nuclear o, nuclear y citoplásmica conjuntamente.

En la capa Molecular (Figura RD-26B), existió mayor porcentaje de células positivas en el núcleo para los tres grupos del estudio. Observándose la falta de positividad en el citoplasma en control Plataforma ( $0.00 \pm 0.00$ ) y en Aprendizaje 6 días ( $0.00 \pm 0.00$ ), con valores muy bajos para control NL ( $2.67 \pm 0.01$ ).

Al mismo tiempo, la cuantificación del porcentaje de positividad en la capa Polimórfica (Figura RD-26C), demostró un aumento significativo y correlativo de las células marcadas positivamente tanto en el núcleo como en el citoplasma, desde el grupo control NL ( $4.93 \pm 1.73$ ), aumentando en control Plataforma ( $41.67 \pm 8.33$ ), hasta hacerse bastante elevado en la condición Aprendizaje 6 días ( $70.83 \pm 4.17$ ).

Excepto en el grupo NL ( $6.25 \pm 0.18$ ), los demás grupos no mostraron positividad citoplásmica en la capa Polimórfica.

Al valorar los resultados en su conjunto, haciendo referencia a la cuantificación de positividad de las células marcadas a PRL en las tres regiones del hipocampo estudiadas, CA1, CA3 y GD.

No se observaron diferencias destacables entre los grupos en ninguna de las tres regiones del estudio. Aunque hubo una tendencia a aumentar la positividad a PRL de NL a Plataforma y de éste a Aprendizaje 6 días, principalmente en CA1 y GD.

*Los resultados, indicaban que había un porcentaje elevado de células positivas a PRL en el núcleo, tanto en CA1, CA3 y GD, que afectaba principalmente al estrato Piramidal de CA1 y CA3 como al estrato Granular del GD. Y era significativamente mayor que el observado para células con marcaje citoplásmico o nuclear y citoplásmico a la vez.*

*También, se observó un bajo porcentaje en células positivas marcadas únicamente en el citoplasma en cualquiera de las tres regiones del estudio. Incluso, su presencia era muy baja o inexistente en algunos estratos, sobre todo en el Oriens y Radiado de CA1 y CA3 o en la capa Molecular y Polimórfica del GD.*

*Por otro lado, sí había presencia de células con marcaje nuclear y citoplásmico conjuntamente en todos los estratos del asta de Amón y en todas las capas del GD. Aunque, nunca fue superior al porcentaje de células con marcaje nuclear exclusivamente.*

#### 4.2.2 DETERMINACIÓN DEL PATRÓN DE DISTRIBUCIÓN DE PRL EN HIPOCAMPO DE RATAS CON CONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA A 9 DÍAS, 16 DÍAS Y 25 DÍAS

Siguiendo el mismo método de trabajo y conociendo los resultados en localización y distribución de PRL para las ratas entrenadas en el MWM, se analizó la presencia de PRL en el hipocampo de ratas que habían consolidado la memoria a 9 días, 16 días y 25 días.

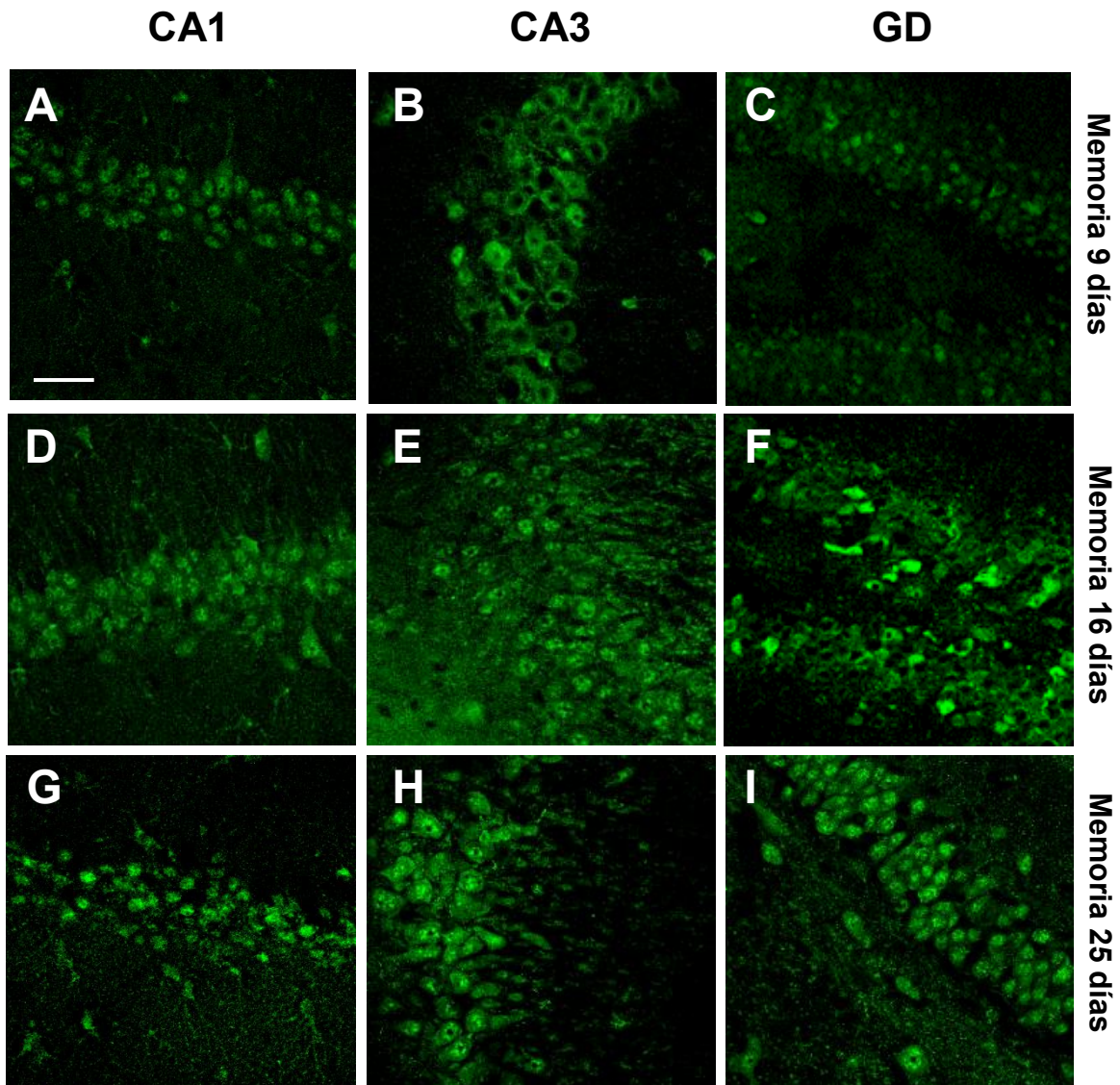
La nomenclatura para los animales seguirá siendo semejante, como venimos haciéndolo hasta ahora: ratas que han consolidado la memoria a los 9 días tras el entrenamiento, llamadas Memoria 9 días, las que lo hicieron a los 16 días, Memoria 16 días y, por último, las ratas entrenadas que consolidaron la memoria a los 25 días, Memoria 25 días.

La intensidad de marcaje a PRL (Tabla RD-15), en las tres regiones estudiadas, aumentó a los 9 respecto a lo Aprendizaje 6 días. Incremento que fue mayor a los 16 y 25 días.

En el asta de Amón, las regiones CA1 y CA3 presentaron un descenso a los 25 con respecto a los 16 días, cosa que no ocurrió en el GD, donde el aumento de intensidad se mantuvo.

Intensidad de fluorescencia (UA)			
GRUPOS	CA1	CA3	GD
MEMORIA 9 DÍAS	4.29 ± 0.29	4.59 ± 0.38	2.93 ± 0.16
MEMORIA 16 DÍAS	6.48 ± 0.16	7.30 ± 0.51	3.42 ± 0.24
MEMORIA 25 DÍAS	6.01 ± 0.22	5.07 ± 0.15	3.83 ± 0.04

**Tabla RD-15.** Cuantificación del nivel de intensidad de fluorescencia en los grupos que han consolidado la memoria, tras un entrenamiento en MWM. Todos los valores fueron expresados como la media ± EEM.



**Figura RD-27.** Inmunolocalización de PRL (en verde) en cortes de hipocampo en ratas machos adultas entrenadas en el MWM cuya consolidación de la memoria ha sido a 9 días, 16 días y 25 días. Los cortes son secciones de las zonas CA1, CA3 y GD en los grupos Memoria 9 días (A, B y C); Memoria 16 días (D, E y F) y Memoria 25 días (G, H e I). Barra de escala, 20  $\mu$ m.

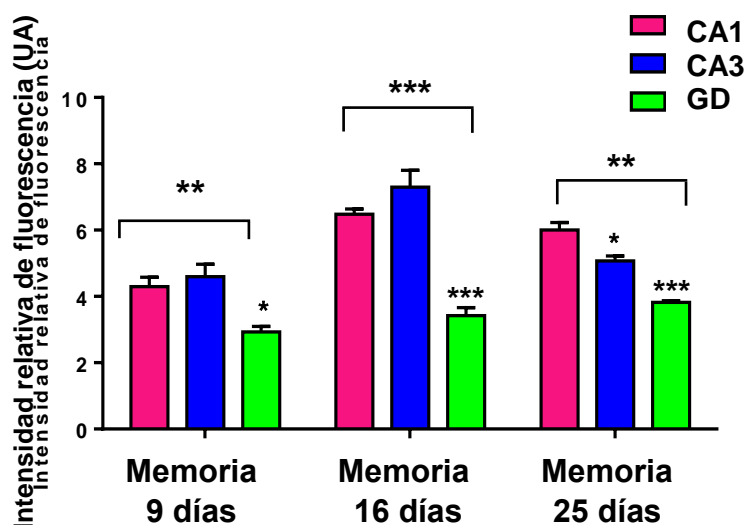
La inmunolocalización de PRL en las diferentes regiones del hipocampo analizadas (Figura RD-27), mostró su presencia en ratas que habían consolidado la memoria, a los 9, 16 y 25 días.

Cualitativamente, se observó un aumento de intensidad de la inmunofluorescencia en todos estos grupos, en comparación con las ratas que

sólo habían sido entrenadas y que ya habíamos valorado. Entre ellos, también se apreció como a los 16 y 25 días presentaban más reacción que a los 9 días.

La reacción, además de a las neuronas piramidales y granulares, se extendió por el neuropilo adyacente y en los estratos fibrilares de las tres regiones estudiadas, sobre todo en los animales del grupo de Memoria 16 días.

En estos animales fue muy frecuente observar prolongaciones neuríticas emergiendo del soma neuronal en el asta de Amón.



**Figura RD-28.** Intensidad relativa de fluorescencia de cortes histológicos de hipocampo. En rosa la región CA1, en azul CA3 y en verde el GD para los grupos Memoria 9 días, 16 días y 25 días. Se representó la media  $\pm$  EEM de  $n=5$  imágenes de cada condición, midiendo 800 células por grupo. Los valores se normalizaron con el grupo control NL, fueron analizados por ANOVA mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni, respecto a la región CA1 dentro de cada grupo y, control NL referente a las condiciones (\* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$ ).

La intensidad relativa de fluorescencia (Figura RD-28), mostraba un aumento significativo de todos los grupos de Memoria respecto a las ratas pre-entrenadas que habíamos analizado.

El grupo Memoria 16 días, presentó la intensidad de fluorescencia más elevada entre todas las condiciones. Percibiéndose, de forma llamativa en la región CA3 ( $7.30 \pm 0.51$ ), seguida de CA1 ( $6.48 \pm 0.16$ ).

Tanto Memoria 16 días como 25 días, fueron de todos los grupos analizados, los que presentaron mayor presencia de PRL en las regiones estudiadas.

Memoria 25 días, mostraba un descenso en los valores respecto a Memoria 16 días en las regiones CA1 (16 días:  $6.48 \pm 0.16$ , 25 días:  $6.01 \pm 0.22$ ) y CA3 (16 días:  $7.30 \pm 0.51$ , 25 días:  $5.07 \pm 0.15$ ) del asta de Amón. Mientras que, GD para ambos grupos se mantenía similar (16 días:  $3.42 \pm 0.24$ , 25 días:  $3.83 \pm 0.04$ ).

*Con la evidencia de que, PRL se encontraba presente e incrementada en la condición de consolidación de Memoria.*

#### **4.2.2-1 CUANTIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS POSITIVAS A PRL EN LOS ESTRATOS DE LA REGIÓN CA1 DEL HIPOCAMPO**

El hecho de que en nuestros resultados cualitativos sobre la observación de los niveles de PRL en el hipocampo, se acompañen de un aumento de la misma, sugería que, la condición de consolidación de la memoria, podía poseer la capacidad inducir ese incremento. Para ello, se hizo un estudio para determinar cómo se encontraba localizada PRL en los diferentes estratos de la región CA1.

Como muestran las imágenes de inmunofluorescencia obtenidas por microscopía confocal (Figura RD-29), la PRL estuvo presente en la región CA1 de hipocampo, en todos los grupos de memoria analizados.

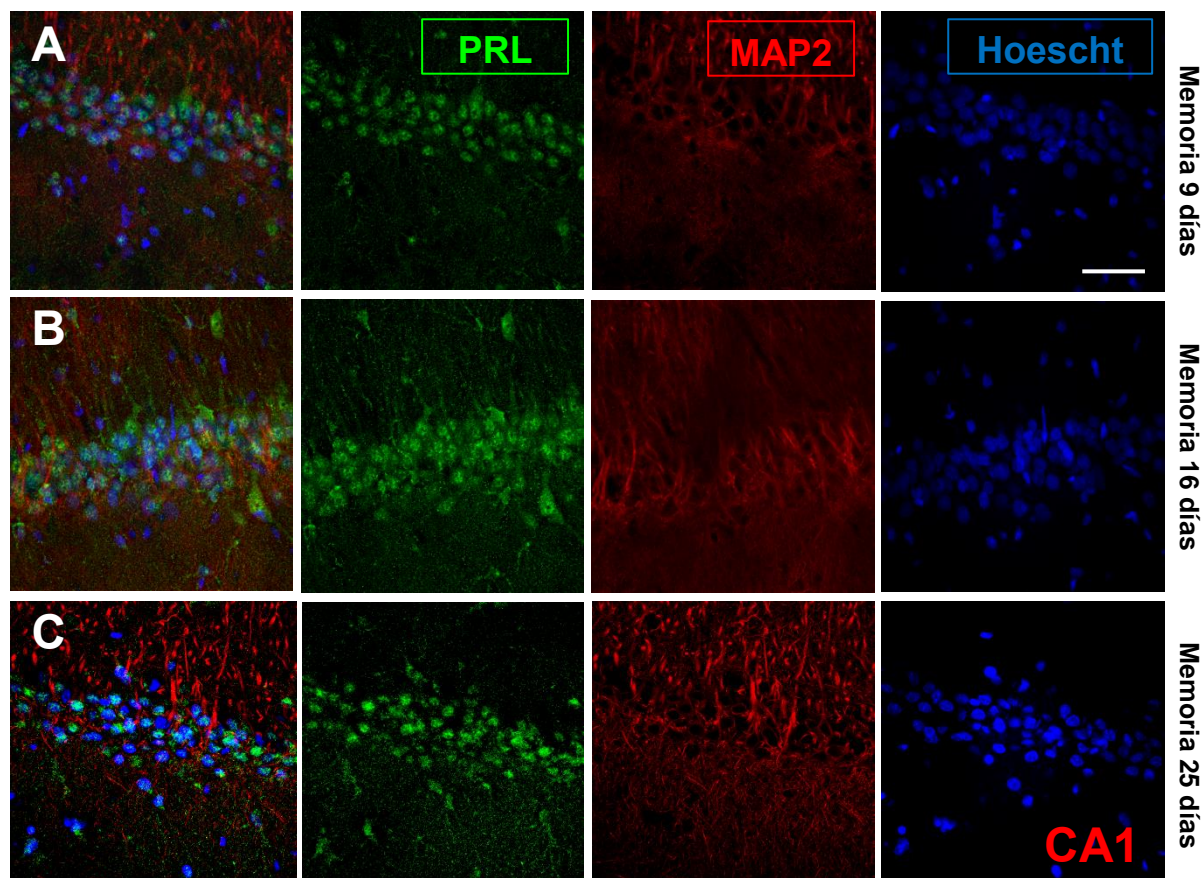
Con claridad, se apreciaba la morfología celular de las neuronas. Los núcleos de las células piramidales, tenían un aspecto redondeado, algunos con aspecto fusiforme, vistos de forma aislada. El grupo Memoria 16 días se caracterizó porque gran parte de sus neuronas presentaban prolongaciones neuríticas desde su soma, lo que les daba el aspecto piramidal de estas neuronas.

La intensidad de fluorescencia para PRL, presentó diferencias cualitativas según se observaban las imágenes de Memoria 9, 16 o 25 días.

En referencia a la red de microtúbulos (en rojo), expuso una trama neuronal bien consolidada y estable, muy llamativa en el grupo Memoria 25 días.

Por otro lado, en el merge de las imágenes, se apreciaba que la ubicación de la hormona estudiada, no era homogénea. Con diferencias peculiares entre los diferentes estratos de CA1.

Además, como ocurría en los grupos de entrenamiento y aprendizaje, la PRL se localizó en el núcleo celular, en el citoplasma o en ambos, con variaciones entre los grupos de consolidación de la memoria.



**Figura RD-29.** Localización de la hormona PRL por inmunofluorescencia confocal, de la región CA1 de hipocampo de ratas machos con consolidación de la memoria. En verde, marcador para PRL. MAP2 en rojo para observar la red de microtúbulos. Los núcleos en azul, teñidos con Hoescht. (A) Memoria 9 días, (B) Memoria 16 días y (C) Memoria 25 días. En todos los casos se realizó el merge de las fotografías. Barra de escala, 20  $\mu$ m.

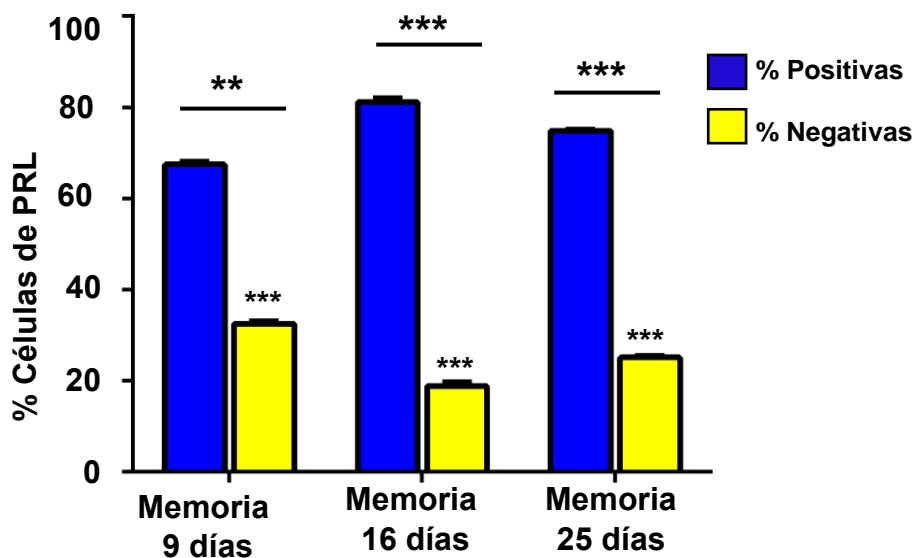
Estas características, nos llevó a realizar, el análisis en los distintos estratos en CA1 para comparar la localización de PRL en ellos.



El primer paso, fue evaluar el porcentaje celular de células positivas y negativas de la hormona PRL en los cortes histológicos del estudio (Tabla RD-16).

REGIÓN CA1		
GRUPOS	Positividad (%)	Negatividad (%)
MEMORIA 9 DÍAS	67.49 ± 0.82	32.51 ± 0.82
MEMORIA 16 DÍAS	81.15 ± 0.99	18.85 ± 0.99
MEMORIA 25 DÍAS	74.84 ± 0.45	25.16 ± 0.46

**Tabla RD-16.** Análisis del porcentaje de células positivas a proteína PRL, en la región CA1 del hipocampo. Todos los valores fueron expresados en media ± EEM.



**Figura RD-30.** Porcentaje celular de PRL en cortes histológicos de la región CA1 del hipocampo de ratas que han consolidado la memoria, tras un entrenamiento en MWM. Los valores se han representado como la media ± EEM de n=10 imágenes para cada grupo, valorando 800 células por grupo. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA comparando los valores de porcentaje con la positividad y, las diferencias entre los grupos con control NL, mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni (\*\*p< 0.0001).

Se observó un aumento significativo (\*\*p<0.001,\*\*\*p<0.0001) en el porcentaje celular de las células positivas a PRL, en todos los grupos de consolidación de la Memoria, con respecto a los grupos de ratas pre-entrenadas.

Este aumento, fue muy llamativo en el grupo Memoria 16 días ( $81.15 \pm 0.99$ ) y, algo menor en el de Memoria 25 días ( $74.84 \pm 0.45$ ). Aún así, ambas condiciones son las que mostraban los porcentajes mayores de neuronas positivas a PRL.

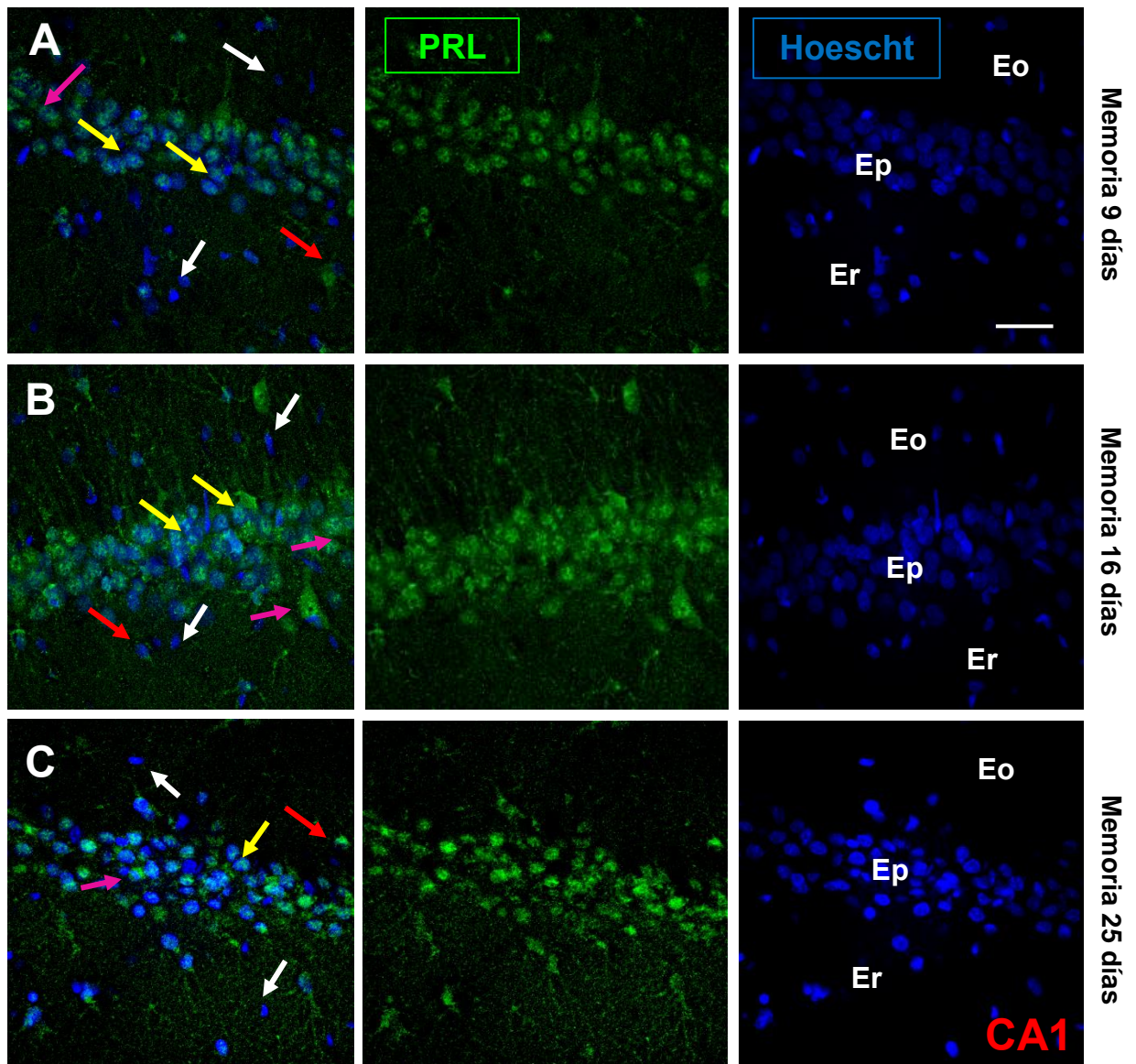
*Estos resultados, demostraban que el número de células positivas a PRL, aumentó en las ratas que consolidaban la memoria, en un intervalo temporal creciente.*

*Siendo Memoria 16 días el porcentaje más alto de afianzamiento y, en menor medida las ratas que consolidaban la memoria a los 25 días.*

Como se contempló en las imágenes de fluorescencia confocal (Figura RD-31) y se observó en el análisis del porcentaje de positividad (Tabla RD-17).

La ubicación intracelular de la hormona, varió en las diferentes regiones de CA1. La reacción apareció en el núcleo de las células, en el citoplasma y en ambos a la vez, pero de la misma forma

La positividad, se presentó con una apariencia uniforme a lo largo de todo el estrato Piramidal. Aunque, se identificaron leves cambios en la intensidad de fluorescencia entre los estratos de CA1.



**Figura RD-31.** Localización por inmunofluorescencia de PRL de la región CA1 de hipocampo en ratas que han consolidado la memoria tras un entrenamiento previo. Los núcleos teñidos de azul por Hoescht, PRL en verde. Eo, Estrato Oriens; Ep, Estrato piramidal y Er, Estrato radiado. Las flechas blancas marcaron células negativas, las rojas, células positivas en el citoplasma, las amarillas positividad en el núcleo y las flechas verdes, doble positividad (núcleo + citoplasma). Se realizó merge para las imágenes. Barra de escala, 20  $\mu\text{m}$ .

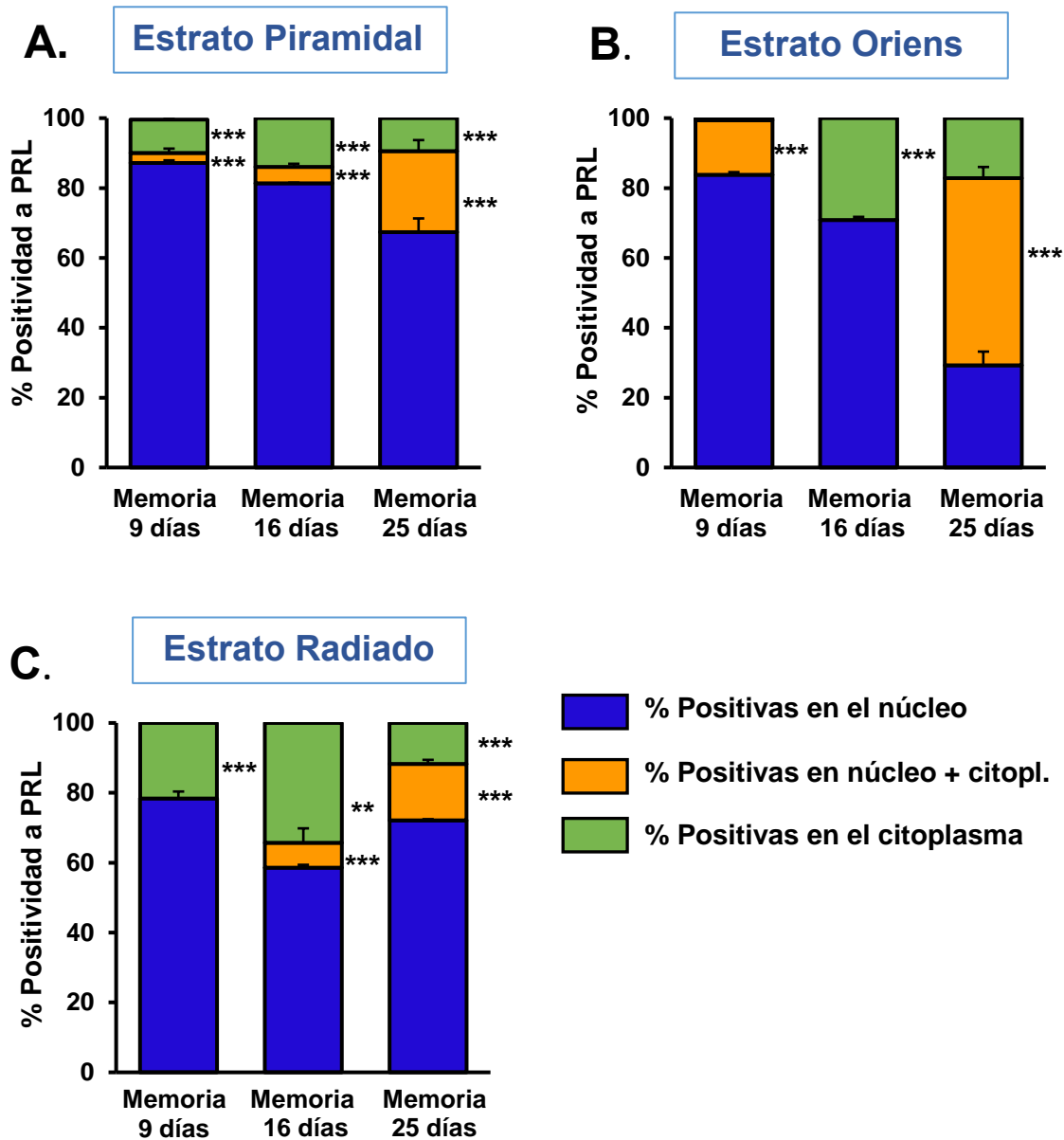
Con todo esto, se analizó el porcentaje de positividad en cada estrato de forma aislada.

<b>Positividad del estrato Piramidal de la región CA1 (%)</b>			
<b>GRUPO</b>	<b>Núcleo</b>	<b>Núcleo +Citoplasma</b>	<b>Citoplasma</b>
<b>MEMORIA 9 DÍAS</b>	87.14 ± 0.77	2.89 ± 1.24	9.55 ± 0.18
<b>MEMORIA 16 DÍAS</b>	81.30 ± 0.21	4.72 ± 0.90	13.97 ± 0.69
<b>MEMORIA 25 DÍAS</b>	67.40 ± 3.89	23.15 ± 3.16	9.44 ± 0.73
<b>Positividad del estrato Oriens de la región CA1 (%)</b>			
<b>GRUPO</b>	<b>Núcleo</b>	<b>Núcleo +Citoplasma</b>	<b>Citoplasma</b>
<b>MEMORIA 9 DÍAS</b>	83.76 ± 1.12	15.62 ± 2.29	0.61 ± 0.35
<b>MEMORIA 16 DÍAS</b>	70.83 ± 2.40	0.00 ± 0.00	29.17 ± 2.40
<b>MEMORIA 25 DÍAS</b>	29.28 ± 0.41	53.57 ± 2.06	17.14 ± 1.65
<b>Positividad del estrato Radiado de la región CA1 (%)</b>			
<b>GRUPO</b>	<b>Núcleo</b>	<b>Núcleo +Citoplasma</b>	<b>Citoplasma</b>
<b>MEMORIA 9 DÍAS</b>	78.41 ± 1.97	0.00 ± 0.00	21.59 ± 2.41
<b>MEMORIA 16 DÍAS</b>	58.57 ± 0.82	7.14 ± 4.12	34.28 ± 4.04
<b>MEMORIA 25 DÍAS</b>	72.08 ± 0.37	16.23 ± 1.24	11.69 ± 1.83

**Tabla RD-17.** Análisis del porcentaje de las células positivas a proteína PRL en los diferentes estratos de CA1 del hipocampo en ratas machos sanas que, han consolidado la memoria a los 9, 16 y 25 días, tras un pre-entrenamiento en MWM, Todos los valores, fueron expresados como la media ± EEM.

El porcentaje celular (Figura RD-32), referente a células positivas en el núcleo, aumentó significativamente (\*\*p<0.0001) en todos los estratos y en todas las condiciones de estudio, exceptuando el grupo Memoria 25 días del estrato Oriens, que tuvo mayor porcentaje para las células que presentaban positividad en citoplasma y en núcleo al mismo tiempo.

Las ratas que habían consolidado la Memoria a 9, 16 y 25 días, presentaron mayor porcentaje de células positivas en el citoplasma que las ratas que sólo fueron entrenadas (control NL, plataforma y aprendizaje 6 días).



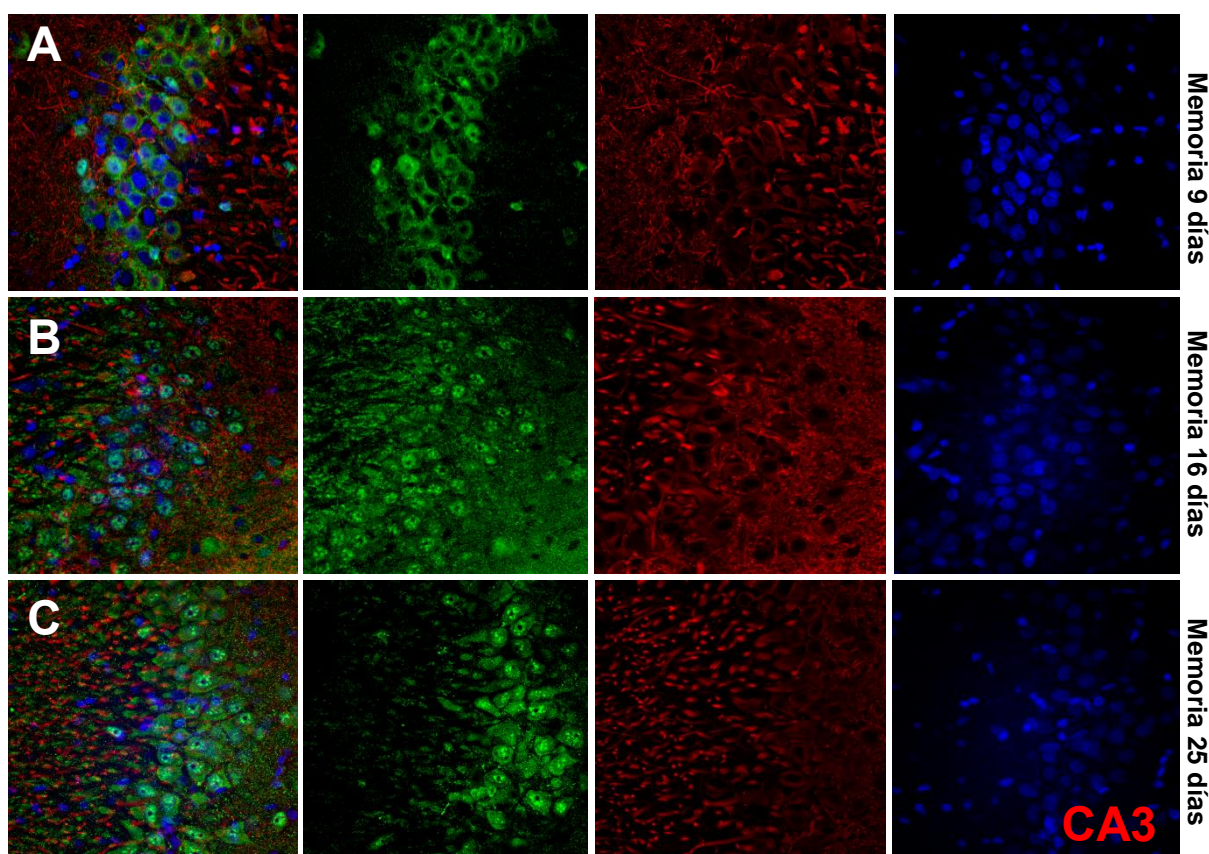
**Figura RD-32.** Porcentaje de positividad a PRL en cada estrato de la región CA1 de hipocampo de ratas que han consolidado la Memoria, tras un entrenamiento en MWM. Se representó, la media  $\pm$  EEM de  $n=10$  cortes inmunohistoquímicos para cada grupo, midiendo 800 células en cada grupo. Se llevó a cabo, ANOVA (test Bonferroni) comparando los datos con porcentaje de células positivas en el núcleo (\*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$ ).

En estrato Piramidal, se observó un aumento significativo (\*\* $p < 0.0001$ ) de positividad en citoplasma+ núcleo en el grupo Memoria 25 días ( $23.15 \pm 3.16$ ), respecto a lo visto en Memoria 9 días ( $2.89 \pm 1.24$ ) y 16 días ( $4.72 \pm 0.90$ ).

Por otro lado, el estrato Oriens, no mostró ninguna célula positiva tanto para el núcleo como para el citoplasma a la vez, en el grupo Memoria 16 días ( $0.00 \pm 0.00$ ), mientras que aumentó su porcentaje de positividad para la zona del citoplasma ( $29.17 \pm 2.40$ ).

Respecto al estrato Radiado, Memoria 9 días, presentaba un porcentaje nulo para la coexistencia de reacción a PRL en citoplasma y núcleo conjuntamente, en contraposición al aumento significativo de células positivas a PRL en citoplasma para el grupo Memoria 16 días ( $34.28 \pm 4.04$ ).

#### 4.2.2-2 CUANTIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS POSITIVAS A PRL EN LOS ESTRATOS DE LA REGIÓN CA3 DEL HIPOCAMPO



**Figura RD-33.** Localización de PRL por inmunofluorescencia confocal de la región CA3 de hipocampo de ratas con consolidación de la memoria. PRL en verde. MAP2 en rojo para observar la red de microtúbulos, con Hoescht los núcleos en azul. Barra de escala, 20  $\mu$ m.

En la región CA3 del asta de Amón (Figura RD-33), las células positivas a PRL se observaron de forma muy evidente.

Estos animales presentaban algunas neuronas con marcaje reactivo a PRL en el citoplasma, a la vez que, en el núcleo. Otras, eran positivas sólo en el citoplasma o en el núcleo. Además, se observó la negatividad al marcaje en otras células.

La red dendrítica (en rojo), se visualizaba de forma firme y uniforme, creando unas marañas de microtúbulos muy consistentes.

La Tabla RD-18 resume los resultados obtenidos al analizar los porcentajes de células positivas y negativas a PRL, en la región CA3 de estos grupos de animales.

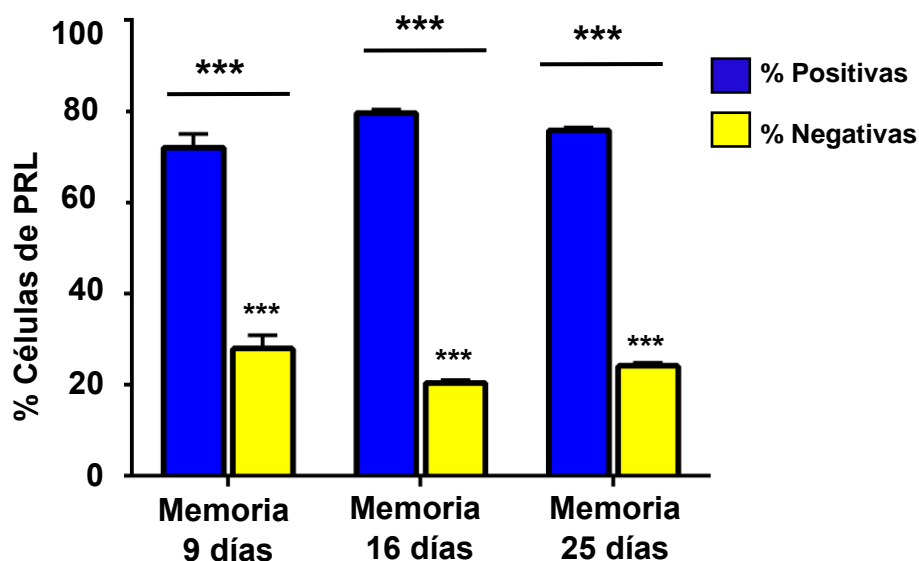
REGIÓN CA3		
GRUPOS	Positividad (%)	Negatividad (%)
MEMORIA 9 DÍAS	72.07 ± 2.93	27.93 ± 2.93
MEMORIA 16 DÍAS	79.68 ± 0.73	20.32 ± 0.73
MEMORIA 25 DÍAS	75.82 ± 0.60	24.18 ± 0.60

**Tabla RD-18.** Análisis del porcentaje de células positivas y negativas a la proteína PRL, en la región CA3 del hipocampo, en ratas que han consolidado la memoria, después de un entrenamiento previo en el MWM. Todos los valores fueron expresados en media ± EEM.

El porcentaje de células positivas a PRL, representado en la Figura RD-34. Indicó un aumento significativo ( $***p < 0.0001$ ) en los grupos Memoria 9 días (72.07 ± 2.93), Memoria 16 días (79.68 ± 0.73) y Memoria 25 días (75.82 ± 0.60); con respecto a los hallazgos obtenidos en los grupos de animales en entrenamiento y aprendizaje.

Siendo el grupo Memoria 16 días el que presentó mayor porcentaje de células positivas a PRL en la región CA3 de todas las condiciones estudiadas.

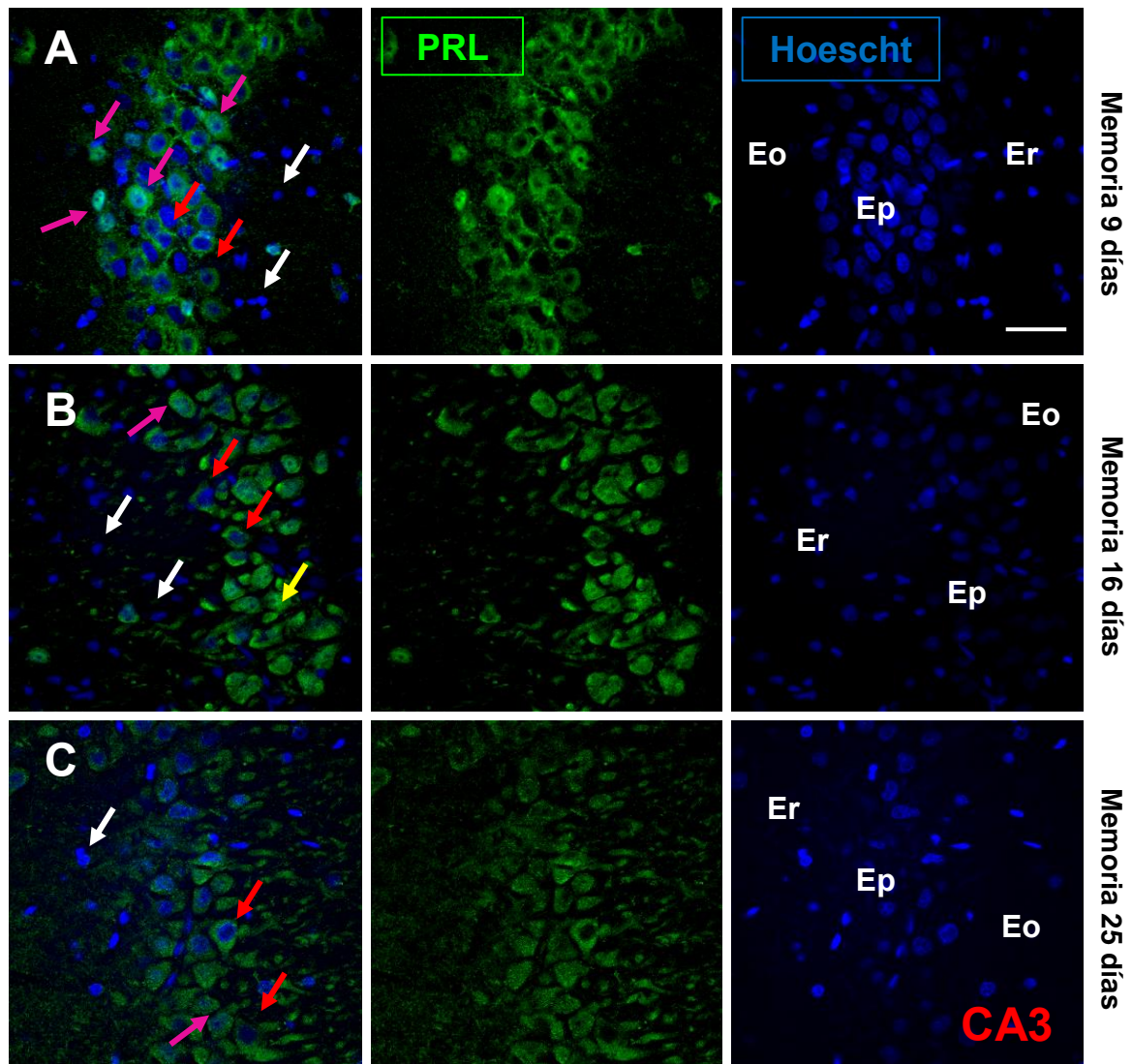
Se observó un incremento significativo ( $***p < 0.0001$ ) del porcentaje celular positivo a PRL de los grupos que habían consolidado la memoria, respecto a los grupos pre-entrenados.



**Figura RD-34.** Porcentaje celular de PRL en cortes de la región CA3 del hipocampo. En azul encontramos el porcentaje de células positivas a PRL, mientras que, en amarillo las negativas. Los valores se han representado con la media  $\pm$  EEM de  $n=10$  imágenes para cada grupo y 800 células contadas por grupo. El estudio estadístico, se evaluó ANOVA comparando los porcentajes con las células positivas y los grupos con control NL, mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni ( $***p < 0.0001$ ).

El aumento de los porcentajes de células positivas en la región CA3 del hipocampo, se acompañó de una gran intensidad de reacción a PRL en las neuronas de estos animales (Figura RD-35)





**Figura RD-35.** Localización por inmunofluorescencia en microscopía confocal de la hormona PRL, de la región CA3 de hipocampo en cortes de ratas machos que han adquirido memoria tras un entrenamiento previo. Los núcleos teñidos de azul por Hoescht, PRL en verde, en todos los casos, se apreció el merge de las fotografías. (A) Memoria 9 días, (B) Memoria 16 días (C) Memoria 25 días. Eo, Estrato Oriens; Ep, Estrato piramidal y Er, Estrato radiado. Las flechas blancas hacen referencia a células negativas, las rojas a células positivas sólo en el citoplasma, las amarillas a positividad en el núcleo y, por último, las flechas rosas a células con doble positividad tanto en el núcleo como en el citoplasma. Barra de escala, 20  $\mu\text{m}$ .

Se observaba positividad en núcleo, en citoplasma y en ambos lugares a la vez. Con una intensidad de fluorescencia muy elevada en todas las condiciones, especialmente en Memoria 16 días.

En los animales de Memoria 9 días, la reacción nuclear era más puntiforme y menos intensa que a los 16 y 25 días, por lo que, en dichos grupos las neuronas aparentaban tener reacción citoplásmica de forma predominante.

La cuantificación permitió comprobar que no había diferencias porcentuales entre Memoria 9 días y Memoria 16 días (Tabla RD-19).

Positividad del estrato Piramidal de la región CA3 (%)			
GRUPO	Núcleo	Núcleo +Citoplasma	Citoplasma
MEMORIA 9 DÍAS	47.66 ± 0.72	24.77 ± 3.80	27.57 ± 3.08
MEMORIA 16 DÍAS	47.75 ± 3.30	17.76 ± 2.87	34.48 ± 0.44
MEMORIA 25 DÍAS	69.44 ± 2.75	10.03 ± 2.47	20.52 ± 1.47
Positividad del estrato Oriens de la región CA3 (%)			
GRUPO	Núcleo	Núcleo +Citoplasma	Citoplasma
MEMORIA 9 DÍAS	41.67 ± 6.35	29.17 ± 4.17	29.17 ± 3.07
MEMORIA 16 DÍAS	64.58 ± 2.08	10.41 ± 2.08	25.00 ± 0.18
MEMORIA 25 DÍAS	29.17 ± 4.17	8.33 ± 2.02	62.5 ± 4.08
Positividad del estrato Radiado de la región CA3 (%)			
GRUPO	Núcleo	Núcleo +Citoplasma	Citoplasma
MEMORIA 9 DÍAS	75.00 ± 4.25	0.00 ± 0.00	25.00 ± 4.01
MEMORIA 16 DÍAS	73.90 ± 3.67	3.85 ± 1.03	22.26 ± 0.82
MEMORIA 25 DÍAS	72.50 ± 2.50	5.00 ± 0.39	22.50 ± 1.12

**Tabla RD-19.** Análisis del porcentaje de las células positivas a proteína PRL en los diferentes estratos de CA3 del hipocampo, en ratas machos sanas que, han consolidado la memoria a los 9, 16 y 25 días, tras un pre-entrenamiento en MWM, Todos los valores fueron expresados como la media ± EEM.

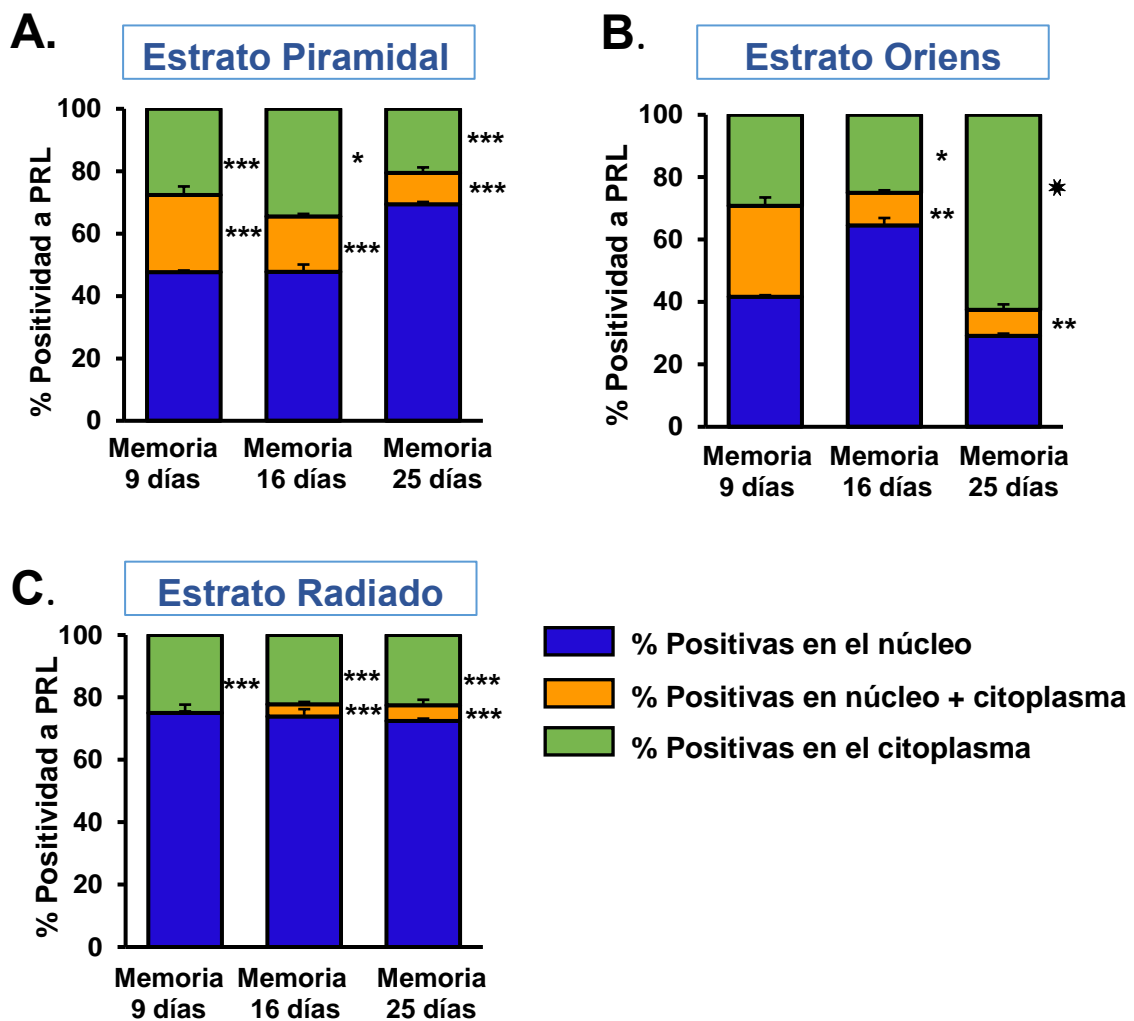
Además, se observó un aumento significativo (\*\*p<0.0001) del porcentaje células positivas en el núcleo, en Memoria 25 días para el estrato Piramidal CA3 (69.44 ± 2.75).

En el estrato Piramidal de los grupos Memoria, se observó un gran aumento de células positivas a PRL en citoplasma, tanto en Memoria 9 (27.57 ± 3.08), 16 (34.48 ± 0.44) y 25 días (20.52 ± 1.47), respecto a lo observado en las ratas controles y aprendizaje 6 días (Figura RD-36A).

En el estudio del porcentaje de positividad del estrato Oriens, hubo un aumento significativo (\*p<0.05) para las células positivas en el citoplasma en

Memoria 25 días ( $62.5 \pm 4.08$ ) en comparación con los otros dos grupos. A la vez que el grupo Memoria 9 días, presentó similitud en el porcentaje de positividad en las tres zonas celulares analizadas (Figura RD-36B).

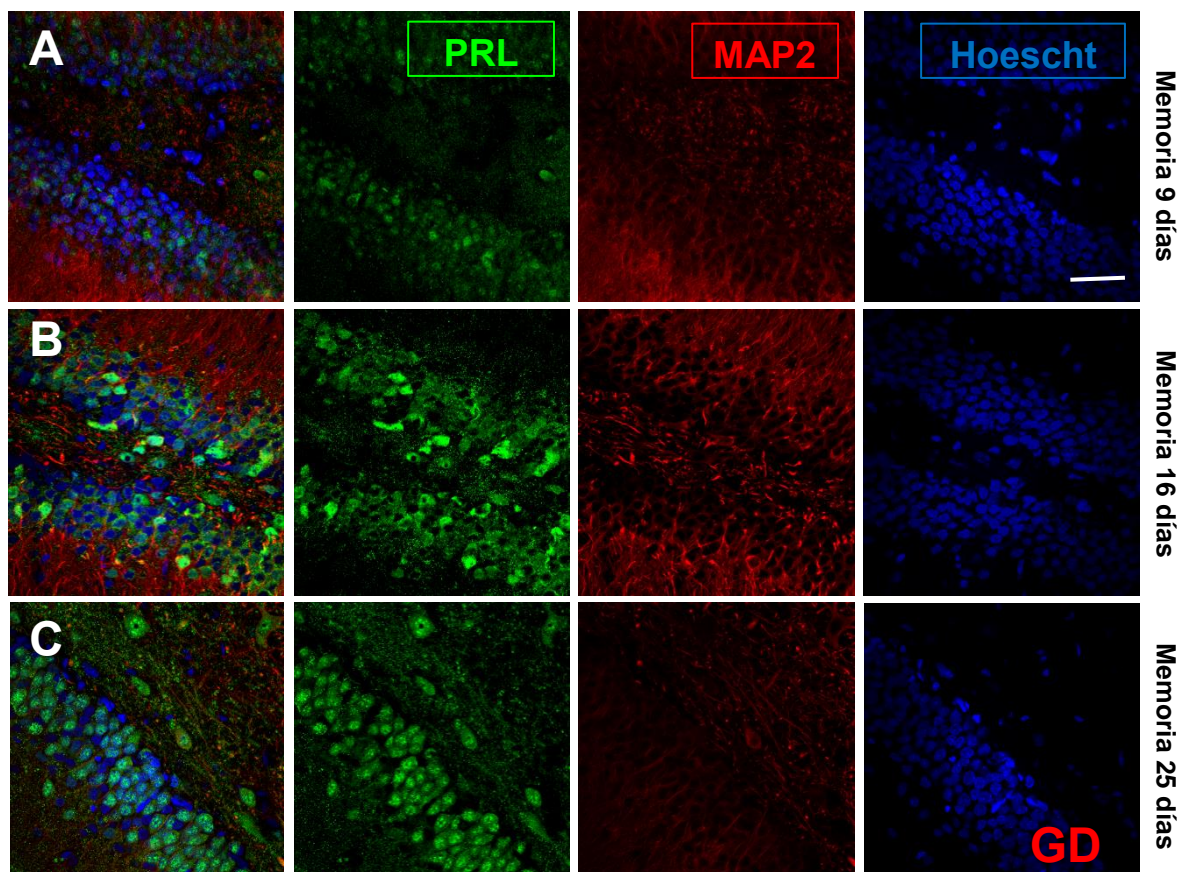
En referencia al estrato Radiado, el aumento del nivel significativo ( $***p < 0.0001$ ) en las células positivas al núcleo, se observó muy alto en los tres grupos del estudio. Mostrando una disminución significativa ( $***p < 0.0001$ ) en la doble positividad para Memoria 16 ( $3.85 \pm 1.03$ ) y 25 días ( $5.00 \pm 0.39$ ), llegando a ser nula en Memoria 9 días ( $0.00 \pm 0.00$ ).



**Figura RD-36.** Porcentaje de positividad a PRL en cada estrato de CA3 en ratas que han consolidado la memoria. Se representó, la media  $\pm$  EEM de  $n = 10$  cortes inmunohistoquímicos por grupo, con 800 células contadas. Se realizó el test de Bonferroni por ANOVA, comparando los porcentajes con la positividad en el núcleo (\* $p < 0.05$ , \* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$ ).

### 4.2.2-3 CUANTIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS POSITIVAS A PRL EN LAS CAPAS DE LA REGIÓN GD DEL HIPOCAMPO

Se analizó la positividad de la hormona PRL en la región del GD como se había hecho para CA1 y CA3.



**Figura RD-37.** Inmunolocalización de la hormona PRL (verde) del GD en hipocampo de ratas que han consolidado la memoria después de un entrenamiento en MWM. MAP2 en rojo para observar la red de microtubulos, teñidos con Hoescht en azul, los núcleos. (A) Memoria 9 días, (B) Memoria 16 días (C) Memoria 25 días. En todos los casos, se apreció el merge de las fotografías. Barra de escala, 20  $\mu$ m.

Se mostró la positividad a PRL en cortes histológicos vistos a microscopio confocal de la región GD de ratas cuya consolidación de la memoria fue a los 9, 16 y 25 días (Figura RD-37).

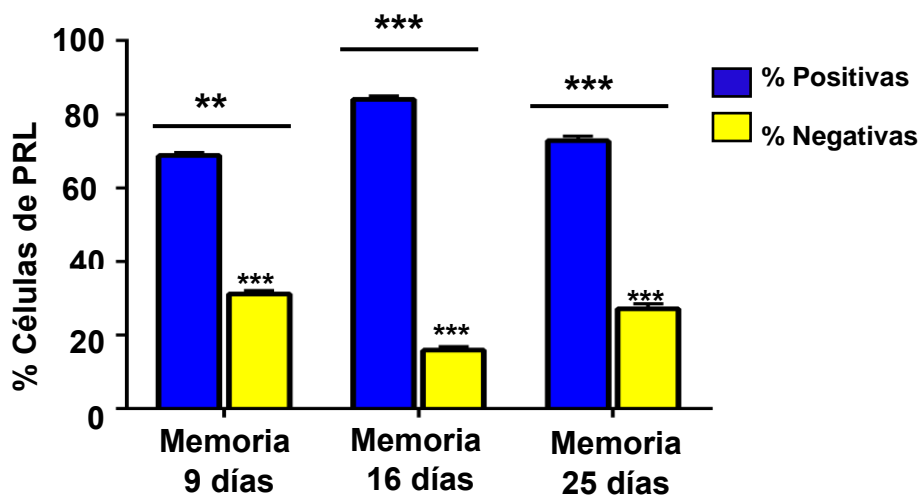
Como se muestra en las micrografías, el GD de estos animales fue más reactivo a PRL que el de los controles y de aprendizaje, sobre todo en el grupo de Memoria 16 días.

En esta región del hipocampo, las células granulares eran numerosas, con un tamaño menor al que presentaban CA1 y CA3, como era de esperar, dando el aspecto compacto a la capa Granular.

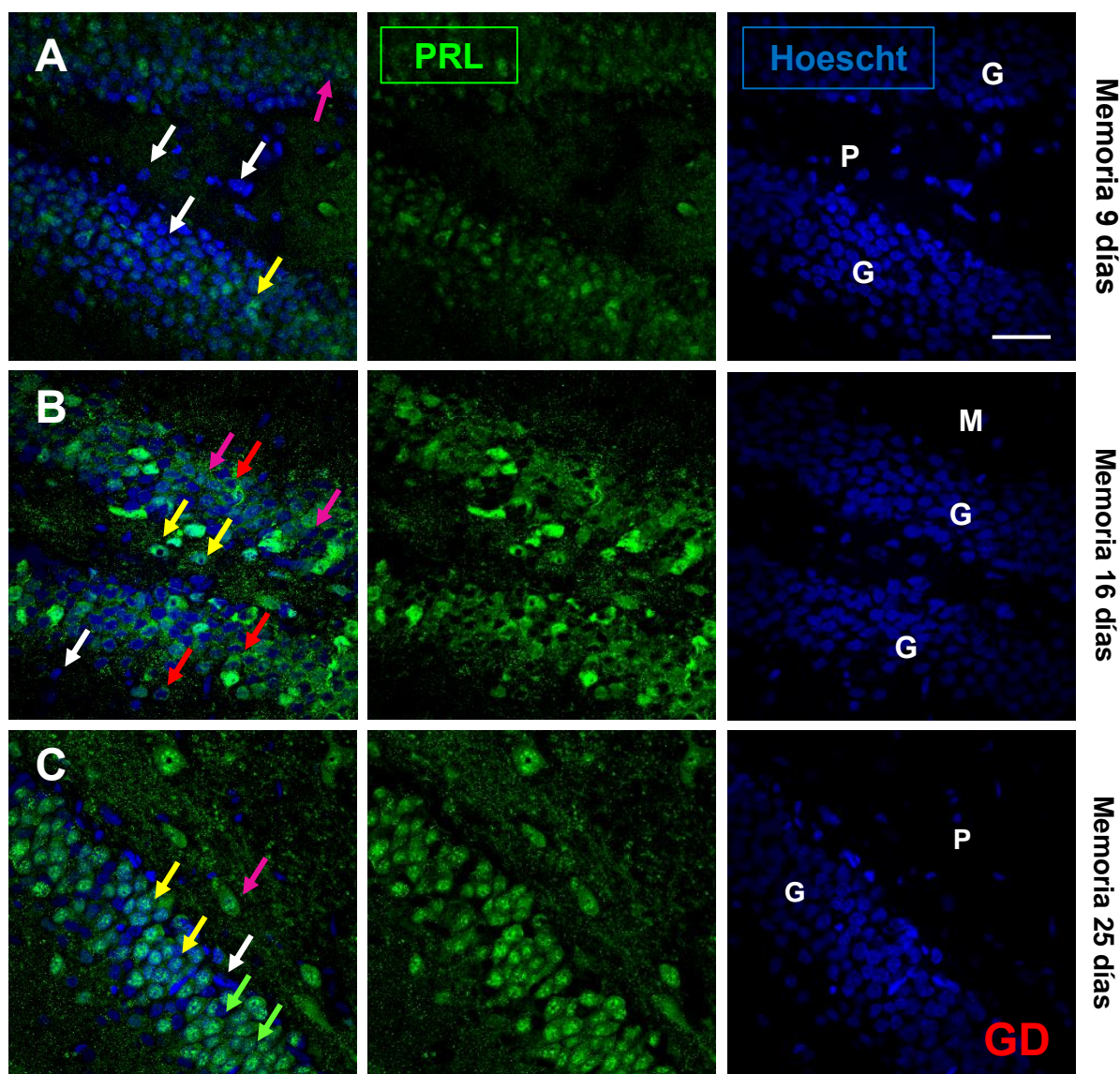
Al analizar el porcentaje de positividad en la región GD (Figura RD-38 y Tabla RD-20) se encontró un aumento significativo ( $***p<0.0001$ ) en el grupo Memoria 16 días ( $84.06 \pm 0.94$ ), seguido de Memoria 25 días ( $72.83 \pm 1.28$ ) y, aunque con valores menos elevados en el grupo de Memoria 9 días ( $68.76 \pm 0.83$ ) respecto a las negativas. Resultados similares a lo que venía sucediendo en las otras dos regiones analizadas.

REGIÓN GD		
GRUPOS	Positividad (%)	Negatividad (%)
MEMORIA 9 DÍAS	$68.76 \pm 0.83$	$31.24 \pm 0.82$
MEMORIA 16 DÍAS	$84.06 \pm 0.94$	$15.94 \pm 0.93$
MEMORIA 25 DÍAS	$72.83 \pm 1.28$	$27.17 \pm 1.29$

**Tabla RD-20.** Porcentaje de positividad a PRL, en la región CA3 del hipocampo, en ratas que han consolidado la memoria. Todos los valores fueron expresados en media  $\pm$  EEM.



**Figura RD-38.** Porcentaje de positividad celular a PRL en la región GD del hipocampo. Se representó la media  $\pm$  EEM (800 células medidas). Se analizó por el test de Bonferroni en comparación con el % de células positivas y con control NL ( $**p<0.001$   $***p<0.0001$ ).



**Figura RD-39.** Localización por inmunofluorescencia confocal de PRL de la región GD de hipocampo, en cortes cerebrales de ratas machos con consolidación de la memoria, después de haber realizado un pre-entrenamiento en MWM. Los núcleos se tiñeron de azul por Hoescht, el marcador de PRL se visualiza en verde. (A) Memoria 9 días, (B) Memoria 16 días (C) Memoria 25 días. En todos los casos se realizó el merge de las fotografías. Se utilizó las siglas, M, capa Molecular; G, capa Granular y P, capa Polimórfica, para nombrar las capas del GD. Las flechas blancas hacen referencia a células negativas, las rojas a células positivas sólo en el citoplasma, las amarillas a positividad en el núcleo y, por último, las flechas rosas a células con doble positividad, tanto en el núcleo como en el citoplasma. Barra de escala, 20  $\mu$ m

Morfológicamente, destacó un gran número de células neuronales positivas en la capa Granular, junto a neuronas secundarias llamativas en la capa Polimórfica (Figura RD-39).

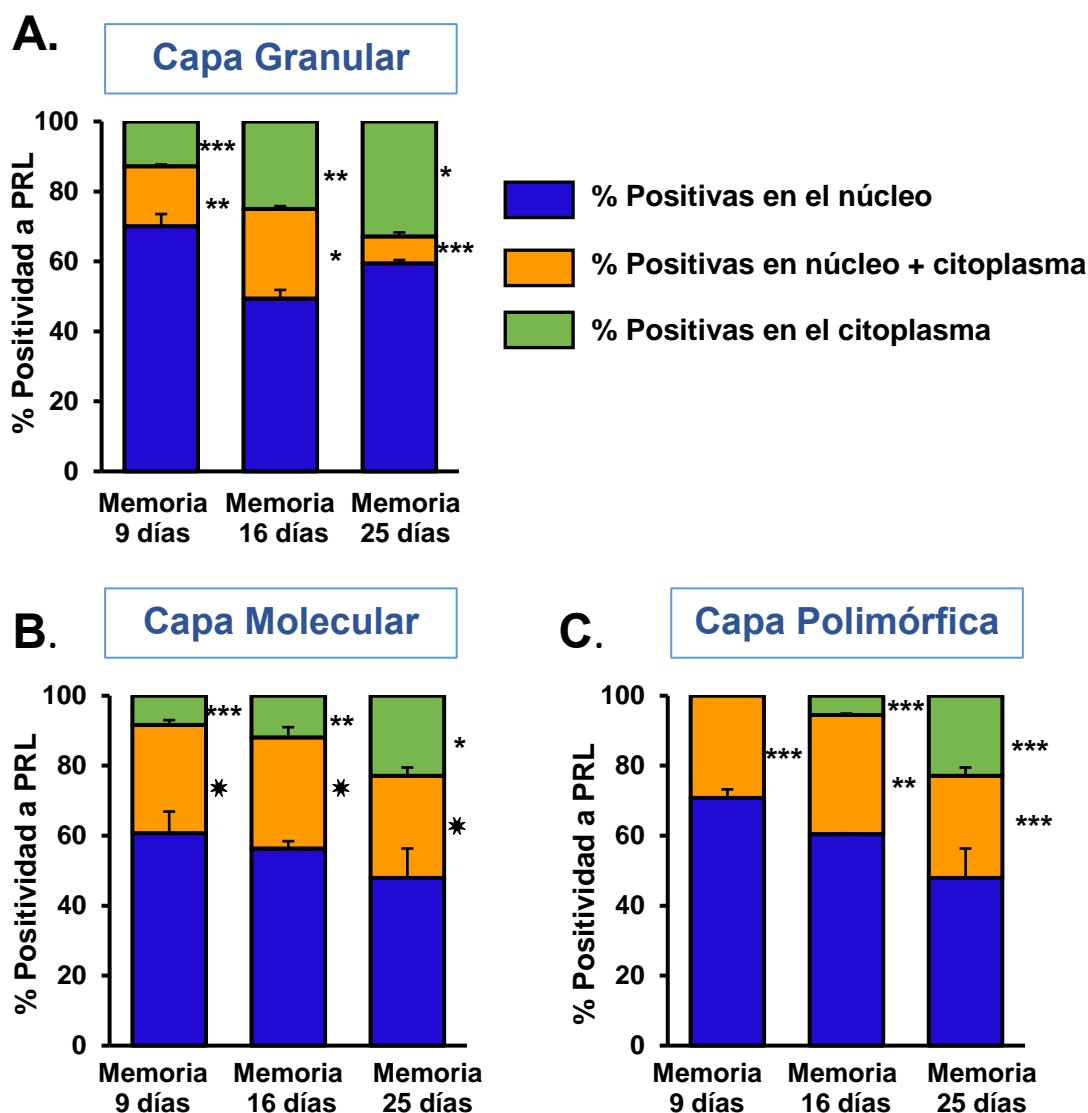
El grupo de Memoria 9 días presentó un predominio de positividad nuclear frente a los otros grupos; mientras que, en el grupo de Memoria 25 días el predominio fue de reacción citoplásmica.

Aparentemente, las neuronas principales y secundarias del grupo Memoria 25 días fueron de mayor tamaño que en los otros grupos.

Conociendo como se apreciaba la inmunolocalización de la hormona PRL en la región GD del hipocampo y cómo era el porcentaje de positividad celular. Se evaluaron las células positivas en cada capa de esta región (Tabla RD-21).

<b>Positividad de la capa Granular del GD (%)</b>			
<b>GRUPO</b>	<b>Núcleo</b>	<b>Núcleo +Citoplasma</b>	<b>Citoplasma</b>
<b>MEMORIA 9 DÍAS</b>	70.06 ± 4.93	17.15 ± 0.70	12.78 ± 5.64
<b>MEMORIA 16 DÍAS</b>	49.38 ± 3.52	25.64 ± 0.16	24.98 ± 3.68
<b>MEMORIA 25 DÍAS</b>	49.83 ± 1.39	7.71 ± 1.62	42.45 ± 0.23
<b>Positividad de la capa Molecular del GD (%)</b>			
<b>GRUPO</b>	<b>Núcleo</b>	<b>Núcleo +Citoplasma</b>	<b>Citoplasma</b>
<b>MEMORIA 9 DÍAS</b>	60.71 ± 8.06	30.95 ± 2.38	8.33 ± 1.23
<b>MEMORIA 16 DÍAS</b>	56.31 ± 3.68	31.75 ± 5.08	11.93 ± 1.40
<b>MEMORIA 25 DÍAS</b>	47.92 ± 9.85	29.17 ± 4.10	22.92 ± 6.36
<b>Positividad de la capa Polimórfica del GD (%)</b>			
<b>GRUPO</b>	<b>Núcleo</b>	<b>Núcleo +Citoplasma</b>	<b>Citoplasma</b>
<b>MEMORIA 9 DÍAS</b>	70.83 ± 4.17	29.17 ± 3.16	0.00 ± 0.00
<b>MEMORIA 16 DÍAS</b>	60.43 ± 0.43	34.06 ± 0.72	5.51 ± 1.16
<b>MEMORIA 25 DÍAS</b>	55.00 ± 1.55	22.50 ± 1.25	22.50 ± 1.78

**Tabla RD-21.** Análisis del porcentaje de las células positivas a proteína PRL en las diferentes capas de GD del hipocampo, en ratas machos sanas que, han consolidado la memoria a los 9, 16 y 25 días, tras un pre-entrenamiento en MWM, Todos los valores, fueron expresados como la media ± EEM.



**Figura RD-40.** Porcentaje de positividad a PRL en la región GD de hipocampo. (A) Capa Granular, (B) Capa Molecular, (C) Capa Polimórfica, para las condiciones Memoria 9 días, Memoria 16 días y Memoria 25 días. Los valores se han representado como la media  $\pm$  EEM de  $n=10$  cortes inmunohistoquímicos para cada grupo, con 800 células contadas por grupo. El estudio estadístico se realizó ANOVA con el test de Bonferroni para el variable estadístico, comparando los porcentajes con el porcentaje en el núcleo (\* $p<0.05$ , \* $p<0.01$ , \*\* $p<0.001$ , \*\*\* $p<0.0001$ ).

En la capa Granular del GD (Figura RD-40A), se apreció un aumento creciente significativo (\*\* $p<0.0001$ , \*\* $p<0.001$ ) de las células positivas en el citoplasma desde el grupo Memoria 9 días ( $12.78 \pm 5.64$ ), Memoria 16 días ( $24.98 \pm 3.68$ ) y, de éste al de Memoria 25 días (\* $p<0.01$ ) ( $42.45 \pm 0.23$ ). Este



incremento en el porcentaje de reacción citoplásmica fue mayor en esta capa que en las capas Molecular y Polimórfica.

El porcentaje de las células marcadas a PRL en el núcleo fue elevado (\* $p < 0.05$ ) en todas las capas del GD, aunque menos que los hallados en las ratas pre-entrenadas.

El porcentaje de positividad en la capa Molecular, fue semejante al encontrado en la capa Granular. Aunque, en la capa Molecular había un aumento significativo (\* $p < 0.05$ ) en las neuronas que presentaban reacción conjunta en el núcleo y el citoplasma en Memoria 9 días ( $30.95 \pm 2.38$ ), 16 ( $31.75 \pm 5.08$ ) y 25 días ( $29.17 \pm 4.10$ ), al comparar el análisis con lo visto en la Granular (9 días:  $17.15 \pm 0.70$ , 16 días:  $25.64 \pm 0.16$ , 25 días:  $7.71 \pm 1.62$ ).

Al mismo tiempo, la capa Polimórfica mostraba la inexistencia de células positivas en el citoplasma para el grupo Memoria 9 días ( $0.00 \pm 0.00$ ), a la vez que, surgió un aumento creciente (\*\* $p < 0.0001$ ) de este tipo de positividad en Memoria 16 días ( $5.51 \pm 1.16$ ) y Memoria 25 días ( $22.50 \pm 1.78$ ).

El porcentaje de células positivas para el marcaje conjunto núcleo y citoplasma fue semejante en la capa Polimórfica y en la capa Molecular, en todos los grupos del estudio.

Con todos los resultados analizados sobre la cuantificación del porcentaje celular positivo a la proteína PRL, en todas las regiones de este estudio.

*En las tres regiones, CA1, CA3 y GD, el nivel de positividad a PRL fue elevado. Estando presente la hormona estudiada, en todos los estratos del asta de Amón y en las capas del GD.*

*El rango de células positivas, fue de manera ascendente desde los grupos controles y aprendizaje en el pre-entrenamiento, hasta alcanzar niveles prominentes en los grupos de consolidación de la Memoria.*

*Viéndose, un aumento de células positivas a PRL, en la condición Memoria 16 días, en CA1, CA3 y GD, y, en menor medida en Memoria 25 días.*

*Todos los estratos de CA1 y CA3 y GD, mostraban diferencias en la localización intracelular de la positividad a PRL. Estando presente PRL en el núcleo, en citoplasma o en ambos lugares a la vez. Si bien la localización intracelular presentó variaciones dependiendo del tiempo transcurrido desde el entrenamiento.*

*Por todo ello, los resultados de este trabajo sugieren un posible papel de la PRL en la memoria y el aprendizaje. Al existir evidencias de cambios en presencia o en su localización en ratas machos sanas que, han realizado tareas de aprendizaje y memoria en el MWM y consolidaron la memoria a largo plazo.*

Con la búsqueda de formas para combatir trastornos neurológicos degenerativos.

Diferentes estudios, han demostrado que la administración de PRL exógena en forma de microesferas, puede activar a un grupo de células precursoras latentes en el hipocampo del ratón adulto, tanto in vitro como in vivo, aumentando el aprendizaje y la memoria.

Debido a que, una pérdida de PRL dispuso un déficit en ambas funciones y en pruebas de comportamiento. Estos resultados indicaban que una falta de esta hormona en el hipocampo del ratón adulto, podía correlacionarse con problemas de aprendizaje y memoria (Walker, Vukovic et al. 2012).

Siguiendo con estas investigaciones y sabiendo que PRL es una hormona hipofisaria esencial para la lactancia y para el comportamiento sexual.

Se ha visto que, ratas tratadas con esta hormona aumentan la estimulación del comportamiento social, el enfoque y el aprendizaje. Siendo necesaria esta proteína para la mejora de la memoria social (Donhoffner, Al Saleh et al. 2017).

Con estos antecedentes previos por parte de otros investigadores y, los resultados analizados en este trabajo.

*Los resultados hallados, indican que un aumento de la hormona PRL tras un entrenamiento en MWM en ratas sanas sin tratamiento, provoca que estos*

*animales puedan recordar mejor la tarea aprendida en esos ensayos. Siempre que los niveles de PRL endógenos estén aumentados en el hipocampo.*

*Se piensa que el aumento de PRL, coincide con una mejora de la memoria a los 9, 16 y 25 días como se mostró en este estudio. Siendo avances importantes, para poder entender la relación entre esta hormona y la memoria a corto y largo plazo.*

### **4.2.3. VALORACIÓN GLOBAL DE LA INTENSIDAD Y LOCALIZACIÓN DE PRL EN EL APRENDIZAJE Y CONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA**

Los resultados obtenidos con el análisis de intensidad de fluorescencia de cortes histológicos, observados a microscopía confocal, y la cuantificación de células positivas a PRL en las tres regiones: CA1, CA3 y GD, habían indicado la presencia de PRL en todas las regiones estudiadas del hipocampo en ratas sanas pre-entrenadas que recordaban la tarea aprendida del estudio.

Al mismo tiempo que se observó un aumento de células positivas a PRL en la condición de Memoria respecto a los controles.

Las regiones CA1, CA3 y GD mostraban diferencias en la localización intracelular de la positividad a PRL. Si bien, el estrato más representativo fue el estrato Piramidal para el asta de Amón y la capa Granular para GD.

Por ello, nos planteamos conocer cuál era la relación global existente entre las tres regiones estudiadas en referencia a la positividad de PRL. Para conocer sus posibles semejanzas y diferencias entre regiones, así, como la tendencia a lo largo del proceso de aprendizaje y consolidación de la memoria.

Se evaluaron CA1, CA3 y GD del hipocampo conjuntamente con los datos hallados en la determinación del patrón de distribución de PRL en el hipocampo.

Analizando la intensidad de positividad a PRL, el porcentaje de células positivas a PRL (%), el porcentaje de positividad nuclear total a PRL (%), el porcentaje de positividad nuclear exclusiva a PRL (%), el porcentaje de positividad citoplásmica total a PRL (%), porcentaje de positividad citoplásmica exclusiva a PRL (%) y porcentaje de positividad nuclear y citoplásmica conjuntamente a PRL (%).

#### 4.2.3-1. INTENSIDAD DE POSITIVIDAD A PRL

La primera relación que se analizó entre las regiones, fue la intensidad del marcaje a PRL, medida en unidades arbitrarias de gris medio (UA) (Figura RD-41).

Para conocer como fue el vínculo entre las regiones, se observó la línea de tendencia desde los animales control NL hasta los de Memoria 25 días, con una función logarítmica.

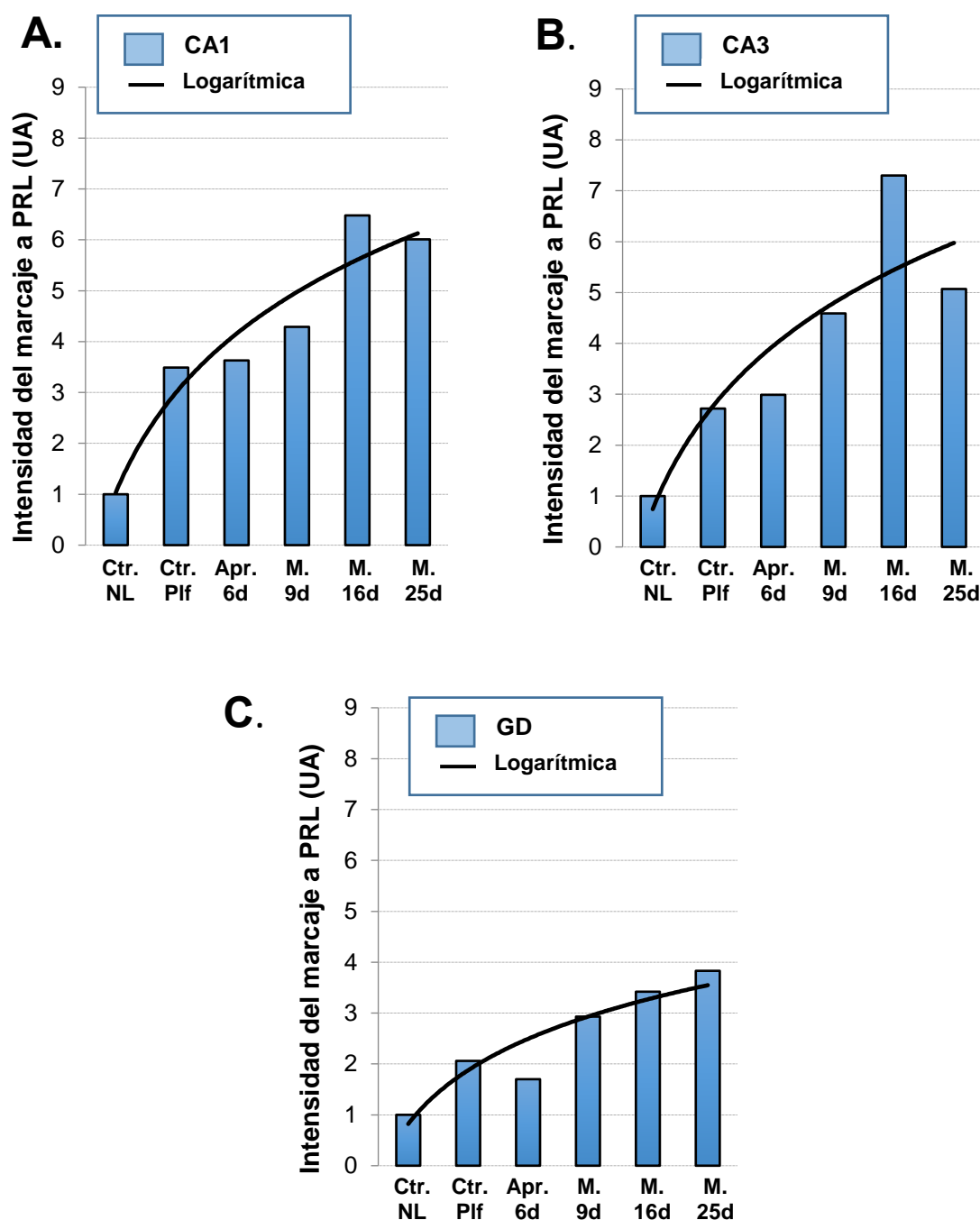
El comportamiento de la tendencia para la región CA1, CA3 y GD fue ascendente.

CA1 y CA3 presentaban una pendiente más ascendente que la que se observaba en la región GD. La tendencia en ambas regiones del asta de Amón fue semejante.

Por otro lado, en GD, también se observaba una línea de tendencia ascendente, pero menos pronunciada.

La intensidad de marcaje a PRL (UA) fue más elevada en CA1 y CA3 en referencia a lo observado en GD.

En las regiones CA1 y CA3 mostraban un aumento de la intensidad positiva a PRL en Memoria 16 días respecto a las otras condiciones. Sin embargo, ese incremento máximo en la región GD se observaba en Memoria 25 días.



**Figura RD-41.** Relación de las regiones del hipocampo en referencia a la Intensidad del marcaje a PRL (UA). (A) CA1, (B) CA3 y (C) GD. Las siglas indican, Ctrl.NL, control nado libre; Ctrl. Plf, control plataforma; Apr.6d, aprendizaje 6 días; M.9d, memoria 9 días; M.16d, memoria 16 días y M.25d, memoria 25 días. La línea negra, representa la línea de tendencia.

#### **4.2.3-2. PORCENTAJE DE CÉLULAS POSITIVAS A PRL**

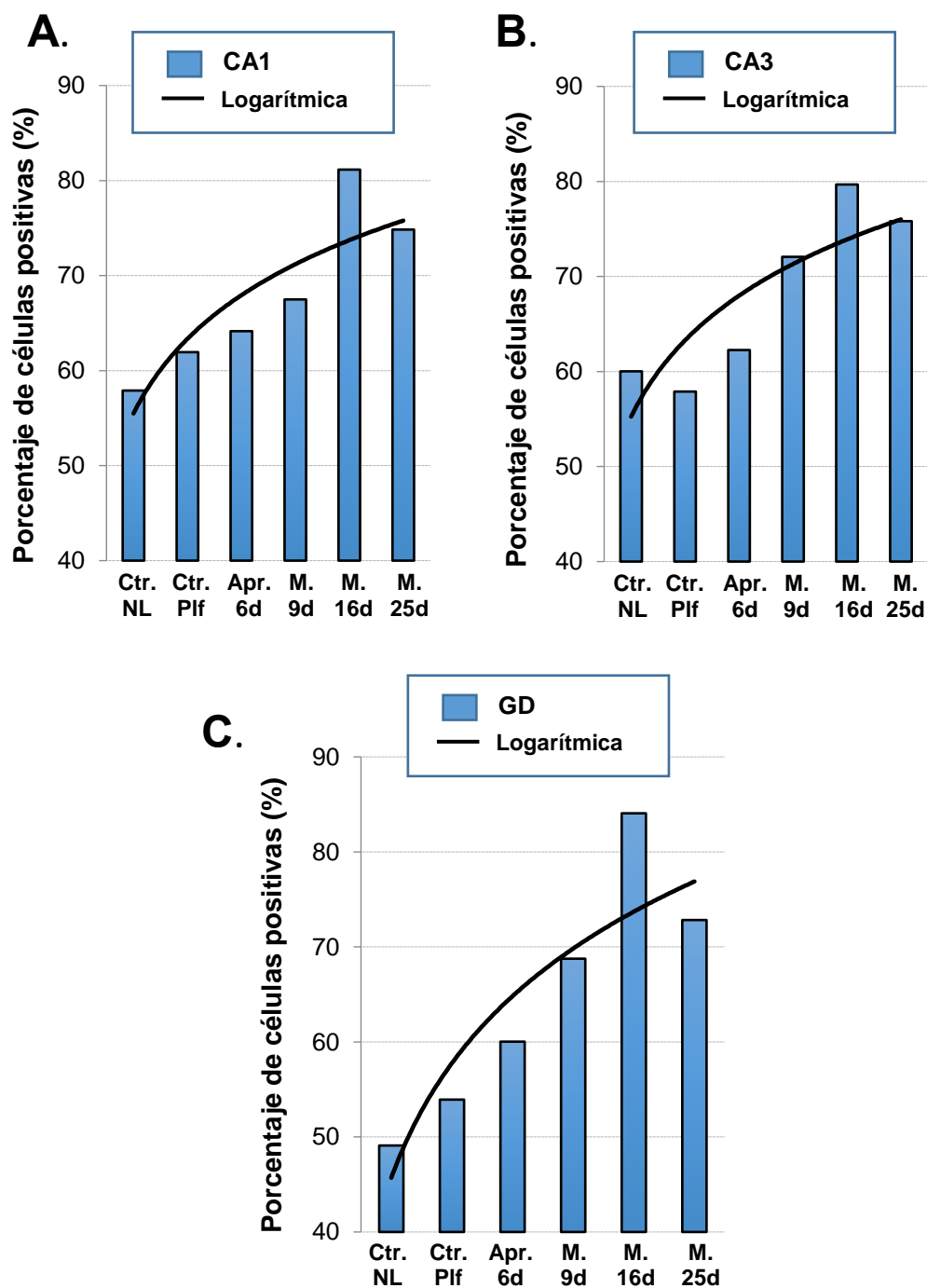
El porcentaje de células positivas a PRL (%), también fue analizado. Se cuantificó el porcentaje de todas las células positivas observadas a microscopía confocal en cada región, sin hacer discriminación de la localización intracelular de PRL, en el asta de Amón o en el GD.

En el porcentaje de células positivas a PRL (Figura RD-42), se observó una tendencia ascendente en las tres regiones analizadas.

Para la región CA1 y CA3, la tendencia fue bastante similar. El porcentaje de células positivas a PRL para el control NL es cercano al 60% y por ello, la tendencia comienza en valores más superiores que lo observado para GD.

En GD, existió una tendencia ascendente como en las otras dos regiones, pero el comienzo de línea logarítmica comienza en valores menos elevado en Control NL, aproximadamente cercanos al 50% de células positivas para PRL.

Para las tres regiones, se observó un aumento creciente en el porcentaje positivo desde el control NL hasta Memoria 25 días. Mostrando los valores máximos en el grupo Memoria 16 días y en menor medida en Memoria 25 días.



**Figura RD-42.** Relación de las regiones del hipocampo en referencia al porcentaje de células positivas (%). (A) CA1, (B) CA3 y (C) GD. Las siglas indican, Ctr.NL, control nado libre; Ctr. Pif, control plataforma; Apr.6d, aprendizaje 6 días; M.9d, memoria 9 días; M.16d, memoria 16 días y M.25d, memoria 25 días. La línea negra, representa la línea de tendencia.



#### **4.2.3-3. PORCENTAJE DE POSITIVIDAD NUCLEAR TOTAL A PRL**

Se analizó el porcentaje de positividad nuclear total a PRL (%), es decir, las células que fueron positivas únicamente en el núcleo, junto con aquellas que fueron positivas en el núcleo y citoplasma conjuntamente.

Se realizó un estudio para conocer la relación de CA1, CA3 y GD, estudiando la línea de tendencia de una función polinómica.

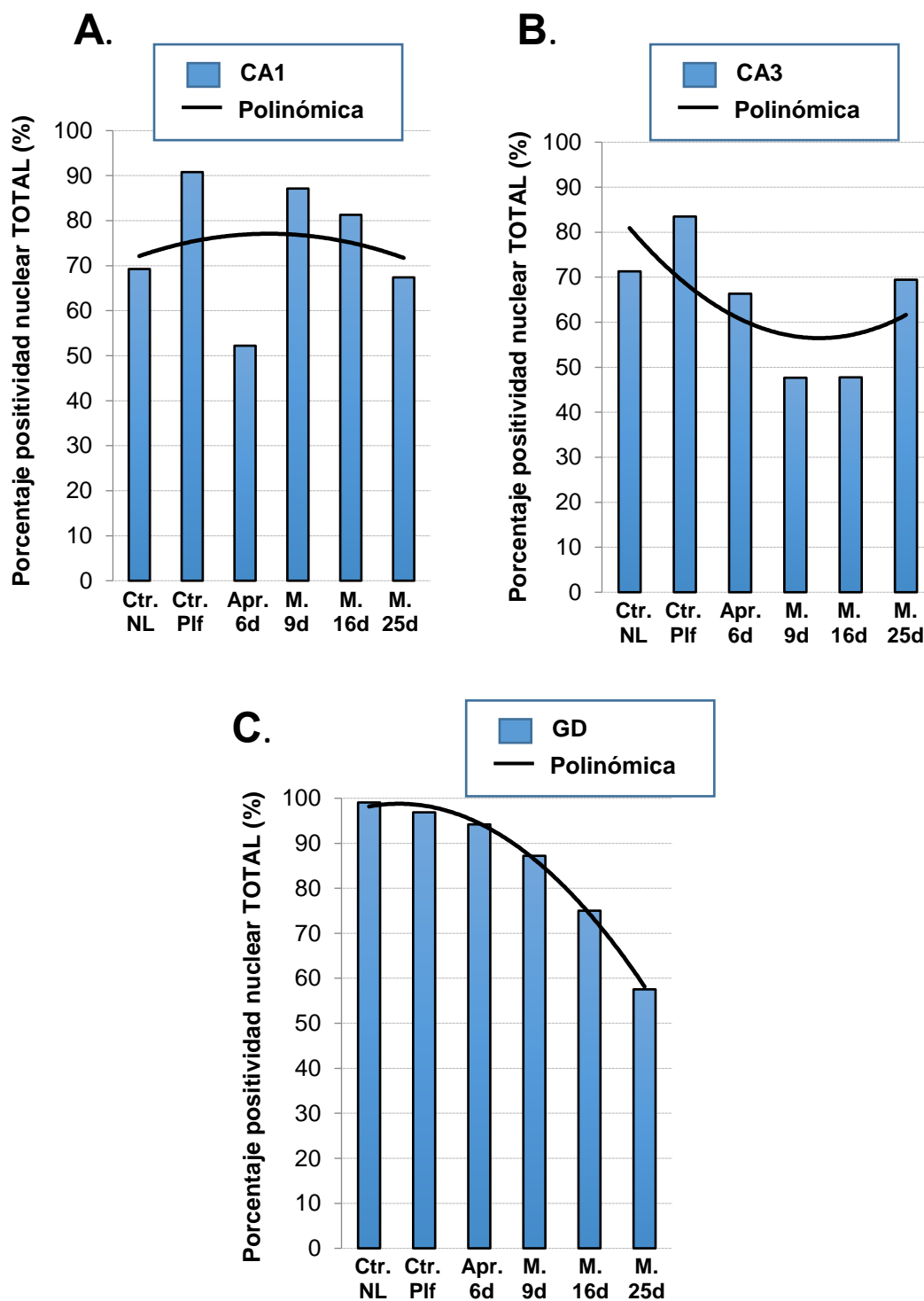
Las tres regiones, CA1, CA3 y GD para el porcentaje de positividad nuclear total (%) (Figura RD-43), presentaban un comportamiento desigual.

La región CA1, presentaba una línea de tendencia ligeramente convexa desde la condición control NL hasta Memoria 25 días.

Con valores superiores al 70% para los grupos, control Plataforma, Memoria 9 y 16 días.

Al contrario, sucedió en la región CA3, la tendencia presentada fue descendente, de forma cóncava desde el grupo control NL hasta Memoria 25 días. Con valores en el porcentaje de positividad nuclear total cercanos al 70%, exceptuando Memoria 9 y 16 días.

Por otro lado, la región GD presentó una tendencia descendente muy pronunciada desde control NL hasta Memoria 25 días. Pasando de valores cercanos al 100% de positividad hasta valores inferiores al 60%.



**Figura RD-43.** Relación de las regiones del hipocampo en referencia al porcentaje de positividad nuclear TOTAL a PRL, (A) CA1, (B) CA3 y (C) GD. Las siglas indican, Ctrl.NL, control nado libre; Ctrl. Plf, control plataforma; Apr.6d, aprendizaje 6 días; M.9d, memoria 9 días; M.16d, memoria 16 días y M.25d, memoria 25 días. La línea negra, representa la línea de tendencia.

#### **4.2.3-4. PORCENTAJE DE POSITIVIDAD NUCLEAR EXCLUSIVA A PRL**

Se analizó el porcentaje de positividad nuclear exclusiva a PRL (%), es decir, las células que únicamente fueron positivas en el núcleo.

El comportamiento sobre el porcentaje de positividad nuclear exclusiva de PRL (%) (Figura RD-44) en las tres regiones analizadas, difiere entre ellas.

Se observó que el porcentaje positivo nuclear exclusivo para el grupo control NL fue muy similar en las tres regiones analizadas, las modificaciones comienzan en los grupos posteriores, ya que cambia la línea de tendencia con la situación experimental.

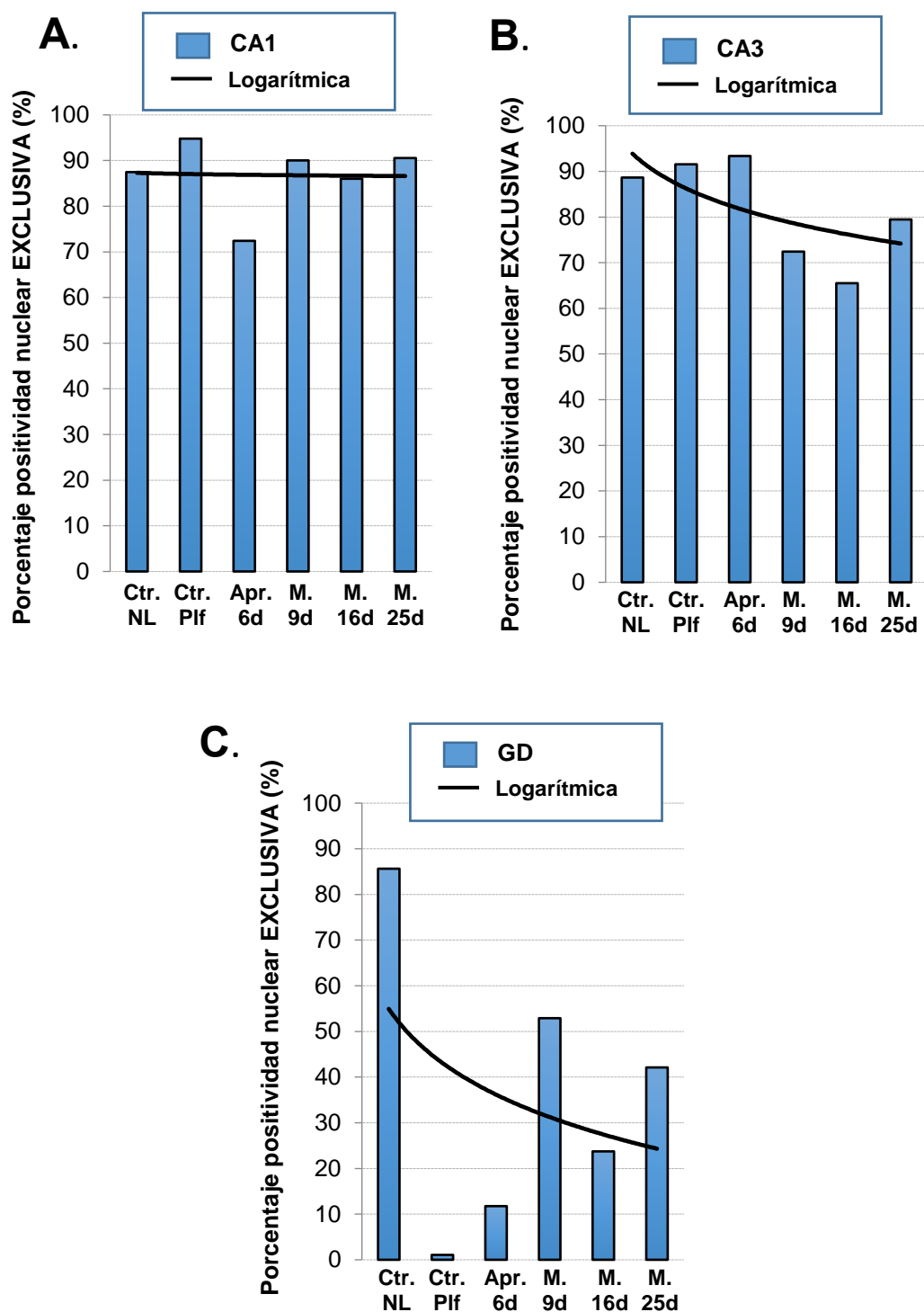
La región CA1, mostraba una línea de tendencia lineal y constante para todos los grupos. Con valores bastante altos del porcentaje de positividad nuclear en todos los grupos, con una disminución en la condición Aprendizaje 6 días.

Las regiones CA3 y GD, ambas presentaban una línea de tendencia descendente desde el grupo control NL hasta Memoria 25 días. A su vez, fue diferente entre ellas.

CA3, presentaba valores del porcentaje de positividad nuclear elevados en los grupos entrenados, con un descenso para los que habían consolidado la memoria, siendo éste más pronunciado en Memoria 9 y 16 días. No obstante, la línea de tendencia es más elevada que la vista para la región GD.

En la región GD, se observó un descenso acentuado del porcentaje de positividad nuclear exclusiva para el grupo control Plataforma que no lo sufrían las otras dos regiones. Para volver a elevar los valores desde este grupo hasta Memoria 25 días.

La línea de tendencia fue descendente, pero menor que la observada en CA3.



**Figura RD-44.** Relación de las regiones del hipocampo en referencia al porcentaje de positividad nuclear EXCLUSIVA a PRL, (A) CA1, (B) CA3 y (C) GD. Las siglas indican, Ctrl. NL, control nado libre; Ctrl. Pif, control plataforma; Apr.6d, aprendizaje 6 días; M.9d, memoria 9 días; M.16d, memoria 16 días y M.25d, memoria 25 días. La línea negra, representa la línea de tendencia.

#### **4.2.3-5. PORCENTAJE DE POSITIVIDAD CITOPLÁSMICA TOTAL A PRL**

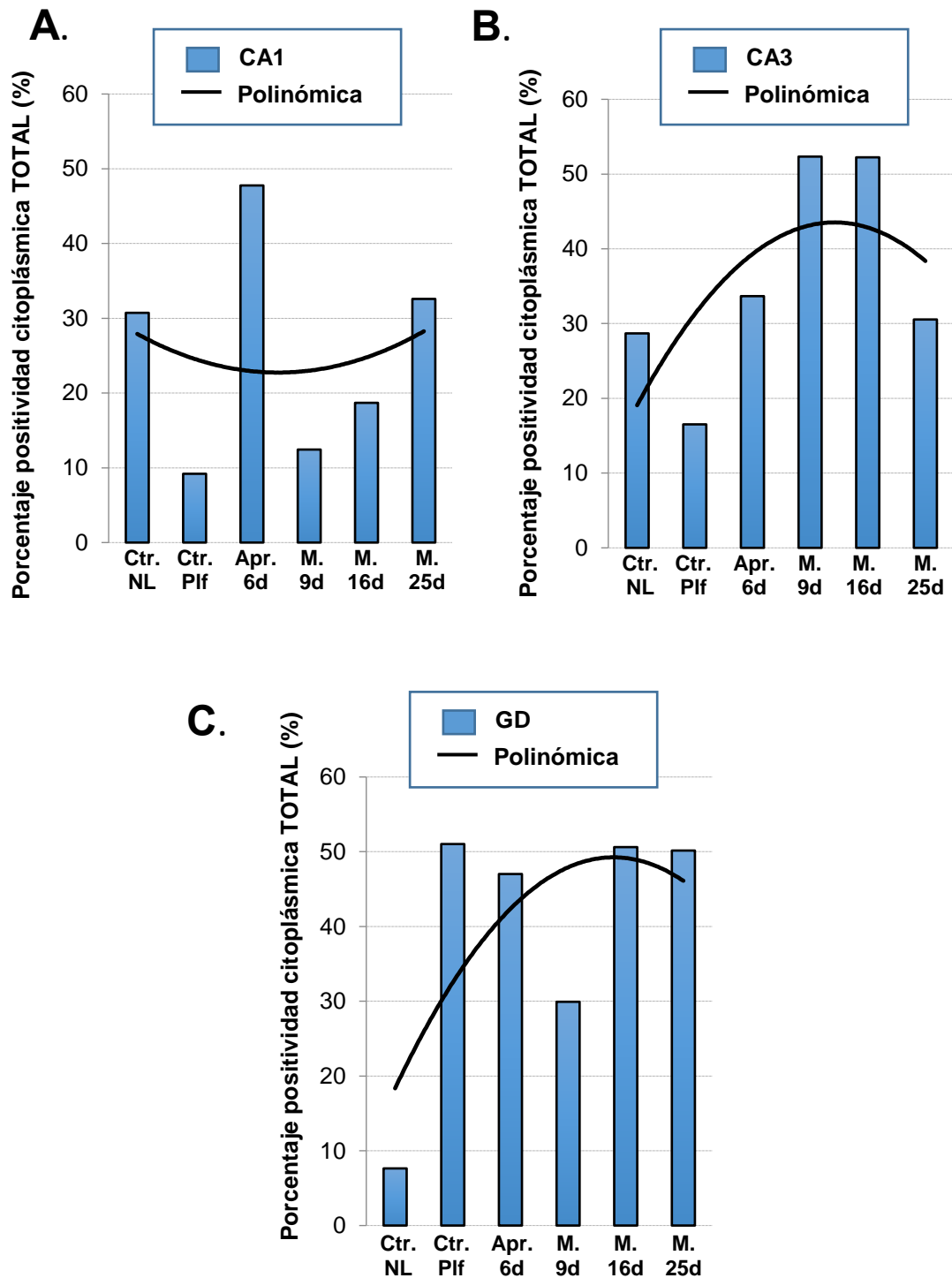
Se analizó el porcentaje de positividad citoplásmica total a PRL. Es decir, las células que fueron positivas únicamente en el citoplasma y las células que presentaban positividad en el citoplasma y el núcleo conjuntamente.

El porcentaje de positividad citoplásmica total a PRL (%) (Figura RD-45), presentaba una línea de tendencia similar para la región CA3 y GD, pero diferente a la presentada por CA1. Lo que indicaba que la situación experimental modificaba el patrón de la PRL en las regiones.

La región CA1, mostraba una tendencia cóncava desde el grupo control NL hasta Memoria 25 días. Con porcentaje positivo citoplásmico incrementado en el grupo Aprendizaje 6 días. Encontrando valores similares entre ellos en la condición NL y 25 días para CA1 y CA3.

La región CA3, presentaba una tendencia convexa. Con un porcentaje en control NL superior al mostrado en control Plataforma y con valores incrementados en las condiciones Memoria 9 y 16 días, para sufrir una disminución en Memoria 25 días.

Sin embargo, la región GD, también poseía una tendencia convexa pero más alta que la presentada por CA3. Con valores de porcentaje más bajos en control NL, sufriendo un incremento similar en control Plataforma, Aprendizaje 6 días, Memoria 16 y 25 días, para observar un descenso en Memoria 9 días, pero con valores superiores a lo visto en control NL.



**Figura RD-45.** Relación de las regiones del hipocampo en referencia al porcentaje de positividad citoplásmica TOTAL (A) CA1, (B) CA3 y (C) GD. Las siglas indican, Ctr. NL, control nado libre; Ctr. Plf, control plataforma; Apr. 6d, aprendizaje 6 días; M. 9d, memoria 9 días; M. 16d, memoria 16 días y M. 25d, memoria 25 días. La línea negra, representa la línea de tendencia.

#### **4.2.3-6. PORCENTAJE DE POSITIVIDAD CITOPLÁSMICA EXCLUSIVA A PRL**

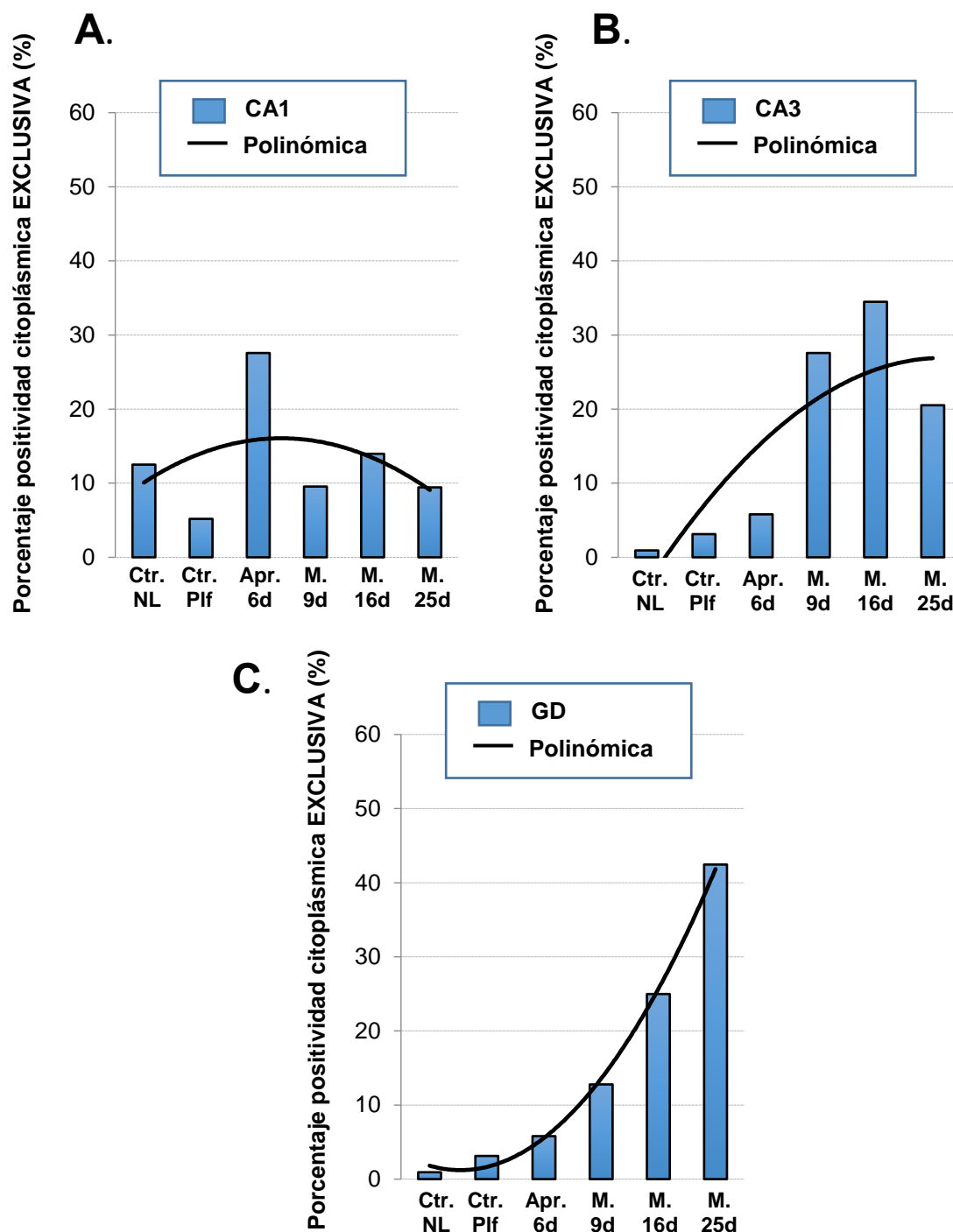
Siguiendo con la valoración global de la intensidad y localización de PRL en el aprendizaje y consolidación de la memoria. Se analizó el porcentaje de positividad citoplásmica exclusiva, es decir, las células positivas a PRL sólo en el citoplasma.

El porcentaje de positividad citoplásmica exclusiva a PRL (%) (Figura RD-46) mostraba que ninguna de las tres regiones analizadas era similar. Cada una de ellas presentaba una tendencia diferente en la función polinómica.

La región CA1, presentaba una línea de tendencia convexa desde control NL hasta Memoria 25 días. Con valores de porcentaje positivo en citoplasma superiores a los que se mostraban en CA3 y GD. Se observó un aumento del porcentaje en el grupo Aprendizaje 6 días respecto a las demás condiciones.

La región CA3 indicaba una tendencia ascendente desde el grupo control NL hasta Memoria 16 días, observando una disminución en el porcentaje en Memoria 25 días, pero más abundante que en los grupos aprendizaje.

Por otro lado, la región GD mostraba un crecimiento paulatino desde el control NL con valores inferiores hasta el grupo Memoria 25 días que fue el que mostraba mayor porcentaje positivo para citoplasma. La línea de tendencia fue ascendente de manera gradual.



**Figura RD-46.** Relación de las regiones del hipocampo en referencia al porcentaje de positividad citoplásmica EXCLUSIVA a PRL (A) CA1, (B) CA3 y (C) GD. Las siglas indican, Ctr.NL, control nado libre; Ctr. Plf, control plataforma; Apr.6d, aprendizaje 6 días; M.9d, memoria 9 días; M.16d, memoria 16 días y M.25d, memoria 25 días. La línea negra, representa la línea de tendencia.



#### **4.2.3-7. PORCENTAJE DE POSITIVIDAD NUCLEAR Y CITOPLÁSMICA CONJUNTAMENTE A PRL**

Siguiendo con el análisis de la valoración global de la intensidad y localización de PRL en aprendizaje y consolidación de la memoria, se analizó el porcentaje de positividad nuclear y citoplásmica a PRL conjunta.

La tendencia de los grupos del estudio referente al porcentaje de positividad nuclear y citoplásmica conjunta (%) (Figura RD-47), mostraba que para las regiones CA3 y GD era semejante, aunque con diferencias dentro de la región en comparación con lo observado en la región CA1.

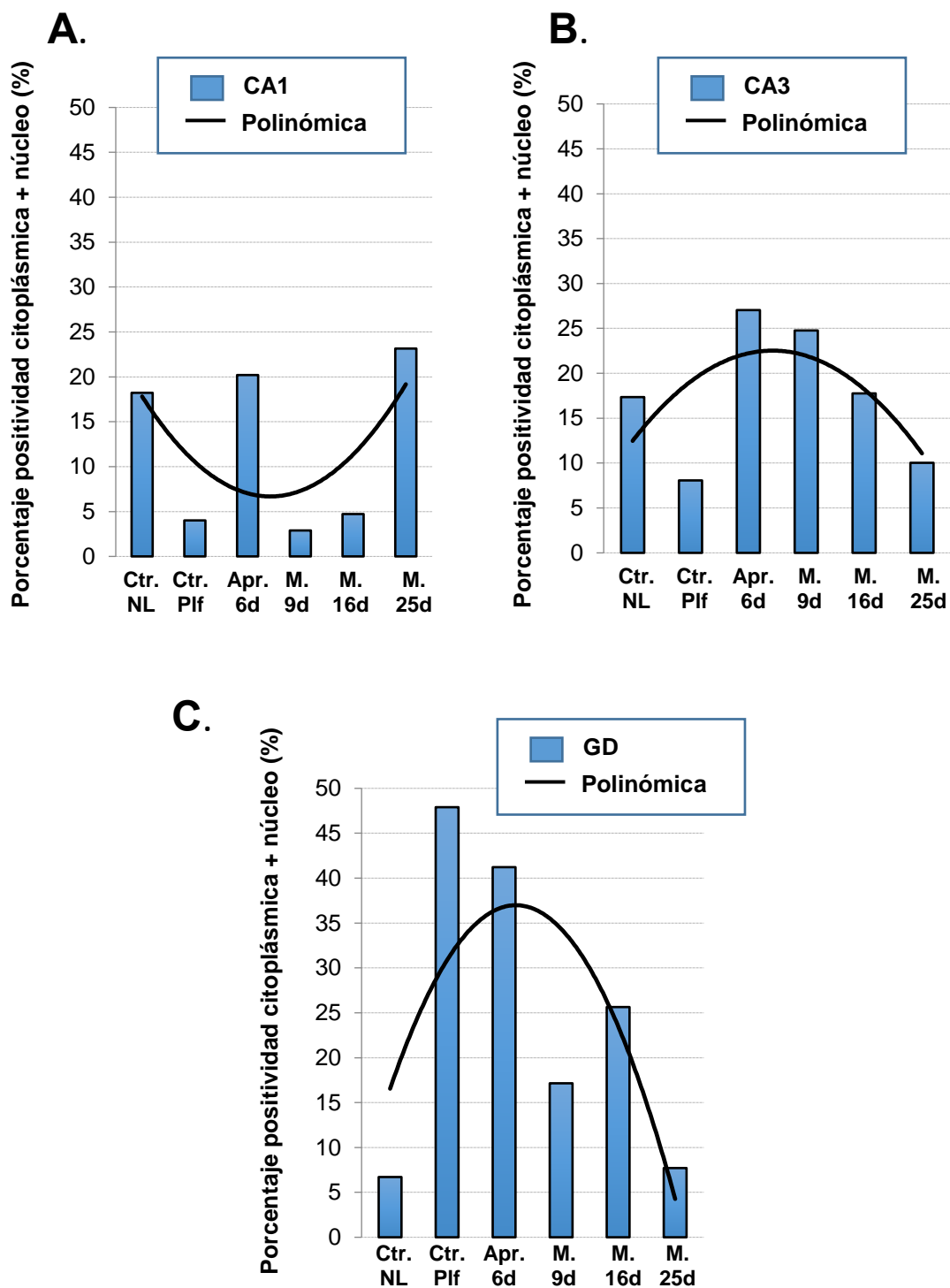
Se mostraba una tendencia cóncava para la región CA1. Con valores semejantes para el control NL entre CA1 y CA3.

En la región CA1 se observó un mayor porcentaje de positividad conjunta (núcleo+citoplasma) en los grupos, control NL, Aprendizaje 6 días y Memoria 25 días. Al mismo tiempo que, se mostró una disminución del porcentaje positivo en control Plataforma, Memoria 9 y 16 días.

Por otro lado, la región CA3 presentaba una tendencia convexa desde el grupo control NL hasta Memoria 25 días. Con valores de porcentaje positivo elevados en Aprendizaje 6 días, con un descenso decreciente y paulatino desde esta condición hasta Memoria 25 días.

Sin embargo, la región GD también presentaba una tendencia convexa, pero fue de manera más pronunciada, llegando a ser hiperconvexo.

Se observaron valores de porcentaje positivo menores en control NL y Memoria 25 días, con un gran aumento para control Plataforma y Aprendizaje 6 días, seguido de un descenso del porcentaje en el grupo Memoria 9 días, pero siempre superior a NL y 25 días, para observar de nuevo un incremento en el porcentaje de Memoria 16 días



**Figura RD-47.** Relación de las regiones del hipocampo en referencia al porcentaje de positividad citoplásmica y nuclear conjunta. (A) CA1, (B) CA3 y (C) GD. Las siglas indican, Ctr.NL, control nado libre; Ctr. Plf, control plataforma; Apr.6d, aprendizaje 6 días; M.9d, memoria 9 días; M.16d, memoria 16 días y M.25d, memoria 25 días. La línea negra, representa la línea de tendencia.

La valoración global referente a la intensidad de positividad a PRL en las tres regiones del hipocampo estudiadas, CA1, CA3 y GD, junto con el porcentaje de positividad a PRL en las diferentes partes de las células neuronales, sugiere que las tres regiones estudiadas muestran un comportamiento semejante si se considera la intensidad de reacción de forma global y el porcentaje de células positivas a PRL.

De forma que hay más PRL y más neuronas positivas a PRL debido al aprendizaje y aún más a la consolidación de la memoria.

Sin embargo, la localización intracelular de la hormona difiere de unas regiones a otras como respuesta al momento y el proceso de aprendizaje y memoria.

*Los resultados sugieren que la locación nuclear, citoplásmica o nuclear y citoplásmica conjunta, podrían ser relevantes dependiendo del momento en que se desarrolla el estudio.*

#### **4.2.4. ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DEL APRENDIZAJE Y LA CONSOLIDACIÓN DE LA MEMORIA EN LA PRESENCIA DE PRL EN EL HIPOCAMPO EN WB**

Un complemento esencial al análisis del proceso de aprendizaje y consolidación de la memoria y su relación con la localización hipocampal de PRL por inmunocitoquímica, junto con las variaciones de la misma a lo largo del tiempo. Fue la determinación de la proteína PRL por western blotting (WB).

En este sentido, el WB nos ha servido para controlar que la proteína que reconoce el anticuerpo empleado, se corresponde con la PRL en su peso molecular, ya sea en su forma monomérica de 23kDa o en alguna de sus formas poliméricas (entrono a 45, 90 ó 150 kDa).

Por otro lado, nos ha permitido valorar densitometría en las bandas obtenidas, comprobar indirectamente que los cambios en intensidad de reacción observados durante los procesos de aprendizaje y consolidación de la memoria se corresponden con cambios en la cantidad de PRL.

Para llevar a cabo este estudio del contenido proteico, se realizó un western blotting de la hormona estudiada, en lisados celulares. Normalizando el contenido de la proteína PRL con  $\beta$ -actina respecto a un grupo de animales no tratados, llamado Naive.

El grupo de animales no tratados, corresponde a un conjunto de ratas machos sanas, sacadas del animalario. A las cuales, no se las sometió a ningún tipo de prueba. De este modo, fue un grupo que se utilizó como control para estabilizar los niveles de PRL respecto al resto de los grupos de animales de este trabajo.

La PRL es una proteína con un peso molecular de 23 kDa. Aunque presenta variaciones de tamaño según dónde se encuentre localizada (Bulatov, Martynov et al. 1997).

Estos cambios, son debidos a que su grado de conservación y su capacidad de actuación varía entre las especies. Por ejemplo, se conoce que PRL de rata

es capaz de activar el RPRL humano, mientras que la PRL de ratón, no posee esta capacidad (Keeler, Dannies et al. 2003, Svensson, Bondensgaard et al. 2008).

La Figura RD-48, presenta la imagen de un gel de poliacrilamida, obtenido tras la electroforesis de lisados celulares hipocampales de las ratas machos de nuestro estudio.

En el WB, se observó bandas en todas las categorías estudiadas.

El WB dio lugar a la presencia de cuatro bandas principales en 23, 46, 90 y 150 kDa, tal y como se esperaba por los datos recogidos.

Todas las bandas aparecieron en todas las condiciones estudiadas. De todas ellas, la más llamativa fue la de 90 kDa.

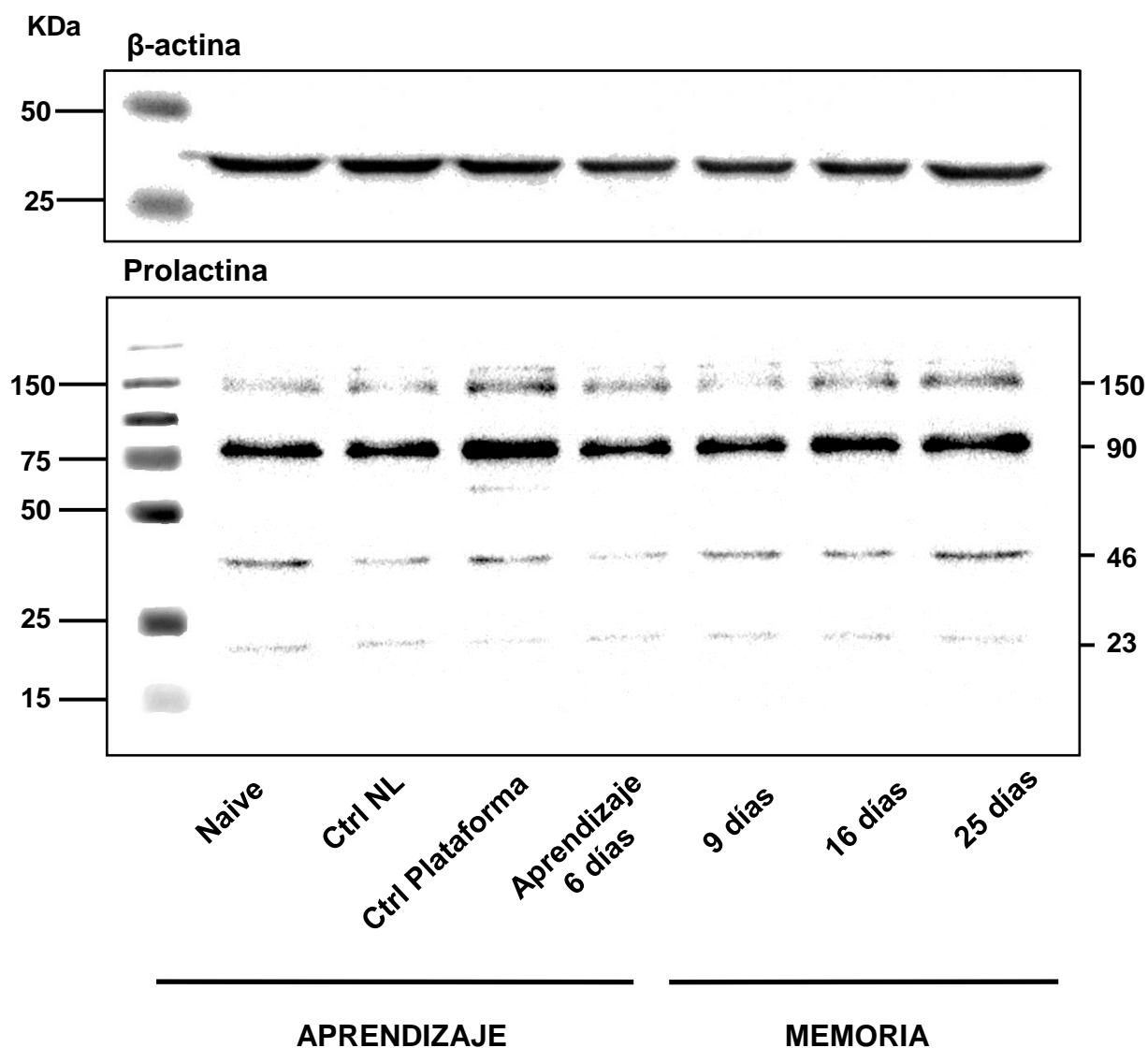
La imagen (Figura RD-48), muestra la electroforesis de la  $\beta$ -actina como control de carga, originando una banda a los 43 kDa.

Con  $\beta$ -actina, nos asegurábamos de que la carga de proteína era la misma en todos los pocillos, demostrando muy pequeñas variaciones en la intensidad de carga.

Estas bandas, dan la certeza de que la transferencia del gel a la membrana ha sido satisfactoria.

Se eligió  $\beta$ -actina como proteína de control de carga porque, se encuentra altamente conservada, está presente en cantidades similares independientemente del tipo de muestra del estudio a analizar, posee un alto nivel de expresión y su peso molecular es distinto al de PRL.

Para la elección, se siguieron los cánones establecidos en investigación, para la elección de un buen control de carga (Thacker, Yeung et al. 2016).



**Figura RD-48.** Western blotting en gel de poliacrilamida al 15% y al 4.5 %. Expresión de PRL en homogenados de tejidos hipocampales de los grupos experimentales aprendizaje y memoria. La primera calle del gel, representó el patrón de tamaños moleculares de ADN (KDa).  $\beta$ -actina se utilizó como control de carga.

A la vista de nuestros resultados, no podemos obviar que las modificaciones post-traduccionales de la PRL, como pueden ser; *la glicosilación, la fosforilación, la escisión proteolítica y la polimerización*, influyen en la estabilidad de esta hormona, no sólo a nivel de unión al receptor sino también en su actividad y biología (Ellis and Picciano 1995, Hiyama, Kansaku et al. 2009).

Se conoce que las formas fosforiladas de PRL se encuentran en la mayoría de las especies. La espectrometría de masas de extractos hipofisarios humanos indican que el 19% de PRLh existe de forma monofosforilada, otro 19% de forma difosforilada y el 62% no se encuentra fosforilada (Tuazon, Lorenson et al. 2002).

Siguiendo en esta línea, otros autores han encontrado esta proteína de forma fosforilada, gracias al sitio de unión ser177 (Wang, Liu et al. 1996).

De igual modo que sucede con PRL fosforilada, se ha identificado PRL glicosilada en las glándulas hipofisarias. Provocando una disminución de su actividad biológica, a la vez que, esta glicosilación provoca deficiencias en la unión a su receptor e incluso, ocasionando casos de hiperprolactinemia asintomática (Majumdar and Mangal 2013, Farag, Basha et al. 2018, Johnston, Bu et al. 2018).

La composición de aminoácidos y la estructura primaria de la PRL glicosilada son idénticas a las de la forma de PRL principal. Pero a medida que sucede diferentes glicosilaciones, se originan diversas formas de la hormona. Así, se tiene PRL monomérica, dimérica unida por disulfuros e inclusive macropolactina por la polimerización de esta molécula (Paepegaey, Veron et al. 2016, Barth, Lippiatt et al. 2018, Sherazi, Baig et al. 2018).

Si nos remontamos a los años 80, ya en esta época, algunos autores habían descrito esta hormona como una proteína de alto peso molecular capaz de formar monómeros, dímeros y oligómeros (Nyberg, Roos et al. 1981, Pankov Yu and Butnev 1986).

Normalmente, alrededor del 90% de la PRL presente en suero forma un monómero de 23 kDa y menos del 10% restante establecen otras composiciones y tamaños (Cohen, Cohen et al. 1994, Kline and Clevenger 2001, Overgaard and Pedersen 2017).

Estas otras formas, consisten en agregados de PRL monomérica con diversos grados de glicosilación y fosforilación que exhiben enlaces covalentes y no covalentes (Panchal and Muralidhar 2008, Gillam 2011).

A parte de la PRL monomérica, se han identificado por cromatografía en gel otras dos especies principales. Denominadas, "PRL grande" cuando tiene un

peso molecular de 48-56 kDa y “PRL muy grande o macroprolactina” cuando su peso es mayor a los 100 kDa (Hattori 2003, Aisaka, Tsuchiya et al. 2018).

La macroprolactina generalmente está compuesta por PRL monomérica unida a inmunoglobulina G (IgG) pero no siempre es así, porque a veces se la puede encontrar en forma de oligómeros. Teniendo rangos inmunoreactivos en WB cercanos a los 97 kDa.

Algunos experimentos tanto en ratas lactantes como en la incubación in vitro de glándula hipofisaria han demostrado la existencia de variantes moleculares de PRL a los 16, 22, 25, 32, 37, 42, 72 y >100 kDa (Mena, Hummelt et al. 1992, Ellis and Picciano 1993, Fahie-Wilson 2006, Richa, Rahul et al. 2010).

A la vista de estos antecedentes y con los resultados obtenidos en el estudio.

*Se determinó que, las bandas presentes en el WB, sí pertenecen a la proteína PRL, de manera monomérica, dimérica y en forma de macroprolactina. Datos que se asemejan a lo visto con anterioridad por otros autores.*

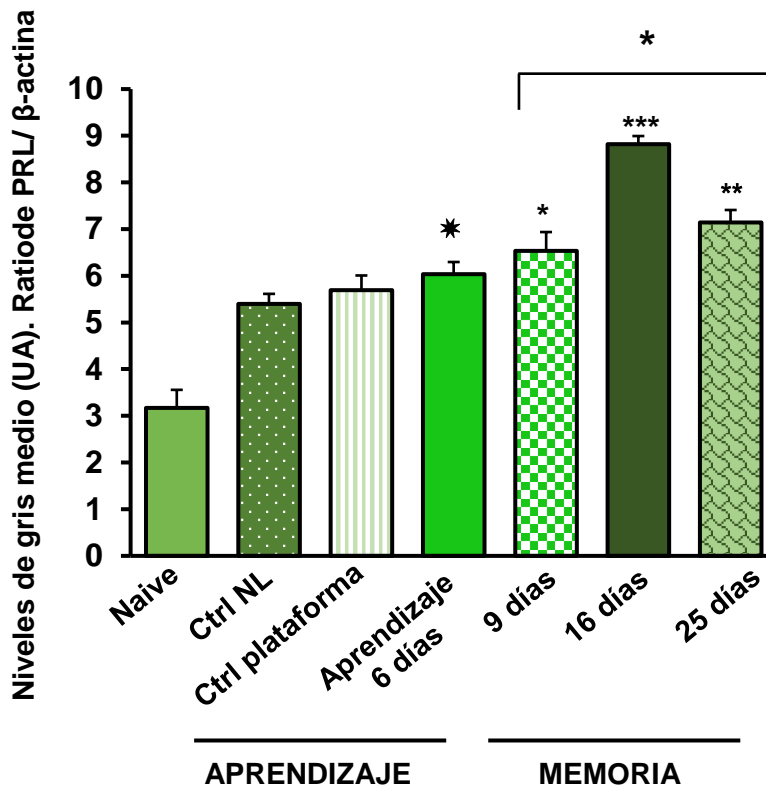
*Predominó la forma de oligómero (80-90 kDa) respecto a los otros tipos, debido a la mayor intensidad que se apreció en las bandas.*

Con estos acontecimientos, se pasó a valorar el contenido proteico relativo de PRL en el tejido hipocampal (se valoró el gris medio de la reacción en UA) (Tabla RD-22), tras su realización en ensayos de inmunotransferencia, de todos los grupos estudiados durante este trabajo.

Contenido proteico relativo de PRL (UA)		
<b>NAIVE</b>	3.17 ± 0.38	<b>NORMALIZADO CON NAIVE (0.00 ± 0.00)</b>
<b>Control NL</b>	5.39 ± 0.21	2.21 ± 0.21
<b>Control Plataforma</b>	5.69 ± 0.31	2.51 ± 0.31
<b>Aprendizaje 6 días</b>	6.03 ± 0.26	2.86 ± 0.26
<b>Memoria 9 días</b>	6.53 ± 0.40	3.36 ± 0.40
<b>Memoria 16 días</b>	8.82 ± 0.17	5.65 ± 0.17
<b>Memoria 25 días</b>	7.14 ± 0.27	3.96 ± 0.27

**Tabla RD-22.** Ratio PRL/ $\beta$ -actina en todos los grupos del estudio. Todos los valores, fueron expresados como la media  $\pm$  EEM





**Figura RD-49.** Niveles de gris medio (UA). Ratio PRL/  $\beta$ -actina en hipocampos enteros de ratas machos, de las categorías de estudio aprendizaje-memoria. Normalizado con respecto a  $\beta$ -actina. Los valores se obtuvieron por inmunoblot, se representó la media  $\pm$  EEM de  $n=5$  WB (por duplicado) de diferentes lisados hipocampales para cada grupo. El estudio estadístico se analizó por ANOVA, normalizado con el grupo Naive y comparando los resultados con el grupo control NL, mediante el test de comparaciones múltiples de Bonferroni (\* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ , \*\*\* $p<0.0001$ ).

La cantidad relativa de PRL en todos los grupos pre-entrenados y que habían consolidado la memoria (Figura RD-49), sufrían un aumento creciente del contenido proteico, desde los grupos controles hasta los de Memoria.

Observando un incremento significativo (\*\* $p<0.001$ , \*\*\* $p<0.0001$ )) en la condición Memoria 16 días ( $8.82 \pm 0.17$ ) y 25 días ( $7.14 \pm 0.27$ ) en comparación a control NL ( $5.39 \pm 0.21$ ) y control Plataforma ( $5.69 \pm 0.31$ ).

Los grupos control NL, control Plataforma presentaron valores sin diferencias significativas, mientras que Aprendizaje 6 días, mostraba diferencias

significativas menores ( $*p < 0.05$ ) que los animales que habían consolidado la memoria.

Al contrario de lo que sucedió en Memoria 9, 16 y 25 días. Entre estos grupos, se advirtieron diferencias significativas ( $*p < 0.01$ ) para 9 ( $6.53 \pm 0.40$ ) y 25 días ( $7.14 \pm 0.27$ ) al compararlos con Memoria 16 días ( $8.82 \pm 0.17$ ).

El análisis llevado a cabo en el grupo de animales no tratados (Naive), sirvió para volver a normalizar los datos obtenidos en el resto de grupos. Valorando así, el incremento real de la hormona, en los animales que habían sufrido manipulación con respecto a los no manipulados.

De este modo, se aseguró que los resultados en el contenido proteico de PRL fueron únicamente producidos por el proceso de aprendizaje-memoria realizado en el MWM y no por estrés de manipulación.

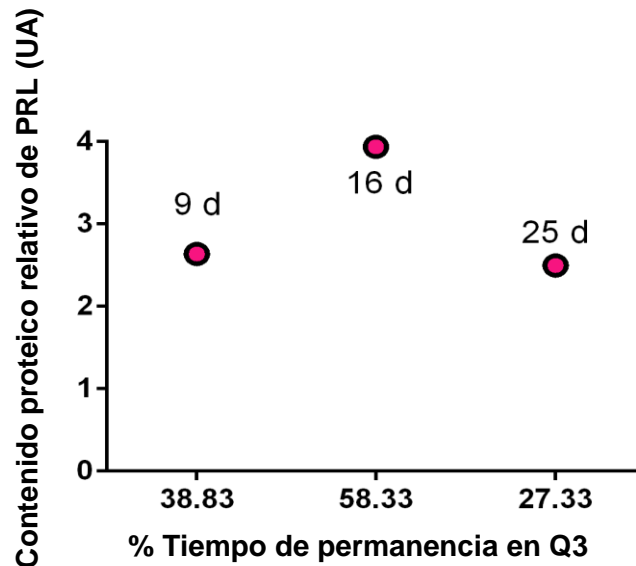
Los resultados obtenidos en WB corroboran los hallados en el análisis de inmunofluorescencia en cortes histológicos y de positividad que hemos descrito anteriormente.

*Tanto, el mayor contenido de PRL, como el mayor porcentaje de positividad a la hormona fueron observados en el grupo que consolidó la memoria a los 16 días y, aunque en menor medida, a Memoria 25 días.*

*Mostrándose un aumento progresivo en la cantidad de proteína según fue dándose el aprendizaje y consolidando la memoria.*

Otro dato a valorar que nos permite validar los resultados, fue estudiar el correlato entre el promedio del contenido de PRL en los grupos Memoria y, el porcentaje de tiempo de permanencia que habían mantenido los tres animales más exitosos de cada grupo Memoria en el cuadrante objetivo (Q3) analizados en el test conductual.

De esta manera, hemos conocido la relación entre la cantidad de proteína PRL con la capacidad de recuerdo de los animales experimentales que mejor habían realizado el test conductual en la condición Memoria.



**Figura RD-50.** Correlato entre el contenido proteico y el porcentaje de tiempo de permanencia en el cuadrante 3 (Q3) del MWM. Los datos se obtuvieron, únicamente de los 3 animales más exitosos para las condiciones, Memoria 9 días (9d), 16 días (16d) y 25 días (25d).

En el correlato (Figura RD-50) se comprobó que, el grupo Memoria 16 días fue la condición que presentaba mayor promedio en la cantidad de PRL ( $3.93 \pm 0.12$  UA/  $58.33 \pm 1.25$  %) en las tres ratas con mayor acierto en permanecer en el Q3.

Seguida de las ratas más exitosas en Memoria 9 días ( $2.63 \pm 0.58$  UA/  $38.33 \pm 1.42$  %), con valores muy similares para la condición 25 días ( $2.49 \pm 0.08$  UA/  $27.33 \pm 0.99$  %).

*Estos resultados, sugieren que el contenido de PRL, parece tener relación con la consolidación de la memoria a corto y largo plazo.*

*Los individuos que mejor recordaban la posición de la plataforma en el test de Memoria fueron aquellos, que tenían mayor cantidad de PRL. Esos animales pertenecieron a la condición Memoria 16 días.*

No se debe obviar que, en el análisis conductual de todas las ratas de cada grupo, no sólo las exitosas. Los animales que mejor recordaban la ubicación del cuadrante objetivo (Q3) fue el grupo Memoria 9 días. No obstante, en el correlato se valoró sólo las tres mejores.

*Por todo ello, se puede pensar que el incremento de la hormona, juega un papel importante en la consolidación de la memoria declarativa por aprendizaje a través de claves visuales.*

La hormona PRL ha sido muy estudiada y considerada por los diferentes investigadores.

No sólo por el posible papel que puede jugar en la memoria declarativa como se ha demostrado con este trabajo. Sino también, en otros procesos en los que interviene como la neurogénesis, la neuroprotección, neurodegeneración o la protección ante la excitotoxicidad entre otros.

Con la neurogénesis, se generan neuronas completamente funcionales en el cerebro adulto. Sobre todo, en la zona subgranular dentro del GD y en la zona subventricular (Wang, Pan et al. 2013).

Es ahí, donde PRL modula la activación de neurogénesis. Este hecho se conoce, porque se ha visto que algunos medicamentos antidopaminérgicos, como por ejemplo, haloperidol, pueden bloquear los receptores de PRL y de neuroblastos dopaminérgicos, disminuyendo la regulación de la neurogénesis adulta y provocando alteraciones mentales (Suzuki, Harada et al. 2018, Veselinovic, Vernaleken et al. 2018).

El efecto proneurogénico que produce PRL, sugiere un amplio potencial terapéutico y ofrece una nueva perspectiva sobre un tratamiento eficaz y moderno de muchos trastornos neuropsiquiátricos. Este efecto también puede ayudar a aclarar la patogénesis de los trastornos asociados con la proliferación y la degeneración de las células cerebrales adultas (Respondek and Buszman 2015).

Otros autores, han demostrado que el eje hormona de crecimiento (GH) y la PRL tienen un papel significativo en la regulación de los mecanismos neuroprotectores y/o neurorestauradores en el cerebro.

Estos efectos neuroprotectores están mediados a través de acciones de PRL sobre células madre neurales. La hormona PRL aplicada exógenamente, promueve la proliferación de estas células madres, en ausencia de factor de crecimiento epidérmico o factor de crecimiento de fibroblastos, e induce la proliferación de progenitores neuronales y gliales.

A su vez, en concentraciones altas PRL promueve y estimula la migración de las células madre neurales a través del receptor de PRL. Teniendo un efecto importante en procesos de recuperación relacionados con lesiones en el cerebro (Pathipati, Gorba et al. 2011).

Un trabajo muy reciente ha sacado a la luz, el papel de PRL como agente protector contra el daño cerebral y, en consecuencia, contra la neurodegeneración.

Se piensa que tanto la neurogénesis como la antiapoptosis, son algunos de los mecanismos que median en este efecto neurodegenerativo. Se cree la participación de la activación glial con el efecto de PRL. Las acciones de las células gliales en condiciones patológicas, combinadas con el efecto neuroprotector de la PRL, podrían actuar en patologías de varios modelos con daño cerebral (Anagnostou, Reyes-Mendoza et al. 2018).

Otros autores, revelan el efecto neuroprotector de PRL contra la excitotoxicidad producida por glutamato (Glu) o ácido kaínico, en modelos tanto in vitro como in vivo. Demostrando que PRL, previene la excitotoxicidad por mecanismos que implica la restauración de la homeostasis del calcio intracelular y la actividad mitocondrial (Zhang, Wang et al. 2010).

Es sabido que, la excitotoxicidad de Glu, causa muerte celular a través de vías apoptóticas o necróticas debido a sobrecarga de calcio ( $Ca^{2+}$ ). La PRL mantiene la viabilidad celular de cultivos primarios de neuronas del hipocampo de ratas expuestas a excitotoxicidad por Glu. La PRL proporciona neuroprotección contra este tipo de excitotoxicidad, porque mantiene la actividad

mitocondrial normal, atenuando los niveles de calcio (Vergara-Castaneda, Grattan et al. 2016, Rivero-Segura, Flores-Soto et al. 2017).

Se ha venido diciendo a lo largo de todo este trabajo, el gran número de funciones clave que desempeña PRL en la modulación de la respuesta al estrés durante el embarazo y la lactancia.

Pero, dentro del cerebro, PRL actúa como un neuropéptido para promover respuestas fisiológicas relacionadas con la reproducción, la adaptación al estrés, la neurogénesis y la neuroprotección. Se sabe que las adaptaciones cerebrales impulsadas por la PRL, son importantes para la regulación de la emocionalidad y el bienestar maternos (Lajud, Gonzalez-Zapien et al. 2013).

La PRL también afecta el cerebro masculino durante la respuesta al estrés. Por lo tanto, las alteraciones en el sistema de PRL debido al estrés o la exposición a sustancias que reducen la neurogénesis u otras afecciones, podrían contribuir a respuestas desadaptativas, influir en resultados patológicos de comportamiento y de emociones. Provocando estados psicopatológicos como la depresión (Torner 2016).

#### **4.2.5. VALORACIÓN GLOBAL DE LA INTENSIDAD DE POSITIVIDAD A PRL EN EL WB**

Los resultados obtenidos en la determinación del Western blotting y conociendo que las bandas presentes en WB pertenecen a la proteína PRL de manera monomérica, dimérica o en forma de macropolactina.

Se planteó conocer la valoración global de la intensidad positiva a PRL en cada banda por separado, para saber la posible relación con la cantidad proteica de PRL en cada condición.

Se evaluaron la intensidad de positividad a PRL en el WB total; intensidad de positividad a PRL en la banda de Pm: 150kDa del WB; intensidad de positividad a PRL en la banda de Pm: 90 kDa del WB; intensidad de positividad

a PRL en la banda Pm: 46 kDa y por último, la intensidad de positividad en la banda Pm: 23kDa del WB.

Todos estos parámetros se midieron con la intensidad del marcaje a PRL mediante el gris medio reactivo con unidades arbitrarias (UA), a la vez que las bandas estaban normalizadas con el ratio PRL/ $\beta$ -actina.

En todos los casos, se estudió la tendencia que seguían los diferentes animales del estudio en los grupos a lo largo del tiempo. Se mostraba la línea de tendencia de la función logarítmica.

➤ INTENSIDAD DE POSITIVIDAD A PRL WB TOTAL (UA) Ratio PRL/ $\beta$ -actina

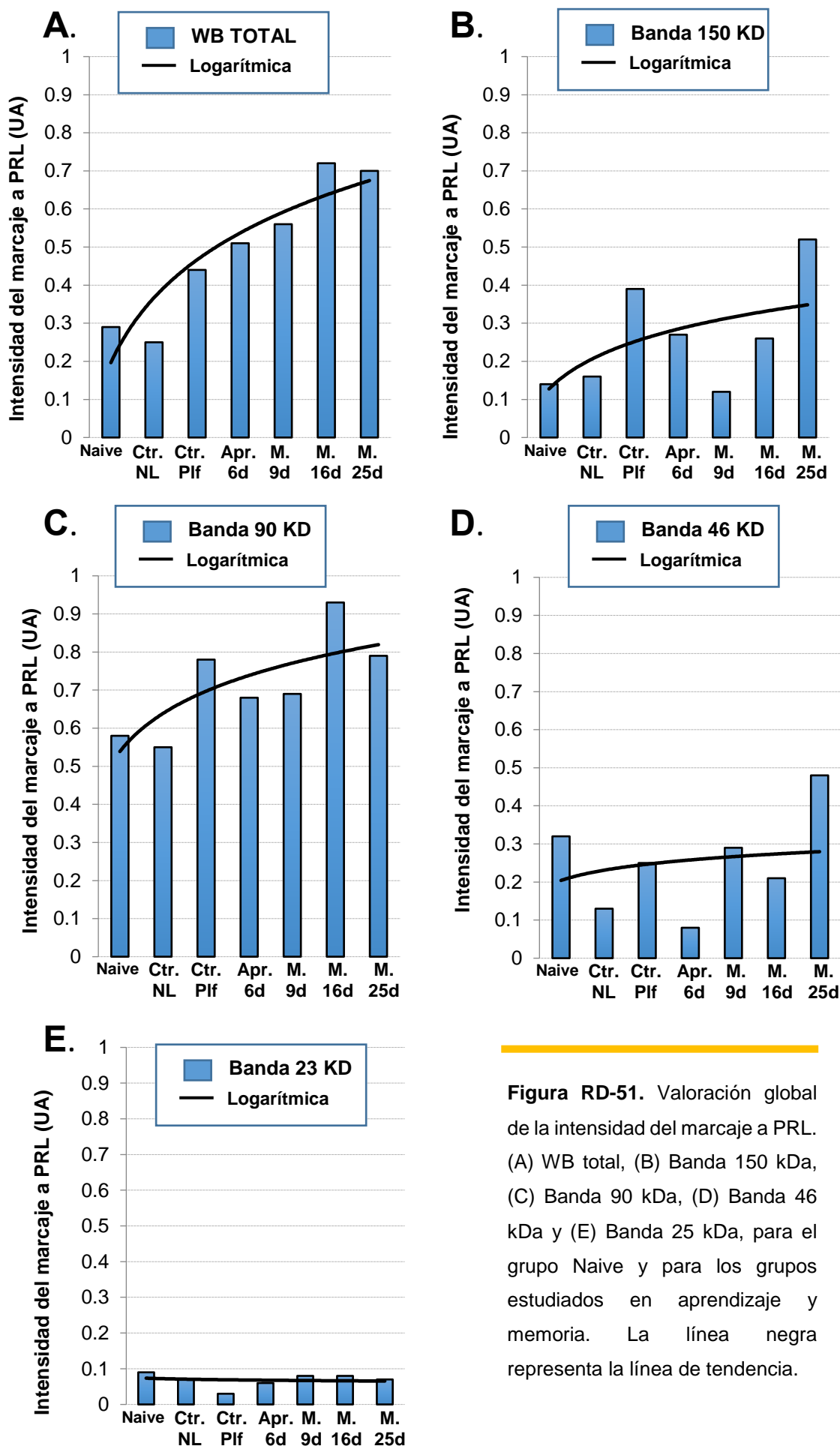
En la intensidad del marcaje a PRL (UA) referente a todas las bandas encontradas en el WB (Figura RD-51A), se observó que la tendencia desde el grupo Naive hasta el grupo Memoria 25 días fue ascendente.

Se observa un aumento en la intensidad positiva a PRL creciente a lo largo del tiempo de entrenamiento y de consolidación de la memoria.

Se mostraban valores de intensidad positiva para Memoria 16 y 25 días, siendo el grupo 16 días el que alcanza el mayor valor.

➤ INTENSIDAD DE POSITIVIDAD A PRL BANDA 150 KDa (UA) Ratio PRL/ $\beta$ -actina

La intensidad positiva a PRL que se mostraba en la banda perteneciente a los 150 kDa (Figura RD-51B), indicaba una tendencia ascendente. Con valores altos para el grupo control Plataforma, haciéndose máximos en control Memoria 25 días.



**Figura RD-51.** Valoración global de la intensidad del marcaje a PRL. (A) WB total, (B) Banda 150 kDa, (C) Banda 90 kDa, (D) Banda 46 kDa y (E) Banda 25 kDa, para el grupo Naive y para los grupos estudiados en aprendizaje y memoria. La línea negra representa la línea de tendencia.



➤ INTENSIDAD DE POSITIVIDAD A PRL BANDA 90 KDa (UA) Ratio PRL/ $\beta$ -actina

Por otro lado, la intensidad positiva a PRL en la banda de 90 kDa (Figura RD-51C), mostraba la mayor cantidad de intensidad positiva a PRL de todas las bandas analizadas.

Los valores para todos los grupos fueron superiores que, para la banda de 150, 46 y 23 kDa.

Se observó un aumento creciente y gradual desde el control NL hasta los grupos de Memoria. Destacando el gran incremento que presentaban control Plataforma, Memoria 16 y 25 días. Presentando el valor más alto Memoria 16 días.

➤ INTENSIDAD DE POSITIVIDAD A PRL BANDA 46 KDa (UA) Ratio PRL/ $\beta$ -actina

Referente a la intensidad de positividad a PRL en la banda de 46 kDa (Figura RD-51D), se mostraba una línea de tendencia ligeramente ascendente, casi rectilínea.

Los valores de intensidad en el grupo Naive fueron elevados en comparación con el grupo NL y Aprendizaje 6 días, casi similares para Plataforma y Memoria 9 días, disminuyendo levemente para Memoria 16 días, hasta que se produce un incremento elevado en Memoria 25 días.

➤ INTENSIDAD DE POSITIVIDAD A PRL BANDA 23 KDa (UA) Ratio PRL/ $\beta$ -actina

El nivel de intensidad del marcaje de PRL en la banda de 23 kDa (Figura RD-51E) fue el más bajo de todas las bandas analizadas. Se observó una intensidad baja en todos los grupos. Siguiendo una tendencia rectilínea.

La valoración global sobre la intensidad de positividad a PRL vista en las bandas del WB, indicaban:

El grupo Naive tenía valores más altos que el control NL, a partir de ahí existía un aumento creciente y gradual de la intensidad de positividad a PRL desde los animales que habían sido entrenados hasta los que habían consolidado la memoria.

Observándose que la banda más intensa fue la de 90 kDa, correspondiente a PRL oligomérica. Siendo la banda de 23 kDa, la PRL monomérica la que mostraba una intensidad de marcaje más leve.

Mientras que las bandas de 46 kDa (dimérica) y 150 kDa (macroprolactina) presentaban una intensidad más desigual para los grupos, con una tendencia ascendente hasta alcanzar el valor más intenso en el grupo de Memoria 25 días.

*Estos resultados, indicaban que el contenido proteico de PRL, parece tener relación con la consolidación de la memoria a corto y largo plazo.*

*La situación experimental modifica el patrón de intensidad a PRL, provocando un aumento en los animales que habían consolidado la memoria, encontrando predominantemente PRL oligomérica.*

#### **4.2.6. CUANTIFICACIÓN Y LOCALIZACIÓN DE LOS NIVELES DE ARNm POR HIBRIDACIÓN “*In situ*”.**

A la vista de los resultados obtenidos en la localización y detección de proteína PRL por inmunofluorescencia y por Western Blotting, conociendo que la PRL se encuentra localizada en las regiones del hipocampo y su inmunodetección en los diferentes estratos presentaron diferencias entre ellos, nos planteamos cuál podría ser su origen.

Por ello, mediante hibridación “*in situ*”, analizamos la presencia del ARNm de PRL, en cuatro regiones del hipocampo CA1; CA3; CA4 y GD.

##### **4.2.6-1 CUANTIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS POSITIVAS A ARNm EN LA ZONA CA1**

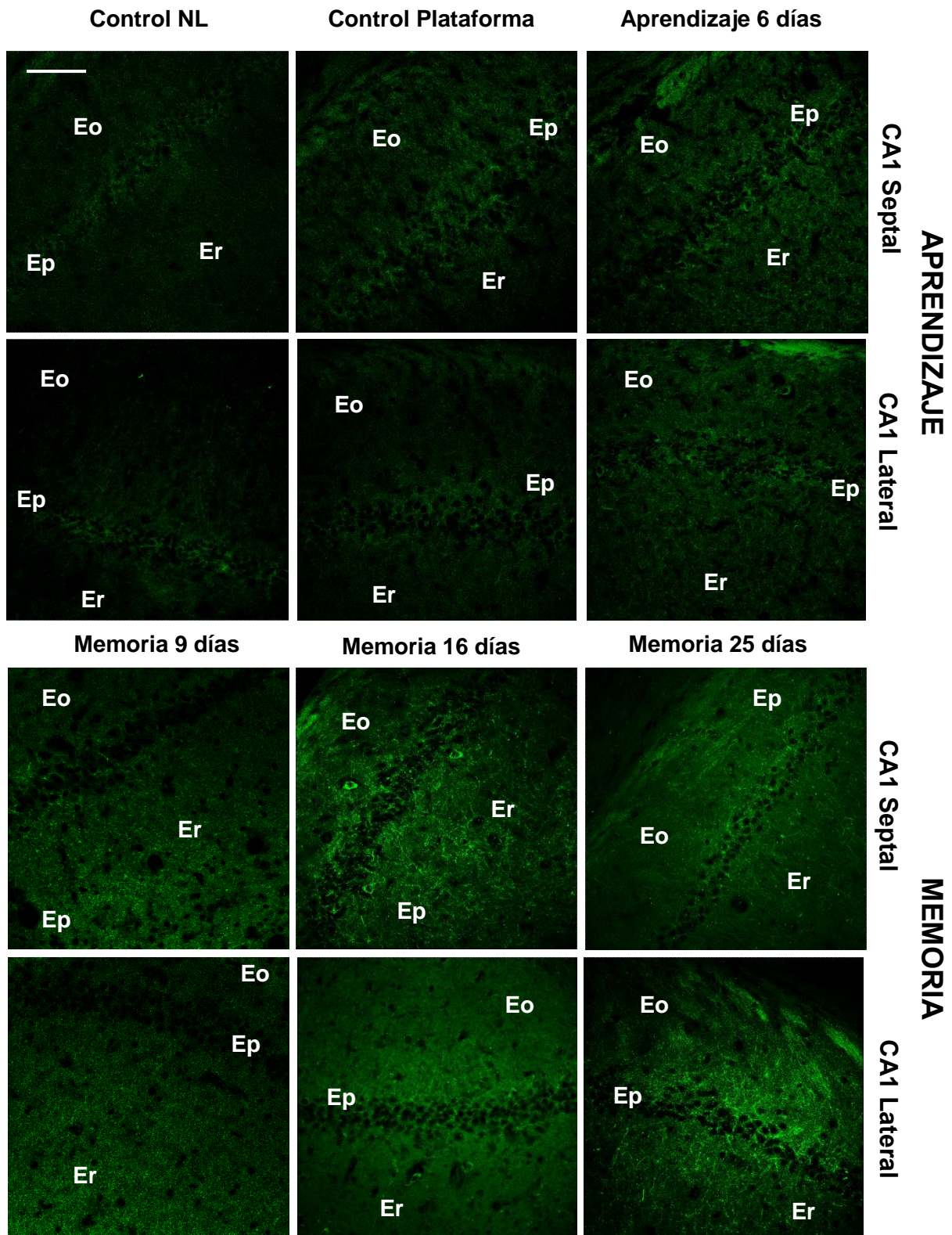
Tras la realización de la hibridación “*in situ*” fluorescente en cortes histológicos de los animales en este estudio. Se observó la presencia de ARNm en la región CA1 del hipocampo a microscopía confocal (Figura- RD-52).

Para cuantificar la reacción se comparó por separado la zona CA1 Lateral y CA1 Septal.

En todos los grupos, la reacción se presentó de forma granular, en pequeñas partículas distribuidas a lo largo del citoplasma de la neurona, sobre todo en las proximidades al núcleo.

A lo largo del estrato Oriens y estrato Radiado, se observaron fibras, terminales nerviosos e interneuronas positivas a la reacción. La intensidad de inmunofluorescencia en el grupo Memoria fue más intensa que en el grupo Aprendizaje.

Como se aprecia en la Figura RD-52 se visualizaba que, en la región CA1 Septal de Memoria 16 días, había interneuronas muy llamativas en el estrato Radiado y en el estrato Oriens.



**Figura RD-52.** Inmunodetección de la presencia de ARNm de PRL de la región CA1 en hipocampo de ratas machos entrenadas en el MWM. Eo, Estrato Oriens; Ep, Estrato piramidal y Er, Estrato radiado. Barra de escala, 75  $\mu$ m.

Se ha medido el porcentaje de área reactiva, el número de moléculas por área total (asumiendo arbitrariamente que 9 pixeles<sup>2</sup> corresponde a una molécula), y el área reactiva referida a 100.000 pixeles<sup>2</sup> de superficie total, mediante el software Image J, en 5 animales por condición, 6 imágenes por animal y 500.000 pix<sup>2</sup> de área analizada (Tabla RD-23 y Figura RD-53).

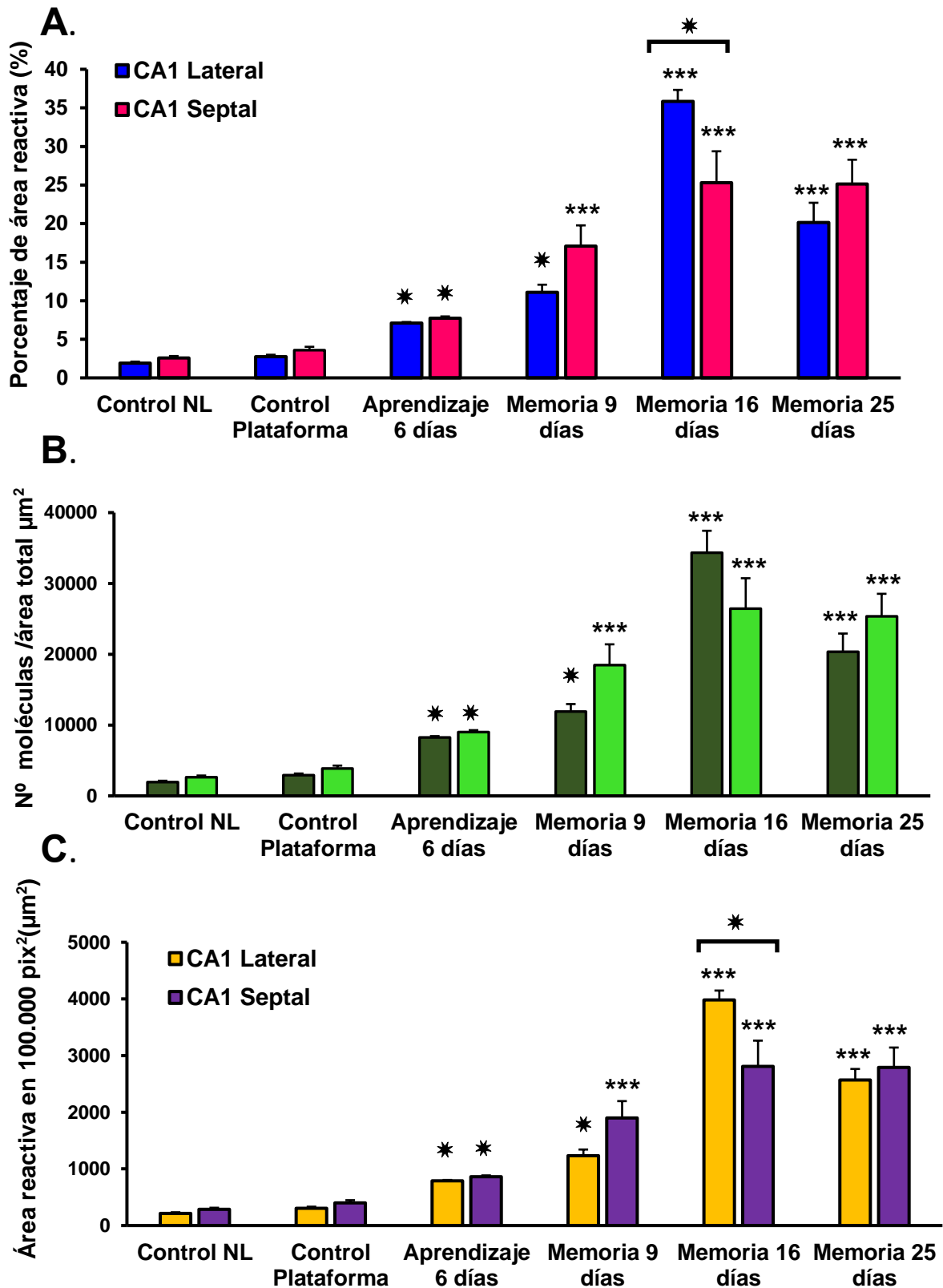
La Figura RD-53A, muestra la tendencia ascendente que presentó el porcentaje de área reactiva durante el proceso en la región CA1. Con diferencias entre la zona Septal y Lateral.

El porcentaje de área reactiva (%), en la condición Memoria 16 días fue mayor de manera estadísticamente significativa ( $***p < 0.0001$ ), para CA1 Lateral ( $35.82 \pm 1.50$ ) en comparación con el resto de los grupos. Sin embargo, en la región CA1 Septal, Memoria 16 días ( $25.29 \pm 4.08$  %) y 25 días ( $25.13 \pm 3.15$  %) presentaron resultados similares pero superiores al resto de los grupos del estudio.

Lógicamente, el número de moléculas reactivas en el área total ( $\mu\text{m}^2$ ) (Figura RD-45B) siguió una tendencia semejante al porcentaje del área reactiva. El número de moléculas fue superior en el grupo consolidación de Memoria a los 16 días tanto en CA1 lateral ( $34326.07 \pm 3113.14$ ) como en CA1 septal ( $26439.54 \pm 4297.85$ ). En esta última región, se observa una leve disminución no significativa en Memoria 25 días ( $25369.68 \pm 3169.52$ ) pero siempre superior respecto a los grupos control NL ( $02627.39 \pm 246.11$ ), control plataforma ( $03875.48 \pm 400.66$ ), Aprendizaje 6 días ( $09014.52 \pm 265.24$ ) y Memoria 9 días ( $18468.28 \pm 2935.94$ ).

En el caso de área reactiva en 100.000 pix<sup>2</sup> (Figura RD-45C), se observó algo similar que, con el porcentaje reactivo, fue significativamente mayor ( $***p < 0.0001$ ) en Memoria 16 días en CA1 lateral ( $3980.64 \pm 167.06$ ) y valores muy equiparables para CA1 septal respecto Memoria 16 días ( $2809.74 \pm 453.78$ ) y 25 días ( $2792.13 \pm 349.83$ ). Sin diferencias significativas para el grupo Aprendizaje 6 días, ni en control Plataforma con respecto al control NL.

Tanto para el porcentaje de área reactiva como para el área reactiva en 100.000 pix<sup>2</sup> se observaron diferencias significativas ( $*p < 0.05$ ) entre CA1 septal y CA lateral cuando ambas zonas fueron comparadas. Siendo el valor de CA1 Lateral superior para los dos parámetros.



**Figura RD-53.**(A) Porcentaje de área reactiva con respecto al área total de la imagen. (B) N° de moléculas por área total. (C) Área reactiva en 100.000  $\text{pix}^2$ . Los resultados se expresan como media  $\pm$  EEM  $n=5$  animales para condición, el nivel de significación estadística se realizó en comparación al grupo Control NL por ANOVA por el test de Bonferroni (\* $p<0.05$ , \*\*\* $p<0.0001$ ).

Se observó un aumento progresivo de los tres parámetros desde los animales que realizaron el test de aprendizaje hasta los animales que consolidaron la memoria, con diferencias estadísticamente significativas (\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.0001$ ).

Siendo el valor más elevado Memoria 16 días para la región CA1 lateral, con resultados muy similares para Memoria 16 días y 25 días en la zona CA1 Septal.

CA1 Septal			
GRUPO	Porcentaje de área reactiva (%)	Número de moléculas/área total	Área reactiva en 100.000 pix <sup>2</sup>
Ctrl NL	2.59 ± 0.24	02627.39 ± 246.11	0287.45 ± 48.17
Ctrl Plataforma	3.59 ± 0.43	03875.48 ± 400.66	0399.36 ± 48.17
Aprendizaje 6 días	7.74 ± 0.23	09014.52 ± 265.24	0859.69 ± 25.29
Memoria 9 días	17.07 ± 2.69	18468.28 ± 2935.94	1897.00 ± 299.42
Memoria 16 días	25.29 ± 4.08	26439.54 ± 4297.85	2809.74 ± 453.78
Memoria 25 días	25.13 ± 3.15	25369.68 ± 3169.52	2792.13 ± 349.83
CA1 Lateral			
GRUPO	Porcentaje de área reactiva (%)	Número de moléculas/área total	Área reactiva en 100.000 pix <sup>2</sup>
Ctrl NL	1.92 ± 0.19	01947.81 ± 189.08	0213.39 ± 20.96
Ctrl Plataforma	2.76 ± 0.24	02937.92 ± 221.29	0306.31 ± 26.35
Aprendizaje 6 días	7.09 ± 0.15	08259.52 ± 177.36	0787.69 ± 16.91
Memoria 9 días	11.10 ± 0.98	11906.26 ± 1060.06	1233.42 ± 108.62
Memoria 16 días	35.82 ± 1.50	34326.07 ± 3113.14	3980.64 ± 167.06
Memoria 25 días	20.13 ± 2.56	20359.22 ± 2565.57	2570.51 ± 192.90

**Tabla RD-23.** Análisis del ARNm de PRL en la región CA1 hipocampal. Todos los valores están expresados como la media ± EEM.

La Tabla RD-23 muestra el análisis del ARNm de PRL en las dos regiones de CA1 estudiadas, la zona Septal y la zona Lateral, valorando el porcentaje de área reactiva(%), el número de moléculas reactivas en el área total medido y el área reactiva en una superficie de 100.000 pix<sup>2</sup>.

Al observar los cortes histológicos de hipocampo se apreció que la presencia de ARNm no era por igual en todas las neuronas, por lo tanto, se decidió calcular el gris medio en los distintos estratos de CA1 por separado (Tabla RD-24 y Figura RD-54), para valorar la posible existencia de diferencias significativas entre ellos.

GRUPO	CA1 Septal			CA1 Lateral		
	Gris medio reactivo (UA)			Gris medio reactivo (UA)		
	PIRAMIDAL	RADIADO	ORIENS	PIRAMIDAL	RADIADO	ORIENS
<b>Ctrl NL</b>	11.70±0.25	8.66±0.19	8.32±0.15	9.68±0.25	5.66±0.15	6.51±0.16
<b>Ctrl Plataforma</b>	13.80±0.31	12.78±0.24	11.56±0.31	12.44±0.29	10.94±0.25	10.76±0.25
<b>Aprendizaje 6 días</b>	18.52±0.38	16.61±0.30	19.10±0.35	15.51±0.27	14.57±0.25	15.37±0.27
<b>Memoria 9 días</b>	19.96±0.26	25.59±0.39	23.36±0.25	20.64±0.38	22.59±0.41	23.15±0.40
<b>Memoria 16 días</b>	28.51±0.39	28.42±0.33	29.08±0.37	37.01±0.41	33.33±0.36	34.76±0.37
<b>Memoria 25 días</b>	28.58±0.51	24.24±0.38	25.95±0.41	26.63±0.47	25.14±0.37	23.63±0.36

**Tabla RD-24.** Análisis del ARNm de PRL en la región CA1 del hipocampo, se calculó la intensidad de reacción mediante la obtención del gris medio del área reactiva (UA, unidades arbitrarias). Todos los valores están expresados como la media ± EEM.

La Tabla RD-24, muestra el análisis de la intensidad de fluorescencia, mediante la valoración del gris medio reactivo (UA).

Siguiendo con los pasos establecidos, se mostró por separado la región CA1 Lateral y CA1 Septal.

A la vez que se hizo un análisis de los tres estratos apreciados en las imágenes confocales, el estrato Piramidal, el estrato Oriens y, por último, el estrato Radiado.

El estrato Piramidal fue el más llamativo en las imágenes y el más relevante para el estudio.



Con respecto a la intensidad de reacción (Figura RD-54) se observó que los estratos presentan unos resultados similares.

Todos ellos, sufren un aumento estadísticamente significativo (\*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$ ) de la síntesis de ARNm de PRL desde los grupos controles hasta alcanzar la consolidación de la memoria.

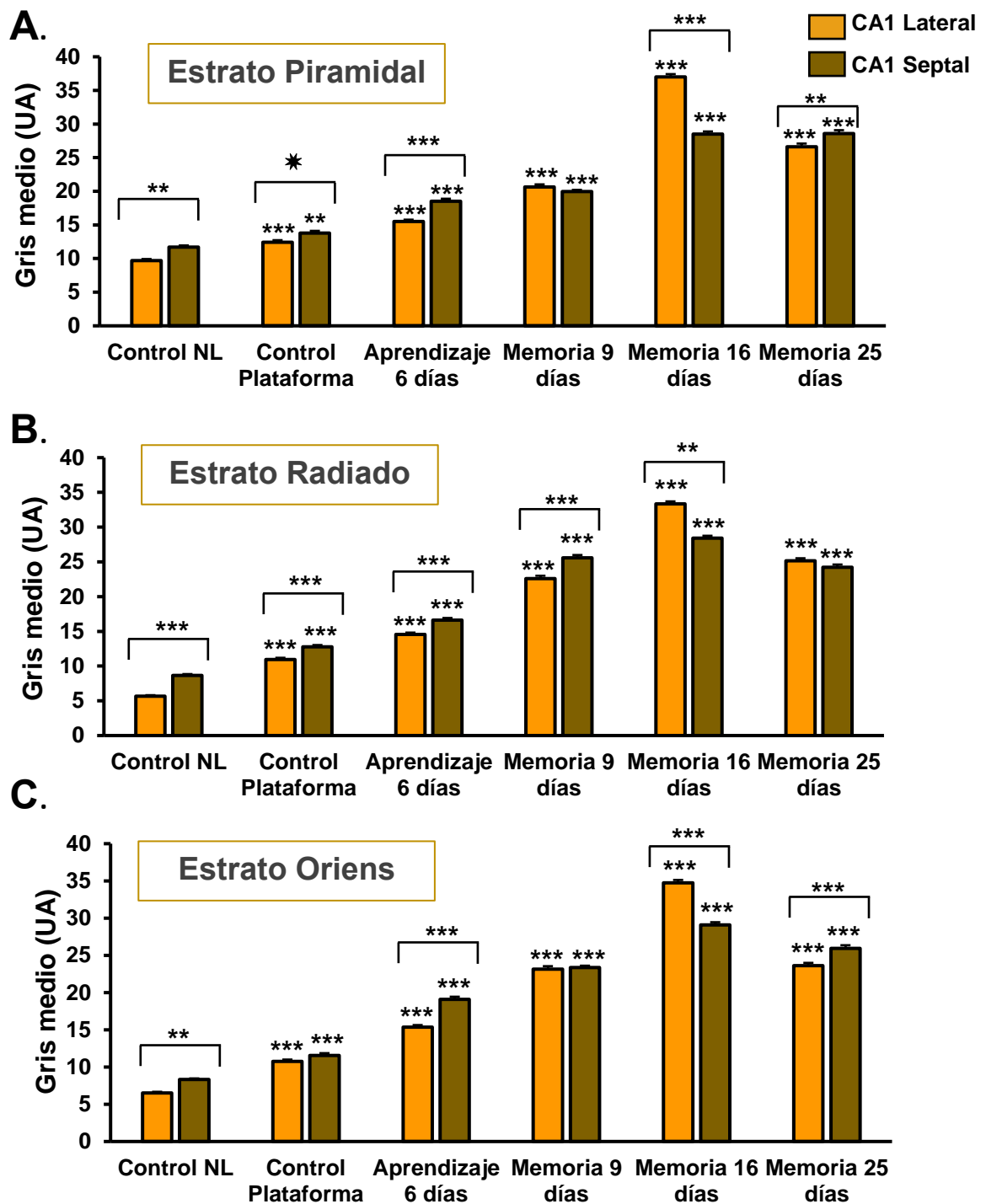
El estrato Piramidal mostró su mayor aumento en el gris medio reactivo en el grupo Memoria 16 días respecto a los otros grupos, siendo mayor en CA1 Lateral ( $37.01 \pm 0.41$ ) que en CA1 Septal ( $28.51 \pm 0.39$ ).

Con diferencias significativas (\*\* $p < 0.0001$ ) al comparar ambas regiones.

En los estratos Radiado y Oriens, la reacción fue similar a la que presentaba el estrato Piramidal.

En ambos estratos se produjo un aumento gradual según se fue consolidando la memoria hasta alcanzar su máximo en Memoria 16 días, para descender en el grupo Memoria 25 días, manteniéndose este último con valores superiores a los de los otros grupos.

En el estrato Oriens, los valores en Memoria 9 días fueron semejantes para CA1 Lateral ( $23.15 \pm 0.40$ ) y CA1 Septal ( $23.36 \pm 0.25$ ), sin diferencias significativas al compararlos.



**Figura RD-54.** Intensidad de reacción medida por la determinación del gris medio (UA) del área considerada como reactiva en el estrato Piramidal, Radiado y Oriens de CA1. Los resultados fueron el análisis de imágenes confocales de cada condición del estudio (n=5 animales por cada condición, 6 imágenes por animal y 200 puntos medidos por imagen). Se expresó la media  $\pm$  EEM, se realizó ANOVA mediante el test de Turkey comparando los distintos grupos con el Control NL. Se aplicó el mismo estudio estadístico para comparar CA1 lateral con CA1 septal en todas las condiciones. El nivel de significación estadística se expresó en forma de p-valor (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$  \*\*\* $p < 0.0001$ ).

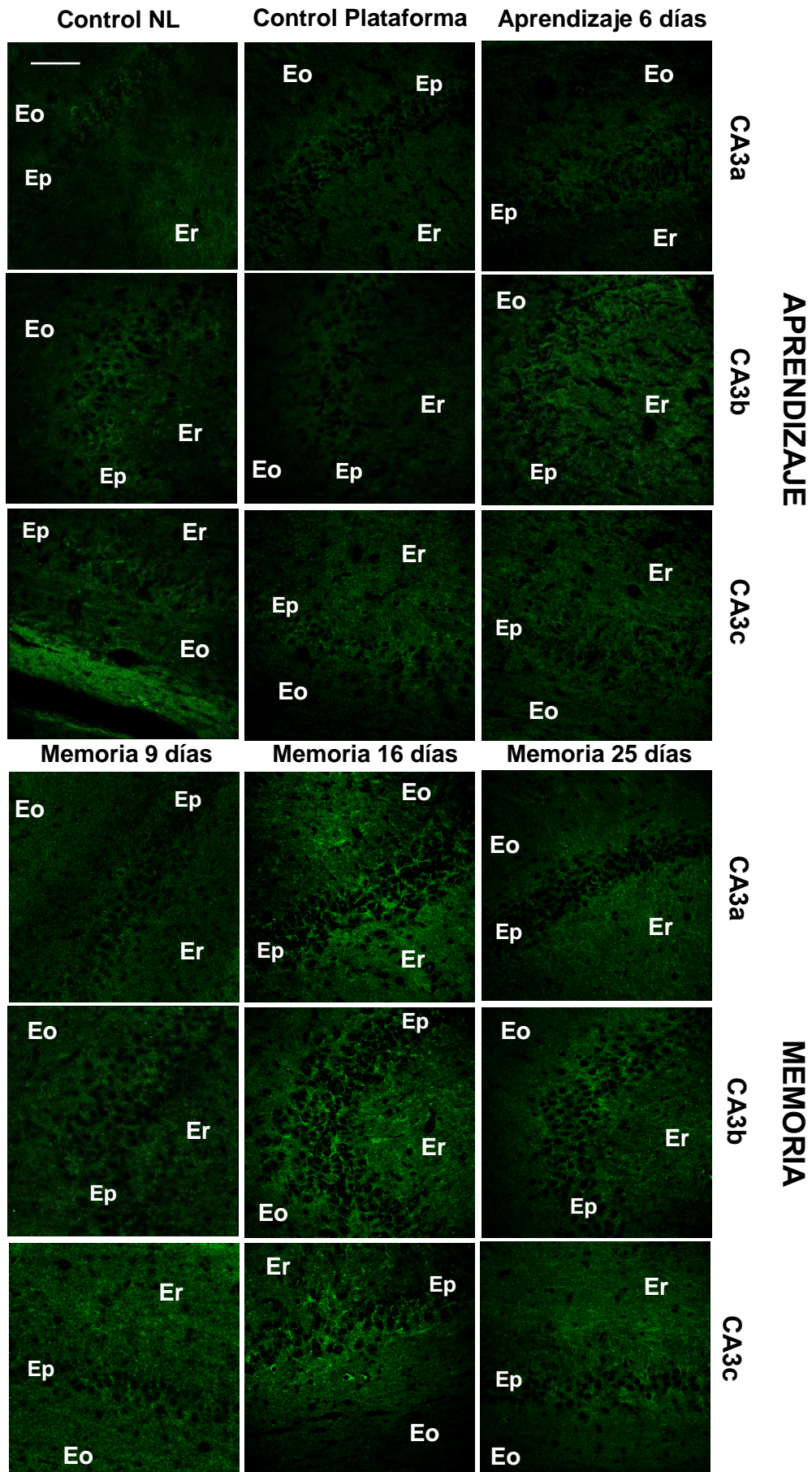
#### 4.2.6-2 CUANTIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS POSITIVAS A ARNm EN LA ZONA CA3

La positividad al ARNm de PRL se analizó en la región CA3, separando tres zonas, CA3a, CA3b y CA3c.

De forma similar a como se hizo en CA1. La Tabla RD-25, resume los resultados obtenidos.

CA3a			
GRUPO	Porcentaje de área reactiva (%)	Número de moléculas/área total	Área reactiva en 100.000 pix <sup>2</sup>
Ctrl NL	2.53 ± 0.36	02566.15 ± 359.64	0281.50 ± 39.68
Ctrl Plataforma	3.76 ± 0.31	04069.81 ± 294.30	0418.19 ± 34.69
Aprendizaje 6 días	3.69 ± 0.18	04295.20 ± 208.98	0409.62 ± 19.93
Memoria 9 días	8.85 ± 0.51	09564.24 ± 538.01	0983.32 ± 57.33
Memoria 16 días	30.86 ± 1.61	32253.55 ± 1793.43	3428.88 ± 179.34
Memoria 25 días	15.69 ± 1.54	01539.93 ± 173.63	1744.28 ± 171.59
CA3b			
GRUPO	Porcentaje de área reactiva (%)	Número de moléculas/área total	Área reactiva en 100.000 pix <sup>2</sup>
Ctrl NL	3.22 ± 0.38	03403.11 ± 351.81	358.23 ± 42.11
Ctrl Plataforma	1.22 ± 0.13	01354.74 ± 119.93	136.22 ± 14.07
Aprendizaje 6 días	6.16 ± 0.16	07177.35 ± 193.27	684.48 ± 18.43
Memoria 9 días	9.02 ± 0.61	09904.39 ± 680.37	1002.25 ± 68.37
Memoria 16 días	15.35 ± 2.03	15507.63 ± 2019.20	1706.10 ± 225.47
Memoria 25 días	15.93 ± 2.20	17274.96 ± 2311.72	1769.70 ± 244.90
CA3c			
GRUPO	Porcentaje de área reactiva (%)	Número de moléculas/área total	Área reactiva en 100.000 pix <sup>2</sup>
Ctrl NL	4.86 ± 0.43	04937.80 ± 425.08	0539.67 ± 47.44
Ctrl Plataforma	5.13 ± 0.72	05564.61 ± 765.83	0569.90 ± 79.57
Aprendizaje 6 días	5.61 ± 0.22	06368.39 ± 312.56	0623.88 ± 24.80
Memoria 9 días	19.82 ± 2.40	21247.70 ± 2588.25	2202.37 ± 267.25
Memoria 16 días	15.19 ± 1.79	15600.00 ± 1653.04	1688.23 ± 198.52
Memoria 25 días	24.31 ± 0.91	26009.70 ± 1614.38	2701.40 ± 101.59

Tabla RD-25. Análisis del ARNm de PRL en la región CA3 del hipocampo. Todos los valores están expresados como la media ± EEM.



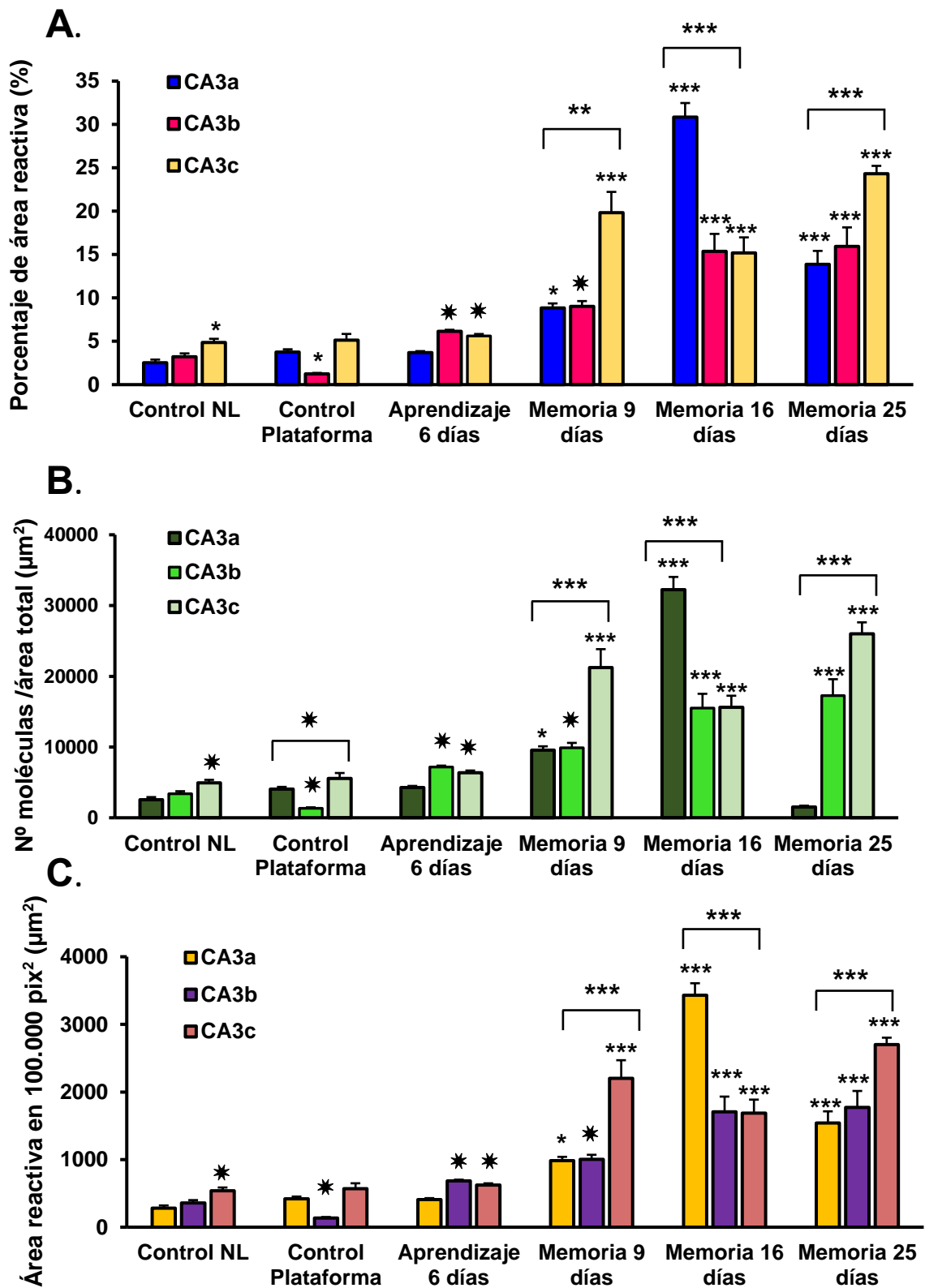
**Figura RD-55.** Hibridación “in situ” de la región CA3 en hipocampo de ratas machos entrenadas en el MWM. Eo, Estrato Oriens; Ep, Estrato piramidal y Er, Estrato radiado. Escala 75 µm.

La Figura RD-55, mostró la inmunolocalización de ARNm de PRL por hibridación “*in situ*”. Como en el caso de CA1, se observó una reacción de aspecto granular, en pequeñas partículas, repartidas por el citoplasma neuronal. Apareciendo haces fibrilares y fibras sueltas en los tres estratos, junto con interneuronas positivas a la reacción. Confrontando todos los grupos, se dio más intensidad de reacción en la condición de Memoria, sobre todo en la región CA3c.

Con respecto al porcentaje de área reactiva (%) (Figura RD-56A), los datos revelaron un aumento significativo de área en Memoria 16 días para CA3a ( $30.86 \pm 1.61$ ), con respecto a los otros grupos. Mientras que CA3b ( $15.35 \pm 2.03$ ) y CA3c ( $15.19 \pm 1.79$ ) que se mantuvieron similares en esta condición, aumentaron significativamente hasta alcanzar niveles máximos en Memoria 25 días (CA3b:  $15.93 \pm 2.20$  y CA3c:  $24.31 \pm 0.91$ ) con respecto al resto de condiciones. Llama la atención, el descenso de reacción en la región CA3b ( $1.22 \pm 0.13$ ) en Control Plataforma y el aumento significativo (\*\* $p < 0.0001$ ) en la región CA3c ( $19.82 \pm 2.40$ ) en Memoria 9 días.

Los resultados en el número de moléculas por área total ( $\mu\text{m}^2$ ) (Figura RD-56B) mantuvieron niveles semejantes al porcentaje de área reactiva, exceptuando un cuantioso descenso en la región CA3a de Memoria 25 días ( $1539.93 \pm 173.63$ ). Cuando se compararon las tres regiones a la vez, se observó que CA3a ( $9564.24 \pm 538.01$ ) y CA3b ( $9904.39 \pm 680.37$ ) alcanzaron niveles similares en Memoria 9 días, mientras que CA3c se elevó significativamente (\*\* $p < 0.0001$ ) ( $21247.70 \pm 2588.25$ ). Al unísono, en Memoria 16 días, las zonas CA3b ( $15507.63 \pm 2019.20$ ) y CA3c ( $15600.00 \pm 1653.04$ ) obtuvieron resultados similares, claramente inferiores a CA3a.

Al comparar el área reactiva en  $100.000 \text{ pix}^2$  (Figura RD-56C), el efecto fue análogo a los otros dos parámetros. Los grupos que habían consolidado la memoria tuvieron niveles reactivos significativamente superiores en comparación al conjunto de aprendizaje (\*\* $p < 0.0001$ ). Se diferenció al resultado de moléculas, en que, el nivel reactivo para la región CA3a de Memoria 25 días sufrió un aumento significativo ( $1744.28 \pm 171.59$ ), alcanzando valores equiparables en CA3b de este grupo y CA3b ( $1769.70 \pm 244.90$ ) junto con CA3a ( $1688.23 \pm 198.52$ ) de Memoria 16 días, haciéndose los más altos para estas zonas en comparación con los controles (Ctr NL:  $281.50 \pm 39.68$ , Ctrl plataforma:  $0418.19 \pm 34.69$ ).



**Figura RD-56.** (A) Porcentaje de área reactiva con respecto al área total de la imagen. (B) N° de moléculas por área total. (C) Área reactiva en 100.000 pix<sup>2</sup>. Los resultados se expresan como media  $\pm$  EEM ( $n=5$  animales por cada condición, 6 imágenes por animal, en 500.000 pix<sup>2</sup>), el nivel de significación estadística fue por ANOVA con el test de Bonferroni. Se realizó en comparación al grupo Control NL entre grupos y CA3a entre regiones (\* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ \*\*\* $p<0.0001$ ).

Para comparar el nivel de intensidad de la reacción en los diferentes estratos de CA3, se calculó el gris medio reactivo (UA) (Tabla RD-26).

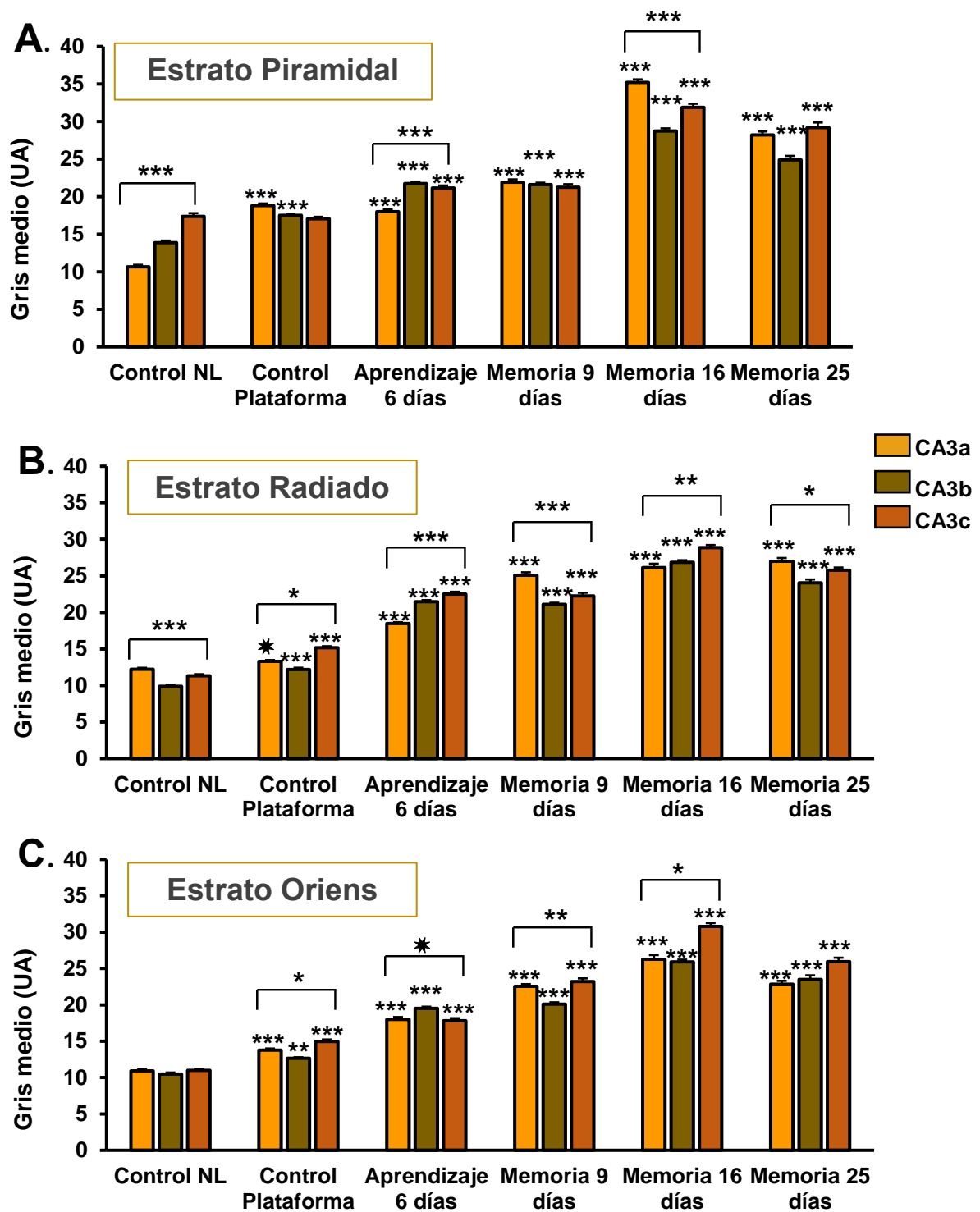
Como puede verse en la Figura RD-57. Los resultados obtenidos en los tres estratos fue muy semejante dentro de cada grupo, variando significativamente entre ellos. En todos los estratos y en las tres regiones del estudio, existe un aumento significativo ( $***p < 0.0001$ ) en el conjunto de Memoria 16 días en relación con el grupo control NL.

El estrato Piramidal (Figura RD-57A) mostró el mayor aumento de gris medio en la región CA3a, tanto para Memoria 16 días ( $35.21 \pm 0.61$ ) como para Memoria 25 días ( $28.22 \pm 0.53$ ) respecto a los valores de en control NL ( $10.68 \pm 0.22$ ).

En este estrato, también despuntó una mayor intensidad de reacción para la región CA3c de Memoria 16 días ( $31.90 \pm 0.46$ ) y 25 días ( $29.21 \pm 0.66$ ). Por otro lado, se dio una semejanza en la intensidad de reacción para las tres regiones de Memoria 25 días (CA3a:  $28.22 \pm 0.53$ , CA3b:  $26.90 \pm 0.53$ , CA3c:  $29.21 \pm 0.66$ ), Memoria 9 días (CA3a:  $21.92 \pm 0.32$ , CA3b:  $21.62 \pm 0.25$ , CA3c:  $21.26 \pm 0.46$ ) y control Plataforma (CA3a:  $18.80 \pm 0.29$ , CA3b:  $17.53 \pm 0.19$ , CA3c:  $17.07 \pm 0.42$ ), no produciéndose diferencias significativas al comparar dichas regiones.

En el estrato Radiado (Figura RD-57B), los valores en el gris medio de los grupos que han consolidado la Memoria no mostraban grandes diferencias entre ellos, pero sí con respecto a los animales que sólo habían sufrido la fase de aprendizaje. Predominaron valores significativamente más altos para Memoria 16 días (CA3a:  $26.12 \pm 0.53$ , CA3b:  $26.86 \pm 0.28$ , CA3c:  $28.85 \pm 0.37$ ) y Memoria 25 días (CA3a:  $26.99 \pm 0.46$ , CA3b:  $24.06 \pm 0.45$ , CA3c:  $25.77 \pm 0.37$ ) en confrontación con control NL (CA3a:  $12.22 \pm 0.20$ , CA3b:  $9.90 \pm 0.20$ , CA3c:  $11.32 \pm 0.22$ ) y control Plataforma (CA3a:  $13.29 \pm 0.19$ , CA3b:  $12.20 \pm 0.23$ , CA3c:  $15.15 \pm 0.22$ ).

Los resultados en el estrato Oriens (Figura RD-57C), en control Plataforma, Aprendizaje 6 días y Memoria 9 días no presentaban diferencias con respecto al estrato Radiado. En este estrato, fue mayor la intensidad de reacción en Memoria 16 días, sobre todo en la región CA3c ( $30.78 \pm 0.47$ ), seguida de la misma región en Memoria 25 días ( $25.96 \pm 0.52$ ).



**Figura RD-57.** Intensidad de reacción medida por la determinación del gris medio (UA) en los diferentes estratos de CA3. El análisis se realizó en imágenes confocales para cada condición del estudio (n=5 animales por cada condición, 6 imágenes por animal y 200 puntos medidos por imagen). Se expresó la media  $\pm$  EEM, se comparó los distintos grupos con el Control NL, a la vez, se realizó el estudio estadístico comparando las tres regiones con CA3a. El nivel de significación estadística se expresó en forma de p-valor (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ), utilizando ANOVA mediante el test de Turkey.



En la Tabla RD-26 se resume los resultados obtenidos tras el análisis de la intensidad reactiva de ARNm de PRL en las tres regiones de CA3 estudiadas. Junto con los tres estratos, piramidal, radiado y oriens para cada región.

Se calculó la intensidad de reacción mediante la obtención del gris medio del área reactiva (UA).

CA3a				CA3b		
GRUPO	Gris medio reactivo (UA)			Gris medio reactivo (UA)		
	PIRAMIDAL	RADIADO	ORIENS	PIRAMIDAL	RADIADO	ORIENS
<b>Ctrl NL</b>	10.68±0.22	12.22±0.20	10.92±0.22	13.89±0.27	9.90±0.20	10.49±0.21
<b>Ctrl Plataforma</b>	18.80±0.29	13.29±0.19	13.77±0.23	17.53±0.19	12.20±0.23	12.65±0.14
<b>Aprendizaje 6 días</b>	18.02±0.25	18.46±0.20	18.01±0.31	21.75±0.26	21.45±0.23	19.51±0.24
<b>Memoria 9 días</b>	21.92±0.32	25.10±0.39	22.53±0.32	21.62±0.25	21.11±0.21	20.10±0.25
<b>Memoria 16 días</b>	35.21±0.61	26.12±0.53	26.27±0.57	28.73±0.36	26.86±0.28	25.91±0.30
<b>Memoria 25 días</b>	28.22±0.53	26.99±0.46	22.83±0.46	24.90±0.53	24.06±0.45	23.49±0.57

CA3c			
GRUPO	Gris medio reactivo (UA)		
	PIRAMIDAL	RADIADO	ORIENS
<b>Ctrl NL</b>	17.38±0.42	11.32±0.22	10.99±0.23
<b>Ctrl Plataforma</b>	17.07±0.26	15.15±0.22	14.97±0.27
<b>Aprendizaje 6 días</b>	21.15±0.34	22.50±0.31	17.83±0.33
<b>Memoria 9 días</b>	21.26±0.40	22.26±0.43	23.19±0.44
<b>Memoria 16 días</b>	31.90±0.46	28.85±0.37	30.78±0.47
<b>Memoria 25 días</b>	29.21±0.66	25.77±0.37	25.96±0.52

**Tabla RD-26.** Análisis de la intensidad de reacción del ARNm de PRL en la región CA3 del hipocampo mediante el gris medio reactivo. Se valoró todos los estratos de las diversas regiones por separado. Todos los valores están expresados como la media ± EEM.

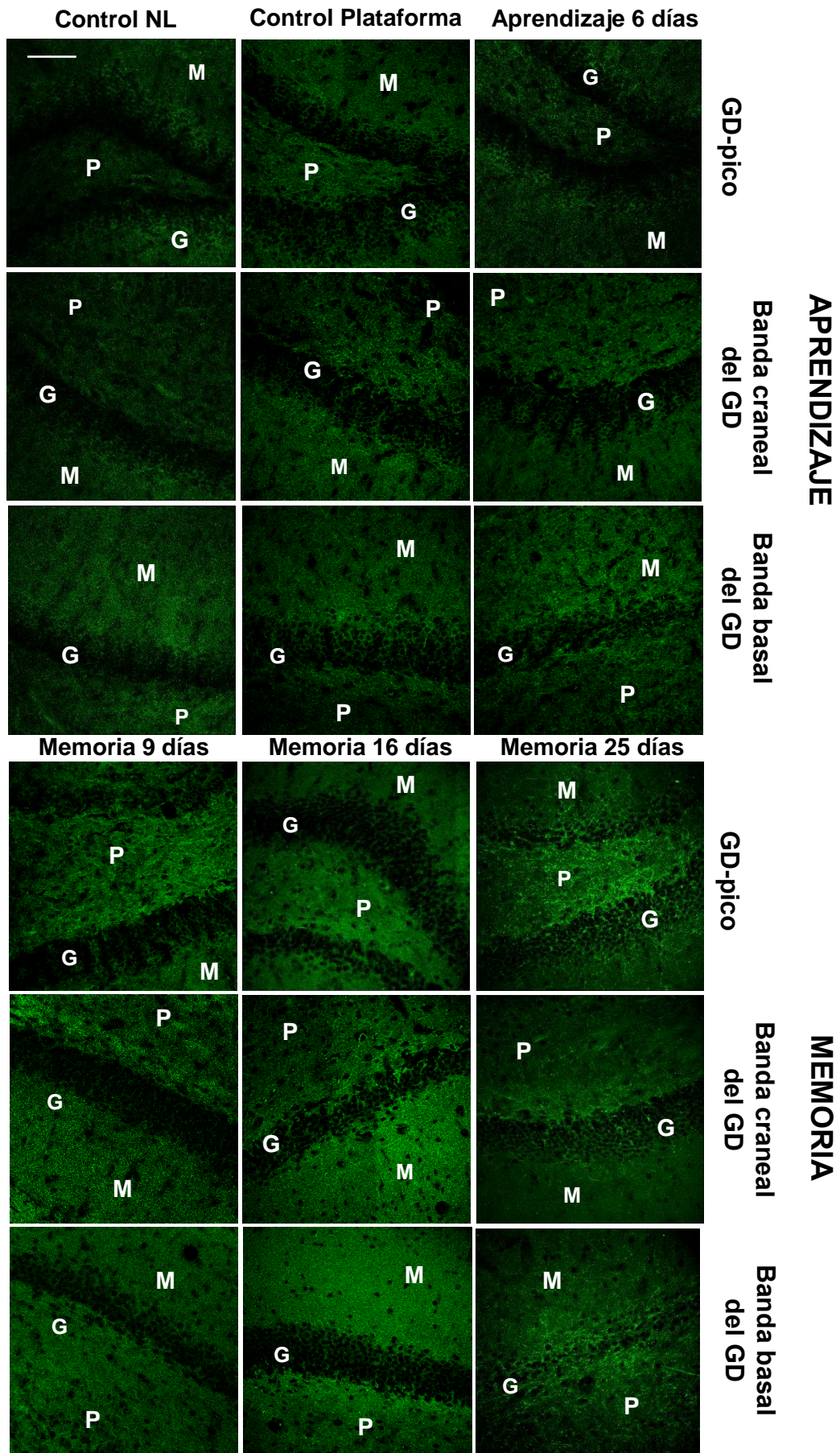
### 4.2.6-3 CUANTIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS POSITIVAS A ARNm EN EL GIRO DENTADO

Para cuantificar las células positivas a ARNm en el GD, se separaron las diferentes zonas del GD, por un lado, se cuantificó el pico del GD, por otro la banda craneal del GD dorsal y, por último, la banda basal del GD ventral.

Los resultados obtenidos para el porcentaje de área reactiva (%), el número de moléculas por área total ( $\mu\text{m}^2$ ) y el área reactiva en 100.000  $\text{pix}^2$ , se recogen en la Tabla RD-27.

GD-pico			
GRUPO	Porcentaje de área reactiva (%)	Número de moléculas/área total	Área reactiva en 100.000 $\text{pix}^2$
Ctrl NL	5.10 $\pm$ 0.37	05203.67 $\pm$ 373.75	0567.11 $\pm$ 40.95
Ctrl Plataforma	4.95 $\pm$ 0.58	05245.96 $\pm$ 569.04	0550.44 $\pm$ 64.85
Aprendizaje 6 días	11.97 $\pm$ 1.07	13165.04 $\pm$ 1482.54	1329.87 $\pm$ 119.23
Memoria 9 días	8.05 $\pm$ 1.81	08731.30 $\pm$ 1914.70	0895.01 $\pm$ 201.24
Memoria 16 días	31.39 $\pm$ 2.99	35204.18 $\pm$ 1552.07	3487.49 $\pm$ 332.36
Memoria 25 días	40.36 $\pm$ 4.80	55779.76 $\pm$ 1768.25	5599.84 $\pm$ 273.64
Banda craneal del GD			
GRUPO	Porcentaje de área reactiva (%)	Número de moléculas/área total	Área reactiva en 100.000 $\text{pix}^2$
Ctrl NL	3.55 $\pm$ 0.50	03576.15 $\pm$ 506.60	0394.98 $\pm$ 55.60
Ctrl Plataforma	9.27 $\pm$ 0.49	09351.22 $\pm$ 486.04	1029.85 $\pm$ 54.14
Aprendizaje 6 días	11.88 $\pm$ 1.40	13843.09 $\pm$ 1635.50	1320.18 $\pm$ 155.97
Memoria 9 días	23.90 $\pm$ 1.09	25689.89 $\pm$ 1225.52	2655.63 $\pm$ 120.94
Memoria 16 días	24.47 $\pm$ 1.52	24753.17 $\pm$ 1503.47	2719.29 $\pm$ 168.98
Memoria 25 días	40.36 $\pm$ 4.80	40704.78 $\pm$ 4835.82	4484.94 $\pm$ 533.03
Banda basal del GD			
GRUPO	Porcentaje de área reactiva (%)	Número de moléculas/área total	Área reactiva en 100.000 $\text{pix}^2$
Ctrl NL	10.94 $\pm$ 0.94	11177.74 $\pm$ 947.57	1215.27 $\pm$ 104.28
Ctrl Plataforma	4.69 $\pm$ 0.57	04958.95 $\pm$ 548.79	0520.92 $\pm$ 63.41
Aprendizaje 6 días	12.03 $\pm$ 1.02	14020.92 $\pm$ 1185.12	1337.14 $\pm$ 113.02
Memoria 9 días	19.80 $\pm$ 2.37	21219.29 $\pm$ 2512.26	2199.72 $\pm$ 263.40
Memoria 16 días	27.46 $\pm$ 2.51	27753.65 $\pm$ 2549.95	3050.86 $\pm$ 278.86
Memoria 25 días	27.50 $\pm$ 1.20	30814.02 $\pm$ 2102.59	3055.41 $\pm$ 132.92

Tabla RD-27. Análisis del ARNm de PRL en la región GD del hipocampo. Todos los valores están expresados como la media  $\pm$  EEM



**Figura RD-58.** Hibridación “in situ” de la región GD del hipocampo de ratas machos entrenadas en el MWM. M, capa Molecular; G, capa Granular y P, capa Polimórfica. Barra de escala 75  $\mu$ m.

La inmunolocalización al microscopio confocal del ARNm de PRL (Figura RD-58) mostró que la mayor intensidad de reacción se encontraba en la condición Memoria 25 días para todas las regiones de GD. La reacción se encontraba de forma granular, distribuida por el citoplasma neuronal de las células granulares y en el entramado fibrilar de las capas Molecular y Polimorfa.

Como en el caso de CA1 y CA3, se percibió reacción en fibras de axones aferentes y eferentes por las tres capas del GD. Estas fibras fueron muy visibles en la capa Polimórfica.

Se observó que la zona subgranular se encontraba muy reactiva a la síntesis de ARNm de PRL, a la vez que las células positivas de la capa Granular presentaban una organización columnar, tan solo desdibujada en la banda basal del grupo Memoria 25 días.

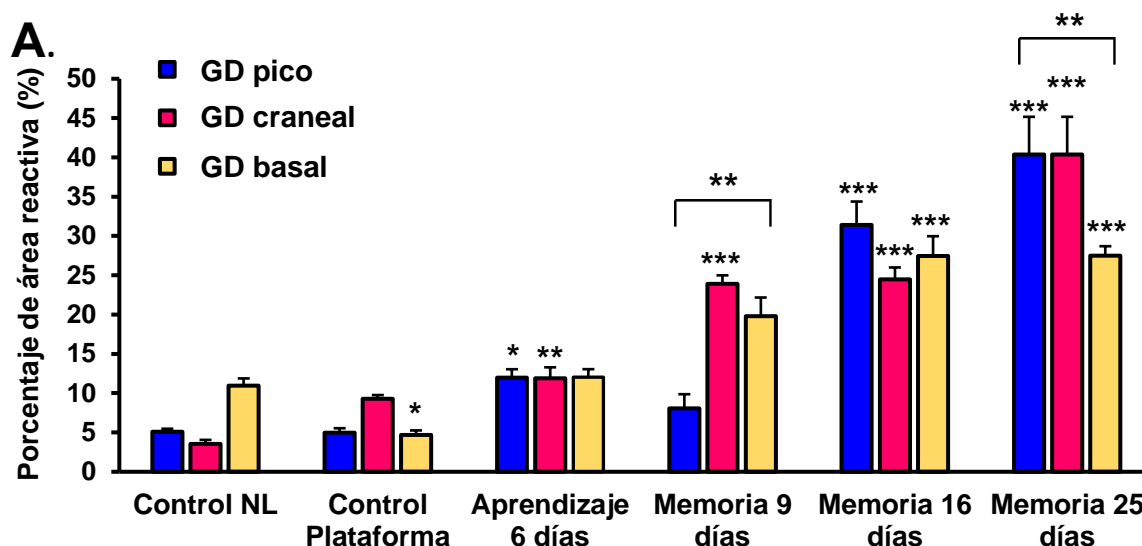
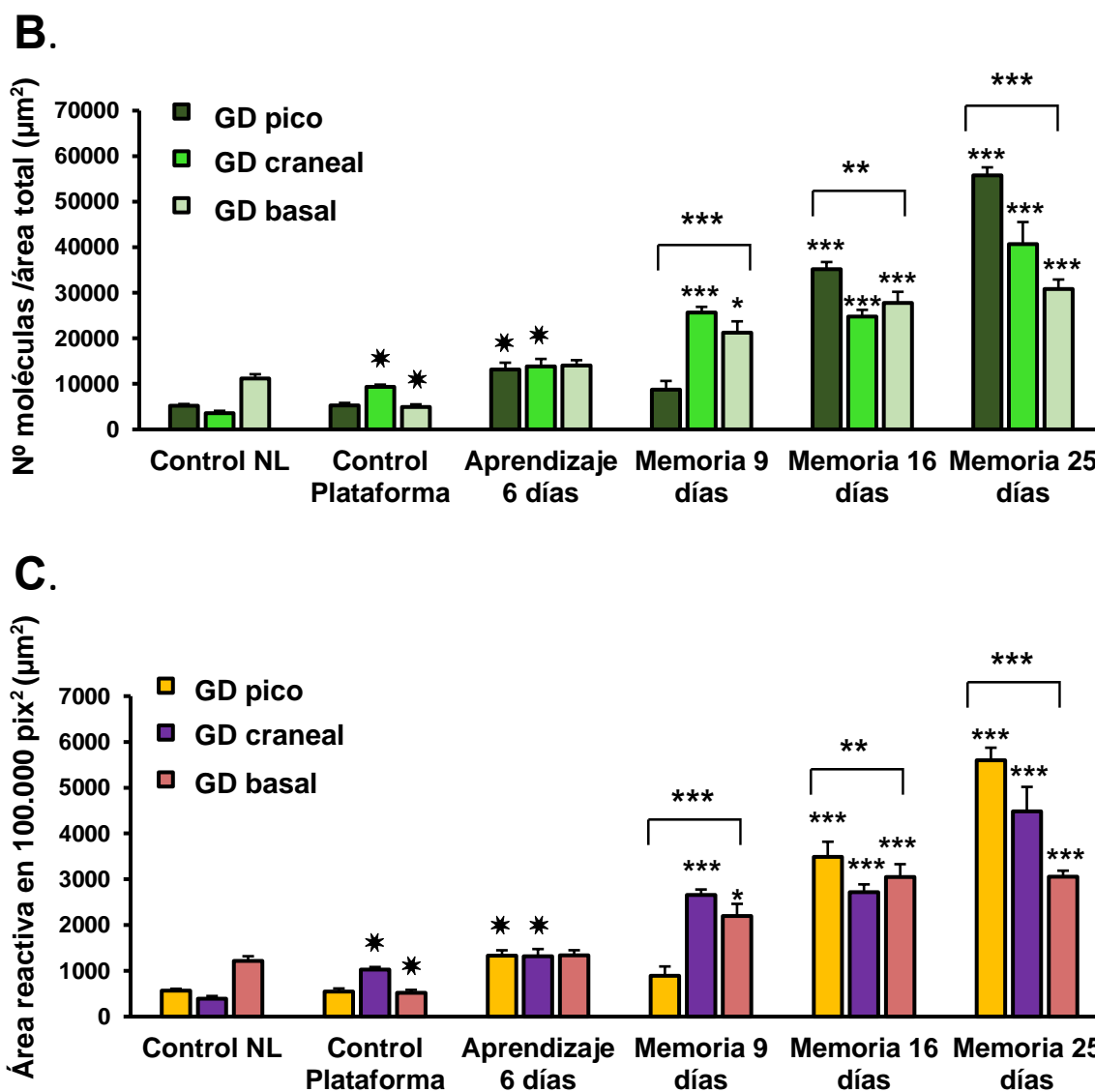


Figura RD-59A. Porcentaje de área reactiva (%) en las diferentes regiones de GD.

Al analizar el porcentaje de área reactiva (%) (Figura RD-59A), se vió que el grupo Memoria 25 días mostraba un aumento significativo (\*\* $p < 0.001$ ) en las regiones del pico del GD ( $40.36 \pm 4.80$ ) y en la banda craneal del GD ( $40.36 \pm 4.80$ ) respecto al control NL.

Los valores, también aumentaban en Memoria 16 días en las tres regiones del estudio (*GD-pico*:  $31.39 \pm 2.99$ , *GD craneal*:  $24.47 \pm 1.52$ , *GD basal*:  $3050.86 \pm 278.86$ ). Se observó similitud en la región de la banda basal del GD de Memoria 16 días ( $27.50 \pm 1.20$ ) y 25 días ( $27.50 \pm 1.20$ ).

En este parámetro, destacó la disminución significativa (\*\* $p < 0.001$ ) del porcentaje en la región del pico en Memoria 9 días ( $8.05 \pm 1.81$ ) en comparación de las otras dos zonas (*GD craneal*:  $23.90 \pm 1.09$ , *GD basal*:  $19.80 \pm 2.37$ ). Mientras que en Aprendizaje 6 días, los valores obtenidos fueron semejante en todas las zonas (*GD pico*:  $11.97 \pm 1.07$ , *banda craneal del GD*:  $11.88 \pm 1.40$ , *banda basal del GD*:  $12.03 \pm 1.02$ ).



**Figura RD-59.** (A) Porcentaje de área reactiva (%), (B) n° de moléculas reactivas por área total de la imagen ( $\mu\text{m}^2$ ), (C) área reactiva en 100.000  $\text{pix}^2$  ( $\mu\text{m}^2$ ). Por ANOVA utilizando el test de Bonferroni, se comparó los distintos grupos con el Control NL, al mismo tiempo que, se realizó el estudio estadístico comparando las tres zonas con el pico del GD. Se expresó la media  $\pm$  EEM. El nivel de significación estadística se expresó en forma de p-valor (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ), para  $n=5$  animales, 6 imágenes por animal y 500.000  $\text{pix}^2$  analizados.

El número de moléculas reactivas por el área total ( $\mu\text{m}^2$ ) (Figura RD-59B) y área reactiva en 100.000  $\text{pix}^2$  observados (Figura RD-59C), presentaron resultados con tendencias similares

El número de moléculas reactivas en Memoria 25 días aumentó significativamente ( $***p < 0.0001$ ) en comparación con el resto de grupos, tanto para el pico del GD ( $55779.76 \pm 1768.25$  moléculas/ $\mu\text{m}^2$ ;  $5599.84 \pm 273.64$   $\mu\text{m}^2$ ), como para la banda craneal del GD ( $40704.78 \pm 4835.82$  moléculas/ $\mu\text{m}^2$ ;  $4484.94 \pm 533.03$   $\mu\text{m}^2$ ).

Se obtuvieron valores parecidos, para la región de la banda basal del GD, tanto en Memoria 16 días ( $27753.65 \pm 2549.95$  moléculas/ $\mu\text{m}^2$ ;  $3050.86 \pm 278.86$   $\mu\text{m}^2$ ) como en 25 días ( $30814.02 \pm 2102.59$  moléculas/ $\mu\text{m}^2$ ;  $3055.41 \pm 132.92$   $\mu\text{m}^2$ ).

Del mismo modo, ocurrió una similitud en todas las regiones estudiadas en Aprendizaje 6 días (*GD pico*:  $13165.04 \pm 1482.54$  moléculas/ $\mu\text{m}^2$ ;  $1329.87 \pm 119.23$   $\mu\text{m}^2$ , *GD craneal*:  $13843.09 \pm 1635.50$  moléculas/ $\mu\text{m}^2$ ; *GD basal*:  $14020.92 \pm 1185.12$  moléculas/ $\mu\text{m}^2$ ;  $1337.14 \pm 113.02$   $\mu\text{m}^2$ ) y al cotejar los datos del pico en, control NL ( $05203.67 \pm 373.75$  moléculas/ $\mu\text{m}^2$ ;  $0567.11 \pm 40.95$   $\mu\text{m}^2$ ), control Plataforma ( $05245.96 \pm 569.04$  moléculas/ $\mu\text{m}^2$ ;  $0550.44 \pm 64.85$   $\mu\text{m}^2$ ) y Memoria 9 días ( $08731.30 \pm 1914.70$  moléculas/ $\mu\text{m}^2$ ;  $0895.01 \pm 201.24$   $\mu\text{m}^2$ ).

Como sucedió en las regiones CA1 y CA3, el nivel de intensidad de la reacción no se daba para todas las células por igual. A la vez, se observaron diferencias entre las distintas capas que formaban la región del GD.

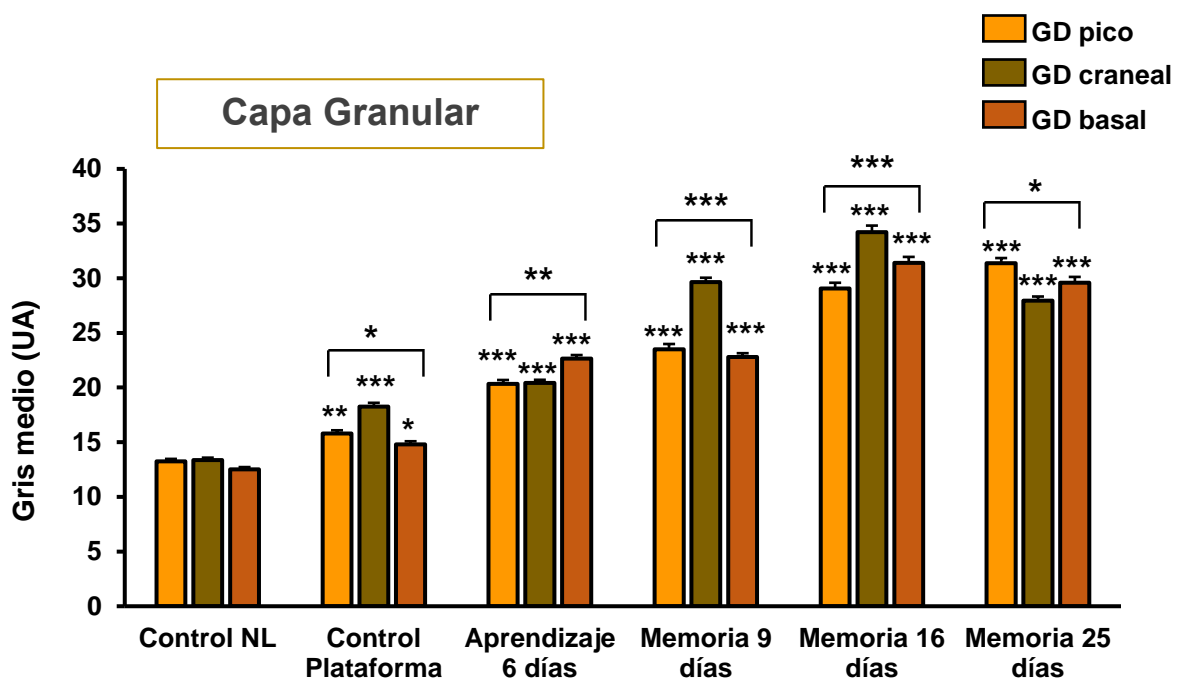
Por lo tanto, se realizó un análisis cuantitativo de esta intensidad reactiva determinando el gris medio reactivo (UA) en todas las capas del GD en el estudio, capa Granular; capa Molecular y capa Polimórfica (Tabla RD-28 y Figura RD-60).

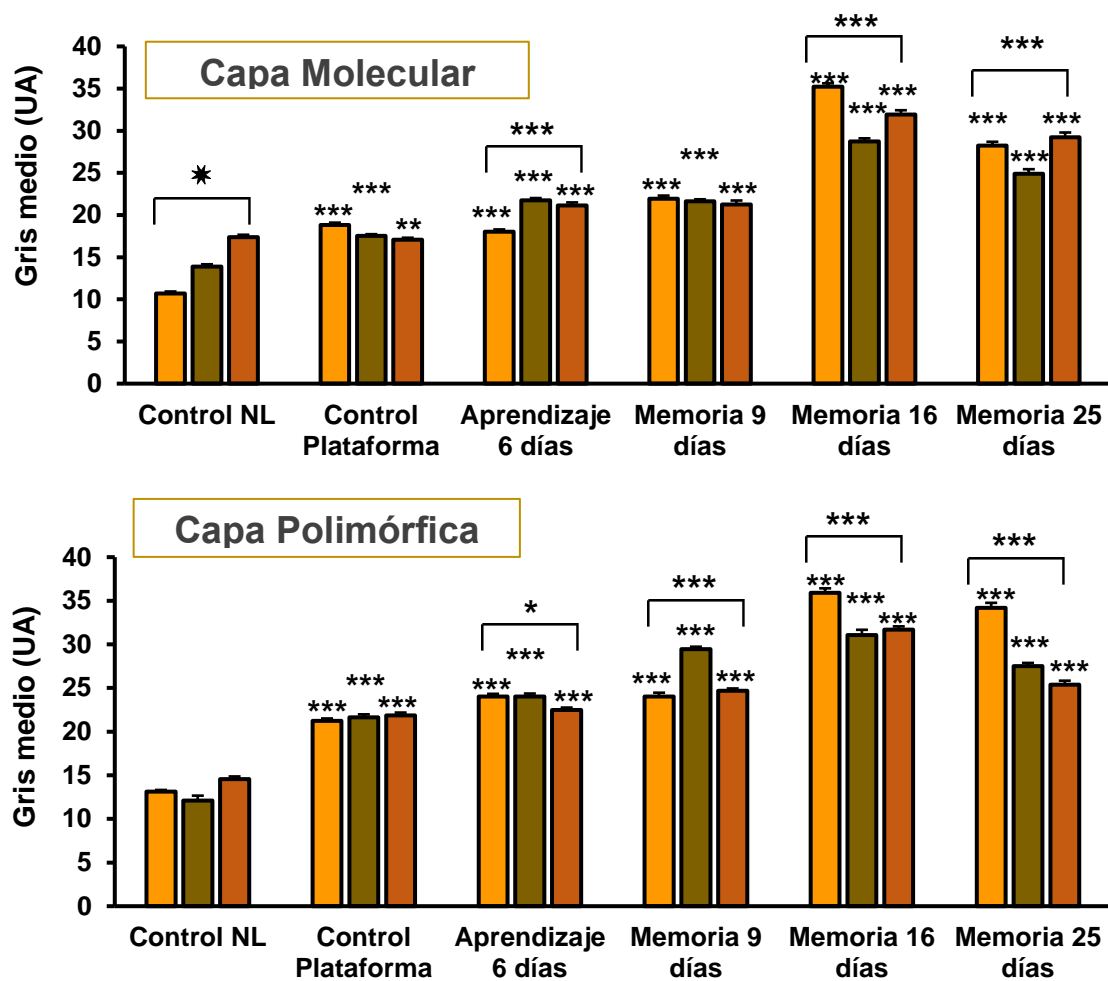
Pico del GD				Banda craneal del GD		
GRUPO	Gris medio reactivo (UA)			Gris medio reactivo (UA)		
	GRANULAR	MOLECULAR	POLIMÓRFICA	GRANULAR	MOLECULAR	POLIMÓRFICA
Ctrl NL	13.24±0.24	15.67±0.18	13.15±0.17	13.38±0.21	14.37±0.25	12.09±0.58
Ctrl Plataforma	15.79±0.30	20.95±0.24	21.24±0.27	18.25±0.35	21.68±0.19	21.64±0.34
Aprendizaje 6 días	20.33±0.36	23.05±0.26	24.02±0.31	20.41±0.30	23.87±0.33	24.01±0.36
Memoria 9 días	23.50±0.49	23.96±0.54	24.01±0.46	29.64±0.40	26.73±0.44	29.46±0.27
Memoria 16 días	29.06±0.53	31.56±0.43	35.91±0.52	34.21±0.60	30.24±0.41	31.07±0.60
Memoria 25 días	31.36±0.48	32.63±0.38	34.18±0.58	27.94±0.39	27.51±0.35	27.51±0.37

Banda basal del GD			
GRUPO	Gris medio reactivo (UA)		
	GRANULAR	MOLECULAR	POLIMÓRFICA
Ctrl NL	12.53±0.19	14.25±0.28	14.58±0.29
Ctrl Plataforma	14.79±0.29	16.60±0.24	21.88±0.31
Aprendizaje 6 días	22.64±0.33	19.78±0.34	22.47±0.29
Memoria 9 días	22.79±0.36	25.54±0.46	24.69±0.26
Memoria 16 días	31.41±0.53	34.82±0.52	31.68±0.39
Memoria 25 días	29.58±0.54	24.85±0.57	25.38±0.46

**Tabla RD-28.** Análisis de la intensidad de reacción de ARNm de PRL en la región GD del hipocampo mediante el gris medio reactivo. Todos los valores están expresados como la media  $\pm$  EEM.





**Figura RD-60.** Cuantificación del gris medio (UA) en las capas del GD. El análisis se realizó en imágenes confocales para cada condición del estudio ( $n=5$  animales por cada condición, 6 imágenes por animal y 200 puntos medidos por imagen). Se expresó la media  $\pm$  EEM, se comparó los distintos grupos con el Control NL, a la vez, se realizó el estudio estadístico comparando las regiones de GD con el pico de GD dentro de cada grupo. El nivel de significación estadística se expresó en forma de p-valor (\* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ , \*\*\*\* $p<0.0001$ ), utilizando ANOVA mediante el test de Turkey.

En las tres capas del GD se han obtenido los resultados semejantes al analizar el gris medio reactivo (UA) (Figura RD-60).

Los grupos de consolidación de la memoria presentaron una intensidad de reacción superior a los observados en los grupos de entrenamiento y aprendizaje (Figura RD-60).

En el pico del GD, la capa Granular mostró una tendencia creciente, siendo el valor más alto en el grupo Memoria 25 días ( $31.36\pm 0.48$ ). La banda craneal presentó su valor más alto en Memoria 16 días ( $34.21\pm 0.60$ ), con valores muy



parecidos para Memoria 9 días ( $29.64 \pm 0.40$ ) y Memoria 25 días ( $27.94 \pm 0.39$ ). La banda basal presentó valores aproximados para los grupos de Memoria 16 días ( $31.41 \pm 0.53$ ) y 25 días ( $29.58 \pm 0.54$ ), siendo algo menor para Memoria 9 días ( $22.79 \pm 0.36$ ). Este último grupo presentó valores parecidos a los observados en Aprendizaje 6 días ( $22.64 \pm 0.33$ ).

La capa Molecular se caracterizó por presentar valores semejantes desde el control Plataforma hasta el grupo Memoria 9 días, siempre significativamente mayores ( $***p < 0.0001$ ) a los obtenidos en el grupo control NL. A los 16 días y, en menor medida a los 25 días, se apreció un aumento significativo ( $***p < 0.0001$ ) de la intensidad de la reacción. Siendo las variaciones en el pico, la banda craneal y la banda basal muy parecidos.

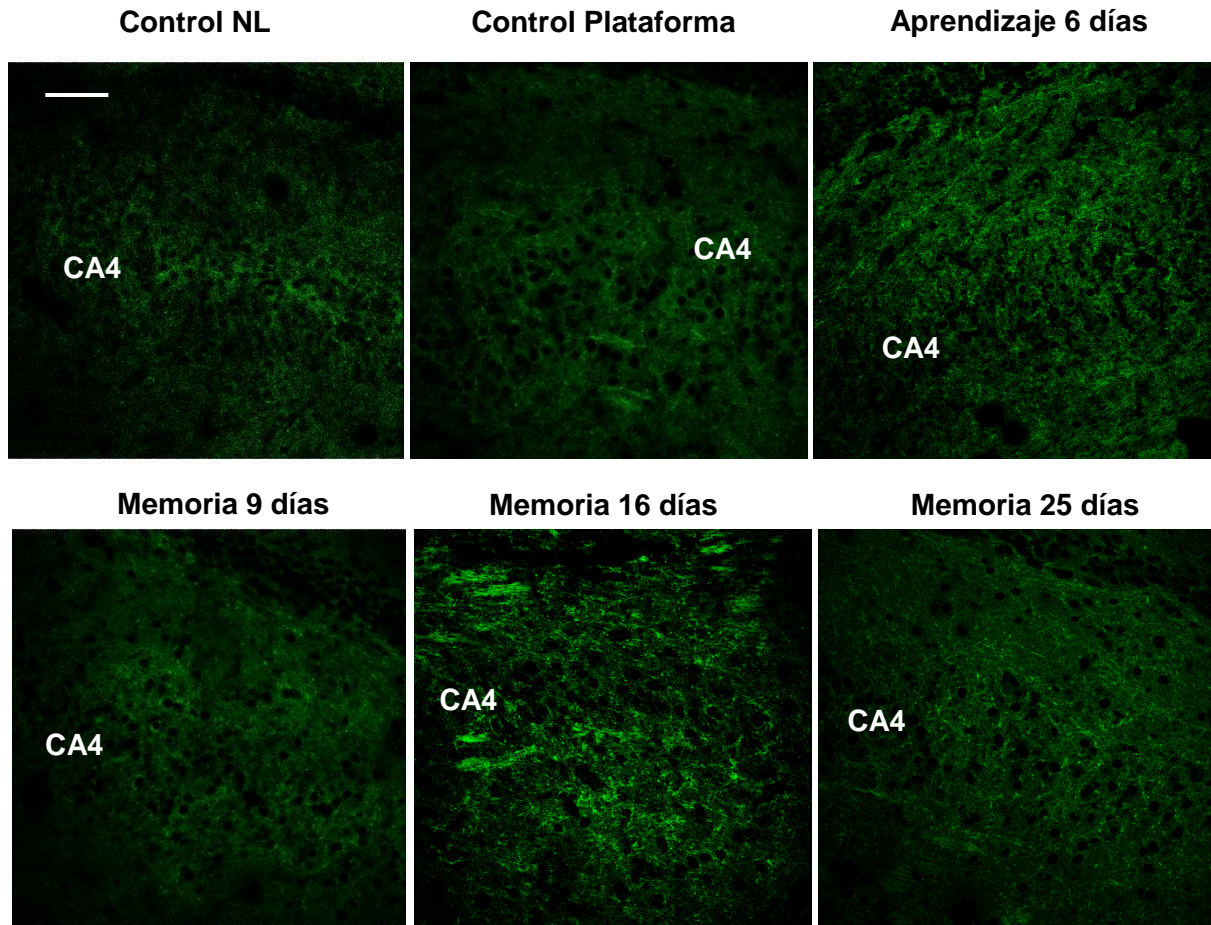
Los resultados en la capa Polimórfica fueron parecidos a los descritos para la Molecular. Destacaron las intensidades de reacción, en el pico del GD, tanto en la capa Molecular ( $31.56 \pm 0.43$ ) como en la Polimórfica ( $35.91 \pm 0.52$ ) de 16 días y de 25 días (*Molecular*:  $24.85 \pm 0.57$ , *Polimórfica*:  $25.38 \pm 0.46$ ).

Además, todos los grupos tuvieron un aumento en la intensidad de reacción en el ARNm de PRL respecto al grupo control NL de manera significativa ( $***p < 0.0001$ ). Al comparar las distintas regiones dentro de cada grupo, se observó que estas capas presentaban diferencias significativas al compararlas con el pico del GD, en Aprendizaje 6 días y en el conjunto de animales que habían consolidado la memoria. Sólo, los grupos control NL y control Plataforma presentaban diferencias entre sus regiones.

#### **4.2.6-4 CUANTIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS POSITIVAS A ARNm EN LA REGIÓN CA4 DEL HIPOCAMPO**

La región CA4, localizada dentro del hilus del GD, ha sido incluida en el estudio de hibridación “*in situ*”, ya que, a diferencia de lo observado en el estudio inmunocitoquímico de la localización de PRL, la expresión de ARNm presentaba diferencias que llamaban la atención.

Aunque la interpretación de estas variaciones es difícil, ya que se sabe poco sobre su papel e incluso, su existencia independientemente de CA3c, en roedores, es discusión entre los autores.



**Figura RD-61.** Inmunolocalización de la presencia de ARNm de PRL de la región CA4 en hipocampo de ratas machos entrenadas en el MWM. Barra de escala, 75  $\mu$ m.

La Figura RD-61 muestra las características principales de la expresión del ARNm de PRL en imágenes observadas a microscopio confocal de la región CA4.

La reacción se mostró similar a las otras regiones estudiadas. Fue, de forma granular, sobre todo en las zonas cercanas al núcleo. Además, la reacción fue desigual, debido a que no todas las células presentaban reacción.

Como sucedió en las otras regiones, había fibras y haces fibrilares con una intensidad llamativa, sobre todo en la condición Memoria 16 días y 25 días.

El porcentaje de área reactiva (%) (Figura RD-62A), reveló que el mayor valor lo presentaba el grupo Memoria 16 días ( $14.93 \pm 1.23$ ), seguido de un aumento significativo ( $*p < 0.01$ ) respecto al control NL del grupo Aprendizaje 6 días ( $11.74 \pm 0.93$ ).

Tanto Memoria 9 días ( $9.04 \pm 0.40$ ), como Memoria 25 días ( $9.18 \pm 0.83$ ) mostraban valores similares, menores a los de 16 días y aprendizaje, pero más elevados que los controles NL ( $7.18 \pm 0.23$ ) y plataforma ( $6.27 \pm 0.25$ ).

En la Figura RD-62B se representa el número de moléculas reactivas por área total ( $\mu\text{m}^2$ ). El nivel significativo aumentó ( $***p < 0.0001$ ) los grupos Aprendizaje 6 días ( $13682.83 \pm 1079.61$ ) y Memoria 16 días ( $15232.07 \pm 1268.61$ ).

A la vez que los grupos controles, tanto control NL ( $07269.98 \pm 227.48$ ) como control Plataforma ( $06958.33 \pm 121.52$ ) tuvieron valores similares y menores al resto de las condiciones.

Afin al porcentaje reactivo y al número de moléculas positivas a ARNm de PRL en el área total, el área reactiva que se produce en 100.000 píxeles<sup>2</sup> (Figura RD-62C) presentó resultados muy similares a los otros dos parámetros.

Aprendizaje 6 días ( $1304.90 \pm 102.96$ ) y Memoria 16 días ( $1659.07 \pm 136.92$ ) aumentaron significativamente respecto al control NL. Siendo valores superiores al resto de condiciones, que a su vez presentaron valores mayores que los de los controles.

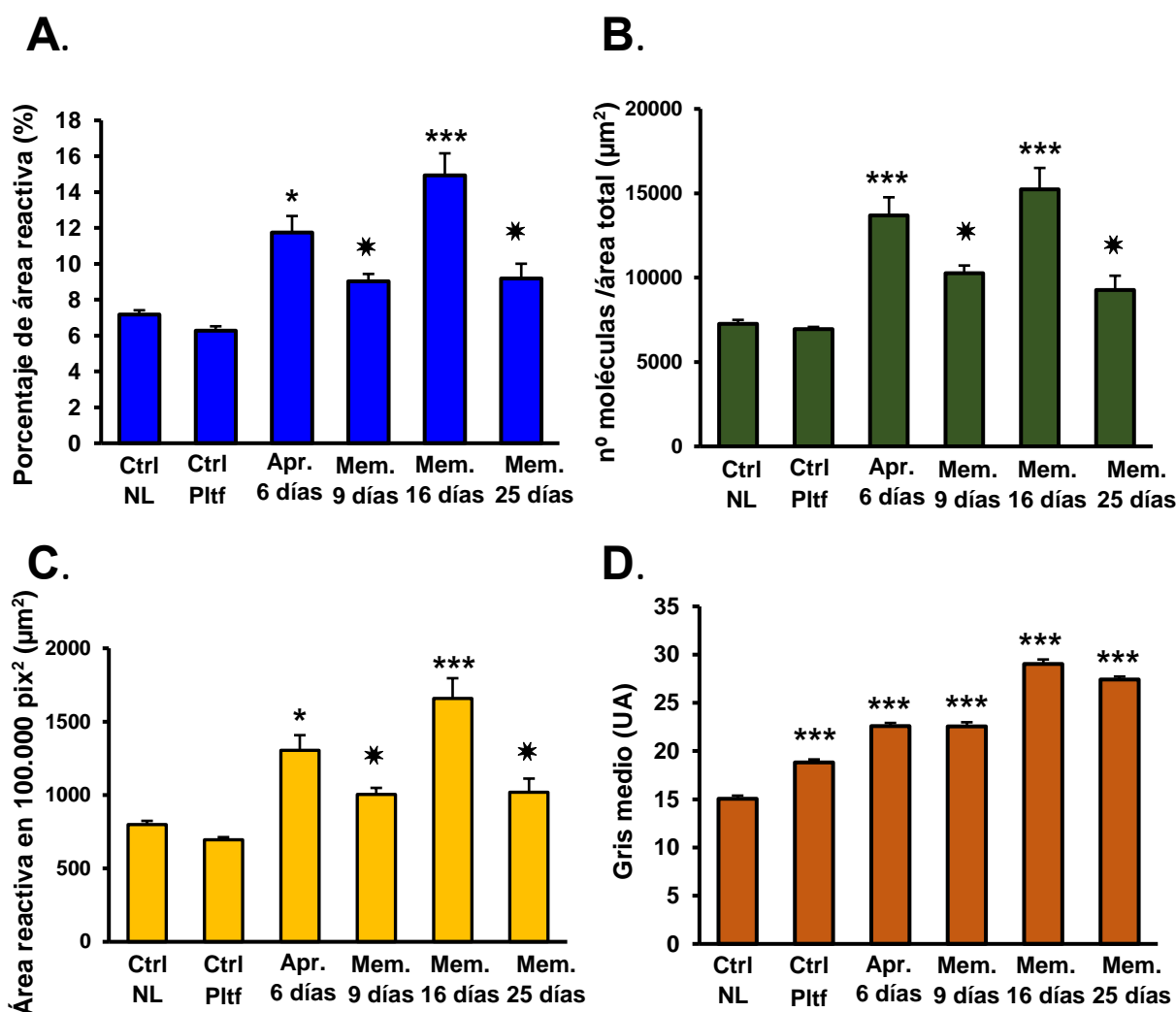
Memoria 9 días ( $1004.12 \pm 44.61$ ) y Memoria 25 días ( $1019.66 \pm 92.37$ ), cuantitativamente fueron similares. Ambos grupos, fueron superiores a los controles NL ( $797.90 \pm 25.94$ ) y Plataforma ( $695.34 \pm 17.80$ ), pero inferiores a 16 días y Aprendizaje 6 días.

Al comparar la intensidad de reacción mediante el gris medio (UA) (Figura RD-51D), se observó un aumento significativo ( $***p < 0.0001$ ) y creciente desde el grupo control NL ( $15.04 \pm 0.33$ ) hasta alcanzar valores máximos en Memoria 16 días ( $29.02 \pm 0.48$ ), para continuar con un descenso leve pero mayor que el resto de las condiciones en Memoria 25 días ( $27.42 \pm 0.30$ ).

En su conjunto, la expresión del ARNm de PRL en CA4 pone de manifiesto que las neuronas de esta región presentan características y respuestas diferentes a CA3c. Además, a diferencia del resto de las regiones del hipocampo, las

variaciones a los 6 días y a los 16 días fueron muy parecidas, a excepción de la intensidad de reacción.

En esta referencia de intensidad, tanto Aprendizaje 6 días ( $22.59 \pm 0.32$ ) como Memoria 9 días ( $22.57 \pm 0.42$ ) obtuvieron un gris medio equivalente para estos dos grupos, con diferencias significativas ( $***p < 0.0001$ ) en comparación al control NL.



**Figura RD-62.** (A) Porcentaje de área reactiva (%), (B) Número de moléculas por área total (µm<sup>2</sup>), (C) Área reactiva medida en 100.000 pix<sup>2</sup> y (D) Gris medio reactivo (UA). Se expresó la media ± EEM, se comparó los distintos grupos con el Control NL, (n=5 animales por cada condición, 6 imágenes por animal y 200 puntos medidos por imagen). El nivel de significación estadística se expresó en forma de p-valor (\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.0001), utilizando ANOVA mediante el test de comparación múltiple de Bonferroni para A,B y C, y el test de Tukey para el gris medio.

En la Tabla RD-29 se resume el análisis cuantitativo del ARNm de PRL para la región CA4 del hipocampo

CA4			
GRUPO	Porcentaje de área reactiva (%)	Número de moléculas/área total	Área reactiva en 100.000 pix <sup>2</sup>
Ctrl NL	7.18 ± 0.23	07269.98 ± 227.48	0797.90 ± 25.94
Ctrl Plataforma	6.27 ± 0.25	06958.33 ± 121.52	0695.34 ± 17.80
Aprendizaje 6 días	11.74 ± 0.93	13682.83 ± 1079.61	1304.90 ± 102.96
Memoria 9 días	9.04 ± 0.40	10270.70 ± 449.35	1004.12 ± 44.61
Memoria 16 días	14.93 ± 1.23	15232.07 ± 1268.61	1659.07 ± 136.92
Memoria 25 días	9.18 ± 0.83	09273.22 ± 842.28	1019.66 ± 92.37

GRUPO	Gris medio reactivo (UA)
Ctrl NL	15.04 ± 0.33
Ctrl Plataforma	18.80 ± 0.32
Aprendizaje 6 días	22.59 ± 0.32
Memoria 9 días	22.57 ± 0.42
Memoria 16 días	29.02 ± 0.48
Memoria 25 días	27.42 ± 0.30

**Tabla RD-29.**

Análisis cuantitativo del ARNm de PRL en CA4 del hipocampo.

Todos los valores están expresados como la media ± EEM.

Mediante hibridación “in situ”, podemos confirmar que *sí existe síntesis de PRL en las regiones CA1, CA3, GD y CA4 del hipocampo, con variaciones de una a otra región, lo que sugiere que el rol fisiológico de PRL no es igual en todo el hipocampo.*

*Los resultados revelaron que existía un incremento de la reacción para los casos en que los animales habían consolidado la memoria. Existió, un aumento creciente desde los controles Plataforma hasta Memoria 25 días.*

Al comparar todas las condiciones, tanto CA1 Lateral como Septal, ambas zonas, padecían un aumento considerable en los grupos Memoria, haciéndose máximo a los 16 días y disminuyendo levemente a los 25 días, tanto en el estrato Piramidal, estrato Radiado y Oriens. En Memoria 16 días la expresión fue mayor en CA1 Lateral, mientras que en los otros grupos fue mayor en CA1 Septal.

En relación a la región CA3. Esta zona, experimentó unos resultados similares a CA1. Crecimiento progresivo desde los grupos controles hasta los que habían consolidado la Memoria. En el grupo Memoria 16 días la mayor expresión se daba en CA3a, en contraposición de lo observado en Memoria 9 días y 25 días, que fue la región CA3c, la zona con mayor expresión.

Además, el estrato Piramidal en CA3a fue más reactivo que el resto de los estratos. Mientras que, el estrato Radiado y Oriens tuvieron mayor gris medio en CA3c.

La localización del ARNm de PRL en la región del GD, evidenció mayor síntesis de ARNm en la condición de Memoria 25 días para las tres regiones estudiadas, el pico del GD; la banda craneal del GD y la banda basal del GD, viéndose la mayor intensidad de reacción, en la capa Granular de la zona craneal. Mientras que, la capa Molecular y Polimórfica, tuvieron mayor nivel reactivo en la región del pico.

Todo ello, sugiere que, en consolidación de memoria a largo plazo, la PRL se comporta de forma diferente en el asta de Amón, en lo que la máxima expresión se daba a los 16 días.

Por último, la región CA4, experimentó un aumento de moléculas y área reactiva en los individuos de Aprendizaje 6 días y Memoria 16 días. Teniendo una mayor intensidad de la reacción los que consolidaron su memoria a los 16 días.

*Nuestro estudio demuestra la presencia de PRL en el GD y en el asta de Amón, a la vez que la expresión de su ARNm con localizaciones semejantes y variaciones concordantes entre ambas zonas durante el aprendizaje y la consolidación de la memoria.*

*Coincidiendo con que, la mayor localización de PRL se da en la condición de Memoria 16 días, a la vez que, es esta condición la que tiene mayor presencia de síntesis de ARNm para esta hormona.*

*Todo ello sugiere, nos hace pensar que la PRL y su síntesis en las áreas del hipocampo estudiadas, pueden jugar un papel importante en la consolidación de la memoria declarativa por aprendizaje a través de claves visuales, con una posible relación en potenciación de la memoria a largo plazo.*

Ya hemos comentado que la PRL desempeña muchas funciones biológicas en los vertebrados y que, junto con la hipófisis, se produce en otros órganos o tejidos (Ben-Jonathan, Khurana et al. 2002, Marano and Ben-Jonathan 2014, Cabrera-Reyes, Limon-Morales et al. 2017).

En el SNC se ha demostrado su presencia mediante inmunocitoquímica (Freeman, Kanyicska et al. 2000) y, aunque discutido por algún autor, existen evidencias de su síntesis en algunas partes del SN. Se ha detectado su ARNm, en los núcleos paraventricular, supraópticos del hipotálamo de ratas hembra mediante PCR (Clapp, Torner et al. 1994, Torner, Maloumby et al. 2004)

En pavos, se ha descrito que la secuencia de ARNm de PRL se localiza predominantemente dentro de la hipófisis, aunque también, se observó en áreas extrahipofisarias del cerebro, incluyendo el cerebelo, el núcleo accumbens, el núcleo septal lateral, el núcleo hipotalámico anterior, el hipotálamo lateral, el núcleo paraventricular, el núcleo ventromedial y el complejo nuclear infundibular (Chaiseha, Ngermsoungnern et al. 2012).

En el hipotálamo, se ha descrito una abundancia de células que expresaban ARNm de PRL en la parte del núcleo hipotalámico anterior, el hipotálamo lateral y el núcleo ventromedial. Mientras que las células que expresaban menos ARNm, se encontraban en el núcleo septal lateral, el núcleo paraventricular y el complejo nuclear infundibular (Grillon, Colard et al. 1998).

Otros estudios en cerebros de ovejas adultas y en fase de desarrollo, sugieren que la síntesis local de PRL y su liberación dentro del propio cerebro, podían actuar, junto con la adquirida desde la circulación, para la modulación de respuestas neuroendocrinas homeostáticas y conductuales.

La expresión del ARNm de PRL por hibridación "*in situ*" en el cerebro de oveja, demostró que se expresaba en el área preóptica medial, núcleo preóptico periventricular, núcleo del lecho de la estría terminal y el núcleo paraventricular del hipotálamo, en particular la región ventral. La distribución neuroanatómica del ARNm de PRL aumentaba a medida que existía envejecimiento, pudiendo estar involucrada en el neurodesarrollo o modulación del estrés neuroendocrino (Roselli, Bocklandt et al. 2008).

Sin embargo, estudios realizados con animales hipofisectomizados, describen que no existe expresión del ARNm de PRL en el cerebro. Pero al tratarlos con testosterona aparecía el mensajero en zonas del hipotálamo y áreas extrahipotalámicas, indicando la existencia de una regulación transcripcional de PRL en el cerebro, diferente a la de la hipófisis (Emanuele, Jurgens et al. 1992).

La presencia de PRL y de su ARNm en el hipotálamo, amígdala y tallo cerebral, después del tratamiento con testosterona en ratas adultas con hipofisectomía, daban evidencias de que PRL se sintetizaba de manera separada a la hipófisis. Concluyendo que, la testosterona es un mecanismo estimulador del gen de PRL de una manera indirecta y evidenciando que el cerebro podría fabricar PRL (Emanuele, Metcalfe et al. 1987, Wilson, Emanuele et al. 1992).

En estudios previos sobre aromatasa P450 en células hipofisarias, llevados a cabo en nuestro laboratorio. Sugirieron que bajo condiciones fisiológicas, la aromatasa P450 ejerce un control relevante sobre las células de prolactina hipofisarias masculinas, probablemente transformando la testosterona en estradiol en la glándula hipofisaria (Garcia Barrado, Blanco et al. 2014).

Con ello, afianzamos la posible relación existente entre testosterona, estradiol y aromatasa P450 como mecanismo regulador de la expresión de PRL en células de la hipófisis. Y su posible estimulación indirecta del gen de PRL no sólo en hipófisis, sino también, en otras zonas cerebrales (Garcia-Barrado, Blanco et al. 2016).

Habiéndose demostrado la presencia de la aromatasa en las neuronas hipocampales (Carretero, Lopez et al. 2016) que en nuestro estudio expresan el ARNm de PRL, lo que sugiere la posibilidad de que el estradiol formado en el hipocampo por metabolización de la testosterona pueda, al igual que hace en la hipófisis, estimular la síntesis de PRL en el hipocampo.

Estudios posteriores analizando variaciones de la expresión hipocampal de aromatasa en relación con el aprendizaje y la consolidación de la memoria, podrán dar validez a esta hipótesis, ya que no existen en la literatura estudios a este respecto.

Este es el primer trabajo que analiza las modificaciones de la presencia de PRL y de su ARNm en el hipocampo de ratas machos entrenadas en el MWM. A



la vez que, se estudió su distribución en las diferentes regiones del asta de Ammon y del GD, analizando las diferencias producidas en sus estratos.

Tampoco, hemos hallado estudios de referencia en los que se haya estudiado la relación de la presencia PRL en el hipocampo con su síntesis de manera endógena, en condición de aprendizaje y consolidación de memoria, tras un test conductual. Ni como se encuentra la conexión de las fibras aferentes y eferentes reactivas al ARNm de PRL, junto con las interneuronas positivas a esta secuencia en las zonas CA1, CA3, CA4 y GD con el resto del SNC.

Aunque se conoce que la PRL exógena y circulante en ratón adulto, es necesaria para aprendizaje y memoria, mejora el rendimiento cognitivo y la memoria espacial, aumenta la memoria social y su enfoque, necesario para el comportamiento en la sociedad (Babb, Carini et al. 2014). Mejora la neurogénesis (Li, Chung et al. 2013), la proliferación celular y la neuroprotección (Walker, Vukovic et al. 2012, Torner 2016)

Del hipocampo sabemos que se conecta con el septum, y tiene conexiones con el núcleo del rafe, hipotálamo, amígdala y corteza frontal medial, áreas involucradas en la ansiedad (Zarrindast and Khakpai 2015).

Se ha demostrado que el aprendizaje conductual implica cambios en la función y la estructura de las conexiones sinápticas del sistema nervioso central (SNC) (Kim and Hikosaka 2015, Griggs, Kim et al. 2017).

Además, los circuitos neuronales en el cerebro maduro se caracterizan por un alto grado de estabilidad que posiblemente, proporciona un correcto almacenamiento de la información a largo plazo. Existiendo, la necesidad de un conjunto de moléculas que inhiban la plasticidad y promuevan la estabilidad. Se ha confirmado que los procesos de aprendizaje y la plasticidad estructural correlacionada implican cambios en las conexiones neuronales excitadoras e inhibitoras (Zagrebelsky, Lonnemann et al. 2017).

Con estos antecedentes, se puede pensar que las fibras positivas a la síntesis de ARNm que mostraban los resultados de nuestro trabajo, podrían guardar relación con la neuroplasticidad y el remodelado dendrítico, como ya se había visto en otros estudios durante la gestación y el postparto (Le Tissier, Hodson et al. 2015)

La bibliografía, no mostró ningún referente sobre la síntesis de PRL en el propio hipocampo, no se conoce como se encuentra regulada ni sus acciones. Pero sí, se han desarrollado estudios a nivel genómico de los niveles de PRL en el plasma sanguíneo y en el líquido cefalorraquídeo (LCR), para explicar cómo son sus niveles de expresión en ambos fluidos biológicos, mediante el desarrollo de un metanálisis.

Así, se ha conocido como eran los marcadores genéticos que afectaban a la expresión de PRL en plasma o del LCR, proporcionando a los investigadores una base para una mejor comprensión de la regulación de PRL, y a su vez comprender el papel que desempeña en múltiples tejidos en el cuerpo humano y cómo afecta a la salud (Staley, Ebbert et al. 2016).

Algunos investigadores, relacionan la enfermedad de Alzheimer con la leptina y, por tanto, a ésta con su interacción con la hormona PRL por pertenecer a la misma familia de adipocinas (Folch, Patraca et al. 2015).

Con todos estos precedentes, *los resultados obtenidos en la cuantificación de las células positivas a ARNm de PRL en las regiones del hipocampo, nos hacen valorar la posible implicación que tiene la presencia de PRL junto con el aumento de su síntesis en la consolidación de la memoria a largo plazo.*

*La importancia que tiene el aumento de ARNm de PRL en los grupos Memoria 9, 16 y 25 días, el crecimiento en la síntesis de PRL, abre una puerta a la investigación para comprender la funcionalidad relativa de PRL en cognición, memoria y aprendizaje, y el posible sistema regulador en el proceso de consolidación de la memoria, para su relevancia en procesos clínicos, debido a que podría incidir sobre enfermedades relacionadas con la pérdida de memoria, como es el caso del Alzheimer o las demencias.*

## CA1 Septal

## Inmunohistoquímica para RPRL

GRUPO	Porcentaje de área reactiva (%)	Número de moléculas/área total	Área reactiva en 100.000 pix <sup>2</sup>
Ctrl NL	5.34 ± 0.74	05315.52 ± 599.30	621.28 ± 102.20
Ctrl Plataforma	7.48 ± 0.79	06170.61 ± 582.17	824.97 ± 56.07
Aprendizaje 6 días	8.80 ± 0.79	06748.34 ± 331.33	894.35 ± 79.19
Memoria 9 días	9.45 ± 1.06	08094.79 ± 1228.11	1941.13 ± 188.79
Memoria 16 días	18.19 ± 1.38	17685.52 ± 2162.83	2725.30 ± 489.43
Memoria 25 días	17.83 ± 2.42	15013.94 ± 4096.06	2200.35 ± 725.45

## Hibridación "in situ" para PRL

GRUPO	Porcentaje de área reactiva (%)	Número de moléculas/área total	Área reactiva en 100.000 pix <sup>2</sup>
Ctrl NL	5.88 ± 0.61	05413.43 ± 424.33	1006.53 ± 135.61
Ctrl Plataforma	10.00 ± 1.23	06947.22 ± 1023.19	1172.10 ± 138.95
Aprendizaje 6 días	12.54 ± 0.83	11682.44 ± 1421.12	1268.17 ± 102.85
Memoria 9 días	11.10 ± 1.82	12151.20 ± 1862.01	1326.47 ± 190.20
Memoria 16 días	23.58 ± 4.49	25457.01 ± 3115.25	2732.05 ± 361.77
Memoria 25 días	13.94 ± 2.91	14828.22 ± 2704.36	1658.15 ± 295.43

## CA1 Lateral

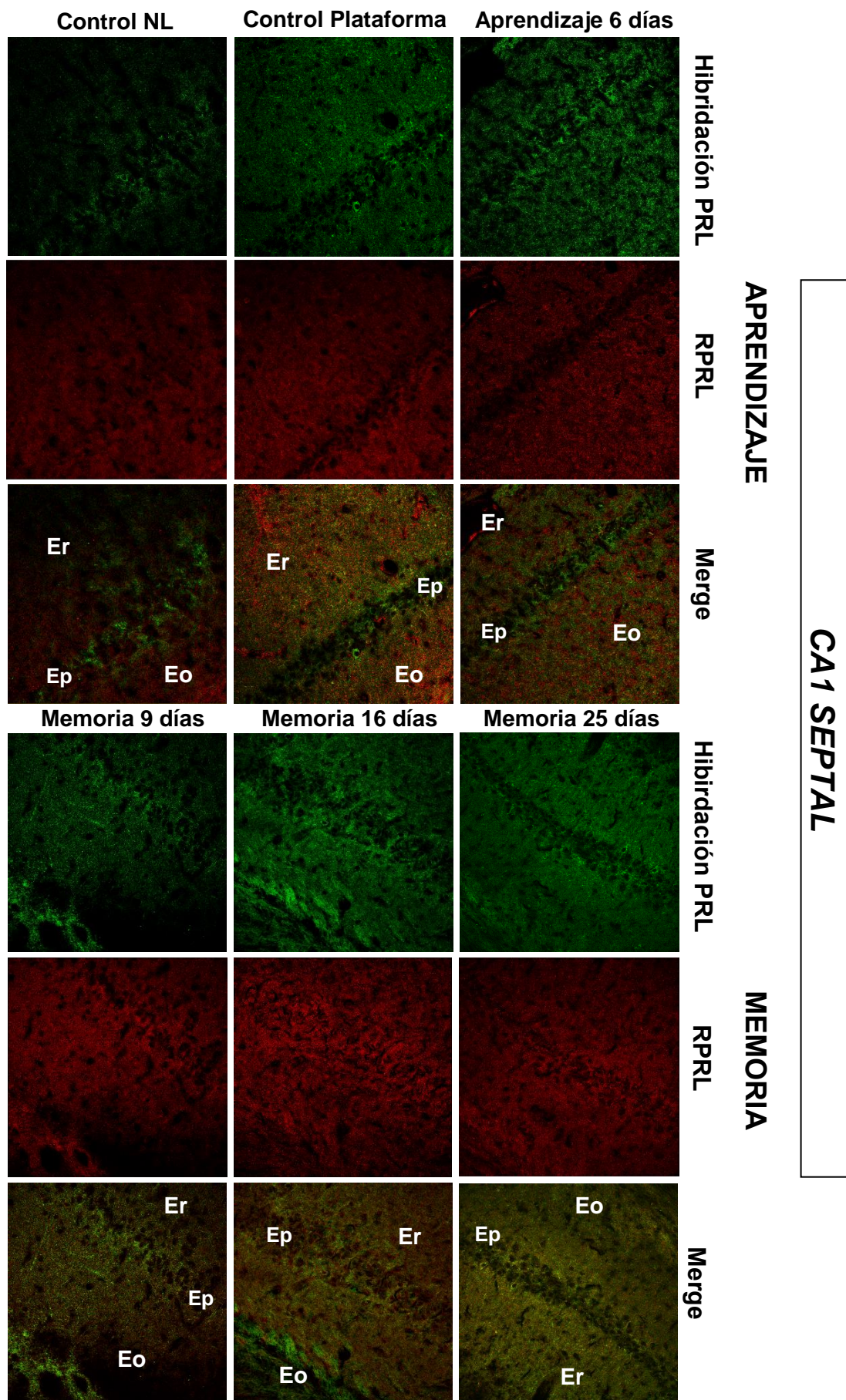
## Inmunohistoquímica para RPRL

GRUPO	Porcentaje de área reactiva (%)	Número de moléculas/área total	Área reactiva en 100.000 pix <sup>2</sup>
Ctrl NL	3.66 ± 0.61	02101.40 ± 393.60	456.30 ± 53.09
Ctrl Plataforma	4.23 ± 0.69	04010.35 ± 958.23	611.64 ± 105.13
Aprendizaje 6 días	5.90 ± 1.05	04865.51 ± 710.21	849.53 ± 81.27
Memoria 9 días	7.09 ± 2.58	06363.15 ± 1012.57	1853.48 ± 764.05
Memoria 16 días	19.09 ± 3.19	19396 ± 6000.26	3816.62 ± 850.78
Memoria 25 días	16.70 ± 2.28	11850.10 ± 4641.01	2032.41 ± 258.58

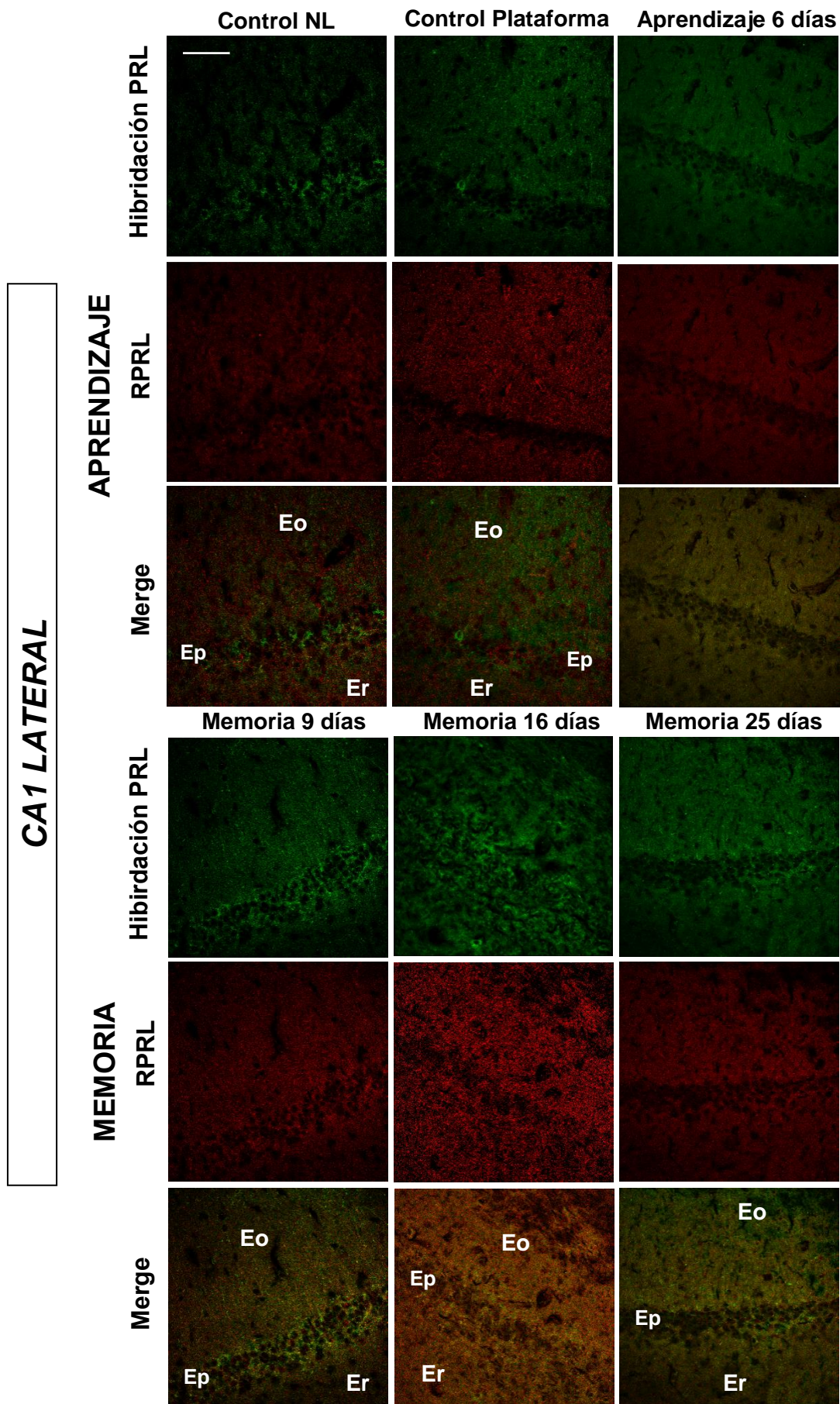
## Hibridación "in situ" para PRL

GRUPO	Porcentaje de área reactiva (%)	Número de moléculas/área total	Área reactiva en 100.000 pix <sup>2</sup>
Ctrl NL	7.45 ± 1.18	02558.31 ± 337.48	623.75 ± 47.28
Ctrl Plataforma	9.06 ± 0.66	02797.56 ± 296.48	1687.26 ± 617.32
Aprendizaje 6 días	13.42 ± 0.60	05392.17 ± 185.58	1960.53 ± 186.48
Memoria 9 días	13.75 ± 1.04	15783.60 ± 1338.57	2692.93 ± 571.42
Memoria 16 días	24.34 ± 0.92	35193.32 ± 7737.34	5710.60 ± 564.33
Memoria 25 días	16.62 ± 2.84	18911.23 ± 3930.85	2733.32 ± 387.81

Tabla RD-30. Análisis cuantitativo de la IQ del RPRL y la hibridación "in situ" para PRL. Todos los valores se realizaron como la media ± EEM.



**Figura RD-63.** Hibridación “in situ” de PRL e IQ de RPRL, región CA1 Septal de hipocampo de ratas machos entrenadas en el MWM. Eo, Estrato Oriens; Ep, Estrato piramidal y Er, Estrato radiado. Escala 75 µm.



**Figura RD-64.** Hibridación “in situ” PRL e IQ de RPRL, región CA1 Lateral en hipocampo de ratas machos entrenadas en el MWM. Eo, estrato Oriens; Ep, Estrato piramidal y Er, Estrato radiado. Escala 75 µm.

Las imágenes combinadas de hibridación *“in situ”* a PRL y de inmunohistoquímica del RPRL mostraron de forma cualitativa, la presencia de la síntesis de ARNm para PRL en los cortes histológicos de los grupos de estudio (en verde), tanto en aprendizaje como en memoria, como ya se había demostrado en experimentos anteriores. A la vez, que se observaba la existencia del RPRL (en rojo) para todas las condiciones, control NL, control Plataforma, Aprendizaje 6 días, Memoria 9, 16 y 25 días (Figura RD-63 y RD-64).

Apareció reacción inmunofluorescente para la síntesis de PRL y para su receptor, en la región CA1 Septal y CA1 Lateral.

Aunque, la intensidad de reacción, no fue por igual para ambas moléculas. Se apreció mayor intensidad relacionada con el ARNm de PRL, en comparación con la fluorescencia ofrecida por el RPRL.

Fijándonos en las dos regiones estudiadas, CA1 Septal y CA1 Lateral, se observó un aumento de reacción en la condición Memoria 16 días tanto para el ARNm como para el receptor. Y en menor medida para Memoria 9 días y Memoria 25 días.

Respecto a la morfología de las células. La síntesis de ARNm para PRL, se manifestaba de forma granular, puntuada, abarcando la superficie del citoplasma neuronal, sobre todo en el estrato Piramidal de las dos regiones de CA1 analizadas.

Sin embargo, la inmunohistoquímica para RPRL, fue más uniforme, sin presencia de esas partículas granulares distribuidas a lo largo del citoplasma de la célula neuronal.

Cuando se estudió el merge de las imágenes. Se observó un color amarillo-anaranjado. Indicador de que ambas moléculas analizadas se encontraban en el mismo lugar, coincidiendo y haciéndose coexistentes. El grado de coexistencia en los estratos Piramidales de ambas zonas de la región CA1 aumentó en relación con la consolidación de la memoria a partir de los 9 días, siendo menos evidente en el periodo de entrenamiento en el de aprendizaje.

Tras la realización de la hibridación *“in situ”* y la IQ. Se llevó a cabo, la cuantificación de los marcadores fluorescentes para ambas moléculas. Se comparó por separado la zona CA1 Septal y CA1 Lateral.

Para realizar esta comparativa, se ha medido el porcentaje de área reactiva (%), el número de moléculas por área total (asumiendo arbitrariamente que 9 pixeles<sup>2</sup> corresponde a una molécula), y el área reactiva en una superficie de 100.000 pixeles<sup>2</sup>, mediante el software Image J (Tabla RD-30 y Figura RD-65).

En referencia con el porcentaje de área reactiva (Figura RD-65A). En CA1 Septal y en CA1 Lateral, se observó un aumento significativo (\*\* $p < 0.001$ ) en el grupo Memoria 16 días (*Septal*: RPRL,  $18.19 \pm 1.38$  / PRL:  $23.58 \pm 4.49$ ), *Lateral*: RPRL,  $19.09 \pm 3.19$  / PRL:  $24.34 \pm 0.92$ ) tanto para RPRL como para ARNm de PRL en comparación con el resto de condiciones. Obteniéndose valores similares para ambas regiones Los animales de 25 días presentaron valores significativos mayores ( $*p < 0.01$ ) que los de los grupos de pre-entramiento.

El análisis, mostraba un mayor aumento en el porcentaje reactivo para la síntesis de PRL respecto a la presencia de su receptor. En todos los grupos, excepto en la zona lateral de los animales de Memoria 25 días que fue similar, y en la zona Septal de estos animales en los que fue menor.

El estudio estadístico para el número de moléculas (Figura RD-65B) y el área reactiva en 100.000 pix<sup>2</sup> (Figura RD-65C), demostró que ambos parámetros modificaban de una manera similar a lo descrito para el área reactiva.

En ambos parámetros, se observó un incremento significativo variable y gradual, desde los grupos controles, como fue control NL (*Septal*: RPRL,  $05315.52 \pm 599.30$  / PRL:  $05413.43 \pm 424.33$  moléculas, *Lateral*: RPRL,  $02101.40 \pm 393.60$  / PRL:  $02558.31 \pm 337.48$  moléculas), hasta alcanzar el nivel más alto en Memoria 16 días (*Septal*: RPRL,  $17685.52 \pm 2162.83$  / PRL:  $25457.01 \pm 3115.25$  moléculas, *Lateral*: RPRL,  $19396 \pm 6000.26$  / PRL:  $35193.32 \pm 7737.34$  moléculas).

La región CA1 Lateral, obtuvo mucha similitud en Memoria 9 días ( $1853.48 \pm 764.05$ ) y 25 días ( $2032.41 \pm 258.58$ ) en el área reactiva encontrada en 100.000 pix<sup>2</sup>. Algo parecido sucedió en CA1 Septal, aunque en estas dos condiciones, el área fue mayor para RPRL que para el ARNm de PRL. Obteniéndose valores semejantes de ambas moléculas para Memoria 16 días.

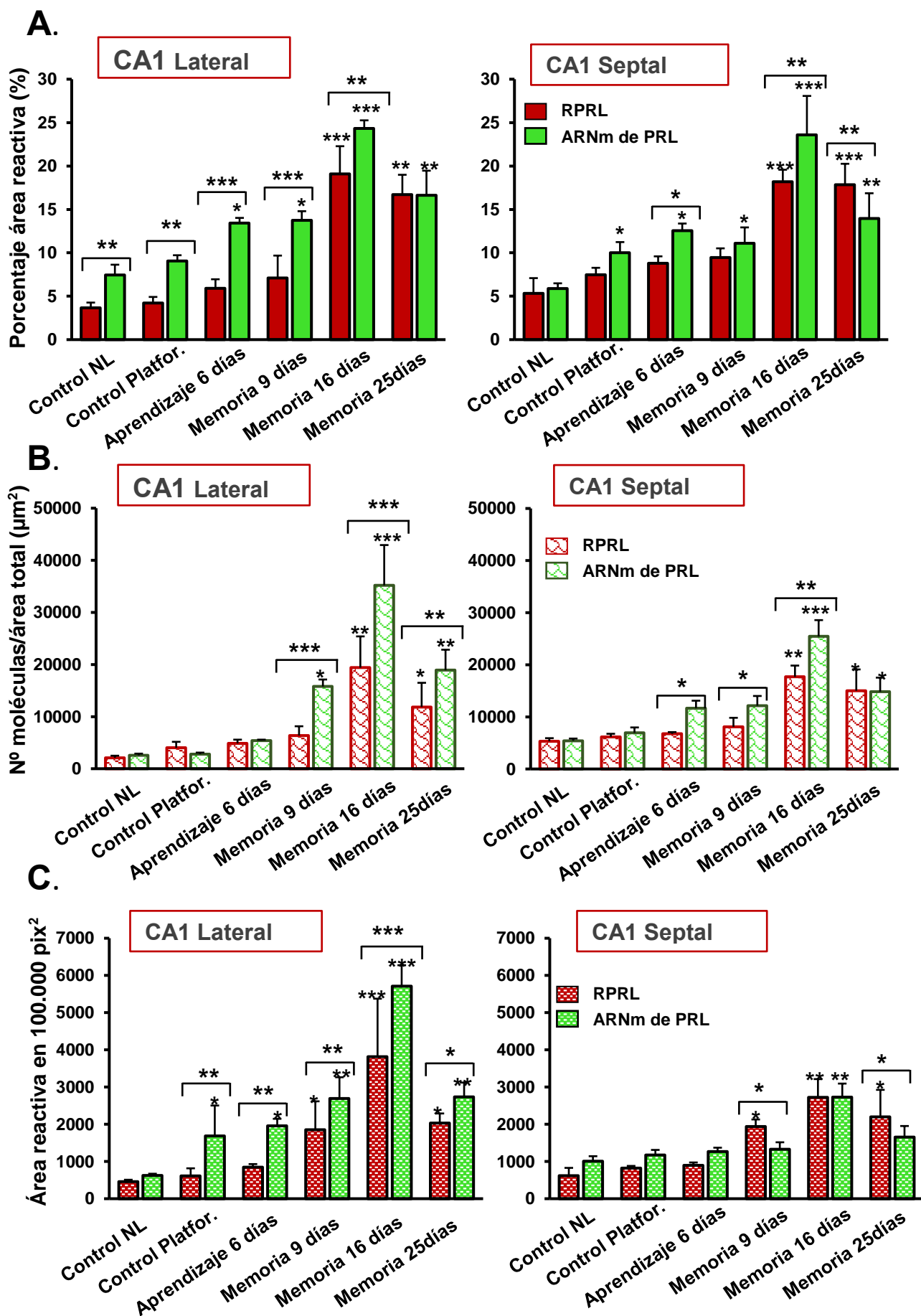


Figura RD-65. Cuantificación de IQ para RPRL (rojo) e hibridación “in situ” PRL (verde).



En la Figura RD-65, se muestra la cuantificación de los niveles en las áreas reactivas y el número de moléculas reactivas para el RPRL (IQ) y el ARNm de PRL (hibridación “*in situ*”), de la región CA1 Septal y Lateral del hipocampo.

Los resultados se expresaron como media  $\pm$  EEM (n=5 animales para cada grupo analizado, en 10 imágenes por animal en un área de 500.000 pix<sup>2</sup> analizados (\*p<0.01, \*\*p<0.001, \*\*\*p<0.0001).

El nivel de significación estadística se realizó en comparación con el grupo control para la síntesis de PRL y RPRL, a la vez, se comparó el RPRL respecto al ARNm de PRL dentro de cada grupo. Mediante ANOVA, por el test de comparaciones múltiples de Bonferroni. El nivel de significancia se valoró en forma de p-valor, aceptando p<0.05 como significativo.

Hallazgos obtenidos mediante la microscopia confocal del doble marcaje para ARNm de PRL y RPRL y, el análisis de la cuantificación del porcentaje de área reactiva, el número de moléculas reactivas respecto al área total y el área reactiva en 100.000 pix<sup>2</sup>; se observó que la presencia de ambas moléculas no fue igual en todas las neuronas. Por lo tanto, se decidió calcular el gris medio en los distintos estratos de CA1 por separado (Tabla RD-31), para valorar la posible existencia de diferencias significativas entre ellos.

Y conocer cómo fue la relación entre la síntesis de PRL y su receptor, mediante la intensidad de reacción que presentaban las imágenes de microscopía confocal analizadas.

<b>CA1 Septal</b>						
<b>GRUPO</b>	<b>IQ para RPRL</b>			<b>ARNm de PRL</b>		
	<i>Gris medio reactivo (UA)</i>			<i>Gris medio reactivo (UA)</i>		
	PIRAMIDAL	RADIADO	ORIENS	PIRAMIDAL	RADIADO	ORIENS
<b>Ctrl NL</b>	15.33 $\pm$ 0.81	10.95 $\pm$ 0.65	6.89 $\pm$ 0.80	16.99 $\pm$ 0.62	8.68 $\pm$ 0.88	7.89 $\pm$ 0.78
<b>Ctrl Plataforma</b>	22.57 $\pm$ 0.68	14.04 $\pm$ 0.56	17.53 $\pm$ 0.68	18.59 $\pm$ 0.46	15.25 $\pm$ 0.52	17.41 $\pm$ 0.30
<b>Aprendizaje 6 días</b>	22.73 $\pm$ 0.59	18.85 $\pm$ 0.48	16.12 $\pm$ 0.47	20.40 $\pm$ 0.36	23.90 $\pm$ 0.48	21.86 $\pm$ 0.56
<b>Memoria 9 días</b>	22.49 $\pm$ 0.78	20.88 $\pm$ 0.59	16.16 $\pm$ 0.42	27.74 $\pm$ 0.68	27.92 $\pm$ 0.65	23.46 $\pm$ 0.69
<b>Memoria 16 días</b>	33.44 $\pm$ 0.78	32.24 $\pm$ 1.06	31.15 $\pm$ 0.96	30.19 $\pm$ 0.59	29.43 $\pm$ 0.76	32.27 $\pm$ 0.63
<b>Memoria 25 días</b>	25.15 $\pm$ 0.53	23.02 $\pm$ 0.91	22.57 $\pm$ 0.72	29.43 $\pm$ 0.51	26.16 $\pm$ 0.60	28.34 $\pm$ 0.91

Tabla RD-31A

## CA1 Lateral

Tabla RD-31B

GRUPO	IQ para RPRL			ARNm de PRL		
	Gris medio reactivo (UA)			Gris medio reactivo (UA)		
	PIRAMIDAL	RADIADO	ORIENS	PIRAMIDAL	RADIADO	ORIENS
Ctrl NL	11.56±0.85	13.47±3.16	7.99±3.05	14.58±2.92	14.59±0.99	8.71±0.88
Ctrl Plataforma	18.43±1.95	13.81±0.39	13.88±0.44	18.98±0.65	26.43±1.70	19.99±1.98
Aprendizaje 6 días	30.37±0.79	25.35±0.99	21.90±1.78	32.36±0.99	29.71±0.75	21.72±0.63
Memoria 9 días	30.26±0.89	28.68±0.65	29.33±0.38	34.72±0.58	27.32±0.84	20.93±0.99
Memoria 16 días	34.41±0.43	41.56±4.28	45.87±3.15	45.85±3.91	35.48±0.44	37.38±0.51
Memoria 25 días	31.69±0.74	29.47±0.73	29.15±0.67	21.99±0.70	26.93±0.57	27.08±0.73

**Tabla RD-31.** Análisis de la intensidad de reacción del ARNm de PRL y del RPRL en la región CA1 del hipocampo mediante el gris medio reactivo. (RD-27A) CA1 Septal y, (RD-27B) CA1 Lateral. Se valoró todos los estratos, estrato Piramidal, estrato Radiado y estrato Oriens de ambas regiones por separado. Todos los valores están expresados como la media ± EEM.

En el análisis del gris medio (UA) (Figura RD-66), en los animales Memoria 16 días, apareció un aumento significativo (\*\* $p < 0.001$ ) de la síntesis de PRL y de la presencia de su receptor en todos los estratos analizados, respecto al control NL. Tanto en CA1 Septal como Lateral.

Los niveles de intensidad reactiva para los dos elementos analizados, indicaban un aumento de esa intensidad para la región CA1 Lateral en comparación con CA1 Septal. Como mostraba el estrato Oriens de Memoria 16 días en las dos regiones.

Aquí, se veía un incremento del gris medio en el ARNm de PRL (*Septal*:  $32.27 \pm 0.63$ , *Lateral*:  $45.87 \pm 3.15$ ) y del RPRL (*Septal*:  $31.15 \pm 0.96$ , *Lateral*:  $37.37 \pm 0.51$ ).

Los resultados en CA1 Septal (Figura RD-58A), marcaban un incremento paulatino desde el control NL hasta la consolidación de la memoria en ARNm de PRL y en RPRL, en todos los estratos del estudio.

Aunque, en el estrato Piramidal, se veía una elevación discreta no significativa del gris medio en RPRL respecto a la síntesis de PRL, en Memoria 9 (*RPRL*:  $33.44 \pm 0.78$ , *ARNm*:  $27.74 \pm 0.68$ ) y 25 días (*RPRL*:  $25.15 \pm 0.53$ , *ARNm*:  $29.43 \pm 0.51$ ).

Por otro lado, el aumento de intensidad reactiva referente a RPRL, era más marcada para los estratos Radiado y Oriens. Representado en todos los grupos, excepto control NL (*Radiado*, RPRL:10.95±0.65, ARNm: 8.68±0.88 /*Oriens*, RPRL: 6.89±0.80, ARNm: 7.89±0.78) y Memoria 16 días (*Radiado*,RPRL: 32.24±1.06, ARNm: 29.43±0.76 /*Oriens*,RPRL: 31.15±0.96, ARNm: 32.27±0.63).

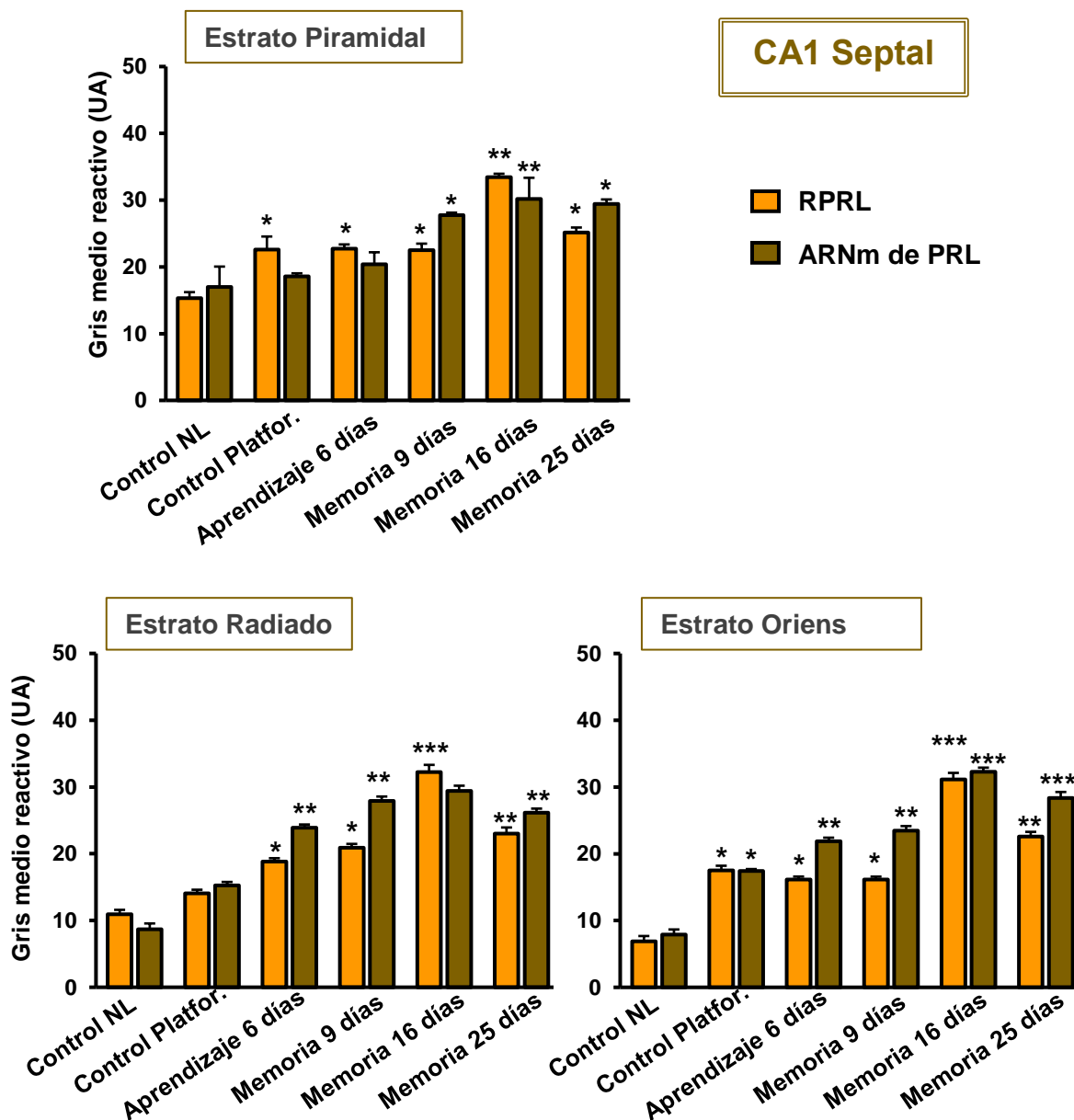
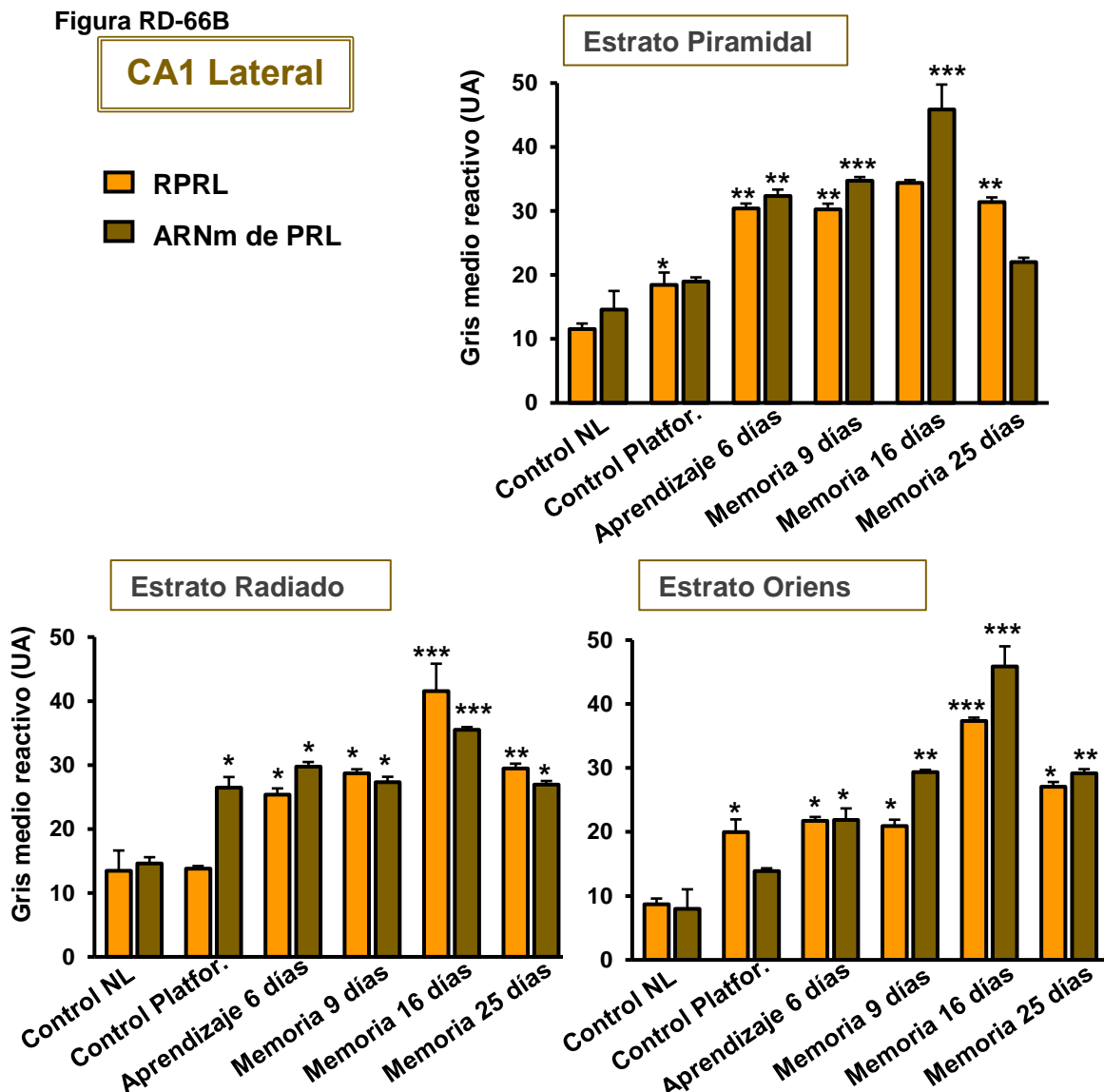


Figura RD-66A

Como puede apreciarse en las gráficas se la Figura RD-66A, la reacción para RPRL en la zona Septal de CA1, siguió un paralelismo en los tres estratos estudiados con un incremento progresivo hasta los 16 días y una caída a los 25

días, aunque los valores encontrados en este grupo de animales fueron mayores de los de los grupos de entrenamiento, aprendizaje y memoria a corto plazo.

La región CA1 Lateral (Figura RD-66B), mostraba resultados semejantes a los mostrados en CA1 Septal. Aunque, hay que destacar una diferencia, el aumento de la intensidad de reacción en esta región al compararla con la Septal.



**Figura RD-66.** Gris medio (UA) del área reactiva, en los estratos de CA1 Septal (RD-66A) y, Lateral (RD-66B). Se analizaron imágenes confocales de los grupos (n=5 animales por cada condición, 6 imágenes por animal y 200 puntos por imagen). Se expresó la media  $\pm$  EEM, por ANOVA mediante el test de Turkey se comparando los grupos con Control NL. Se aplicó el mismo estudio estadístico para comparar RPRL y ARNm de PRL en todas las condiciones. El nivel de significación estadística se expresó como p-valor (\* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.001$  \*\*\* $p < 0.0001$ ).

### 4.2.7-2 CUANTIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS POSITIVAS A ARNm de PRL Y RPRL, EN LA ZONA CA3 DEL HIPOCAMPO

Para cuantificar las células positivas a ARNm de PRL y la presencia del RPRL, como se hizo para la región CA1, se realizó, el doble marcaje con la técnica de hibridación “*in situ*” para el ARNm e inmunohistoquímica para visualizar el RPRL. Se cuantificó CA3a, por otro CA3b y, por último, CA3c.

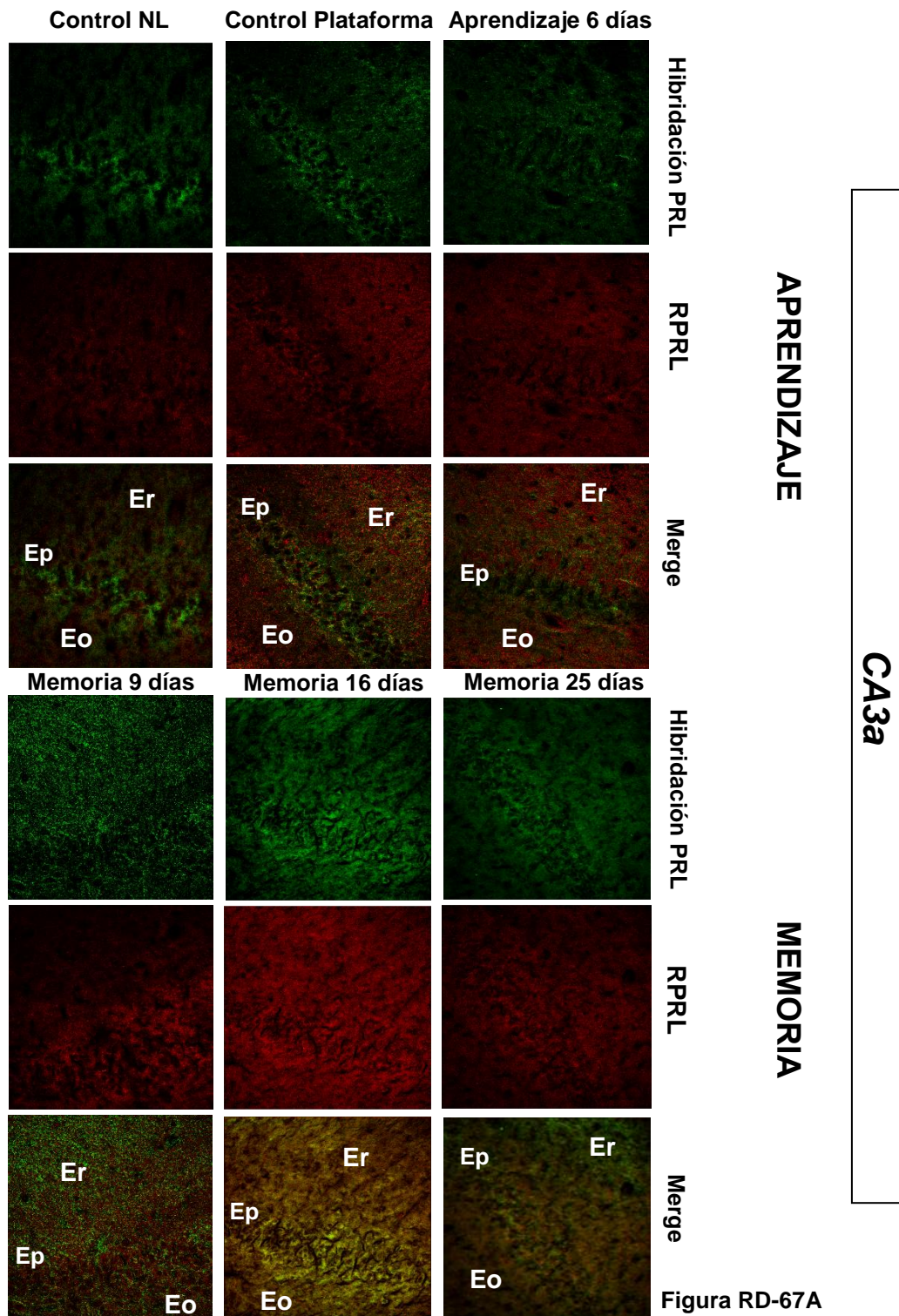


Figura RD-67A

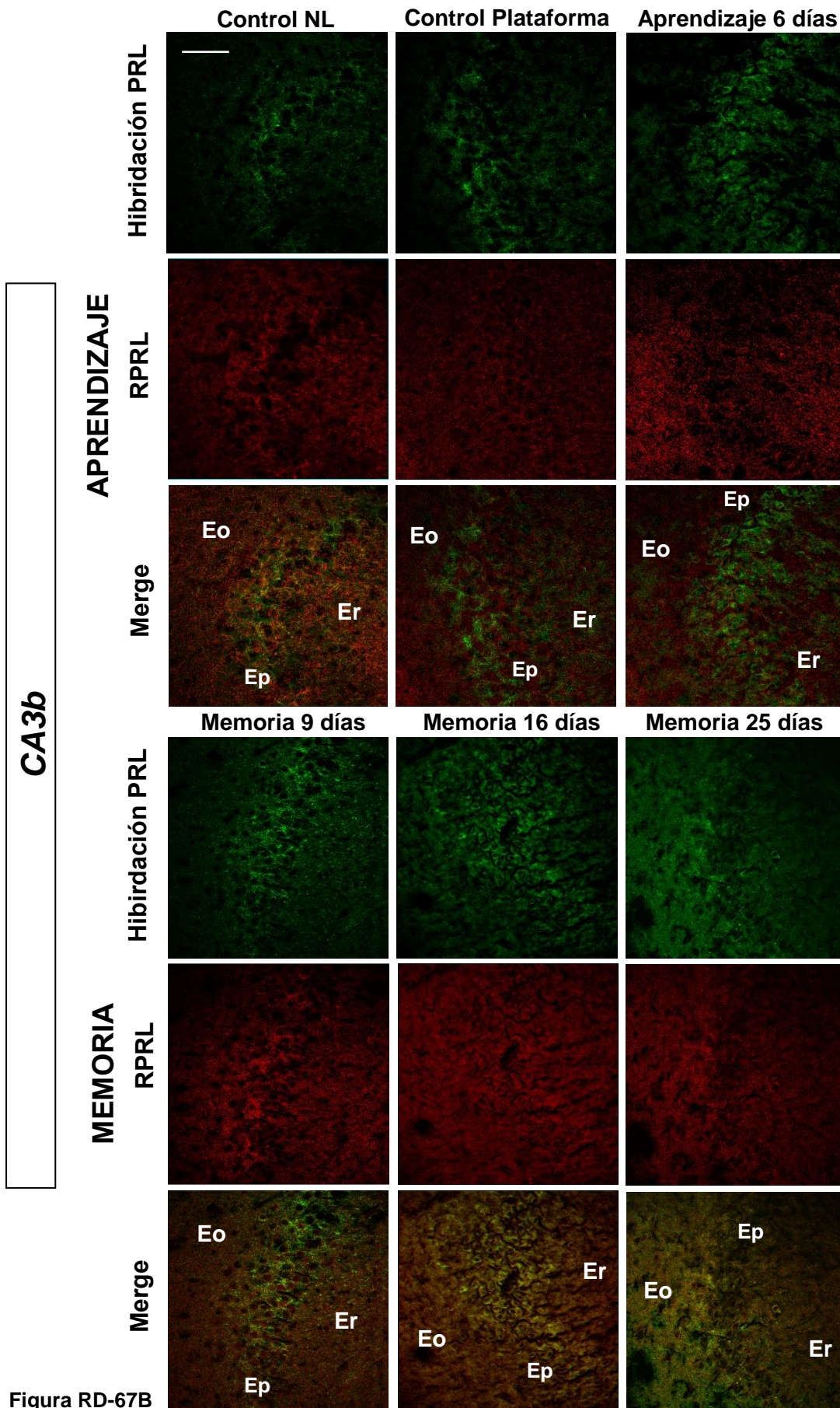


Figura RD-67B

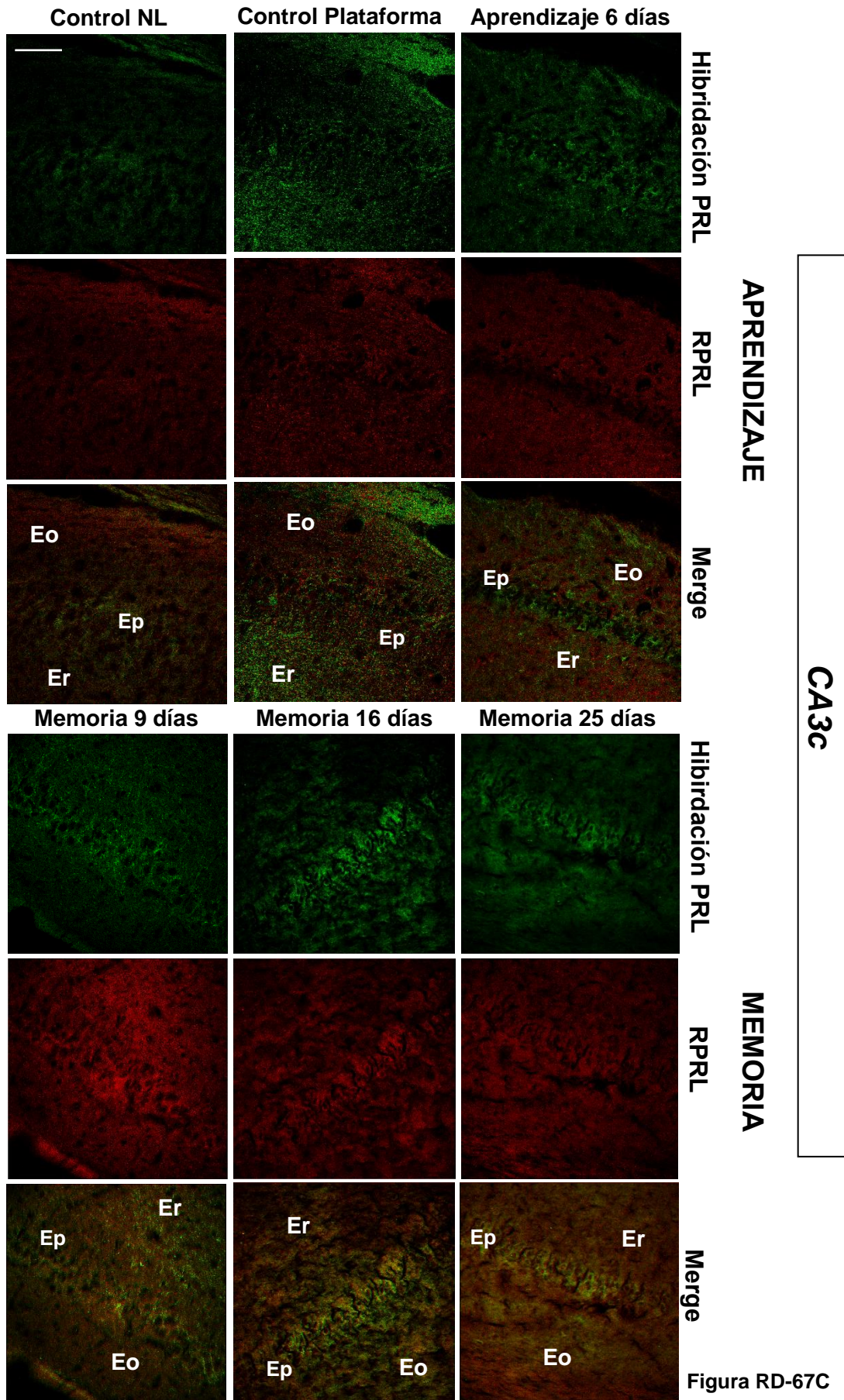


Figura RD-67C

**Figura RD-67.** Hibridación “in situ” de PRL e IQ de RPRIL, región CA3a, CA3b y CA3c, de hipocampo de ratas machos entrenadas en el MWM. Eo, Estrato Oriens; Ep, Estrato piramidal y Er, Estrato radiado. Escala 75  $\mu$ m.

La Figura RD-67, muestra imágenes obtenidas con el microscopio confocal de la región CA3 de todos los grupos del estudio, que son representativas de los hallazgos encontrados.

En referencia a la región CA3a (Figura RD-67A), se observó mayor intensidad de fluorescencia para el conjunto de ratas machos sanas que habían consolidado la memoria, al respecto de la intensidad que mostraban las imágenes correspondientes a las pre-entrenadas.

En el estrato Piramidal, las células neuronales presentaban una morfología redondeada, uniforme, con aspecto bastante similar entre ellas. Aunque se vio que, no todas las células poseían reacción a la síntesis de PRL ni a la presencia de RPRL y, la intensidad fluorescente no era constante en todas las células.

En todas las regiones consideradas en el experimento. La presencia de ARNm de PRL, fue exhibida de forma granular, punteada por el citoplasma de las neuronas.

Mientras que el RPRL, se observaba de manera más homogénea, estable, ocupando toda la superficie citoplasmática

Al mismo tiempo, se manifestó por las tres regiones de CA3, fibras reactivas a ambas moléculas del estudio, sobre todo fueron muy numerosas para el ARNm de PRL.

CA3b y CA3c, mostraron resultados cualitativos muy similares a CA3a, en las dos regiones, se observó un aumento creciente y paulatino de los marcadores en las ratas de Memoria, en comparación con las controles y aprendizaje 6 días.

Llamó la atención, el incremento que se produjo en CA3a y en mayor medida en CA3c concerniente a la intensidad del marcador del RPRL. Se manifestó un color rojo más intenso que el presentado en CA3b, a excepción del grupo de Memoria 16 días.

En todas las regiones y en todos los grupos, se realizó el merge de las imágenes. Revelando la coexistencia de la síntesis de ARNm y la presencia del RPRL en muchas células neuronales, especialmente, ese doble marcaje conjunto se ofrecía en el estrato Piramidal de todas las regiones de CA3.



Dado las observaciones de las imágenes confocales, el siguiente paso fue medir el porcentaje de área reactiva (%), el número de moléculas por área total ( $\mu\text{m}^2$ ) y área reactiva en 100.000  $\text{pix}^2$  (Tabla RD-32).

CA3a

Inmunohistoquímica para RPRL			
GRUPO	<i>Porcentaje de área reactiva (%)</i>	<i>Número de moléculas/área total</i>	<i>Área reactiva en 100.000 <math>\text{pix}^2</math></i>
Ctrl NL	4.14 ± 0.84	03119.40 ± 370.74	0128.88 ± 7.85
Ctrl Plataforma	5.66 ± 0.65	06156.65 ± 608.48	0371.29 ± 51.29
Aprendizaje 6 días	5.94 ± 0.76	06611.86 ± 840.24	0550.26 ± 215.94
Memoria 9 días	10.45 ± 0.99	12508.27 ± 1439.35	1160.63 ± 110.40
Memoria 16 días	24.11 ± 4.85	28945.89 ± 4152.52	2678.70 ± 539.42
Memoria 25 días	12.10 ± 1.35	21021.39 ± 3253.84	1558.39 ± 215.16

Hibridación "in situ" para PRL			
GRUPO	<i>Porcentaje de área reactiva (%)</i>	<i>Número de moléculas/área total</i>	<i>Área reactiva en 100.000 <math>\text{pix}^2</math></i>
Ctrl NL	10.04 ± 0.89	03629.30 ± 686.05	0315.31 ± 46.47
Ctrl Plataforma	15.34 ± 1.67	05968.56 ± 501.77	0411.96 ± 62.63
Aprendizaje 6 días	16.22 ± 1.51	05951.33 ± 435.89	0778.52 ± 60.76
Memoria 9 días	21.23 ± 1.56	12019.48 ± 1756.75	1548.72 ± 154.56
Memoria 16 días	32.90 ± 2.79	24067.15 ± 4086.94	3585.37 ± 332.62
Memoria 25 días	23.42 ± 2.46	15817.07 ± 3144.59	1827.54 ± 131.89

Tabla RD-32A.

**Tabla RD-32.** Análisis de la intensidad de reacción del ARNm de PRL y del RPRL en la región CA3 del hipocampo mediante el porcentaje de área reactiva (%), número de moléculas reactivas por el área total ( $\mu\text{m}^2$ ) y, el área reactiva medida en 100.000  $\text{pix}^2$ . Todos los valores están expresados como la media ± EEM. Tabla RD-32A, estudio para la región CA3a; Tabla RD-32B, análisis para la región CA3b y Tabla RD-32C, cuantificación para la región CA3b.

## CA3b

## Inmunohistoquímica para RPRL

GRUPO	Porcentaje de área reactiva (%)	Número de moléculas/área total	Área reactiva en 100.000 pix <sup>2</sup>
Ctrl NL	3.40 ± 0.53	02165.33 ± 564.46	0220.57 ± 58.23
Ctrl Plataforma	3.88 ± 0.42	01949.51 ± 197.94	0192.60 ± 19.65
Aprendizaje 6 días	5.60 ± 1.23	05272.37 ± 596.78	594.07 ± 146.54
Memoria 9 días	12.34 ± 1.66	13539.71 ± 1836.79	1402.77 ± 209.87
Memoria 16 días	14.55 ± 2.46	14331.80 ± 2538.81	1609.40 ± 282.95
Memoria 25 días	13.99 ± 2.61	16228.17 ± 4172.20	1410.20 ± 309.94

## Hibridación "in situ" para PRL

GRUPO	Porcentaje de área reactiva (%)	Número de moléculas/área total	Área reactiva en 100.000 pix <sup>2</sup>
Ctrl NL	7.60 ± 0.93	05345.11 ± 609.18	0538.76 ± 69.69
Ctrl Plataforma	8.37 ± 1.05	09421.86 ± 683.78	0974.68 ± 124.25
Aprendizaje 6 días	17.81 ± 1.32	12826.22 ± 1245.87	1398.29 ± 137.53
Memoria 9 días	24.83 ± 2.57	13604.27 ± 2024.45	1386.48 ± 219.24
Memoria 16 días	32.68 ± 3.15	16368.47 ± 1761.26	2328.81 ± 281.74
Memoria 25 días	31.96 ± 3.87	21201.44 ± 2578.44	1380.53 ± 183.56

Tabla RD-32B.

## CA3c

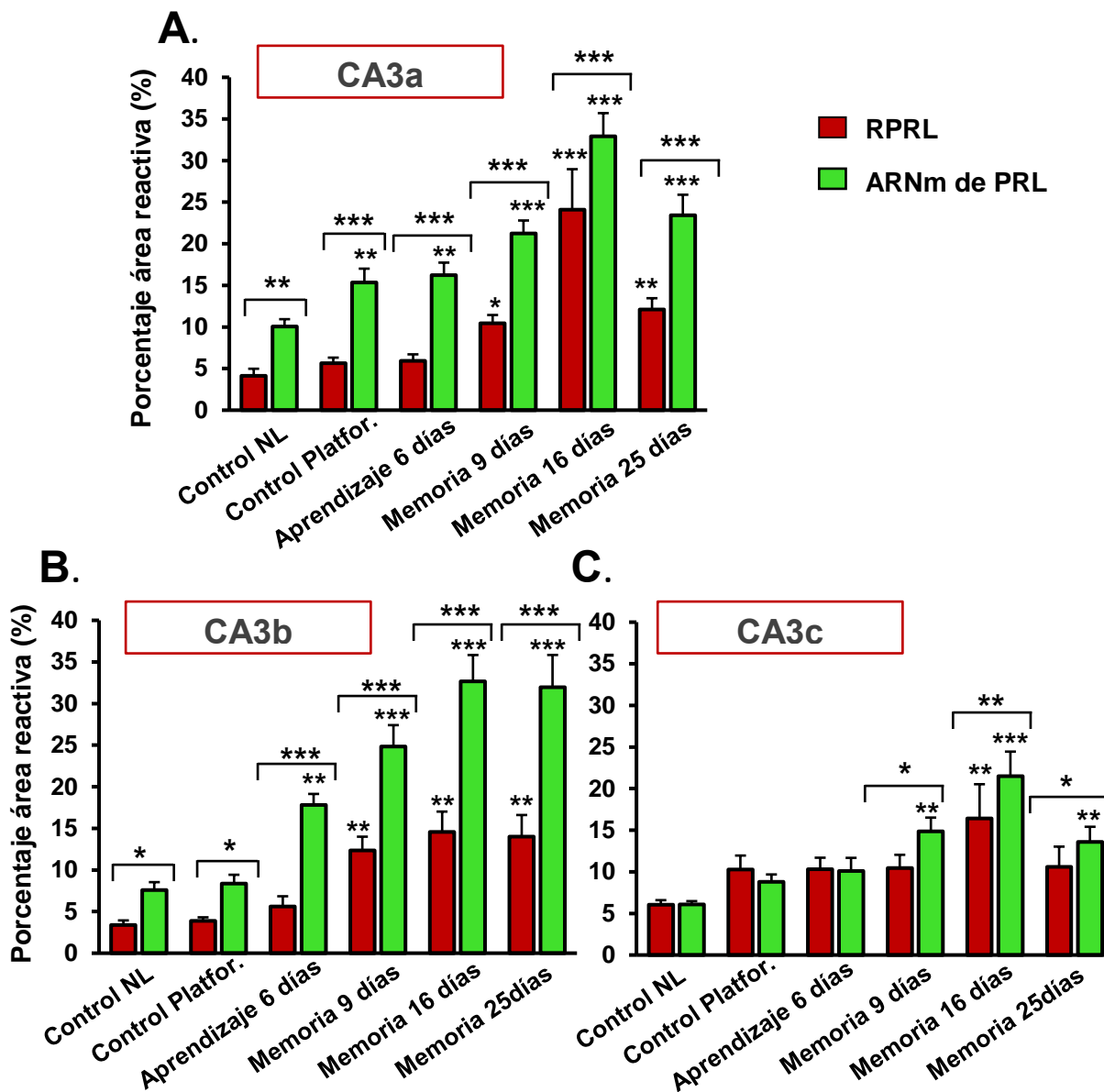
## Inmunohistoquímica para RPRL

GRUPO	Porcentaje de área reactiva (%)	Número de moléculas/área total	Área reactiva en 100.000 pix <sup>2</sup>
Ctrl NL	6.03 ± 0.57	05981.77 ± 647.31	0744.12 ± 62.95
Ctrl Plataforma	10.28 ± 1.68	05293.31 ± 742.27	1259.63 ± 129.45
Aprendizaje 6 días	10.30 ± 1.39	06453.52 ± 836.75	1092.45 ± 132.01
Memoria 9 días	10.45 ± 1.59	26645.97 ± 3409.60	2106.51 ± 330.20
Memoria 16 días	16.41 ± 4.11	26719.41 ± 5487.62	1823.97 ± 468.87
Memoria 25 días	10.58 ± 2.44	27646.40 ± 3886.64	2016.32 ± 348.48

## Hibridación "in situ" para PRL

GRUPO	Porcentaje de área reactiva (%)	Número de moléculas/área total	Área reactiva en 100.000 pix <sup>2</sup>
Ctrl NL	6.06 ± 0.41	07246.46 ± 634.74	0594.60 ± 66.86
Ctrl Plataforma	8.81 ± 0.87	08755.18 ± 905.96	0927.81 ± 113.15
Aprendizaje 6 días	10.09 ± 1.59	10829.15 ± 1610.08	1120.68 ± 189.66
Memoria 9 días	14.87 ± 1.65	16416.13 ± 1793.99	1652.08 ± 196.89
Memoria 16 días	21.51 ± 2.94	22235.81 ± 2960.00	2189.94 ± 363.84
Memoria 25 días	13.59 ± 1.81	14681.17 ± 2059.18	1698.92 ± 229.29

Tabla RD-32C.



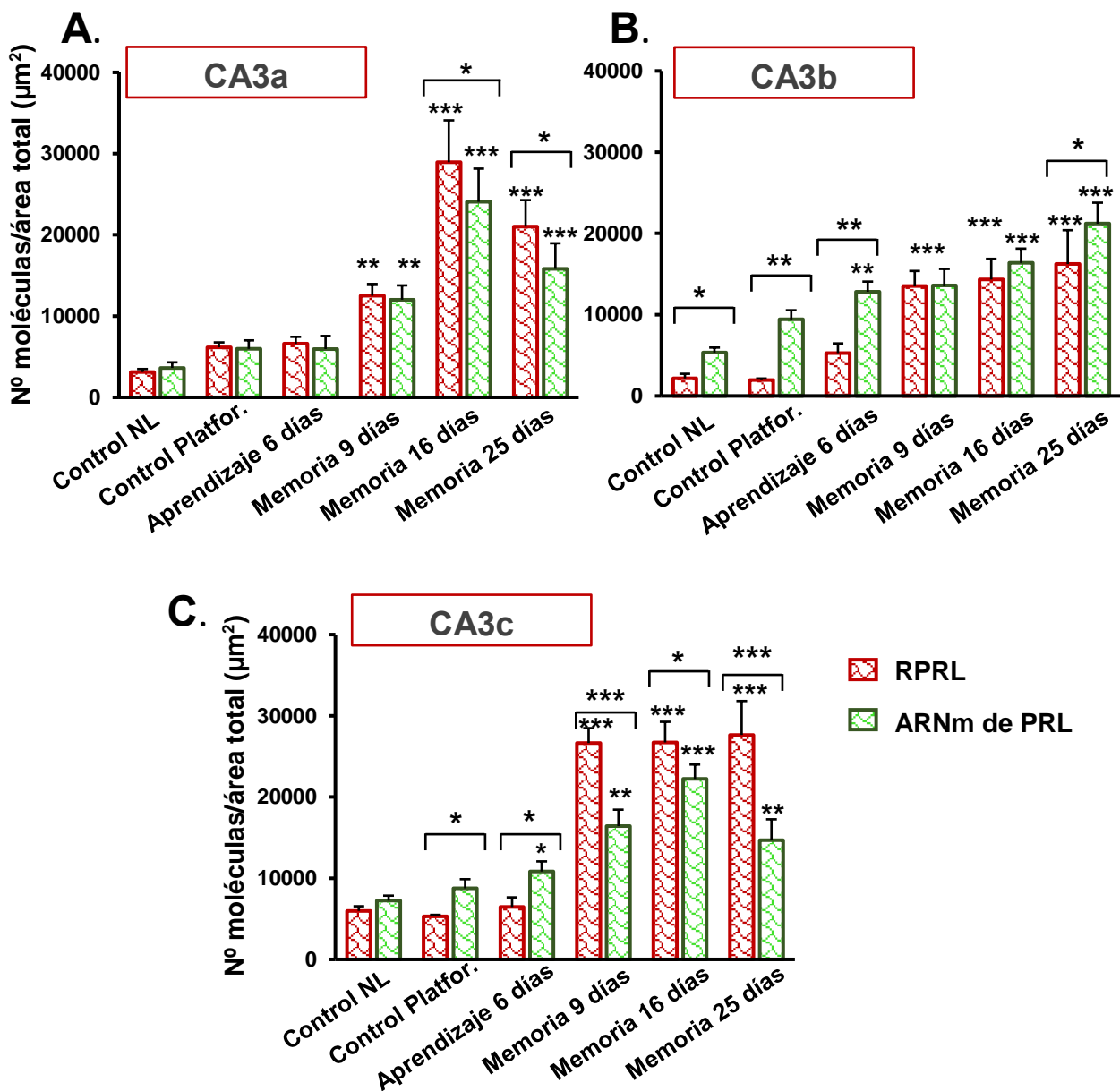
**Figura RD-68.** (A) Porcentaje de área reactiva. Se expresó la media  $\pm$  EEM  $n=5$  animales para condición y 10 imágenes para cada animal, en un área de 500.000  $\text{pix}^2$ . Se realizó la comparación con el Control NL entre los grupos y, RPRL respecto al ARNm de PRL, por ANOVA por el test de Bonferroni (\* $p<0.01$ , \*\* $p<0.001$ , \*\*\* $p<0.0001$ ).

En cuanto, al porcentaje de área reactiva para las moléculas del estudio. Se observó un aumento significativo creciente para la síntesis de PRL en casi todas las regiones de CA3 en comparación con el porcentaje del RPRL.

CA3a y CA3c, mostraban mayor porcentaje para ARNm de PRL (CA3a:  $32.90 \pm 2.79$ , CA3c:  $21.51 \pm 2.94$ ) y para RPRL (CA3a:  $24.11 \pm 4.85$ , CA3c:  $16.41 \pm 4.11$ ) en el grupo Memoria 16 días.

Por otro lado, CA3b, evidenciaba un incremento significativo ( $***p<0.0001$ ) para las condiciones de memoria en ambas moléculas, aunque los valores para Memoria 16 días (ARNm:  $32.68 \pm 3.15$ , RPRL:  $14.55 \pm 2.46$ ) y Memoria 25 días (ARNm:  $31.96 \pm 3.87$ , RPRL:  $13.99 \pm 2.61$ ;) fueron semejantes entre ellos.

CA3c no presentaba diferencias significativas ni para ARNm de PRL, ni para su receptor en todos los grupos que habían sufrido pre-entrenamiento, con un aumento significativo leve en la síntesis de PRL para los que habían consolidado la memoria en Memoria 16 días ( $21.51 \pm 2.94$ ) y 25 días ( $13.59 \pm 1.81$ ). Pero no se observa aumentos en el receptor en ningún grupo, exceptuando el de 16 días.



**Figura RD-69.** N° de moléculas reactivas en el área total. Se realizó la comparación con el Control NL entre los grupos y, RPRL respecto al ARNm de PRL, por ANOVA por el test de Bonferroni ( $*p<0.01$ ,  $**p<0.001$ ,  $***p<0.0001$ ).

El número de moléculas reactivas en toda el área analizada (Figura RD-68), apuntaba que CA3 mostraba resultados que, diferían a lo visto en CA1.

En esta región hipocampal, sobre todo CA3a y CA3b, tenían un aumento significativo ( $*p<0.01$ ) del RPRL frente a la síntesis de PRL.

Para las tres regiones analizadas, sucedió un aumento considerable del RPRL en los grupos que habían consolidado la memoria, en comparativa con los que sólo habían desarrollado un pre-entrenamiento.

CA3a, mostraba un incremento del ARNm de PRL ( $24067.15 \pm 4086.94$ ) en Memoria 16 días y aún, se observaba más aumento del RPRL ( $28945.89 \pm 4152.52$ ) en relación al control NL (*ARNm*:  $05345.11 \pm 609.18$  *PRL*:  $03119.40 \pm 370.74$ ).

Sin embargo, la región CA3b sufrió un aumento creciente de ambas moléculas, desde los controles hasta los grupos de memoria. No obstante, los valores fueron bastante similares, especialmente en Memoria 9 días (*ARNm*:  $13604.27 \pm 2024.45$ , *RPRL*:  $13539.71 \pm 1836.79$ ) y 16 días (*ARNm*:  $16368.47 \pm 1761.26$ , *RPRL*:  $14331.80 \pm 2538.81$ ).

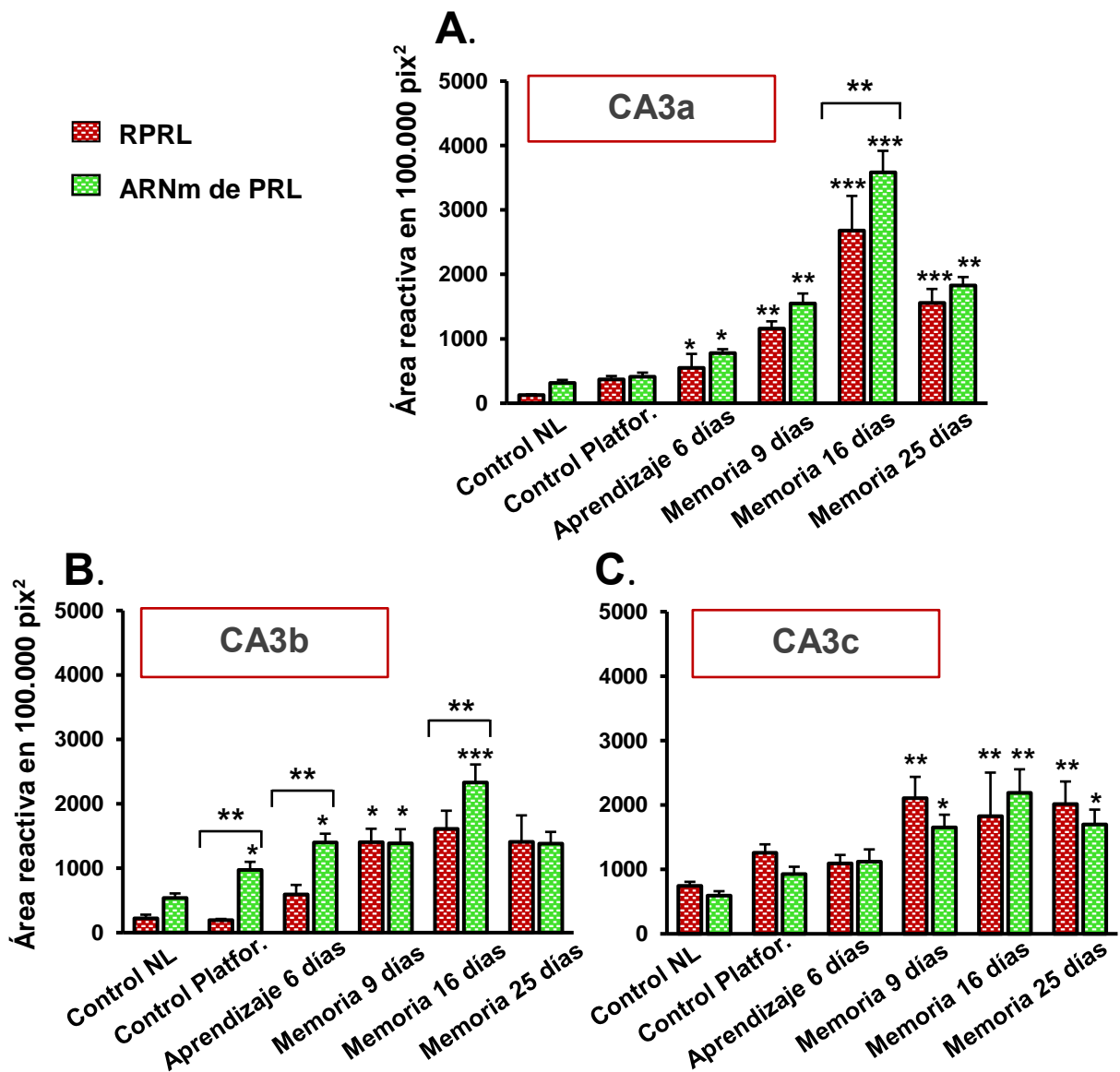
Por otro lado, CA3c, mostró una clara tendencia significativa ( $***p<0.0001$ ), elevándose los resultados del RPRL en los grupos de Memoria 9 días ( $26645.97 \pm 3409.60$ , 16 días ( $26719.41 \pm 5487.62$ ) y 25 días ( $27646.40 \pm 3886.64$ ) en referencia a control NL ( $05981.77 \pm 647.31$ ), control Plataforma ( $05293.31 \pm 742.27$ ) y Aprendizaje 6 días ( $06453.52 \pm 836.75$ ).

Pasando de tener mayores en la hibridación de ARNm que para el RPRL en los pre-entrenados, a ser, justo lo contrario en los animales que habían consolidado la memoria.

El área reactivo en  $100.000 \text{ pix}^2$  (Figura RD-70), se contemplaba un incremento significativo ( $**p<0.001$ ) en la condición de Memoria en relación con lo que se vio en los animales pre-entrenados.

Para CA3a, el área reactiva en Memoria 16 días, sufrió un aumento significativo ( $***p<0.0001$ ), como venía sucediendo a lo largo de este trabajo. Se elevó tanto la síntesis de PRL como el área reactiva del RPRL.

Sin embargo, aunque los resultados en los animales que habían consolidado la memoria fueron mayores. Memoria 9 días ( $RPRL: 1160.63 \pm 110.40$ ,  $ARNm: 1548.72 \pm 154.56$ ) y Memoria 25 días ( $RPRL: 1558.39 \pm 215.16$ ,  $ARNm: 1827.54 \pm 131.89$ ) mostraban datos más elevados que las ratas pre-entrenadas, pero similares entre ellos.



**Figura RD-70.** N° de moléculas reactivas en el área total. Se realizó la comparación con el Control NL entre los grupos y, RPRL respecto al ARNm de PRL, por ANOVA por el test de Bonferroni (\* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$ ).

CA3b mostró áreas reactivas aumentadas, pero semejantes para ARNm de PRL en las condiciones, Aprendizaje 6 días ( $1398.29 \pm 137.53$ ), Memoria 9 ( $1386.48 \pm 219.24$ ) y 25 días ( $1380.53 \pm 183.56$ ). Sufriendo un incremento significativo para la condición Memoria 16 días, en síntesis de PRL ( $2328.81 \pm 281.74$ ) y en su receptor ( $1609.40 \pm 282.95$ ).

El área reactiva en  $100.000 \text{ pix}^2$  en CA3c, fue algo diferente que para las otras dos zonas. También, se mostraba un aumento significativo para las condiciones de consolidación de la memoria, aunque no era tan pronunciado como en otras ocasiones.

Otra desigualdad, se veía en el incremento del área reactiva para la presencia del RPRL en todos los grupos, excepto en el de Memoria 16 días. Con valores similares para Aprendizaje 6 días en ARNm PRL ( $1120.68 \pm 189.66$ ) y en el receptor de la hormona de estudio ( $1092.45 \pm 132.01$ ).

A la vista de los resultados en el análisis de las imágenes confocales en la región CA3 y, tras la observación de la presencia desigual de las dos moléculas estudiadas. Se realizó el estudio cuantificativo del gris medio (UA) para los diferentes estratos de cada región por separado, CA3a, CA3b y CA3c (Tabla RD-33).

Tabla RD-33A

CA3a

GRUPO	IQ para RPRL			ARNm de PRL		
	Gris medio reactivo (UA)			Gris medio reactivo (UA)		
	PIRAMIDAL	RADIADO	ORIENS	PIRAMIDAL	RADIADO	ORIENS
Ctrl NL	15.76±1.28	16.06±0.85	13.74±0.94	16.44±1.37	22.59±1.03	17.77±1.23
Ctrl Plataforma	18.21±0.99	10.85±0.87	14.43±0.75	24.38±1.60	18.15±0.88	18.73±0.87
Aprendizaje 6 días	23.39±1.74	21.22±1.12	19.44±1.29	23.46±2.12	25.47±3.54	27.92±3.28
Memoria 9 días	23.71±0.92	24.86±0.36	26.92±0.62	26.51±0.66	27.28±1.09	24.01±1.03
Memoria 16 días	37.90±0.50	36.93±1.14	36.82±0.88	40.82±1.06	37.13±0.78	33.35±0.64
Memoria 25 días	25.44±0.77	26.42±0.76	27.34±0.96	30.15±1.09	26.32±0.57	23.64±0.54

**Tabla RD-33.** Análisis de la intensidad de reacción del ARNm de PRL y del RPRL en la región CA3 del hipocampo mediante el gris medio reactivo. CA3a (RD-33A), CA3b (RD-33B) y, CA3c (RD-33C). Se valoró todos los estratos, estrato Piramidal, estrato Radiado y estrato Oriens de las tres regiones por separado. Todos los valores están expresados como la media  $\pm$  EEM.

## CA3b

GRUPO	IQ para RPRL			ARNm de PRL		
	Gris medio reactivo (UA)			Gris medio reactivo (UA)		
	PIRAMIDAL	RADIADO	ORIENS	PIRAMIDAL	RADIADO	ORIENS
Ctrl NL	15.56±0.67	10.43±0.49	6.67±0.39	21.27±1.40	23.86±1.29	8.69±1.49
Ctrl Plataforma	18.64±0.93	10.07±0.43	12.57±0.40	34.56±1.89	28.36±1.35	23.15±1.95
Aprendizaje 6 días	26.49±1.14	16.28±0.59	17.74±0.39	36.97±1.09	27.68±0.71	20.96±1.09
Memoria 9 días	27.85±1.39	25.27±1.13	31.02±2.36	38.07±1.18	24.78±0.87	34.68±0.95
Memoria 16 días	31.73±1.88	29.86±2.12	35.91±3.23	42.12±3.25	27.22±1.36	39.41±1.74
Memoria 25 días	28.90±2.10	26.06±1.75	33.49±1.54	38.99±2.75	24.78±2.14	35.20±1.54

Tabla RD-33B

## CA3c

GRUPO	IQ para RPRL			ARNm de PRL		
	Gris medio reactivo (UA)			Gris medio reactivo (UA)		
	PIRAMIDAL	RADIADO	ORIENS	PIRAMIDAL	RADIADO	ORIENS
Ctrl NL	19.73±1.64	17.32±1.66	17.80±1.11	14.10±1.53	17.32±1.66	14.28±2.00
Ctrl Plataforma	19.42±1.48	15.19±2.32	21.78±1.15	13.79±1.37	21.15±1.66	18.26±2.04
Aprendizaje 6 días	23.50±1.56	26.37±2.42	24.64±1.21	17.87±1.45	28.50±1.76	21.12±2.10
Memoria 9 días	23.61±1.62	26.13±2.53	30.00±1.32	17.98±1.51	28.26±1.87	26.48±2.21
Memoria 16 días	34.26±1.68	32.72±2.47	37.59±1.35	28.63±1.57	34.85±1.81	34.07±2.25
Memoria 25 días	31.56±1.88	29.64±2.47	32.77±1.40	25.93±1.77	31.77±1.80	29.25±2.29

Tabla RD-33C

Observando el gris medio reactivo (UA) (Figura RD-71), desde un punto de vista más general, se manifestaba que en las tres regiones de CA3, existió un incremento de la intensidad de reacción para los animales que habían consolidado la memoria, especialmente en el grupo Memoria 16 días.

CA3a (RD-71A), reveló resultados bastante similares en los grupos pre-entendados (*Control Plataforma*, ARNm: 24.38±1.60, RPRL: 18.20±0.99) y Memoria 9 días (ARNm: 23.46±2.12, RPRL: 23.39±1.74) para las dos moléculas estudiadas. Observando un ascenso significativo en Memoria 16 días (ARNm: 40.82±1.06 RPRL: 37.90±0.50) en el estrato Piramidal.



Al mismo tiempo, el estrato Radiado y Oriens, también mostraban un aumento para los grupos que habían consolidado la memoria. Pero, fue de manera más desigual.

Se vio un descenso no significativo del RPRL en control Plataforma (10.85±0.87) en Radiado. Mientras que Oriens, padeció un leve aumento en Memoria 16 días (36.82±0.88) respecto al ARNm de PRL (33.35±0.64).

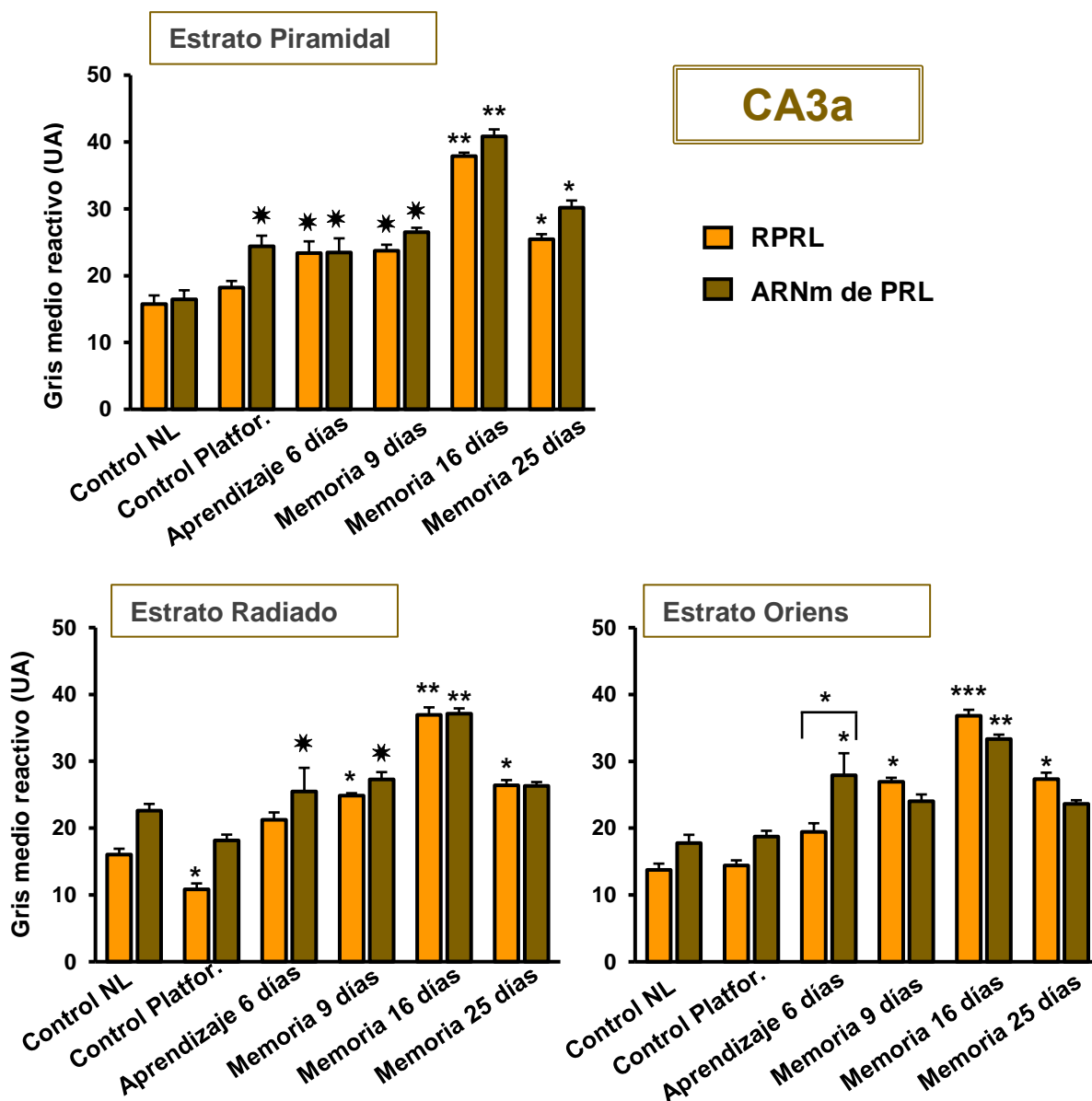


Figura RD-71A

## CA3b

■ RPRL  
■ ARNm de PRL

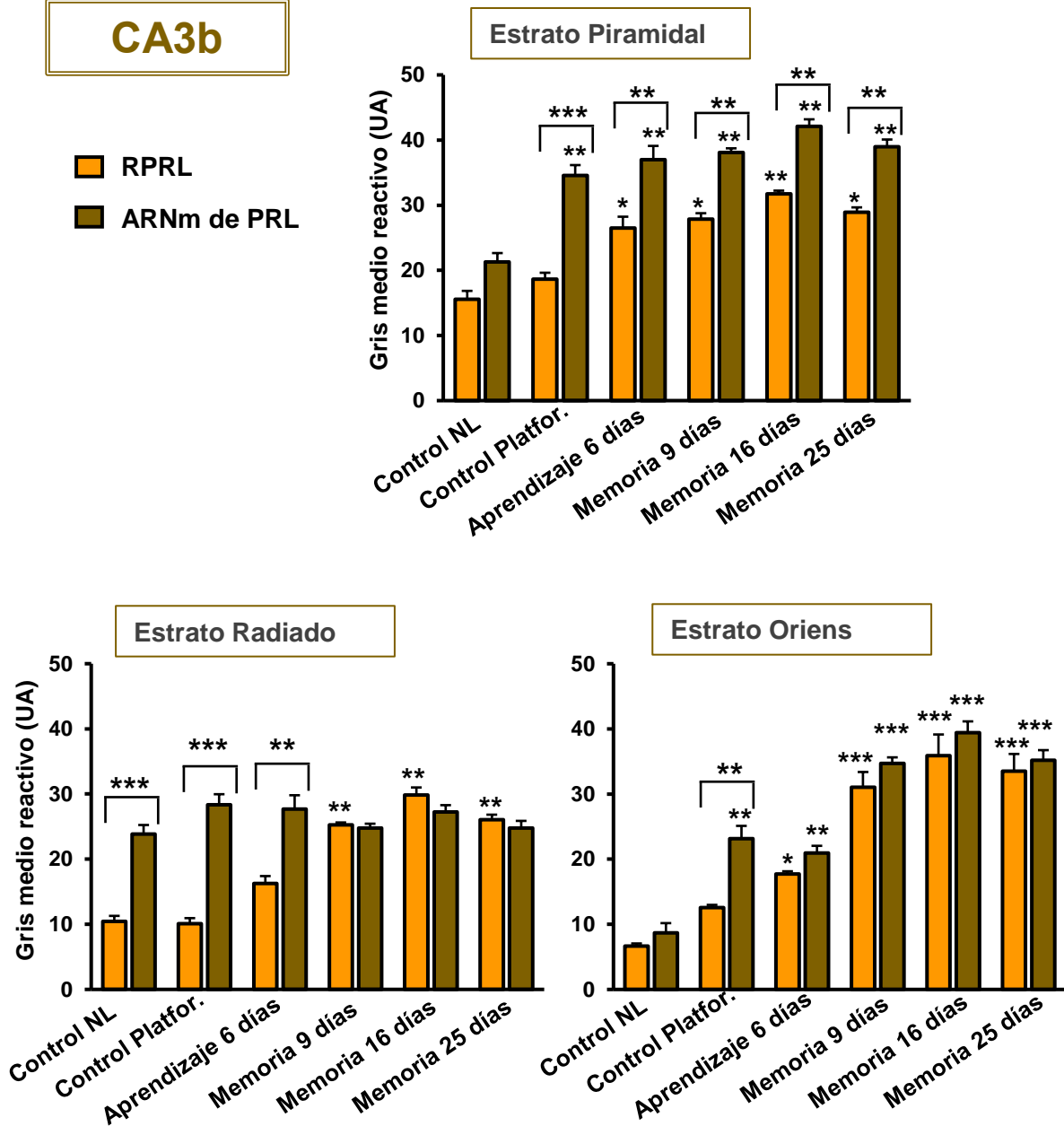


Figura RD-71B

El estudio del gris medio reactivo (UA) de la región CA3b (Figura RD-71B), demostraba un aumento significativo (\*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$ ) del marcador para ARNm de PRL respecto al RPRL.

A la vez que, en estrato Piramidal, el nivel significativo de la síntesis de PRL respecto al receptor, se incrementaba considerablemente (\*\* $p < 0.001$ ) en todos los grupos del estudio (**16 días**, RPRL:  $35.91 \pm 2.36$ , ARNm:  $39.41 \pm 1.74$ ) en comparación con el grupo control NL (RPRL:  $6.67 \pm 0.38$ , ARNm:  $8.68 \pm 1.49$ ).

Al analizar el estrato Radiado, la intensidad del ARNm de PRL se mantuvo en todos los animales del estudio, mostrando un leve aumento no significativo desde el control *Plataforma* ( $RPRL: 10.07 \pm 0.49$ ,  $ARNm: 28.36 \pm 1.35$ ) hasta Memoria 25 días ( $RPRL: 26.06 \pm 1.75$ ,  $ARNm: 24.78 \pm 2.14$ ) respecto a NL ( $RPRL: 10.43 \pm 0.49$ ,  $ARNm: 23.86 \pm 1.29$ ).

Sin embargo, estrato Oriens evidenció resultados semejantes a los que con mayor frecuencia hemos observando durante todo este trabajo. Un aumento gradual para ambas moléculas desde el control NL ( $RPRL: 6.67 \pm 0.39$ ,  $ARNm: 8.69 \pm 1.49$ ) hasta Memoria 16 días ( $RPRL: 35.91 \pm 3.23$ ,  $ARNm: 39.41 \pm 1.74$ ), para sufrir un pequeño descenso en Memoria 25 días ( $RPRL: 33.49 \pm 2.66$ ,  $ARNm: 35.20 \pm 1.54$ ), pero con valores más altos al resto de grupos.

Al mismo tiempo, la región CA3c (Figura RD-71C) en el asta de Amón, manifestaba discrepancia con CA3a y CA3b.

En esta región, todos los estratos mostraban un aumento significativo (\*\* $p < 0.001$ ) por parte del RPRL, en comparación con la intensidad de reacción del ARNm de PRL en los tres estratos y, en todos los grupos estudiados.

Los niveles de gris medio se incrementaban de manera progresiva, desde los animales controles hasta los de memoria.

En el estrato Piramidal, se observaron valores semejantes para control NL ( $ARNm: 14.10 \pm 1.53$ ,  $RPRL: 19.73 \pm 1.64$ ) y *Plataforma* ( $ARNm: 13.79 \pm 1.37$ ,  $RPRL: 19.42 \pm 1.48$ ). A la vez que surgió similitud entre Aprendizaje 6 días ( $ARNm: 17.87 \pm 1.45$ ,  $RPRL: 23.50 \pm 1.45$ ) y Memoria 9 días ( $ARNm: 17.98 \pm 1.51$ ,  $RPRL: 23.61 \pm 1.62$ ). Para continuar con un aumento significativo elevado para Memoria 16 días ( $ARNm: 28.63 \pm 1.57$ ,  $RPRL: 34.26 \pm 1.68$ ) y 25 días ( $ARNm: 25.93 \pm 1.77$ ,  $RPRL: 31.56 \pm 1.88$ ).

En los estratos Radiado y Oriens, también se observó ese aumento por parte de las dos moléculas del análisis; pero, no se produjo ese paralelismo entre los grupos, sino que el incremento fue subiendo de forma paulatina entre las condiciones.

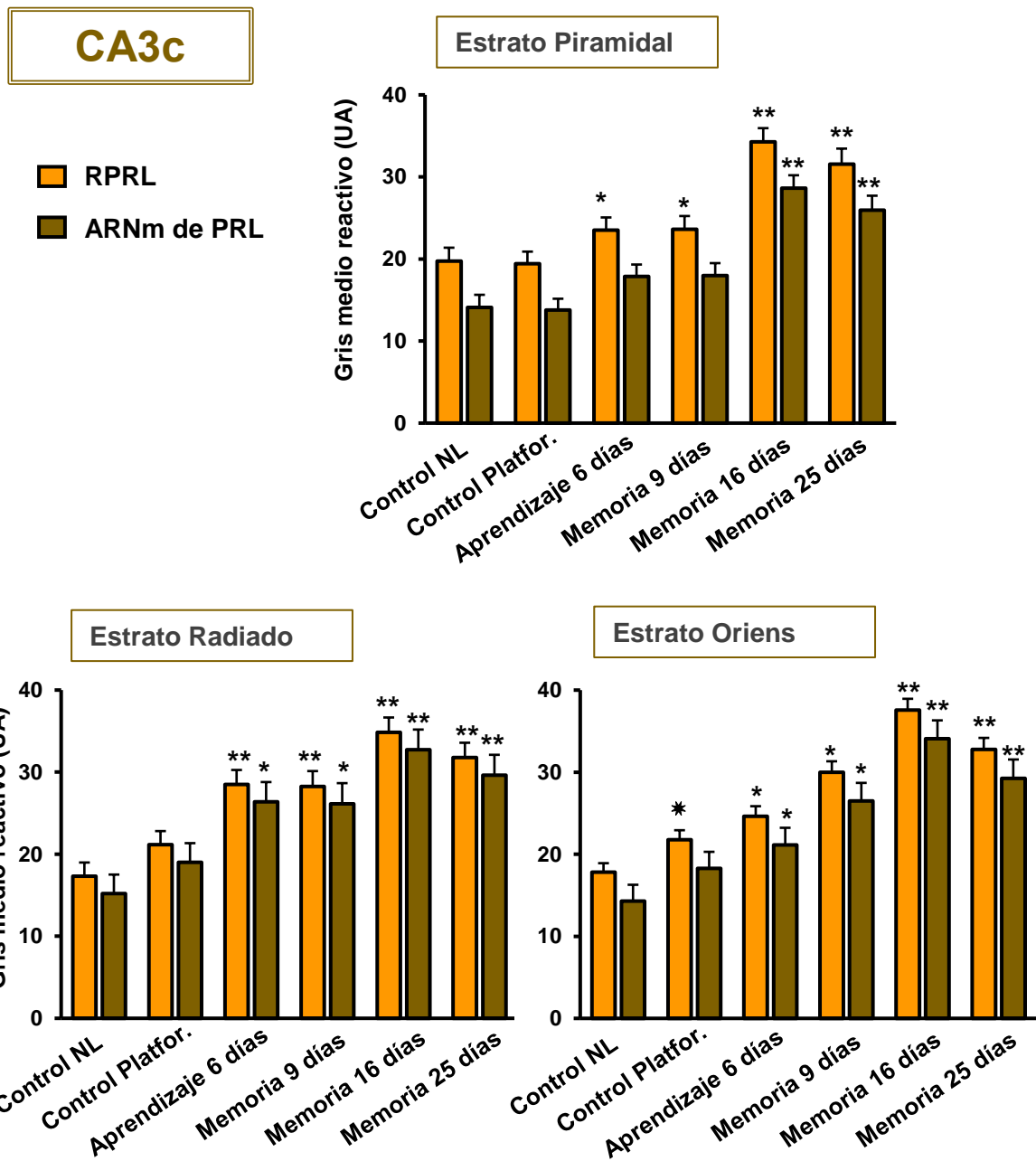
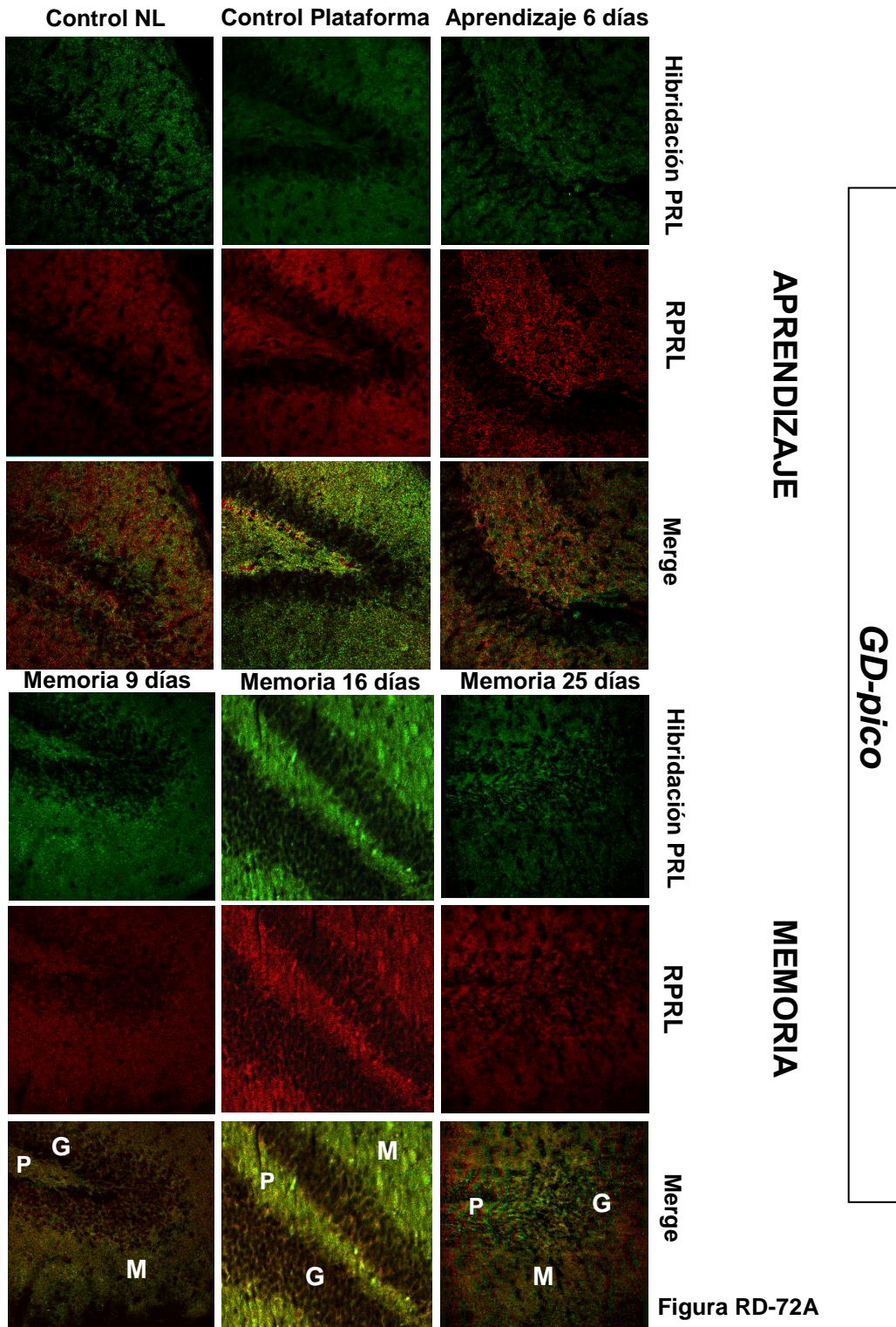


Figura RD-71C

**Figura RD-71.** Intensidad de reacción por la determinación del gris medio (UA), en el área reactiva de las regiones CA3a (RD-71A), CA3b (RD-71B) y CA3c (RD-71C). Los resultados fueron el análisis en imágenes confocales de los grupos del estudio (n=5 animales por cada condición, 6 imágenes por animal y 200 puntos medidos por imagen). Se expresó la media  $\pm$  EEM, se realizó ANOVA mediante el test de Turkey comparando los distintos grupos con el Control NL. Se aplicó el mismo estudio estadístico para comparar RPRL y ARNm de PRL en todas las condiciones. El nivel de significación estadística se expresó como p-valor (\* $p < 0.05$ , \* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.001$  \*\*\* $p < 0.0001$ ).

### 4.2.7-3 CUANTIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS POSITIVAS A ARNm de PRL Y RPRL, EN LA ZONA GD DEL HIPOCAMPO

Mediante el doble marcaje a ARNm de PRL e RPRL, se cuantificaron las células positivas de ambas moléculas en GD. Como se hizo para la región CA1 y CA3.



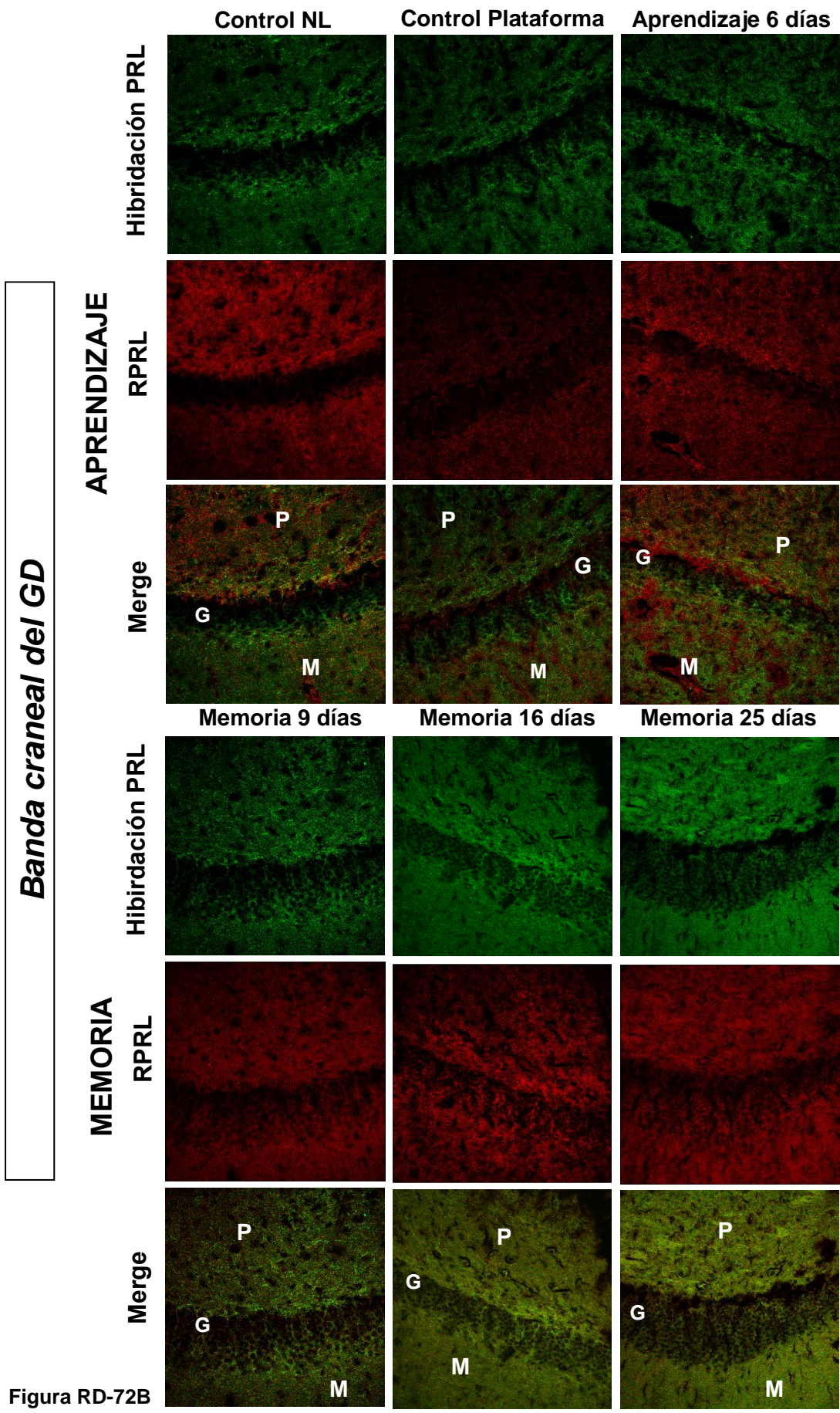


Figura RD-72B

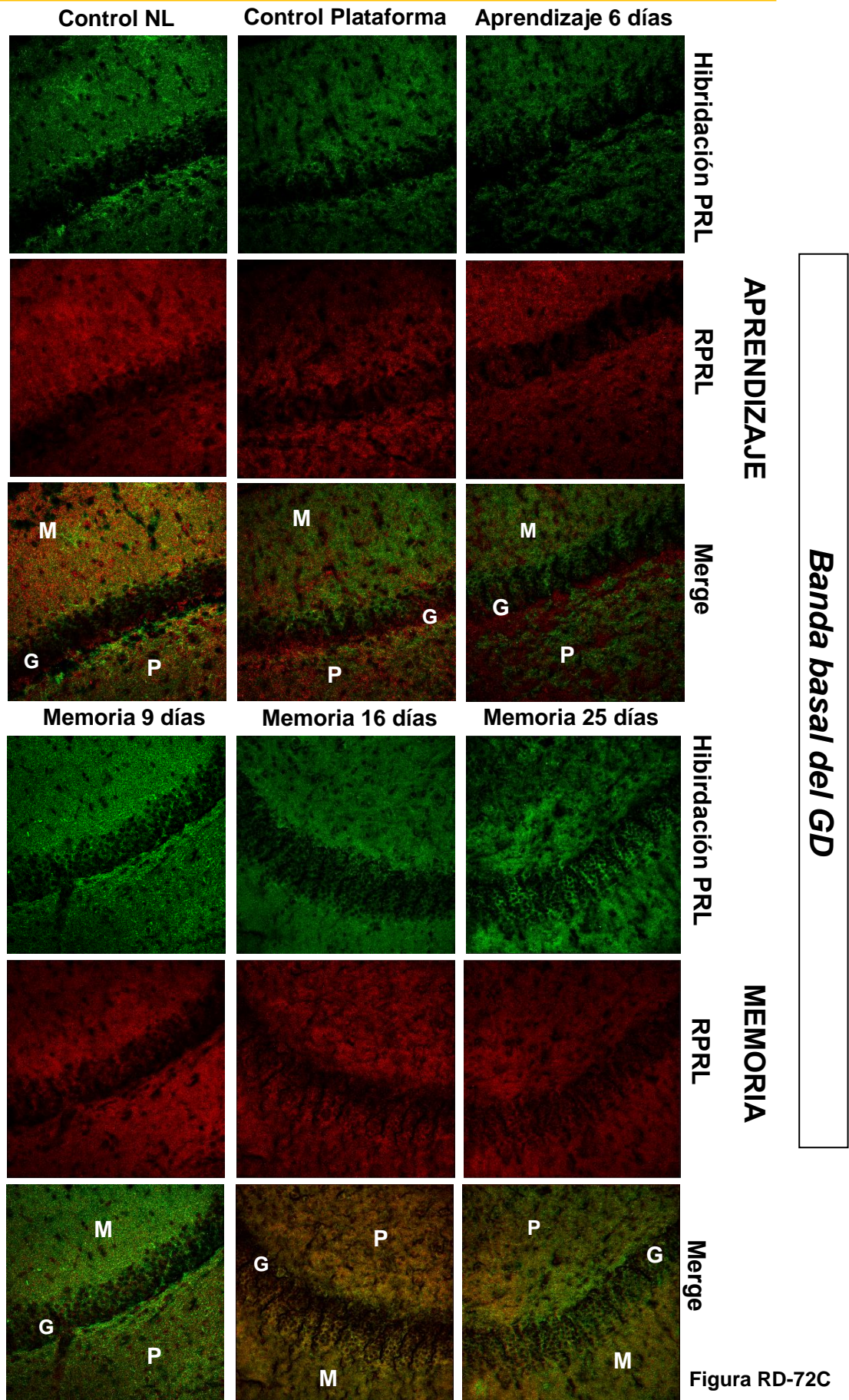


Figura RD-72C

**Figura RD-72.** Hibridación “in situ” de PRL e IQ de RPRL, de la región del GD de hipocampo en ratas machos entrenadas en el MWM. G, Capa Granular, Capa Polimórfica y M, Capa Molecular. Barra de escala 75 µm.

Las imágenes obtenidas con el microscopio confocal de la región GD, ponen de manifiesto la presencia del ARNm de PRL y del RPRL en la zona del pico (Figura RD-72A), en la banda craneal del GD (Figura RD-72B) y, en la banda basal del GD (Figura RD-72C), para todos los grupos analizados.

En el GD la reacción para el ARNm de PRL mostró una disposición muy parecida para todos los grupos estudiados, exceptuando que la intensidad aumentaba progresivamente con la consolidación de la memoria a excepción del pico del GD en los animales de Memoria 25 días.

Si se exceptúa el pico del GD, en el que se dieron variaciones en la localización del RPRL, en el resto del GD se produjo un aumento progresivo del RPRL según se consolidaba la memoria, apreciándose más la reacción en las neuronas granulares del grupo de Memoria 16 días.

Por otro lado, la reacción para RPRL era uniforme, estable, repartida por el citoplasma y en algunas ocasiones en la zona nuclear.

En la capa Granular, como había ocurrido cuando se analizó la hibridación de ARNm en experimentos anteriores. Presentaba una morfología celular en hilera. Con mayor intensidad para ambas moléculas del estudio, en la cercanía a la capa Molecular si hablamos de la banda basal del GD y, próxima a la capa Polimórfica en la banda craneal del GD.

Para todos los casos, se realizó el merge de las imágenes. En él se identificaba la coexistencia de los dos marcadores analizados a la vez en algunas células en color amarillo-anaranjado, sobre todo se vio en la capa Granular. Pero esta coincidencia, no la presentaban todas las células, ni con la misma intensidad.

La coexistencia de ambos marcadores aumentó con la consolidación de la memoria, siendo más evidente en Memoria 16 días.

Las capas Molecular y Polimorfa mostraron un alto nivel de coexistencia en el control Plataforma que fue uno de los grupos con mayor coexistencia en la zona subgranular.



Tras las observaciones de las imágenes en el microscopio confocal y, conociendo cualitativamente la presencia de las dos moléculas del trabajo. Se cuantificó, el porcentaje reactivo (%), el número de moléculas reactivas por el área total (pix<sup>2</sup>) y el área reactiva encontrada en 100.000 pix<sup>2</sup> (Tabla RD-34).

<b>GD pico</b>			
<b>Inmunohistoquímica para RPRL</b>			
<b>GRUPO</b>	<b>Porcentaje de área reactiva (%)</b>	<b>Número de moléculas/área total</b>	<b>Área reactiva en 100.000 pix<sup>2</sup></b>
Ctrl NL	7.07 ± 0.92	04152.80 ± 125.75	0354.40 ± 48.63
Ctrl Plataforma	7.54 ± 0.62	05106.85 ± 297.95	0642.13 ± 51.79
Aprendizaje 6 días	8.32 ± 2.15	06427.00 ± 155.77	0938.52 ± 145.05
Memoria 9 días	8.40 ± 1.89	07494.99 ± 1689.46	0761.45 ± 197.31
Memoria 16 días	27.47 ± 1.96	29165.59 ± 1321.62	3064.14 ± 188.37
Memoria 25 días	28.72 ± 2.67	34365.73 ± 4893.83	3638.99 ± 383.21
<b>Hibridación "in situ" para PRL</b>			
<b>GRUPO</b>	<b>Porcentaje de área reactiva (%)</b>	<b>Número de moléculas/área total</b>	<b>Área reactiva en 100.000 pix<sup>2</sup></b>
Ctrl NL	9.92 ± 1.24	04872.56 ± 502.14	0766.66 ± 64.24
Ctrl Plataforma	10.26 ± 1.11	06422.26 ± 550.80	1140.05 ± 123.47
Aprendizaje 6 días	17.72 ± 1.77	18354.51 ± 3115.68	1370.49 ± 204.50
Memoria 9 días	15.95 ± 2.59	15402.78 ± 1999.88	1994.65 ± 287.40
Memoria 16 días	27.16 ± 1.60	35565.59 ± 1299.28	2907.49 ± 226.70
Memoria 25 días	26.43 ± 1.39	31883.56 ± 2347.20	3881.59 ± 346.72

Tabla RD-34A.

**Tabla RD-34.** Análisis de la intensidad de reacción del ARNm de PRL y del RPRL en la región GD del hipocampo mediante el porcentaje de área reactiva (%), número de moléculas reactivas por el área total (pix<sup>2</sup>) y, el área reactiva medida en 100.000 pix<sup>2</sup>. Todos los valores están expresados como la media ± EEM. Tabla RD-34A, estudio para el pico del GD; Tabla RD-34B, análisis para la banda craneal del GD y Tabla RD-34C, cuantificación para la banda basal del GD.

## Banda craneal del GD

## Inmunohistoquímica para RPRL

GRUPO	Porcentaje de área reactiva (%)	Número de moléculas/área total	Área reactiva en 100.000 pix <sup>2</sup>
Ctrl NL	5.71 ± 0.54	02271.78 ± 706.17	0566.08 ± 60.05
Ctrl Plataforma	9.69 ± 1.07	04328.77 ± 727.17	1054.30 ± 324.24
Aprendizaje 6 días	11.89 ± 0.91	10809.22 ± 524.24	1109.75 ± 93.52
Memoria 9 días	15.38 ± 2.71	13239.60 ± 2374.83	1693.05 ± 273.21
Memoria 16 días	22.39 ± 1.95	22199.10 ± 1110.68	2315.29 ± 236.48
Memoria 25 días	36.20 ± 7.07	28788.69 ± 2182.84	2600.00 ± 402.54

## Hibridación "in situ" para PRL

GRUPO	Porcentaje de área reactiva (%)	Número de moléculas/área total	Área reactiva en 100.000 pix <sup>2</sup>
Ctrl NL	5.81 ± 0.59	03613.48 ± 2439.16	0693.58 ± 60.92
Ctrl Plataforma	5.86 ± 1.13	06349.18 ± 674.84	1347.45 ± 185.97
Aprendizaje 6 días	18.54 ± 2.34	19753.61 ± 1148.70	1550.15 ± 304.84
Memoria 9 días	18.63 ± 1.60	25082.03 ± 1202.30	2218.88 ± 180.92
Memoria 16 días	30.05 ± 3.21	27461.22 ± 1317.95	3267.13 ± 354.17
Memoria 25 días	32.26 ± 2.58	32512.12 ± 1357.30	3601.41 ± 293.13

Tabla RD-34B

## Banda basal del GD

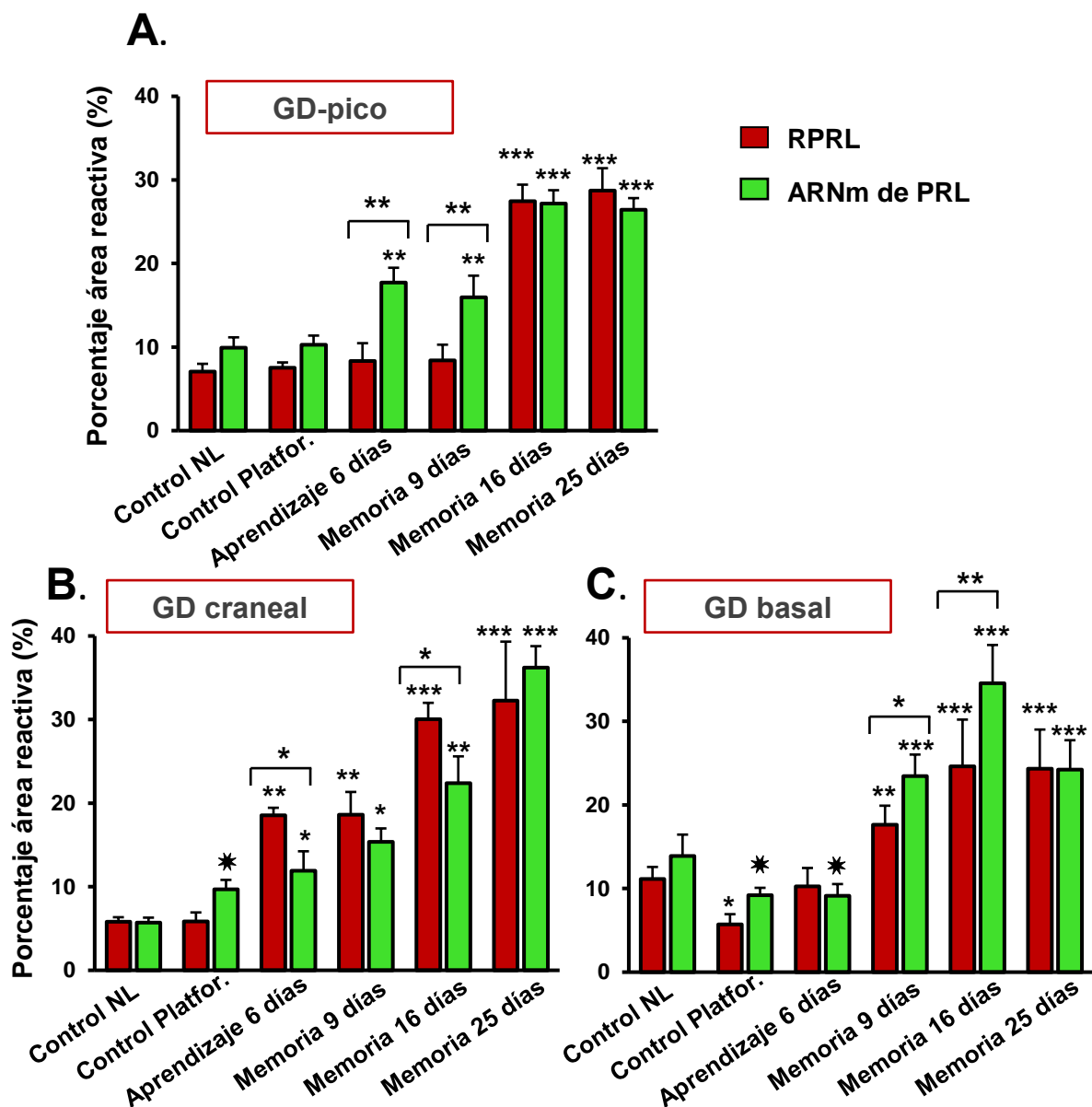
## Inmunohistoquímica para RPRL

GRUPO	Porcentaje de área reactiva (%)	Número de moléculas/área total	Área reactiva en 100.000 pix <sup>2</sup>
Ctrl NL	13.90 ± 2.55	17339.79 ± 2595.50	1240.03 ± 258.58
Ctrl Plataforma	9.19 ± 0.89	15394.47 ± 1251.68	0624.63 ± 115.59
Aprendizaje 6 días	9.15 ± 1.39	19182.05 ± 2034.479	1350.98 ± 202.70
Memoria 9 días	23.47 ± 2.56	23784.99 ± 6229.90	1733.59 ± 467.78
Memoria 16 días	34.57 ± 4.58	22763.61 ± 4204.90	3071.97 ± 330.51
Memoria 25 días	24.22 ± 3.53	30385.77 ± 5798.09	2793.55 ± 419.40

## Hibridación "in situ" para PRL

GRUPO	Porcentaje de área reactiva (%)	Número de moléculas/área total	Área reactiva en 100.000 pix <sup>2</sup>
Ctrl NL	13.90 ± 1.42	26878.70 ± 1145.71	1445.26 ± 157.89
Ctrl Plataforma	5.71 ± 1.22	24201.03 ± 5263.74	1058.83 ± 131.80
Aprendizaje 6 días	10.26 ± 2.19	36096.01 ± 5805.66	1566.43 ± 185.66
Memoria 9 días	17.62 ± 2.29	35374.46 ± 1487.95	2607.66 ± 284.95
Memoria 16 días	24.62 ± 5.59	41402.47 ± 1655.56	3507.53 ± 376.29
Memoria 25 días	24.34 ± 4.68	29471.94 ± 4879.81	3413.06 ± 401.81

Tabla RD-34C



**Figura RD-73.** (A) Porcentaje de área reactiva. Se expresó la media  $\pm$  EEM  $n=5$  animales por cada condición y 10 imágenes para cada animal, en un área de 500.000 pix<sup>2</sup>. Se realizó la comparación con el Control NL entre los grupos, RPRL respecto al ARNm de PRL, por ANOVA por el test de Bonferroni (\* $p<0.05$ , \* $p<0.01$ , \*\* $p<0.001$ , \*\*\* $p<0.0001$ ).

El porcentaje de área reactiva (Figura RD-73), aumento de forma significativa (\*\* $p<0.0001$ ) en Memoria 16 y 25 días en todas las regiones de GD estudiadas.

La región del pico, presentó valores similares para Memoria 16 días (RPRL:  $27.47 \pm 1.96$ , ARNm:  $27.16 \pm 1.60$ ) y 25 días (RPRL:  $28.72 \pm 2.67$ , ARNm:  $26.43 \pm 1.39$ ), siempre superiores a lo visto para el control NL (RPRL:  $7.07 \pm 0.92$ , ARNm:  $9.92 \pm 1.24$ ) o plataforma (RPRL:  $7.54 \pm 0.62$ , ARNm:  $10.26 \pm 1.11$ ) tanto para la síntesis de PRL como para la presencia de su receptor.

Únicamente, se observaron diferencias significativas (\*\* $p < 0.001$ ) entre el porcentaje de ARNm de PRL y RPRL para las condiciones Aprendizaje 6 días y Memoria 9 días.

En la banda craneal del GD aumentaron las dos moléculas estudiadas para los animales de memoria. Especialmente, ese aumento se veía para el RPRL, que tomaba valores más altos respecto al ARNm de PRL en todos los grupos, exceptuando Memoria 25 días.

Por otro lado, la banda basal del GD, mostró un crecimiento ascendente en los animales de consolidación de la memoria para el porcentaje reactivo de ARNm de PRL; aunque los resultados para RPRL fueron altos, eran menores que para el ARNm.

En el análisis del número de moléculas reactivas (Figura RD-74) en el área total (500.000  $\text{pix}^2$ ), se observó un aumento significativo (\*\* $p < 0.0001$ ) en Memoria 16 y 25 días en la región del pico y en la banda craneal del GD, para las dos moléculas del estudio.

El incremento de moléculas positivas a ARNm de PRL y de su receptor fue muy llamativo desde el grupo Aprendizaje 6 días (*ARNm*:  $18354.51 \pm 3115.68$  *RPRL*:  $06427.00 \pm 155.77$ ) hasta Memoria 25 días (*ARNm*:  $31883.56 \pm 2347.20$ , *RPRL*:  $34365.73 \pm 4893.83$ ), en relación a control NL (*ARNm*:  $04872.56 \pm 502.14$ , *RPRL*:  $04152.80 \pm 125.75$ ) y control Plataforma (*ARNm*:  $06422.26 \pm 550.80$ , *RPRL*:  $05106.85 \pm 297.95$ ) en las tres regiones del estudio, pero especialmente en la banda craneal del GD.

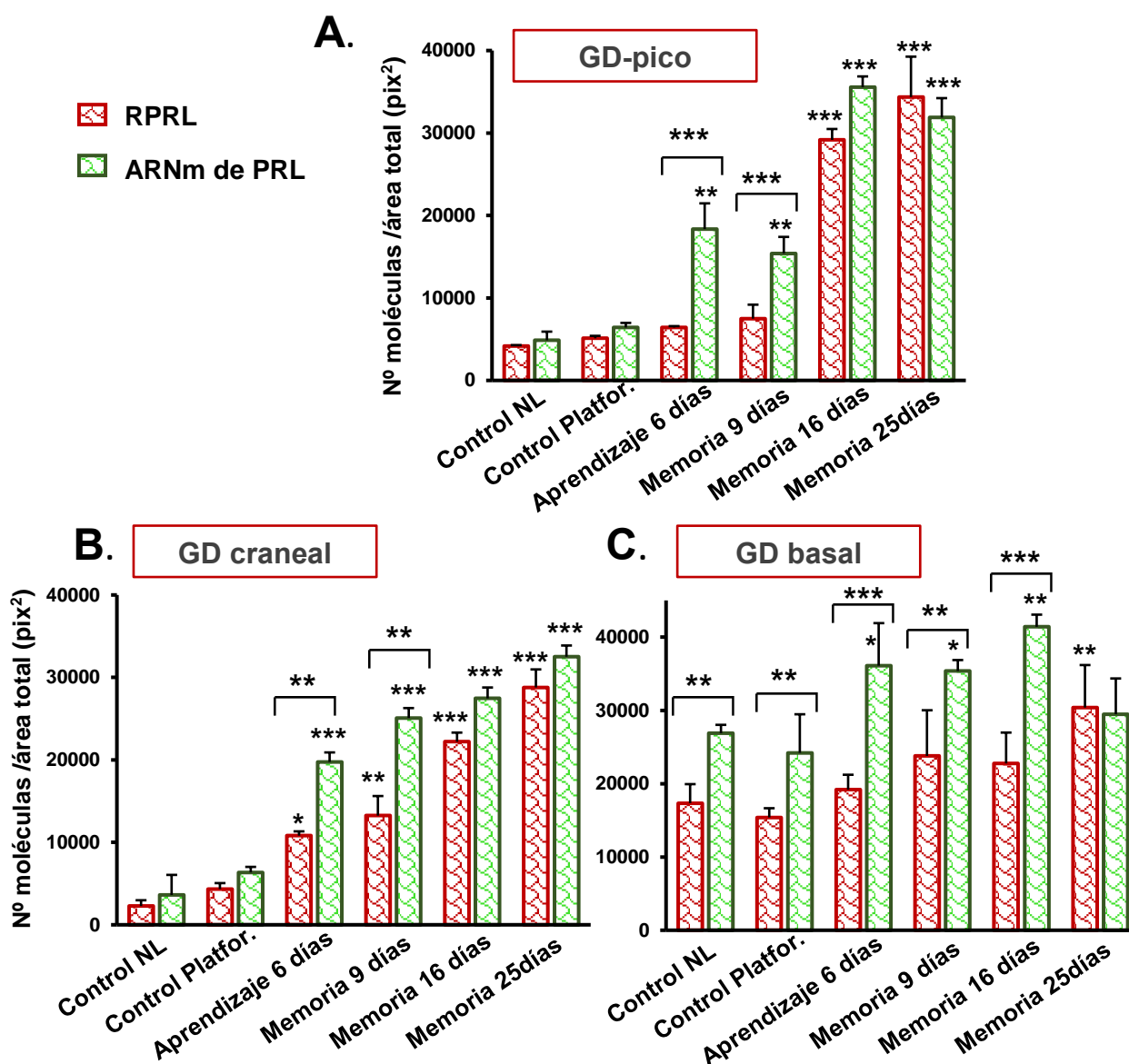
Las tres regiones del GD, tenían mayor número de moléculas reactivas para el ARNm de PRL que para el RPRL.

En el pico del GD, el RPRL fue semejante en los controles (*NL*:  $04152.80 \pm 125.75$ ; *Plataforma*:  $05106.85 \pm 297.95$ ), aprendizaje ( $06427.00 \pm 155.77$ ) y memoria 9 días ( $07494.99 \pm 1689.46$ ), disparándose los valores en Memoria 16 días ( $29165.59 \pm 1321.62$ ) y Memoria 25 días ( $34365.73 \pm 4893.83$ ).

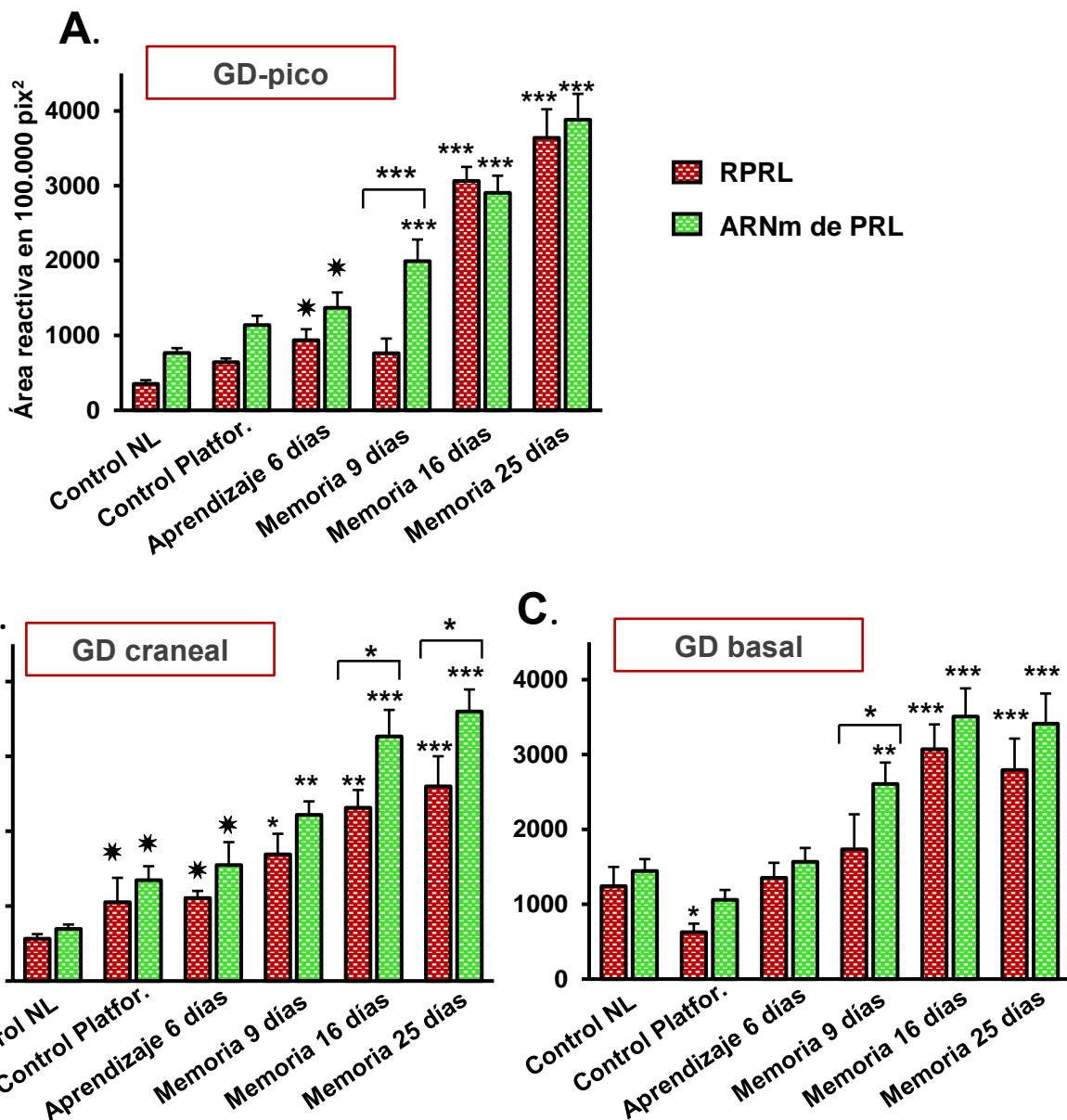
Por otro lado, la banda craneal del GD sufrió un crecimiento gradual desde los animales pre-entrenados a los que consolidaron la memoria.

La banda basal del GD, aunque presentó un incremento igual que la craneal, presentó una estabilidad para el RPRL, con un aumento leve no significativo entre los grupos.

En esta región al comparar niveles de RPRL y los de ARNm de PRL, se comprobó que no seguían la misma tendencia. Siempre significativamente mayores los valores para el ARNm que para el RPRL.



**Figura RD-74.** Nº de moléculas reactivas en el área total. Se realizó la comparación con el Control NL entre los grupos y, RPRL respecto al ARNm de PRL en 500.000 pix<sup>2</sup> analizados, por ANOVA por el test de Bonferroni (\*p<0.01, \*\*p<0.001, \*\*\*p<0.0001).



**Figura RD-75.** Área reactiva en 100.000 pix<sup>2</sup>. Se realizó la comparación con el Control NL entre los grupos y, RPRL respecto al ARNm de PRL en 500.000 pix<sup>2</sup> analizados, por ANOVA por el test de Bonferroni (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

Al analizar el área reactiva en 100.000 pix<sup>2</sup> (Figura RD-75), se mostró un aumento significativo paulatino (\*\*\* $p < 0.0001$ ), relacionado con la síntesis de PRL y de su receptor.

El aumento fue más llamativo para ARNm de PRL en las tres regiones de GD, que para el RPRL.

En las regiones del GD analizadas, el área reactiva aumentó en Memoria 25 días, respecto al resto de grupos, a diferencia de CA1 y CA3, que indicaron mayor aumento en Memoria 16 días.

Siendo muy semejante a los 25 y a los 16 días en la banda basal, (**25 días:** ARNm: 3413.06  $\pm$  401.81, RPRL: 2793.55  $\pm$  419.40), ese incremento fue bastante semejante a lo visto en 16 días (**16 días:** ARNm: 3507.53  $\pm$  376.29, RPRL: 3071.97  $\pm$  330.51).

La relación ARNm de PRL y RPRL entre los diferentes grupos, se vio muy similar, sin diferencias significativas. Sólo algunas condiciones mostraban niveles significativos distintos entre ellos. Como se observó en la región del pico del GD en el grupo Memoria 9 días (ARNm: 2218.88  $\pm$  180.92, RPRL: 1693.05  $\pm$  273.21) o, en la región de la banda craneal del GD dorsal en los animales que habían consolidado la memoria a los 16 días (ARNm: 3267.13  $\pm$  354.17, RPRL: 2315.29  $\pm$  236.48) y 25 días (ARNm: 3601.41  $\pm$  293.13, RPRL: 2600.00  $\pm$  402.54).

Como sucedió en las regiones CA1 y CA3, el nivel de intensidad de la reacción no se daba para todas las células por igual. A la vez, se observaron diferencias entre las distintas capas que formaban la región del GD.

Por esta razón, se realizó un análisis cuantitativo de esta intensidad reactiva determinando el gris medio reactivo (UA) en todas las capas del GD del estudio, capa Granular; capa Molecular y capa Polimórfica (Tabla RD-35)

GRUPO	IQ para RPRL			ARNm de PRL		
	Gris medio reactivo (UA)			Gris medio reactivo (UA)		
	GRANULAR	MOLECULAR	POLIMORFICA	GRANULAR	MOLECULAR	POLIMORFICA
Ctrl NL	15.13 $\pm$ 0.58	11.44 $\pm$ 1.18	13.40 $\pm$ 0.67	18.99 $\pm$ 0.71	13.57 $\pm$ 0.78	17.93 $\pm$ 1.16
Ctrl Plataforma	17.68 $\pm$ 0.64	13.72 $\pm$ 1.24	21.49 $\pm$ 0.77	21.54 $\pm$ 0.78	16.85 $\pm$ 0.84	26.02 $\pm$ 1.26
Aprendizaje 6 días	22.22 $\pm$ 0.70	15.82 $\pm$ 1.26	24.27 $\pm$ 0.81	26.08 $\pm$ 0.84	18.95 $\pm$ 0.86	28.80 $\pm$ 1.30
Memoria 9 días	25.39 $\pm$ 0.83	29.73 $\pm$ 1.54	24.26 $\pm$ 0.95	19.25 $\pm$ 0.96	29.86 $\pm$ 1.14	28.79 $\pm$ 1.44
Memoria 16 días	30.95 $\pm$ 0.87	24.33 $\pm$ 1.43	32.16 $\pm$ 1.02	34.81 $\pm$ 1.01	27.46 $\pm$ 1.03	37.69 $\pm$ 1.51
Memoria 25 días	37.25 $\pm$ 0.82	27.40 $\pm$ 1.38	31.43 $\pm$ 1.08	37.11 $\pm$ 0.96	28.53 $\pm$ 0.98	35.96 $\pm$ 1.57

Tabla RD-35A

## Banda craneal del GD

GRUPO	IQ para RPRL			ARNm de PRL		
	<i>Gris medio reactivo (UA)</i>			<i>Gris medio reactivo (UA)</i>		
	GRANULAR	MOLECULAR	POLIMORFICA	GRANULAR	MOLECULAR	POLIMÓRFICA
<b>Ctrl NL</b>	14.50±0.54	12.78±1.45	12.34±1.57	16.16±1.76	17.53±0.26	14.67±1.69
<b>Ctrl Plataforma</b>	19.37±0.68	20.09±1.40	22.89±1.33	21.03±1.90	24.84±0.22	20.22±1.45
<b>Aprendizaje 6 días</b>	21.53±0.98	22.28±1.53	24.26±1.34	23.19±2.20	27.03±0.38	24.59±1.46
<b>Memoria 9 días</b>	28.39±0.73	25.14±1.64	28.80±1.26	28.09±1.95	29.89±0.48	26.58±1.38
<b>Memoria 16 días</b>	32.96±0.93	28.65±1.61	31.42±1.59	32.66±2.15	33.40±1.41	28.19±1.71
<b>Memoria 25 días</b>	26.69±0.72	25.92±1.55	26.86±1.36	26.39±1.94	28.12±0.64	24.63±1.48

Tabla RD-35B

## Banda basal del GD

GRUPO	IQ para RPRL			ARNm de PRL		
	<i>Gris medio reactivo (UA)</i>			<i>Gris medio reactivo (UA)</i>		
	GRANULAR	MOLECULAR	POLIMORFICA	GRANULAR	MOLECULAR	POLIMÓRFICA
<b>Ctrl NL</b>	11.38±0.57	16.03±0.72	16.96±2.02	12.53±0.19	16.99±1.40	17.87±0.38
<b>Ctrl Plataforma</b>	13.64±0.67	18.38±0.68	24.26±2.05	14.79±0.29	19.34±1.36	25.17±0.41
<b>Aprendizaje 6 días</b>	21.49±0.71	21.57±0.78	24.85±1.40	22.64±0.33	23.03±1.46	25.76±0.39
<b>Memoria 9 días</b>	21.64±0.73	27.32±0.90	27.07±1.37	22.79±0.36	28.79±1.58	27.98±0.36
<b>Memoria 16 días</b>	30.26±0.91	33.47±0.96	34.06±1.50	31.41±0.53	38.07±1.64	34.06±1.39
<b>Memoria 25 días</b>	28.43±0.62	27.51±1.01	27.76±1.57	29.58±0.54	29.11±1.69	29.13±0.98

Tabla RD-35C

**Tabla RD-35..** Análisis de la intensidad de reacción del ARNm de PRL y del RPRL en la región GD del hipocampo mediante el gris medio (UA). Tabla RD-31A, estudio para el pico del GD; Tabla R1D-3B, análisis para la banda craneal del GD dorsal y Tabla RD-31C, cuantificación para la banda basal del GD ventral. Se analizó por separado todas las capa Granular, capa Polimórfica y capa Molecular del GD en cada región. Todos los valores están expresados como la media ± EEM.



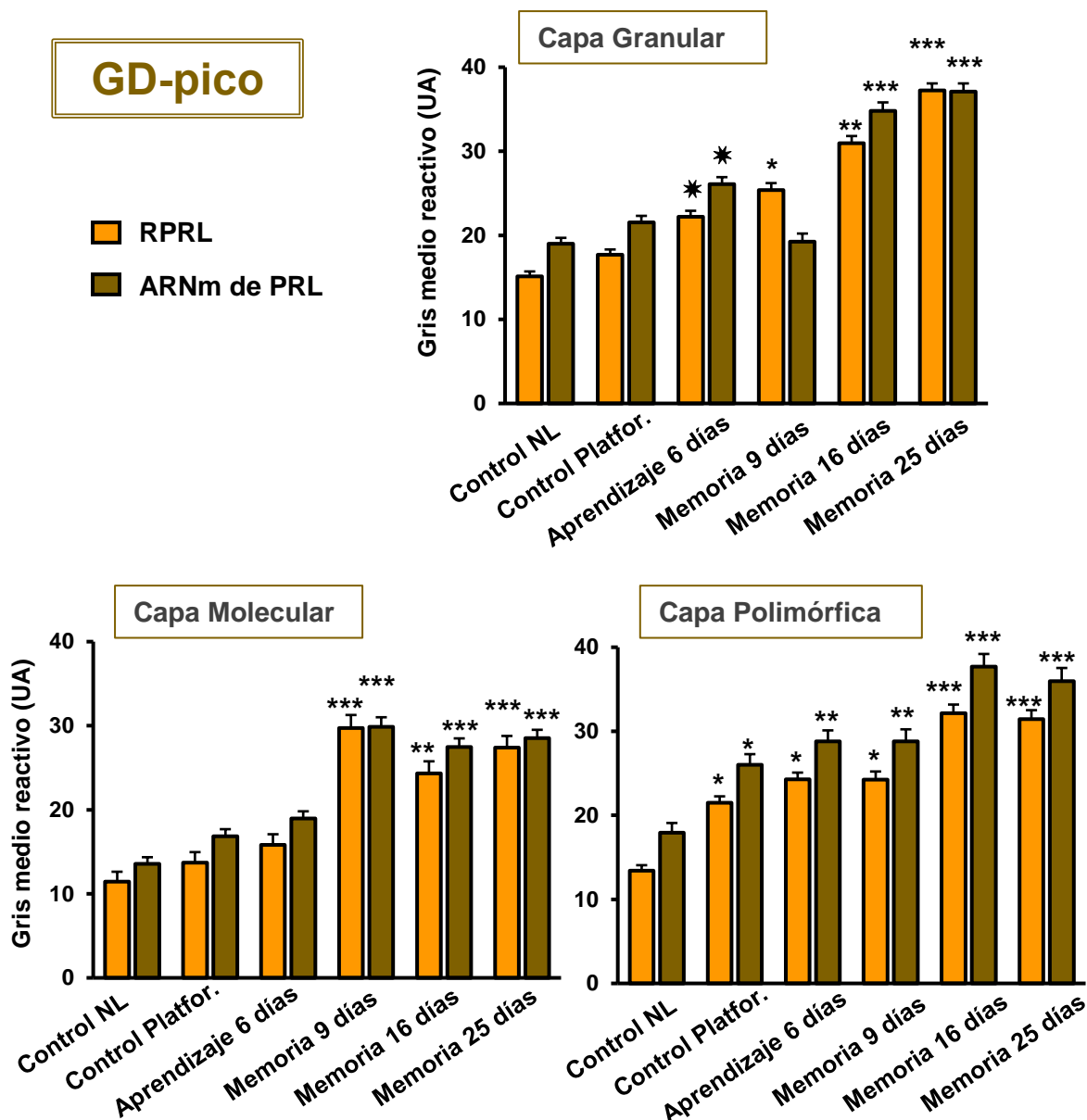


Figura RD-76A

El gris medio en la región del pico del GD, aumentó significativamente (\*\* $p < 0.001$ ) en la síntesis de PRL y en su receptor, en todas las capas analizadas, para los animales que habían consolidado la memoria.

Ningún grupo presentó diferencias significativas en la comparación de la intensidad reactiva para RPRL y ARNm de PRL.

La capa Granular y la Polimórfica, eran las que indicaban mayor gris medio en Memoria 16 y 25 días en referencia al grupo control NL.

En la capa Molecular, el gris medio en RPRL y ARNm de PRL fue similar y superior desde Memoria 9 días hasta Memoria 25 días.

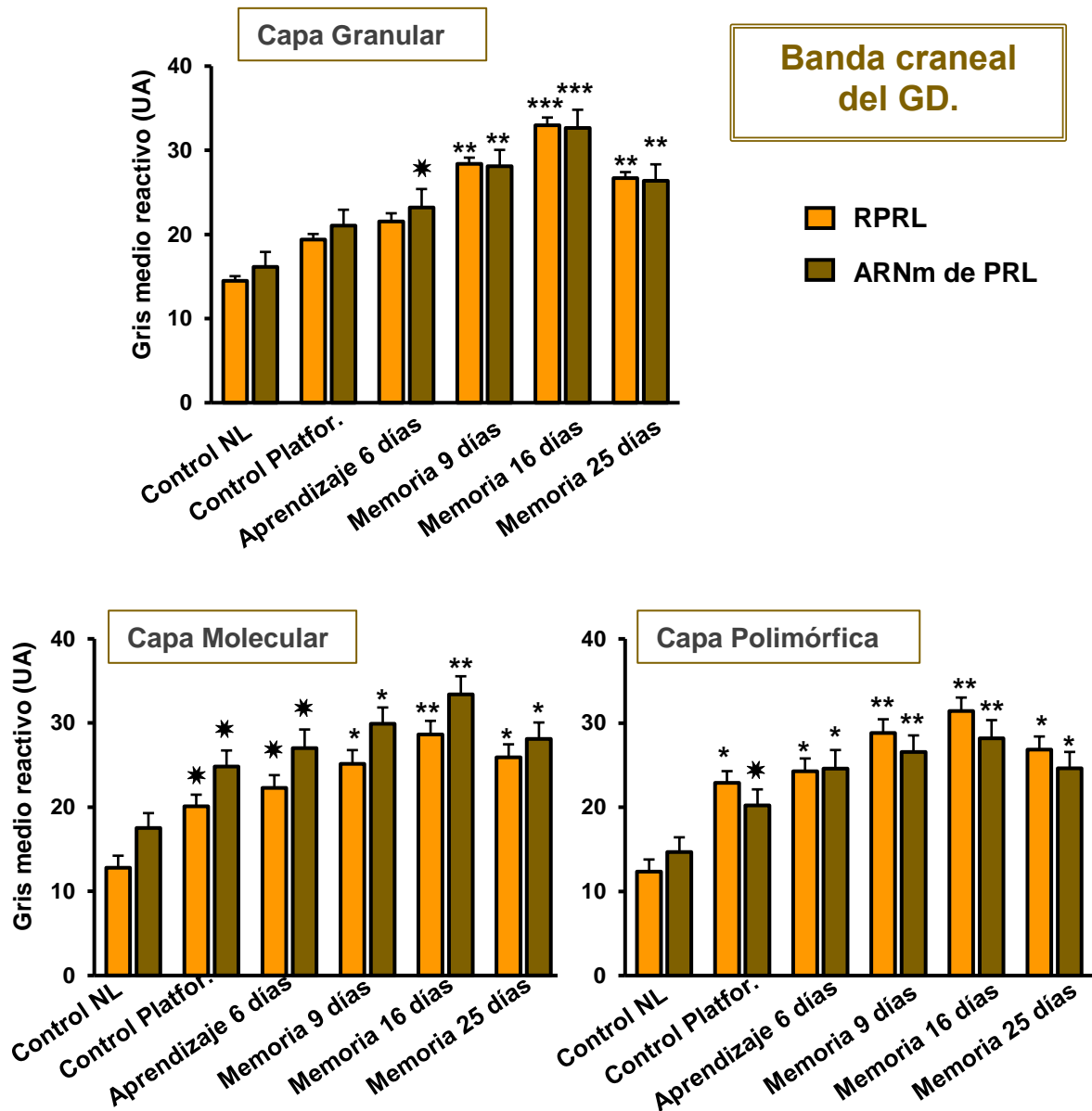


Figura RD-76B

En la capa Granular de la banda craneal del GD (Figura RD-76B), ambos marcadores aumentaron significativamente (\*\* $p < 0.001$ ) en los grupos Memoria. Sin diferencias significativas entre la relación de intensidad de ARNm de PRL y RPRL.

La capa Molecular, presentó un incremento no significativo en el ARNm de PRL en relación con el RPRL para todas las condiciones. Al contrario que en la capa Polimórfica que fue el RPRL el que sufrió esa elevación.

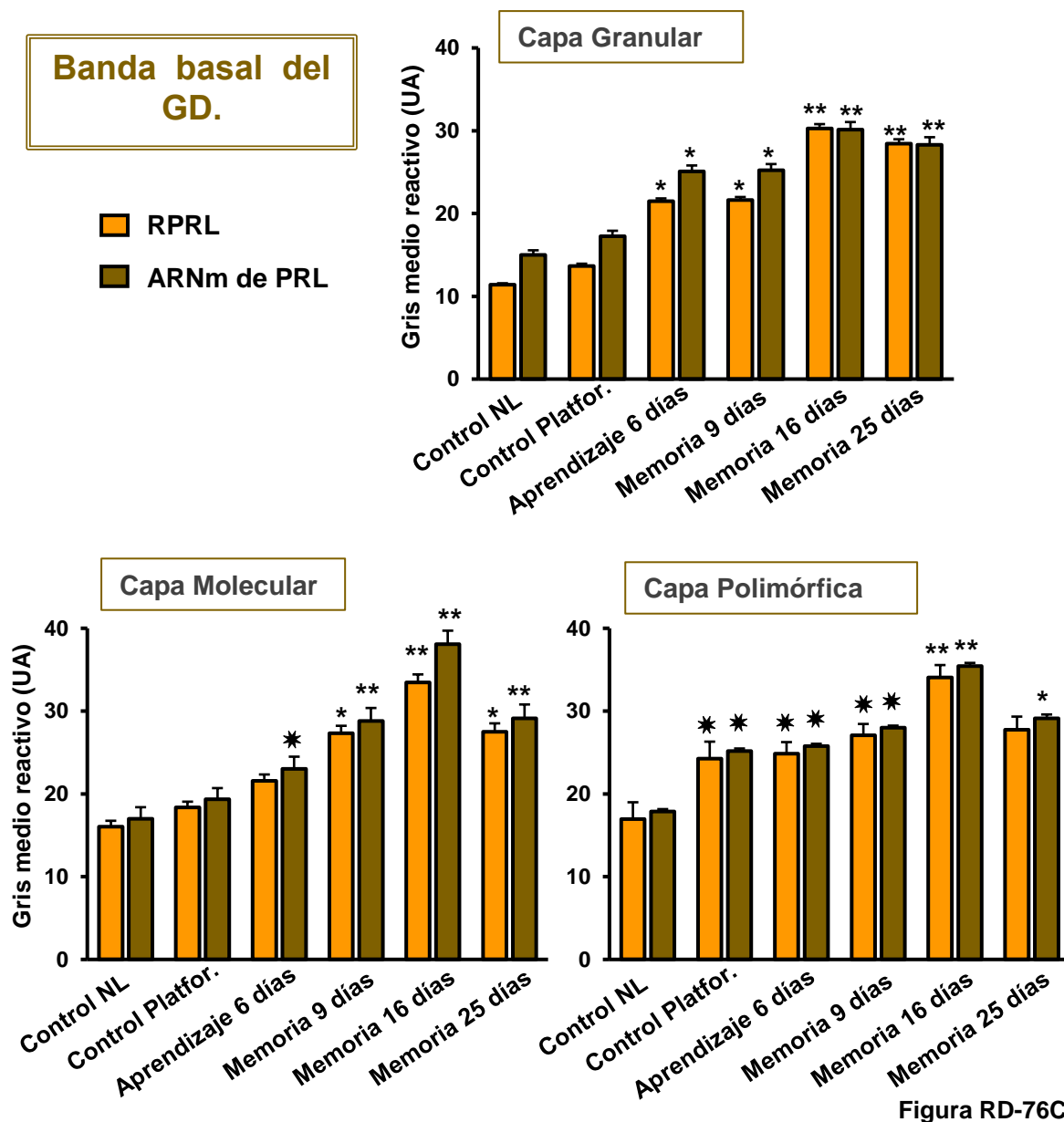


Figura RD-76C

**Figura RD-76.** Intensidad de reacción medida por la determinación del gris medio (UA) del área reactiva en las capas del pico GD (76A), dorsal (76B) y ventral (76C). Los resultados fueron el análisis de imágenes confocales de los grupos del estudio (n=5 animales por cada condición, 6 imágenes por animal y 200 puntos medidos por imagen). Se expresó la media  $\pm$  EEM, se realizó ANOVA mediante el test de Turkey comparando los distintos grupos con el Control NL. Se aplicó el mismo estudio estadístico para comparar RPRL y ARNm de PRL en todas las condiciones. El nivel de significación estadística se expresó como (\* $p < 0.05$ , \* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.001$  \*\*\* $p < 0.0001$ ).

Los resultados en la región de la banda basal del GD para todas las capas, fueron similares que para pico y la banda craneal, observándose un aumento significativo de las dos moléculas analizadas para los grupos de consolidación de la memoria.

#### 4.2.7-4 CUANTIFICACIÓN DE LAS CÉLULAS POSITIVAS A ARNm de PRL Y RPRL, EN LA REGIÓN CA4 DEL HIPOCAMPO

Se cuantificaron las células positivas de ambas moléculas en la región de CA4 de hipocampo. Siguiendo el mismo orden establecido que para la región CA, CA3 y GD.

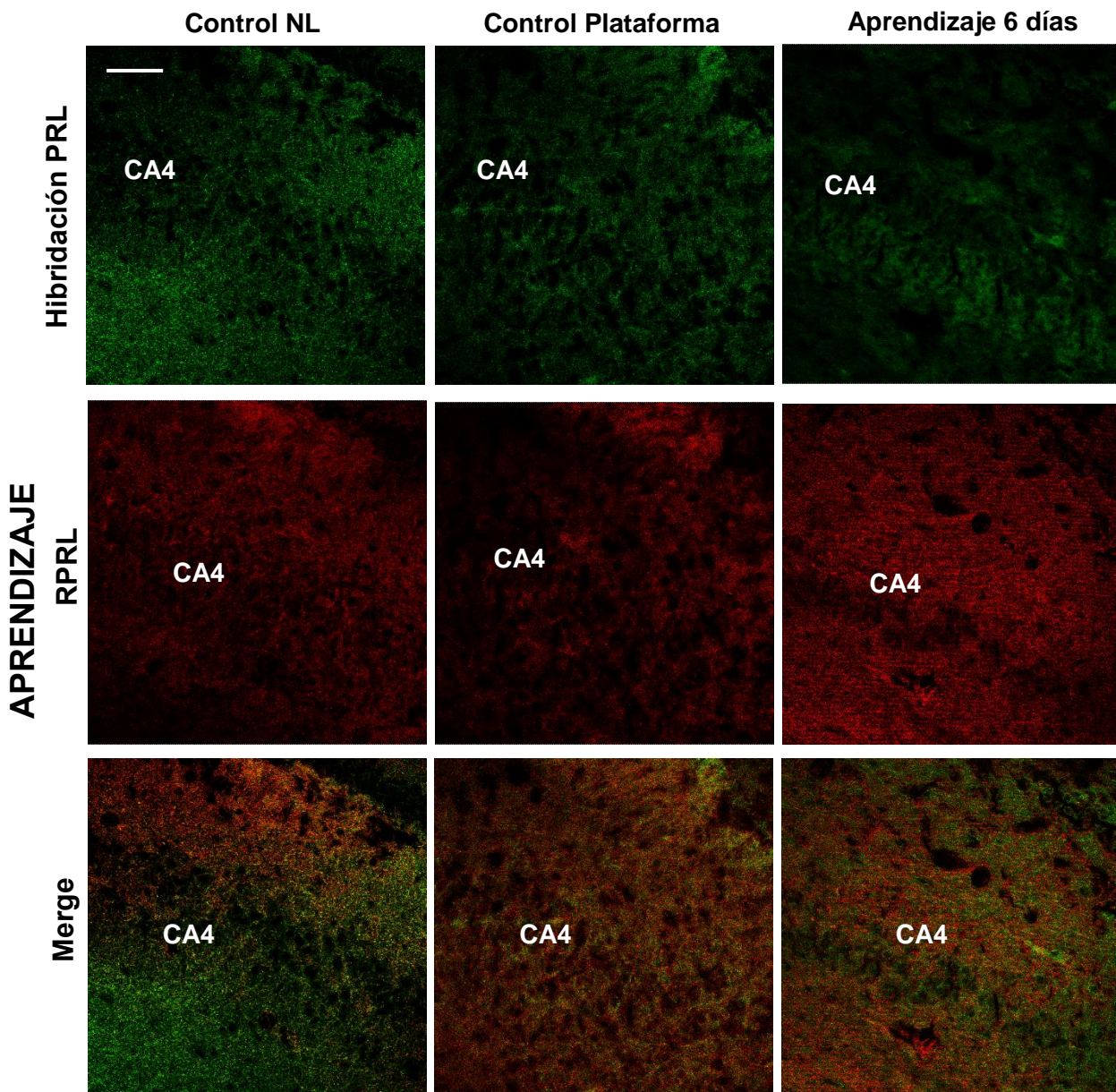


Figura RD-77A

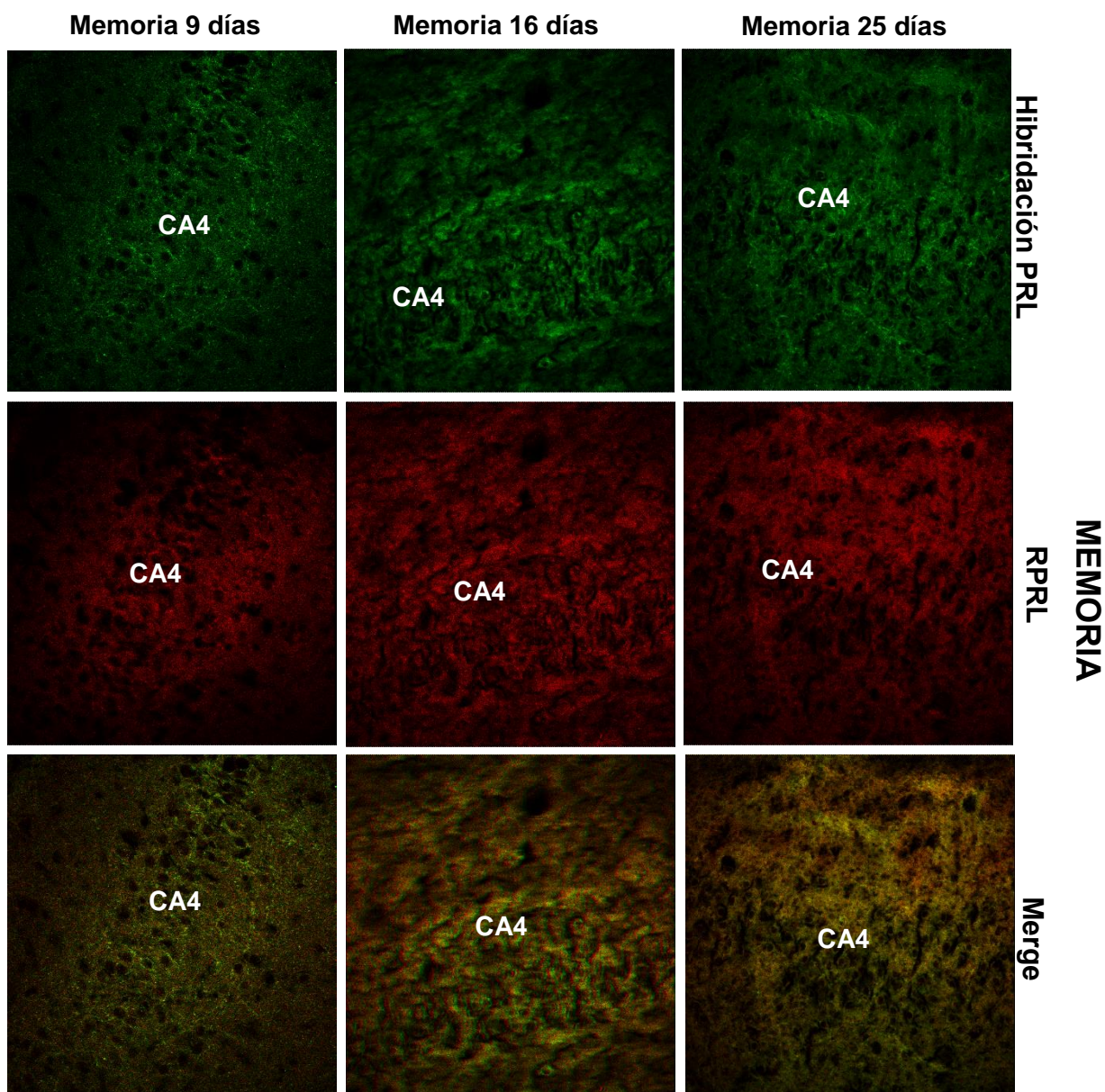


Figura RD-77B

**Figura RD-77.** Inmunolocalización del ARNm (verde) y del RPRL (en rojo), de cortes histológicos de ratas machos sanas entrenadas en el MWM y cuya memoria ha sido consolidada después de la tarea. Imágenes confocales de los grupos Aprendizaje (Figura RD-66A) y grupos Memoria (Figura RD-66B). Barra de escala 75  $\mu$ m.

Como se muestra en las imágenes de la Figura RD-77, la región CA4 presentó una reacción a ambos marcadores.

La reacción al RPRL, se mostraba menos intensa que la del ARNm de PRL. Ambos, se hacían más intenso para los grupos de memoria en comparación con los pre-entrenados.

Memoria 16 días, manifestaba de manera cualitativa una reacción bastante intensa para las dos moléculas estudiadas, aunque no todas las células tenían reactividad y si la presentaban, no era de manera uniforme.

Para cuantificar la reacción a ARNm de PRL por hibridación “*in situ*”, se ha medido el porcentaje de área reactiva (%), el número de moléculas reactivas por área total ( $\mu\text{m}^2$ ), el área reactiva en 100.000  $\text{pix}^2$  y la intensidad de la reacción, mediante el gris medio (UA).

Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla RD-36.

Inmunohistoquímica para RPRL			
GRUPO	Porcentaje de área reactiva (%)	Número de moléculas/área total	Área reactiva en 100.000 $\text{pix}^2$
Ctrl NL	8.39 ± 1.18	07609.83 ± 1605.42	1091.47 ± 184.90
Ctrl Plataforma	6.71 ± 1.49	04658.73 ± 672.44	0411.85 ± 76.87
Aprendizaje 6 días	12.33 ± 0.74	12204.28 ± 1652.73	1266.46 ± 73.90
Memoria 9 días	9.56 ± 2.94	08255.82 ± 2913.18	0840.21 ± 302.67
Memoria 16 días	24.32 ± 5.42	23277.46 ± 3540.96	2702.75 ± 102.06
Memoria 25 días	11.15 ± 4.08	13080.05 ± 2202.20	1794.44 ± 356.10

GRUPO	Gris medio reactivo (UA)
Ctrl NL	11.49 ± 0.47
Ctrl Plataforma	15.25 ± 0.86
Aprendizaje 6 días	19.04 ± 1.46
Memoria 9 días	17.93 ± 1.56
Memoria 16 días	24.38 ± 0.62
Memoria 25 días	22.78 ± 0.44

**Tabla RD-36.** Análisis de la intensidad de reacción del ARNm de PRL y del RPRL en la región CA4 del hipocampo mediante el porcentaje de área reactiva (%), número de moléculas reactivas por el área total ( $\text{pix}^2$ ), área reactiva medida en 100.000  $\text{pix}^2$  y, gris medio reactivo (UA). Tabla RD-32A, estudio para la inmunohistoquímica de RPRL y, Tabla RD-32B, análisis para la hibridación “*in situ*” de PRL. Todos los valores están expresados como la media ± EEM.

<b>Inmunohistoquímica para RPRL</b>			
<b>GRUPO</b>	<b>Porcentaje de área reactiva (%)</b>	<b>Número de moléculas/área total</b>	<b>Área reactiva en 100.000 pix<sup>2</sup></b>
Ctrl NL	10.83 ± 1.33	10954.17 ± 1736.10	1342.37 ± 216.29
Ctrl Plataforma	6.13 ± 1.38	05430.42 ± 936.71	510.01 ± 106.33
Aprendizaje 6 días	14.57 ± 2.66	15105.14 ± 1399.37	1690.32 ± 221.18
Memoria 9 días	12.47 ± 3.00	13659.78 ± 2194.21	1386.04 ± 333.69
Memoria 16 días	20.00 ± 3.54	22310.31 ± 3140.22	2255.93 ± 351.53
Memoria 25 días	20.77 ± 2.77	15585.83 ± 3230.47	1465.28 ± 244.68

<b>GRUPO</b>	<b>Gris medio reactivo (UA)</b>	<b>Tabla RD-36B</b>
Ctrl NL	16.29 ± 0.88	
Ctrl Plataforma	20.05 ± 15.25	
Aprendizaje 6 días	23.84 ± 19.04	
Memoria 9 días	23.81 ± 0.97	
Memoria 16 días	30.27 ± 1.72	
Memoria 25 días	28.67 ± 0.95	

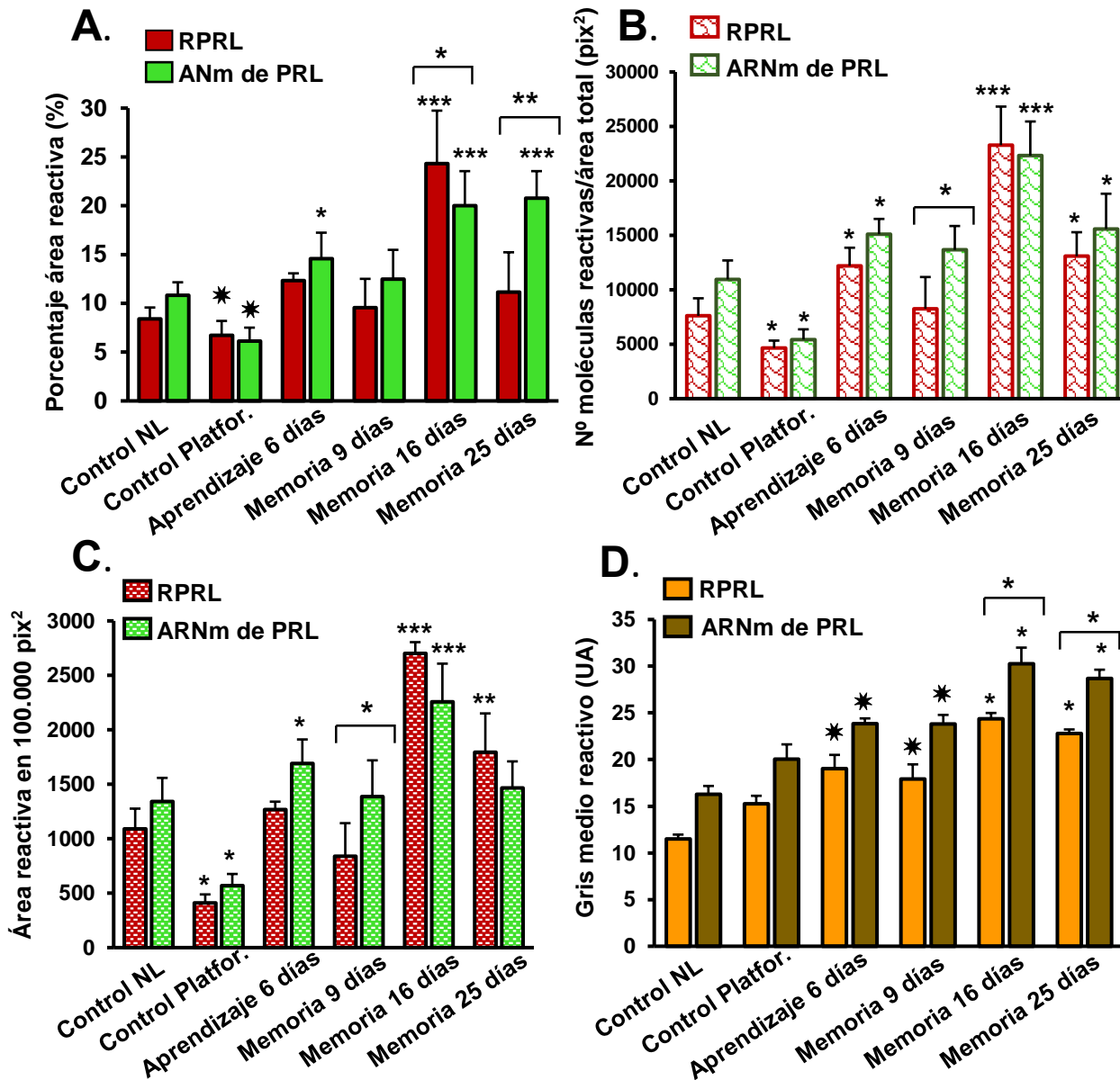
En la Figura RD-78, se muestra la cuantificación de la reacción del ARNm de PRL y de su receptor en los animales pre-entrenados y en aquellos que habían consolidado la memoria a lo largo del tiempo.

El porcentaje de área reactiva (RD-78A) aumentó significativamente (\* $p < 0.01$ ) en Memoria 16 días (ARNm:  $20.00 \pm 3.54$ , RPRL:  $24.32 \pm 5.41$ ) respecto al grupo control NL (ARNm:  $10.83 \pm 1.32$ , RPRL:  $8.39 \pm 1.18$ ) para las dos moléculas analizadas. Disparándose significativamente (\*\* $p < 0.001$ ), los valores expuestos en Memoria 25 días para el ARNm ( $20.77 \pm 2.77$ ) frente a los del RPRL ( $11.15 \pm 4.08$ ). Estos últimos presentaban porcentajes similares al control NL ( $8.39 \pm 1.18$ ) o plataforma ( $6.71 \pm 1.49$ ).

Por otro lado, en el número de moléculas reactivas por el área total (pix<sup>2</sup>) (Figura RD-78B). El resultado fue semejante que para el porcentaje. La única diferencia, se presentó en el grupo Memoria 25 días, debido a que los valores para ARNm de PRL ( $15585.83 \pm 3230.47$ ) y RPRL ( $13080.05 \pm 2202.20$ ) fueron levemente superiores y similares entre ellos.

No obstante, el área reactiva encontrada en 100.000 pix<sup>2</sup>.(Figura RD-78C) Demostraba un aumento en el análisis para el RPRL ( $2702.75 \pm 102.06$ ) de

memoria 16 días, respecto al ARNm de PRL de ese grupo ( $2255.93 \pm 351.53$ ). Al igual que sucedió para Memoria 25 días, pero con resultados por debajo.



**Figura RD-78.** Cuantificación de la reacción de la síntesis de PRL y de su receptor en los animales del estudio. (A) Porcentaje de área reactiva, (B) N° de moléculas reactivas en el área total, (C) área reactiva en 100.000 pix<sup>2</sup>. Se realizó la comparación con el Control NL entre los grupos y, RPRL respecto al ARNm de PRL en 500.000 pix<sup>2</sup> analizados, por ANOVA por el test de Bonferroni (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).



El gris medio reactivo (UA) (Figura RD-78D), revelaba un aumento significativo ( $*p < 0.01$ ), en la síntesis de PRL ( $30.27 \pm 1.72$ ) y, en su receptor ( $24.38 \pm 0.62$ ), para Memoria 16 días respecto a los animales pre-entrenados.

También se apreciaba un aumento significativo en la condición 25 días, aunque no era tan relevante. En general, todos los grupos del estudio, no presentaban diferencias significativas en el análisis, ni en referencia al control NL, ni entre el RPRL y el ARNm de PRL.

Sí, se observó un incremento leve y creciente desde control NL hasta Memoria 16 días, para sufrir un descenso en 25 días.

Al hacer una valoración general, sobre la cuantificación de células positivas a la expresión de ARNm de PRL, junto con la presencia del RPRL en regiones del asta de Ammón y de GD del hipocampo, tras un doble marcaje fluorescente para ambas moléculas. *Se ha confirmado, la presencia y coexistencia del ARNm de PRL y de su receptor en las regiones CA1, CA3, GD y CA4 del hipocampo. Y un posible papel conjunto en aprendizaje y, consolidación de memoria a corto y largo plazo.*

*Los resultados revelaron un aumento creciente a la expresión de ARNm para PRL en todas las regiones estudiadas y en sus estratos, de forma semejante como ya se había visto cuando se cuantificó de forma aislada.*

*Al mismo tiempo, también indicaban un incremento de la intensidad de reacción para el RPRL desde los grupos control NL hasta los animales que habían consolidado la memoria.*

Tanto para ARNm de PRL como para su receptor, se observó coexistencia en muchas de las células neuronales analizadas. Sobre todo, esa aparición conjunta sucedía en el estrato Piramidal del asta de Ammón o en la capa Granular del GD. Haciéndose muy llamativa para la condición Memoria 16 días y 25 días.

CA3c, fue una región que mostraba un ligero descenso en el área reactiva y en el número de moléculas en comparación con el resto de regiones.

Sin embargo, en casi todas las regiones del hipocampo analizadas, existió mayor índice de reactividad para ARNm de PRL respecto al RPRL. Aunque, en las regiones CA3a, CA3b y, la banda craneal del GD esa reactividad disminuía para dejar paso a valores más altos del RPRL.

Se observó que Memoria 16 días, fue el grupo con mayor porcentaje y número de moléculas reactivas a la presencia del RPRL en los tres estratos analizados. Exceptuando, la banda craneal del GD que presentaba un incremento en Memoria 25 días del RPRL.

*A la vista de estos resultados, podemos entrever que la síntesis de la secuencia de ARNm de PRL y la presencia del receptor para esta hormona en las regiones del hipocampo, sugiere que PRL y su receptor juegan un papel en la consolidación de la memoria. A la vez que, puede existir una autorregulación de la misma para llevar a cabo el aprendizaje espacial y mantener activos los recuerdos aprendidos tras un proceso de pre-entrenamiento en el MWM.*

*Por lo tanto, existe una relación directa entre la presencia del RPRL y la síntesis de la hormona, para que se produzca un proceso de aprendizaje y memoria declarativa. Aumentando su presencia para afianzar la consolidación de la memoria, como mínimo a 16 y 25 días en ratas machos sanas que han realizado un test conductual.*

En este trabajo, se ha indicado varias veces que PRL es una hormona peptídica sintetizada y secretada principalmente por la hipófisis anterior, pero también por los tejidos extrahipofisarios, donde actúa como un factor autocrino-paracrino local (Harvey, Aramburo et al. 2012, Marano and Ben-Jonathan 2014), incluidos los tejidos neuronales en humanos (Ben-Jonathan, Mershon et al. 1996). Asegurándose una síntesis de esta hormona independientemente a la que se produce en la hipófisis.

Se consideró que, podía ser producida localmente por el SNC e ingresar al cerebro a través de transportadores específicos localizados en la membrana del plexo coroideo (WALSH, SLABY et al. 1987, Hirai, Nishita et al. 2013, Brown, Wyatt et al. 2016).

El gen de PRL de la rata, se expresa en tejido cerebral. Algunos autores ya habían detectado el ARNm de PRL normal en diferentes zonas cerebrales.

Mediante la reacción de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR), se observó la expresión del ARNm de PRL en hipotálamo, cerebelo, núcleo caudado, tallo cerebral, amígdala, tálamo, corteza e hipocampo (Ehmann, Salzig et al. 2008, Roselli, Bocklandt et al. 2008). Expresando dos señales de hibridación, el producto amplificado esperado y otro más pequeño (transcripción empalmada alternativa, faltando una parte del gen de PRL).

Los animales hipofisectomizados no expresaron mensajero de PRL en el cerebro, pero se restableció la expresión en animales hipofisectomizados tratados con testosterona. Este hallazgo de estimulación del mensajero de PRL con testosterona, indicó que la regulación transcripcional de la PRL en el cerebro, es diferente a la de la hipófisis anterior (Emanuele, Jurgens et al. 1992, Cabrera-Reyes, Limon-Morales et al. 2017).

Aunque para el gen de PRL humano, es mucho más complejo que el de los roedores.

Del mismo modo, el RPRL con sus isoformas se expresa en la hipófisis, en tejidos periféricos y de manera constante en varias regiones del cerebro, como la corteza cerebral, bulbo olfatorio, hipotálamo (Bakowska and Morrell 2003, Brown, Kokay et al. 2010), hipocampo (Torner, Karg et al. 2009, Cabrera-Reyes, Limon-Morales et al. 2017, Carretero, Sanchez-Robledo et al. 2018) y, amígdala entre otros.

En el cerebro, se ha relacionado PRL y su receptor con el comportamiento sexual (Nogami, Hoshino et al. 2007, Ignacak, Kasztelnik et al. 2012), comportamiento materno (Sangeeta Devi and Halperin 2014), neuroprotección (Nogami, Hoshino et al. 2007, Li, O et al. 2013) y neurogénesis (Walker, Vukovic et al. 2012, Fester and Rune 2015). Al mismo tiempo que se ha visto una sobreexpresión de PRL y RPRL en el cerebro y en la hipófisis en lactación (Walker, Vukovic et al. 2012), estrés (Ignacak, Kasztelnik et al. 2012) y, la exposición a lesiones inducidas por hipoxia o isquemia (Modersheim, Gorba et al. 2007).

*Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, son interesantes para dar una explicación al posible papel que desempeña la sobreexpresión de ARNm de PRL local en el hipocampo y la presencia de su receptor en relación al proceso de comportamiento conductual y de consolidación de la memoria a 16 y 25 días, tras un pre-entrenamiento previo. Además de afianzar algunos hallazgos recientes y descritos por otros autores en la relación de ambas moléculas en el cerebro adulto.*

En las últimas dos décadas, varios estudios han revelado el papel potencial de la PRL para regular la neurogénesis en el cerebro adulto, se ha observado un incremento de la neurogénesis en la zona subventricular debido a la secreción elevado de PRL en nuevas neuronas del bulbo olfatorio en ratones hembras gestantes y lactantes (Shingo, Gregg et al. 2003), para mediar en varios comportamientos reproductivos incluyendo el reconocimiento paterno y materno de la descendencia y la preferencia de las feromonas masculinas en las hembras (Bridges 2015).

La sobreexpresión del gen de PRL en la neurogénesis y el RPRL en las hembras puede contribuir a los comportamientos adaptativos durante el apareamiento, el embarazo y el posparto. Paradójicamente, cuando se administra PRL durante el período neonatal, la neurogénesis en el GD del hipocampo y el bulbo olfatorio se reduce y produce alteraciones psicopatológicas durante la vida adulta (Lajud, Gonzalez-Zapien et al. 2013).

Otra función que se está evaluando en los últimos tiempos, es la relación del ARNm de PRL y RPRL en el neurodesarrollo, en ovejas fetales (60-135 días de gestación) y adultas (Roselli, Bocklandt et al. 2008). A la vez que estudios realizados en ratas adultas, se observó que el RPRL y el ARNm de PRL se expresaban en el bulbo olfatorio, con abundancia en las células mitrales del bulbo. Evidenciando que PRL participaba en la diferenciación olfativa y el desarrollo, con la implicación en una posible regulación del comportamiento de la descendencia neonatal y las interacciones materno-infantil (Freemark, Driscoll et al. 1996).

La PRL participa significativamente en la neuroplasticidad observada durante el embarazo y la lactancia.

Las espinas dendríticas, son un indicador celular de plasticidad relacionado con la experiencia y la estabilidad sináptica. Se ha visto un aumento en las espinas dendríticas en la región CA1 del hipocampo durante el final del embarazo y el postparto temprano, un efecto presumiblemente provocado por el aumento de la PRL durante estos períodos (Kinsley, Trainer et al. 2006, Brusco, Wittmann et al. 2008).

Siguiendo estas investigaciones, PRL también es importante en la neuroprotección del hipocampo, provocando una disminución en la actividad glutamatérgica excitadora en el hipocampo y en la corteza cerebral durante la lactancia (Standley 1999); y se encuentra involucrada en procesos excitotóxicos, debido a que la PRL sistémica, actuando a través de su receptor, modula la actividad convulsiva en respuesta a convulsiones epilépticas como se ha visto en cultivos primarios de neuronas del hipocampo (Doretto, Oliveira-e-Silva et al. 2003)

Estudios más relacionados con los resultados experimentales de este trabajo están más encadenados al tema de memoria, cognición y aprendizaje.

Sí se pueden encontrar en la bibliografía, estudios en relación a la expresión de PRL y del RPRL in vivo e in vitro en hipocampo de rata (Wilkanowska, Mazurowski et al. 2014), ninguno de ellos se ha realizado en ratas entrenadas en el MWM, cuya adquisición y recuperación de información espacial, así, como la consolidación y almacenamiento de la memoria se hubiera mantenido a lo largo del tiempo.

Los escasos estudios que se encuentran, han analizado la participación de la PRL relacionada con la memoria y el aprendizaje, y los resultados de estos informes limitados son controvertidos.

La maternidad se relaciona con un mejor rendimiento cognitivo en animales que han parido por primera vez, que mostraron memoria espacial mejorada en el laberinto de tierra seca, mayor exploración en laberinto elevado (Love, Torrey et al. 2005) y un mejor rendimiento en un laberinto de brazo radial (Henry and Sherwin 2012). Pero, los mecanismos neurobiológicos para estos efectos duraderos, aún no se han identificado y no se puede decir que sea por el efecto de la relación de PRL y de su receptor por la abstinencia de ese estudio.

En las ratas hembras primerizas, se mejoró el trabajo espacial y la memoria de referencia en comparación con las hembras nulíparas (que nunca han parido), aunque estos parámetros asociados a la memoria no mejoraron con embarazos posteriores (Pawluski, Walker et al. 2006).

En controversia a estos datos, se conoce que en mujeres embarazadas, los niveles elevados de PRL y hormonas esteroideas como estradiol, progesterona, testosterona y cortisol, se asocian con deterioro cognitivo en el recuerdo verbal y en tareas que implican velocidad de procesamiento (Henry and Sherwin 2012).

Por otro lado, estudios en ratas machos con hiperprolactinemia muestran un reconocimiento de objetos escaso, sin modificaciones en el aprendizaje espacial (Torner, Tinajero et al. 2013).

En hombres mayores, los niveles más altos de PRL se han asociado con un menor rendimiento cognitivo en la memoria verbal y de trabajo (Castanho, Moreira et al. 2014).

Desde otro punto de vista, los estudios sobre la memoria dependiente del hipocampo muestran que la pérdida de RPRL en ratones origina déficits de aprendizaje y memoria, tanto en machos como en hembras (Walker, Vukovic et al. 2012). Lo que refuerza la evidencia de que se requiere PRL para la adquisición de aprendizaje normal hipocampo.

Se debe destacar que la mayoría de los efectos descritos para la PRL en la memoria y el comportamiento, se refieren a niveles sistémicos de PRL, no ha niveles cerebrales de PRL.

Debido al limitado número de estudios relacionados con la presencia de la síntesis de PRL y de su receptor, en las diferentes regiones del hipocampo. Que lleven a una relación veraz de esta hormona con el aprendizaje y consolidación de la memoria.

*Este trabajo, es relevante y pionero en manifestar la acción biológica en memoria, cognición y aprendizaje por parte de la hormona PRL mediada por su receptor, con la síntesis local de la hormona en relación con una autorregulación en procesos de mantenimiento de los recuerdos a largo plazo en ratas sanas machos pre-entrenadas en el MWM.*

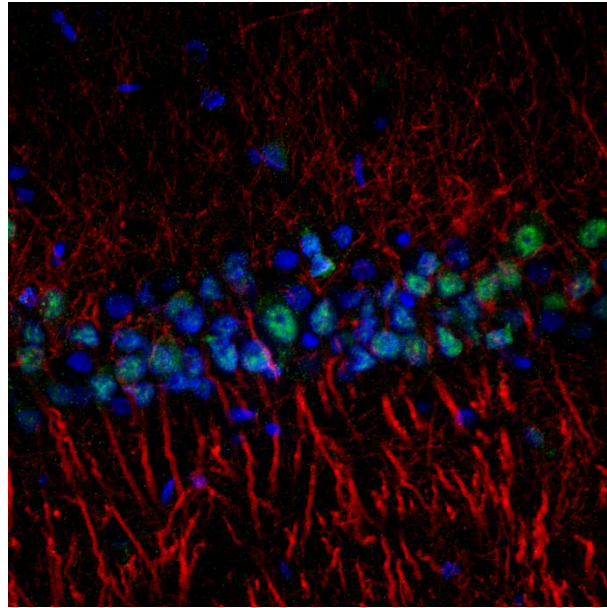
*Al mismo tiempo que, los resultados manifestaron un aumento significativo en los grupos de animales que habían consolidado la memoria, respecto a los controles y pre-entrenados, tanto de la presencia de PRL, del RPRL y de la síntesis de PRL de manera local en las regiones CA1, CA3, GD y CA4 de hipocampo.*

*Haciendo un estudio detallado de esos factores, en los diferentes estratos del asta de Ammón, estrato Piramidal, Radiado y Oriens de CA1 Lateral y Septal; CA3a, CA3b y CA3c; CA4. A la vez que, se desarrolló el mismo análisis para las capas del GD, Granular, Molecular y Polimórfica en las regiones del pico del GD; Banda craneal del GD dorsal y banda craneal del GD ventral.*

*Observando que no existía el mismo nivel de reactividad para las tres moléculas estudiadas en este trabajo, ni la misma distribución por todas las regiones analizadas. Aunque sí se mostraba la existencia de todas ellas en el hipocampo en todos los grupos del estudio y una implicación en el papel de consolidación de la memoria declarativa.*







*“Recordar un buen momento es sentirse  
feliz de nuevo”*

Gabriela Mistral

## 5. CONCLUSIONES



Después de analizar individual y conjuntamente los resultados obtenidos en el estudio que se presenta, y contrastarlos y compararlos con la literatura existente sobre el tema, hemos obtenido las siguientes conclusiones:

**Conclusión primera:** Los animales sometidos a test conductual y aprendizaje espacial en el Morris Water Maze desarrollan un proceso de aprendizaje que a partir de los seis días se consolida memorísticamente, de manera que a los dieciséis, principalmente, e incluso a los veinticinco días persiste el recuerdo.

*Lo que sugiere la consolidación de lo aprendido en memoria a largo plazo. Este es el primer estudio que demuestra la consolidación de la memoria a los veinticinco días en ratas sometidas al test MWM.*

**Conclusión segunda:** Las neuronas del hipocampo, Asta de Amón y Giro Dentado, sintetizan Prolactina, como sugiere la presencia del mRNA de Prolactina detectado mediante hibridación in situ.

*Lo que sugiere que no es necesario que la Prolactina presente en la sangre tenga que llegar a dichas neuronas a través de su filtrado en los plexos coroideos hacia el líquido cefalorraquídeo o bien por un transportador específico localizado en las paredes vasculares.*

**Conclusión tercera:** La síntesis de Prolactina en las neuronas piramidales del Asta de Amón y en las granulares del Giro Dentado se modifica durante el proceso de aprendizaje y en la consolidación de la memoria de corto a largo plazo.

*Lo que sugiere que la Prolactina podría necesitarse en el proceso de formación y refuerzo de los circuitos hipocampales implicados en ambos procesos, actuando a través de una regulación autocrina o paracrina.*

**Conclusión cuarta:** El proceso de traslación en la síntesis de Prolactina en el Hipocampo se acompaña del proceso de traducción, ya que tanto el western blotting como la inmunocitoquímica demuestran la presencia de la hormona en el Asta de Amón y en el Giro Dentado; de forma similar a como se expresaba el mRNA.

*Lo que sugiere que la síntesis de Prolactina es un proceso activo y continuo y que la hormona es un regulador importante en las respuestas del Hipocampo al aprendizaje y la memoria.*

**Conclusión quinta:** Las mismas regiones que expresan el mRNA de Prolactina y la hormona tienen receptores para Prolactina, como demuestra el estudio inmunocitoquímico de nuestro trabajo. Los receptores se localizan en los tres estratos analizados: oriens, piramidal y radiado, en el Asta de Amón, y molecular, granular y polimorfo, en el Giro Dentado.

*Lo que sugiere que la Prolactina desarrolla un papel fisiológico en las neuronas del Hipocampo.*

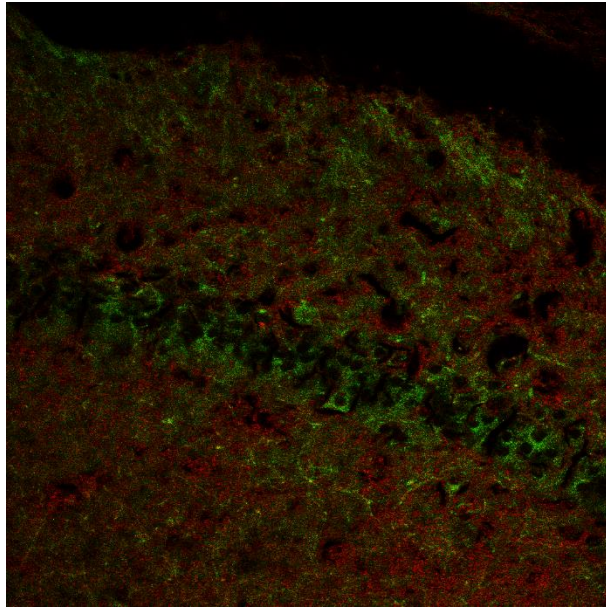
**Conclusión sexta:** La presencia de los receptores de Prolactina en el Hipocampo aumenta paulatinamente dependiendo de que los animales estén en entrenamiento, aprendizaje, memoria a corto plazo o memoria a largo plazo.

*Lo que sugiere que el aumento de Prolactina y de su síntesis guarda relación con la actuación de la hormona sobre su receptor y confirma un papel relevante de la Prolactina durante el aprendizaje y la consolidación de la memoria.*

**Conclusión séptima:** Este es el primer estudio que confirma la coexistencia del mRNA de Prolactina y el receptor para la hormona en las neuronas hipocampales. Además, evidencia que la coexistencia es mayor en el proceso de consolidación de la memoria a largo plazo que en etapas anteriores.

*El que las mismas células que sintetizan la Prolactina tienen su receptor, descarta que la reacción a Prolactina de las neuronas se deba a la unión de hormona sistémica al receptor y su interiorización.*

*Todo ello sugiere que la Prolactina hipocampal puede desempeñar un papel regulador auto-paracrino en las neuronas del Hipocampo y que sus efectos, entre otros, está en relación con los procesos de aprendizaje y consolidación de la memoria a través de un asa corta o ultracorta de regulación, probablemente estimuladora, de neurogénesis y neuroprotección.*



*“Existen más locos que sabios; y en el sabio hay siempre más locura que sabiduría”*

Miguel de Cervantes

## 6.BIBLIOGRAFÍA



- Abdullahi, P. R., S. Eskandarian, A. Ghanbari and A. Rashidy-Pour (2018). "Oxytocin receptor antagonist atosiban impairs consolidation, but not reconsolidation of contextual fear memory in rats." *Brain Res*, **1695 (1): 31-36**.
- Abramicheva, P. A., T. A. Balakina, O. A. Bulaeva, A. A. Guseva, O. D. Lopina and O. V. Smirnova (2017). "Role of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in Natriuretic Effect of Prolactin in a Model of Cholestasis of Pregnancy." *Biochemistry (Mosc)*, **82(5): 632-641**.
- Abu El-Hamd, M. and A. Farah (2017). "Possible role of serum testosterone, gonadotropins and prolactin in patients with premature ejaculation." *Andrologia*, **50(1): 1-5**.
- Adasme, T., P. Haeger, A. C. Paula-Lima, I. Espinoza, M. M. Casas-Alarcon, M. A. Carrasco and C. Hidalgo (2011). "Involvement of ryanodine receptors in neurotrophin-induced hippocampal synaptic plasticity and spatial memory formation." *Proc Natl Acad Sci U SA*, **108(7): 3029-3034**.
- Addis, D. R., A. R. McIntosh, M. Moscovitch, A. P. Crawley and M. P. McAndrews (2004). "Characterizing spatial and temporal features of autobiographical memory retrieval networks: a partial least squares approach." *Neuroimage*, **23(4): 1460-1471**.
- Aggleton, J. P., A. Pralus, A. J. Nelson and M. Hornberger (2016). "Thalamic pathology and memory loss in early Alzheimer's disease: moving the focus from the medial temporal lobe to Papez circuit." *Brain*, **139(Pt 7): 1877-1890**.
- Aguado-Aguilar, L. (2001). "Aprendizaje y memoria." *Rev neurol* **32(4): 373-381**.
- Aguilera, G., C. L. Hyde and K. J. Catt (1982). "Angiotensin II receptors and prolactin release in pituitary lactotrophs." *Endocrinology*, **111(4): 1045-1050**.
- Aisaka, K., F. Tsuchiya, M. Sueta, K. Itabashi, S. Nose, A. Hasegawa, S. Obata, H. Hiraike and T. Yokoyama (2018). "Impact of macroprolactin on galactorrhea and the rate of patients possibly affected by macroprolactin." *Endocr J*, **65(2): 203-211**.
- Alam, S. M., T. Konno and M. J. Soares (2015). "Identification of target genes for a prolactin family paralog in mouse decidua." *Reproduction*, **149(6): 625-632**.
- Alexandre-Pires, G., C. Martins, A. M. Galvao, M. Miranda, O. Silva, D. Ligeiro, T. Nunes and G. Ferreira-Dias (2017). "Understanding the Inguinal Sinus in Sheep (Ovaries)-Morphology, Secretion, and Expression of Progesterone, Estrogens, and Prolactin Receptors." *Int J Mol Sci*, **18(7)**.
- Allen, P. G. (2016). "Allen Institute for Brain Science: Allen rat brain atlas."

- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D. J. Lipman (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." *Nucleic Acids Res*, **25(17)**: 3389-3402.
- Álvarez, L. A. M. y. M. A. (2015). "La memoria humana. Aportaciones desde la neurociencia cognitiva." *Pirámide*, **1ª Edición**.
- Amakhin, D. V., J. L. Ergina, A. V. Chizhov and A. V. Zaitsev (2016). "Synaptic Conductances during Interictal Discharges in Pyramidal Neurons of Rat Entorhinal Cortex." *Front Cell Neurosci*, **10**: 233.
- Amaral DG; Insausti, R. (1990). "Hippocampal formation. In: Paxinos. The human nervous system". *Academic Press*. New York: 711-755.
- Amaral, D. L., P. (2006). "Hippocampal Neuroanatomy, in the hippocampus book". USA, *Oxford University Press*, **4th Edition**.
- Amaral, R. S., M. T. Park, G. A. Devenyi, V. Lynn, J. Pipitone, J. Winterburn, S. Chavez, M. Schira, N. J. Lobaugh, A. N. Voineskos, J. C. Pruessner, M. M. Chakravarty and I. Alzheimer's Disease Neuroimaging (2016). "Manual segmentation of the fornix, fimbria, and alveus on high-resolution 3T MRI: Application via fully-automated mapping of the human memory circuit white and grey matter in healthy and pathological aging." *Neuroimage*, **170**: 132-150.
- Amparan, A. A., S. M. Djoufack-Momo, B. Grunden and G. P. Boivin (2014). "Exposure of research personnel to carbon dioxide during euthanasia procedures." *J Am Assoc Lab Anim Sci*, **53(4)**: 376-380.
- Amunts, K., O. Kedo, M. Kindler, P. Pieperhoff, H. Mohlberg, N. J. Shah, U. Habel, F. Schneider and K. Zilles (2005). "Cytoarchitectonic mapping of the human amygdala, hippocampal region and entorhinal cortex: intersubject variability and probability maps." *Anat Embryol (Berl)*, **210(5-6)**: 343-352.
- Anagnostou, I., J. Reyes-Mendoza and T. Morales (2018). "Glial cells as mediators of protective actions of prolactin (PRL) in the CNS." *Gen Comp Endocrinol*. **Epub ahead of print**.
- Anisman, H. and R. M. Zacharko (1992). "Depression as a consequence of inadequate neurochemical adaptation in response to stressors." *Br J Psychiatry*, **Suppl(15)**: 36-43.
- Anuradha and A. Krishna (2017). "Prolactin modulates luteal activity in the short-nosed fruit bat, *Cynopterus sphinx* during delayed embryonic development." *Gen Comp Endocrinol*, **248**: 27-39.



- Aquino, N. S. S., R. Araujo-Lopes, P. C. Henriques, F. E. F. Lopes, D. O. Gusmao, C. C. Coimbra, C. R. Franci, A. M. Reis and R. E. Szawka (2017). "alpha-Estrogen and Progesterone Receptors Modulate Kisspeptin Effects on Prolactin: Role in Estradiol-Induced Prolactin Surge in Female Rats." *Endocrinology*, **158(6): 1812-1826**.
- Arendt, L. M. and C. Kuperwasser (2015). "Form and function: how estrogen and progesterone regulate the mammary epithelial hierarchy." *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, **20(1-2): 9-25**.
- Aronin, N., R. Coslovsky and S. E. Leeman (1986). "Substance P and neurotensin: their roles in the regulation of anterior pituitary function." *Annu Rev Physiol*, **48: 537-549**.
- Asai-Sato, M., M. Okamoto, M. Endo, H. Yoshida, M. Murase, M. Ikeda, H. Sakakibara, T. Takahashi and F. Hirahara (2006). "Hypoadiponectinemia in lean lactating women: Prolactin inhibits adiponectin secretion from human adipocytes." *Endocr J*, **53(4): 555-562**.
- Atkinson, R. C. and R. M. Shiffrin (1971). "The control of short-term memory." *Sci Am*, **225(2): 82-90**.
- Augustine, R. A., S. R. Ladyman, G. T. Bouwer, Y. Alyousif, T. J. Sapsford, V. Scott, I. C. Kokay, D. R. Grattan and C. H. Brown (2017). "Prolactin regulation of oxytocin neurone activity in pregnancy and lactation." *J Physiol*, **595(11): 3591-3605**.
- Babb, J. A., L. M. Carini, S. L. Spears and B. C. Nephew (2014). "Transgenerational effects of social stress on social behavior, corticosterone, oxytocin, and prolactin in rats." *Horm Behav*, **65(4): 386-393**.
- Bachelot, A., N. Carre, O. Mialon, M. Matelot, N. Serval, P. Monget, P. Ahtiainen, I. Huhtaniemi and N. Binart (2013). "The permissive role of prolactin as a regulator of luteinizing hormone action in the female mouse ovary and extragonadal tumorigenesis." *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **305(7): E845-852**.
- Baddeley, A. (2003). "Working memory and language: an overview." *J Commun Disord*, **36(3): 189-208**.
- Baddeley, A. D. (2002). "Human Memory: Theory And Practice, Revised." Psychology Press.
- Bakken, T., S. W. Kang, S. Kosonsiriluk, T. Kuwayama, Y. Chaiseha and M. E. El Halawani (2014). "Differential roles of hypothalamic serotonin receptor subtypes in the regulation of prolactin secretion in the turkey hen." *Acta Histochem*, **116(1): 131-137**.
- Bakowska, J. C. and J. I. Morrell (2003). "The distribution of mRNA for the short form of the prolactin receptor in the forebrain of the female rat." *Molecular Brain Research*, **116(1): 50-58**.

- Balci, H., K. Akgun-Dar, N. Gazioglu, A. Kapucu, M. Bolayirli and B. Oz (2009). "The relationship between prolactin (PRL), leptin, nitric oxide (NO), and cytokines in patients with hyperprolactinemia." *Pituitary*, **12(3)**: 170-176.
- Ball, T. S. and R. F. Deich (1972). "Reading disability and hypothesis-formation: an application of the Postman and Bruner theory." *Percept Mot Skills*, **34(2)**: 383-386.
- Ballesteros, S. (1999). "Memoria humana: investigación y teoría." *Psicothema*, **11(4)**: 705-723.
- Bandura, A. and A. Rivière (1982). "Teoría del aprendizaje social." *Espasa-Calpe*, **2ª Edición**.
- Bannerman, D. M., M. A. Good, S. P. Butcher, M. Ramsay and R. G. Morris (1995). "Distinct components of spatial learning revealed by prior training and NMDA receptor blockade." *Nature*, **378(6553)**: 182-186.
- Banqueri, M., M. Mendez and J. L. Arias (2017). "Spatial memory-related brain activity in normally reared and different maternal separation models in rats." *Physiol Behav*, **181**: 80-85.
- Barnhart, C. D., D. Yang and P. J. Lein (2015). "Using the Morris water maze to assess spatial learning and memory in weanling mice." *PLoS One*, **10(4)**: e0124521.
- Barth, J. H., C. M. Lippiatt, S. G. Gibbons and R. A. Desborough (2018). "Observational studies on macroprolactin in a routine clinical laboratory." *Clin Chem Lab Med*, **Epub ahead of print**.
- Bao, L., C. Tessier, A. Prigent-Tessier, F. Li, O. L. Buzzio, E. A. Callegari, N. D. Horseman and G. Gibori (2007). "Decidual prolactin silences the expression of genes detrimental to pregnancy." *Endocrinology*, **148(5)**: 2326-2334.
- Baranowska, B. (1987). "The role of opioid peptides in the control of secretion of pituitary hormones." *Mater Med Pol*, **19(1)**: 52-55.
- Barnhart, C. D., D. Yang and P. J. Lein (2015). "Using the Morris water maze to assess spatial learning and memory in weanling mice." *PLoS One*, **10(4)**: e0124521.
- Barrett, R., C. A. Narasimhulu and S. Parthasarathy (2018). "Adrenergic hormones induce extrapituitary prolactin gene expression in leukocytes-potential implications in obesity." *Sci Rep*, **8(1)**: 1936.
- Barry, J. M., S. Sakkaki, S. J. Barriere, K. P. Patterson, P. P. Lenck-Santini, R. C. Scott, T. Z. Baram and G. L. Holmes (2016). "Temporal Coordination of Hippocampal Neurons Reflects Cognitive Outcome Post-febrile Status Epilepticus." *EBioMedicine*, **7**: 175-190.

- Bass, D. I., Z. G. Nizam, K. N. Partain, A. Wang and J. R. Manns (2014). "Amygdala-mediated enhancement of memory for specific events depends on the hippocampus." *Neurobiol Learn Mem*, **107**: 37-41.
- Batool, Z., S. Sadir, L. Liaquat, S. Tabassum, S. Madiha, S. Rafiq, S. Tariq, T. S. Batool, S. Saleem, F. Naqvi, T. Perveen and S. Haider (2016). "Repeated administration of almonds increases brain acetylcholine levels and enhances memory function in healthy rats while attenuates memory deficits in animal model of amnesia." *Brain Res Bull*, **120**: 63-74.
- Baum, M. J. and J. Bakker (2013). "Roles of sex and gonadal steroids in mammalian pheromonal communication." *Front Neuroendocrinol*, **34**(4): 268-284.
- Baum, M. J. and J. A. Cherry (2015). "Processing by the main olfactory system of chemosignals that facilitate mammalian reproduction." *Horm Behav*, **68**: 53-64.
- Bayley, P. J., R. O. Hopkins and L. R. Squire (2006). "The fate of old memories after medial temporal lobe damage." *J Neurosci*, **26**(51): 13311-13317.
- Becu-Villalobos, D., I. M. Lacau-Mengido, S. M. Thyssen, G. S. Diaz-Torga and C. Libertun (1994). "Effects of LHRH and ANG II on prolactin stimulation are mediated by hypophysial AT1 receptor subtype." *Am J Physiol*, **266**(2 Pt 1): E274-278.
- Bechtold, D. A. and S. M. Luckman (2006). "Prolactin-releasing Peptide mediates cholecystokinin-induced satiety in mice." *Endocrinology*, **147**(10): 4723-4729.
- Beltran, J. Q., S. Reyes, J. A. Perez-Guzman, D. Elias-Vinas and R. Gutierrez (2012). "Dissociation of CA3 pyramidal cells with attached, functional, identified mossy fiber and interneuronal boutons for studying glutamatergic and GABAergic synaptic transmission." *J Neurosci Methods*, **208**(2): 155-160.
- Belugin, S., A. R. Diogenes, M. J. Patil, E. Ginsburg, M. A. Henry and A. N. Akopian (2013). "Mechanisms of transient signaling via short and long prolactin receptor isoforms in female and male sensory neurons." *J Biol Chem*, **288**(48): 34943-34955.
- Ben-Jonathan, N. and E. Hugo (2015). "Prolactin (PRL) in adipose tissue: regulation and functions." *Adv Exp Med Biol*, **846**: 1-35.
- Ben-Jonathan, N., S. Khurana and R. Hnasko (2002). Brain prolactin. *Hormones, Brain and Behavior*. Elsevier, 97-120.
- Ben-Jonathan, N., C. R. LaPensee and E. W. LaPensee (2008). "What can we learn from rodents about prolactin in humans?" *Endocr Rev*, **29**(1): 1-41.
- Ben-Jonathan, N., J. L. Mershon, D. L. Allen and R. W. Steinmetz (1996). "Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects." *Endocr Rev*, **17**(6): 639-669.

- Bernal, I. M. (2005). "Psicobiología del aprendizaje y la memoria." *CIC Cuadernos de Información y Comunicación*, **(10)**: 221-233.
- Bernard, V., S. Lamothe, I. Beau, A. Guillou, A. Martin, P. Le Tissier, D. Grattan, J. Young and N. Binart (2018). "Autocrine actions of prolactin contribute to the regulation of lactotroph function in vivo." *FASEB, J: fj201701111RR*. **Epub ahead of print.**
- Berry, C. M. (2017). "Antibody immunoprophylaxis and immunotherapy for influenza virus infection: Utilization of monoclonal or polyclonal antibodies?" *Hum Vaccin Immunother*, **1-4**.
- Bezchlibnyk, Y. B., S. S. Stone, C. Hamani and A. M. Lozano (2017). "High frequency stimulation of the infralimbic cortex induces morphological changes in rat hippocampal neurons." *Brain Stimul*, **10(2)**: 315-323.
- Bhattacharya, T. K., R. N. Chatterjee, R. P. Sharma, M. Niranjana, U. Rajkumar and B. L. Reddy (2011). "Polymorphism in the prolactin promoter and its association with growth traits in chickens." *Biochem Genet*, **49(5-6)**: 385-394.
- Bicanski, A. and N. Burgess (2016). "Environmental Anchoring of Head Direction in a Computational Model of Retrosplenial Cortex." *J Neurosci*, **36(46)**: 11601-11618.
- Bjelke, B., K. Fuxe and L. F. Agnati (1988). "Survival of adenohipophyseal homologous transplants in the rat striatum associated with prolactin-like immunoreactivity in the surrounding neuropil of the striatum." *Neurosci Lett*, **93(2-3)**: 139-145.
- Bjelke, B., K. Fuxe and L. F. Agnati (1989). "Increased diffusion of prolactin-like material into the brain neuropil from homologous adenohipophyseal transplants in the rat neostriatum after a 6-OH-dopamine induced degeneration of the mesostriatal dopamine neurons." *Neurosci Lett*, **107(1-3)**: 33-38.
- Blackstad, J. S., K. K. Osen, H. E. Scharfman, J. Storm-Mathisen, T. W. Blackstad and T. B. Leergaard (2016). "Observations on hippocampal mossy cells in mink (Neovison vison) with special reference to dendrites ascending to the granular and molecular layers." *Hippocampus*, **26(2)**: 229-245.
- Blanco, E. J., M. Carretero-Hernandez, J. Garcia-Barrado, M. C. Iglesias-Osma, M. Carretero, J. J. Herrero, M. Rubio, J. M. Riesco and J. Carretero (2013). "The activity and proliferation of pituitary prolactin-positive cells and pituitary VIP-positive cells are regulated by interleukin 6." *Histol Histopathol*, **28(12)**: 1595-1604.
- Block, F., M. Kunkel and M. Schwarz (1993). "Quinolinic acid lesion of the striatum induces impairment in spatial learning and motor performance in rats." *Neurosci Lett*, **149(2)**: 126-128.

- Bloom, B., R. A. Cohen and G. Freeman (2010). "Summary health statistics for U.S. children: National Health Interview Survey, 2009." *Vital Health Stat*, **10(247): 1-82**.
- Bole-Feysot, C., V. Goffin, M. Edery, N. Binart and P. A. Kelly (1998). "Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice." *Endocr Rev*, **19(3): 225-268**.
- Borba, V. V., G. Zandman-Goddard and Y. Shoenfeld (2018). "Prolactin and Autoimmunity." *Front Immunol*, **9: 73**.
- Botha, M., L. Grace, K. Bugarith, V. A. Russell, M. Kidd, S. Seedat and S. M. Hemmings (2012). "The impact of voluntary exercise on relative telomere length in a rat model of developmental stress." *BMC Res Notes*, **5: 697**.
- Bouilly, J., C. Sonigo, J. Auffret, G. Gibori and N. Binart (2012). "Prolactin signaling mechanisms in ovary." *Mol Cell Endocrinol*, **356(1-2): 80-87**.
- Bradley, C. and J. Pearson (2012). "The sensory components of high-capacity iconic memory and visual working memory." *Front Psychol*, **3: 355**.
- Brandebourg, T., E. Hugo and N. Ben-Jonathan (2007). "Adipocyte prolactin: regulation of release and putative functions." *Diabetes Obes Metab*, **9(4): 464-476**.
- Bratz, E. (1899). "Ammonshornbefunde der Epileptischen." *Arch Neurol Psychiatry Nevenkr*, **31: 820-836**.
- Brelje, T. C., N. V. Bhagroo, L. E. Stout and R. L. Sorenson (2017). "Prolactin and oleic acid synergistically stimulate beta-cell proliferation and growth in rat islets." *Islets*, **9(4): e1330234**.
- Bridges, R. S. (2015). "Neuroendocrine regulation of maternal behavior." *Front Neuroendocrinol*, **36: 178-196**.
- Britten, A., J. Archer-Hall and G. Lockwood (1978). "Technique for the determination of fluorescence quantum efficiencies: a method avoiding direct measurement of absorbance." *Analyst*, **103(1230): 928-936**.
- Breves, J. P., S. D. McCormick and R. O. Karlstrom (2014). "Prolactin and teleost ionocytes: new insights into cellular and molecular targets of prolactin in vertebrate epithelia." *Gen Comp Endocrinol*, **203: 21-28**.
- Breves, J. P., S. B. Serizier, V. Goffin, S. D. McCormick and R. O. Karlstrom (2013). "Prolactin regulates transcription of the ion uptake Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> cotransporter (ncc) gene in zebrafish gill." *Mol Cell Endocrinol*, **369(1-2): 98-106**.
- Bromley-Brits, K., Y. Deng and W. Song (2011). "Morris water maze test for learning and memory deficits in Alzheimer's disease model mice." *J Vis Exp*, **(53)**.

- Brown, R. S., I. C. Kokay, A. E. Herbison and D. R. Grattan (2010). "Distribution of prolactin-responsive neurons in the mouse forebrain." *J Comp Neurol*, **518(1)**: 92-102.
- Brown, R. S., I. C. Kokay, H. R. Phillipps, S. H. Yip, P. Gustafson, A. Wyatt, C. M. Larsen, P. Knowles, S. R. Ladyman, P. LeTissier and D. R. Grattan (2016). "Conditional Deletion of the Prolactin Receptor Reveals Functional Subpopulations of Dopamine Neurons in the Arcuate Nucleus of the Hypothalamus." *J Neurosci*, **36(35)**: 9173-9185.
- Brown, R. S., R. Piet, A. E. Herbison and D. R. Grattan (2012). "Differential actions of prolactin on electrical activity and intracellular signal transduction in hypothalamic neurons." *Endocrinology*, **153(5)**: 2375-2384.
- Brown, R. S., A. K. Wyatt, R. E. Herbison, P. J. Knowles, S. R. Ladyman, N. Binart, W. A. Banks and D. R. Grattan (2016). "Prolactin transport into mouse brain is independent of prolactin receptor." *FASEB*, **30(2)**: 1002-1010.
- Brusco, J., R. Wittmann, M. S. de Azevedo, A. B. Lucion, C. R. Franci, M. Giovenardi and A. A. Rasia-Filho (2008). "Plasma hormonal profiles and dendritic spine density and morphology in the hippocampal CA1 stratum radiatum, evidenced by light microscopy, of virgin and postpartum female rats." *Neurosci Lett*, **438(3)**: 346-350.
- Bu, G., X. Liang, J. Li and Y. Wang (2015). "Extra-pituitary prolactin (PRL) and prolactin-like protein (PRL-L) in chickens and zebrafish." *Gen Comp Endocrinol*, **220**: 143-153.
- Buckmaster, P. S. and D. G. Amaral (2001). "Intracellular recording and labeling of mossy cells and proximal CA3 pyramidal cells in macaque monkeys." *J Comp Neurol*, **430(2)**: 264-281.
- Bugge, K., E. Papaleo, G. W. Haxholm, J. T. Hopper, C. V. Robinson, J. G. Olsen, K. Lindorff-Larsen and B. B. Kragelund (2016). "A combined computational and structural model of the full-length human prolactin receptor." *Nat Commun*, **7**: 11578.
- Bulatov, A. A., A. V. Martynov and N. B. Smirnova (1997). "Biochemical nature of high-molecular-weight prolactin of human serum: identification of a prolactin-binding protein." *Biochemistry (Mosc)*, **62(9)**: 1039-1046.
- Burgess, N., E. A. Maguire and J. O'Keefe (2002). "The human hippocampus and spatial and episodic memory." *Neuron*, **35(4)**: 625-641.
- Burris, T. P., L. C. Stringer and M. E. Freeman (1991). "Pharmacologic evidence that a D2 receptor subtype mediates dopaminergic stimulation of prolactin secretion from the anterior pituitary gland." *Neuroendocrinology*, **54(2)**: 175-183.

- Buzsaki, G. and E. I. Moser (2013). "Memory, navigation and theta rhythm in the hippocampal-entorhinal system." *Nat Neurosci*, **16(2): 130-138**.
- Cabrera-Reyes, E. A., O. Limon-Morales, N. A. Rivero-Segura, I. Camacho-Arroyo and M. Cerbon (2017). "Prolactin function and putative expression in the brain." *Endocrine*, **57(2): 199-213**.
- California, U. o. (2007). University of California. UCSC Genome Browser on Mouse July 2007 (NCBI37/mm9) Assembly. *UCSC Genome Browser*. **2007**.
- California, U. o. (2009). " UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009 (GRCh37/hg19) Assembly". *UCSC Genome Browser on Human*. **2009**.
- Cao, H., L. Wang, S. Zhang, L. Lu, X. Sheng, Y. Han, Z. Yuan and Q. Weng (2015). "Seasonal Expression of Prolactin Receptor in the Scented Gland of Male Muskrat (*Ondatra zibethicus*)." *Sci Rep*, **5: 15036**.
- Capozzi, A., G. Scambia, A. Pontecorvi and S. Lello (2015). "Hyperprolactinemia: pathophysiology and therapeutic approach." *Gynecol Endocrinol*, **31(7): 506-510**.
- Carboni, A. (2007). "Desarrollo de la memoria declarativa." *EduPsykhé: Revista de psicología y psicopedagogía* **6(2): 245-268**.
- Caride, A., B. Fernandez-Perez, T. Cabaleiro, A. I. Esquifino and A. Lafuente (2009). "Cadmium exposure disrupts GABA and taurine regulation of prolactin secretion in adult male rats." *Toxicol Lett*, **185(3): 175-179**.
- Carlo, C. N. and C. F. Stevens (2011). "Analysis of differential shrinkage in frozen brain sections and its implications for the use of guard zones in stereology." *J Comp Neurol*, **519(14): 2803-2810**.
- Caronti, B., C. Calderaro, F. Passarelli, G. Palladini and F. E. Pontieri (1998). "Dopamine receptor mRNAs in the rat lymphocytes." *Life Sci*, **62(21): 1919-1925**.
- Carr, G. V., F. Maltese, D. R. Sibley, D. R. Weinberger and F. Papaleo (2017). "The Dopamine D5 Receptor Is Involved in Working Memory." *Front Pharmacol*, **8: 666**.
- Carre, N. and N. Binart (2014). "Prolactin and adipose tissue." *Biochimie*, **97: 16-21**.
- Carretero, J., E. Blanco, F. Sanchez, J. M. Riesco, M. Rubio, J. A. Juanes and R. Vazquez (1992). "Morphometrical variations of prolactin cells in response to prolonged and systemic administration of Met-enkephalin in female rats." *Anat Embryol (Berl)*, **186(1): 99-105**.

- Carretero, J., F. Lopez, L. Catalano-Iniesta, V. Sanchez-Robledo, M. J. Garcia-Barrado, M. C. Iglesias-Osma, M. Carretero-Hernandez, E. J. Blanco and D. J. Burks (2016). "Pituitary Aromatase P450 May Be Involved in Maintenance of the Population of Luteinizing Hormone-Positive Pituitary Cells in Mice." *Cells Tissues Organs*, **201(5): 390-398**.
- Carretero, J., V. Sanchez-Robledo, M. Carretero-Hernandez, L. Catalano-Iniesta, M. J. Garcia-Barrado, M. C. Iglesias-Osma and E. J. Blanco (2018). "Prolactin system in the hippocampus." *Cell Tissue Res*. **Epub ahead of print**.
- Carrillo-Mora, P. (2010). "Sistemas de memoria: reseña histórica, clasificación y conceptos actuales. Primera parte: Historia, taxonomía de la memoria, sistemas de memoria de largo plazo: la memoria semántica." *Salud mental*, **33(1): 85-93**.
- Castelhano-Carlos, M. J. and V. Baumans (2009). "The impact of light, noise, cage cleaning and in-house transport on welfare and stress of laboratory rats." *Lab Anim*, **43(4): 311-327**.
- Carvalho, J. C., E. de Oliveira, N. Peixoto-Silva, M. C. Fraga, J. L. Nobre, P. C. Lisboa and E. G. Moura (2015). "Maternal prolactin inhibition causes changes in leptin at 22- and 30-day-old pups." *Horm Metab Res*, **47(7): 528-536**.
- Castanho, T. C., P. S. Moreira, C. Portugal-Nunes, A. Novais, P. S. Costa, J. A. Palha, N. Sousa and N. C. Santos (2014). "The role of sex and sex-related hormones in cognition, mood and well-being in older men and women." *Biol Psychol*, **103: 158-166**.
- Catania, A. C. (1992). "B. F. Skinner, organism." *Am Psychol*, **47(11): 1521-1530**.
- Chaiseha, Y., P. Ngernsoungnern, N. Sartsoongnoen, N. Prakobsaeng and M. E. El Halawani (2012). "Presence of prolactin mRNA in extra-pituitary brain areas in the domestic turkey." *Acta Histochem*, **114(2): 116-121**.
- Chapin, R. E., D. J. Ball, Z. A. Radi, S. W. Kumpf, P. H. Koza-Taylor, D. M. Potter and W. Mark Vogel (2017). "Effects of the Janus Kinase Inhibitor, Tofacitinib, on Testicular Leydig Cell Hyperplasia and Adenoma in Rats, and on Prolactin Signaling in Cultured Primary Rat Leydig Cells." *Toxicol Sci*, **155(1): 148-156**.
- Chen, P. and M. S. Smith (2004). "Regulation of hypothalamic neuropeptide Y messenger ribonucleic acid expression during lactation: role of prolactin." *Endocrinology*, **145(2): 823-829**.
- Cho, Y. H., K. P. Giese, H. Tanila, A. J. Silva and H. Eichenbaum (1998). "Abnormal hippocampal spatial representations in alphaCaMKII286A and CREBalphaDelta- mice." *Science*, **279(5352): 867-869**.



- Christiansen, K., C. Metzler-Baddeley, G. D. Parker, N. Muhlert, D. K. Jones, J. P. Aggleton and S. D. Vann (2017). "Topographic separation of fornical fibers associated with the anterior and posterior hippocampus in the human brain: An MRI-diffusion study." *Brain Behav*, **7(1)**: e00604.
- Clapp, C., C. Gonzalez, Y. Macotela, J. Aranda, J. C. Rivera, C. Garcia, J. Guzman, M. Zamorano, C. Vega, C. Martin, M. C. Jeziorski and G. M. de la Escalera (2006). "Vasoinhibins: a family of N-terminal prolactin fragments that inhibit angiogenesis and vascular function." *Front Horm Res*, **35**: 64-73.
- Clapp, C., S. Thebault and G. Martinez de la Escalera (2008). "Role of prolactin and vasoinhibins in the regulation of vascular function in mammary gland." *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, **13(1)**: 55-67.
- Clapp, C., L. Torner, G. Gutierrez-Ospina, E. Alcántara, F. J. Lopez-Gomez, M. Nagano, P. A. Kelly, S. Mejia, M. A. Morales and G. Martinez de la Escalera (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(22)**: 10384-10388.
- Clark, R. E. (2018). "A History and Overview of the Behavioral Neuroscience of Learning and Memory." *Curr Top Behav Neurosci*, **Epub ahead of print**.
- Cohen, H., O. Cohen and J. Gagnon (1994). "Serum prolactin-binding protein (PRL-BP) of human and rat are identified as IgG." *C R Acad Sci III*, **317(4)**: 293-298.
- Connor, L. T., A. J. MacKay and D. A. White (2000). "Working memory: a foundation for executive abilities and higher-order cognitive skills." *Semin Speech Lang*, **21(2)**: 109-118; quiz 118-109.
- Cooke, N. E., D. Coit, J. Shine, J. D. Baxter and J. A. Martial (1981). "Human prolactin. cDNA structural analysis and evolutionary comparisons." *J Biol Chem*, **256(8)**: 4007-4016.
- Cooke, N. E., D. Coit, R. I. Weiner, J. D. Baxter and J. A. Martial (1980). "Structure of cloned DNA complementary to rat prolactin messenger RNA." *J Biol Chem*, **255(13)**: 6502-6510.
- Cooper, D. C., S. Chung and N. Spruston (2005). "Output-mode transitions are controlled by prolonged inactivation of sodium channels in pyramidal neurons of subiculum." *PLoS Biol*, **3(6)**: e175.
- Cooper, D. C., S. J. Moore, N. P. Staff and N. Spruston (2003). "Psychostimulant-induced plasticity of intrinsic neuronal excitability in ventral subiculum." *J Neurosci*, **23(30)**: 9937-9946.

- Corbacho, A. M., Y. Macotela, G. Nava, L. Torner, Z. Duenas, G. Noris, M. A. Morales, G. Martinez De La Escalera and C. Clapp (2000). "Human umbilical vein endothelial cells express multiple prolactin isoforms." *J Endocrinol*, **166(1)**: 53-62.
- Corona, R. and F. Levy (2015). "Chemical olfactory signals and parenthood in mammals." *Horm Behav*, **68**: 77-90.
- Cosenza, G., M. Iannaccone, B. Auzino, N. P. P. Macciotta, A. Kovitvadhi, I. Nicolae and A. Pauciullo (2018). "Remarkable genetic diversity detected at river buffalo prolactin receptor (PRLR) gene and association studies with milk fatty acid composition." *Anim Genet*, **49(3)**: 159-168.
- Costanza, M., N. Binart, L. Steinman and R. Pedotti (2015). "Prolactin: a versatile regulator of inflammation and autoimmune pathology." *Autoimmun Rev*, **14(3)**: 223-230.
- Costanza, M. and R. Pedotti (2016). "Prolactin: Friend or Foe in Central Nervous System Autoimmune Inflammation?" *Int J Mol Sci*, **17(12)**.
- Craven, A. J., A. J. Nixon, M. G. Ashby, C. J. Ormandy, K. Blazek, R. J. Wilkins and A. J. Pearson (2006). "Prolactin delays hair regrowth in mice." *J Endocrinol*, **191(2)**: 415-425.
- D'Hooge, R. and P. P. De Deyn (2001). "Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory." *Brain Res Brain Res Rev*, **36(1)**: 60-90.
- De la Lengua Española, D. (2001). "Real academia española." **Vigésima 1**.
- De Lillo, F. (1959). "[On a method of rapid staining of preparations obtained with the freezing microtome]." *Ann Med Nav Trop*, **64**: 755-758.
- del Rosal, E., L. Alonso, R. Moreno, M. Vazquez and J. Santacreu (2006). "Simulation of habituation to simple and multiple stimuli." *Behav Processes*, **73(3)**: 272-277.
- Dening, T. and M. B. Sandilyan (2015). "Dementia: definitions and types." *Nurs Stand*, **29(37)**: 37-42.
- Derr, R. F. (1991). "Pain perception in decapitated rat brain." *Life Sci*, **49(19)**: 1399-1402.
- Devi, Y. S. and J. Halperin (2014). "Reproductive actions of prolactin mediated through short and long receptor isoforms." *Mol Cell Endocrinol*, **382(1)**: 400-410.
- DeVito, W. J. (1988). "Distribution of immunoreactive prolactin in the male and female rat brain: effects of hypophysectomy and intraventricular administration of colchicine." *Neuroendocrinology*, **47(4)**: 284-289.
- Diakonova, M. (2015). *Advances in Experimental Medicine and Biology: Recent Advances in Prolactin Research*. Switzerland, Springer International.

- DiMattia, G. E., B. Gellersen, H. G. Bohnet and H. G. Friesen (1988). "A human B-lymphoblastoid cell line produces prolactin." *Endocrinology*, **122(6)**: 2508-2517.
- Donhoffner, M. E., S. Al Saleh, O. Schink and R. I. Wood (2017). "Prosocial effects of prolactin in male rats: Social recognition, social approach and social learning." *Horm Behav*, **96**: 122-129.
- Donner, N., R. Bredewold, R. Maloumy and I. D. Neumann (2007). "Chronic intracerebral prolactin attenuates neuronal stress circuitries in virgin rats." *Eur J Neurosci*, **25(6)**: 1804-1814.
- Doretto, M. C., M. Oliveira-e-Silva, D. L. Ferreira-Alves, S. G. Pires, N. Garcia-Cairasco and A. M. Reis (2003). "Effect of lactation on the expression of audiogenic seizures: association with plasma prolactin profiles." *Epilepsy Res*, **54(2-3)**: 109-121.
- Dorkkam, N., K. Wongdee, P. Suntornsaratoon, N. Krishnamra and N. Charoenphandhu (2013). "Prolactin stimulates the L-type calcium channel-mediated transepithelial calcium transport in the duodenum of male rats." *Biochem Biophys Res Commun*, **430(2)**: 711-716.
- Duncan, R. S., B. Song and P. Koulen (2018). "Presenilins as Drug Targets for Alzheimer's Disease-Recent Insights from Cell Biology and Electrophysiology as Novel Opportunities in Drug Development." *Int J Mol Sci*, **19(6)**.
- Dusanter-Fourt, I., O. Muller, A. Ziemiecki, P. Mayeux, B. Drucker, J. Djiane, A. Wilks, A. G. Harpur, S. Fischer and S. Gisselbrecht (1994). "Identification of JAK protein tyrosine kinases as signaling molecules for prolactin. Functional analysis of prolactin receptor and prolactin-erythropoietin receptor chimera expressed in lymphoid cells." *EMBO J*, **13(11)**: 2583-2591.
- Duval, F., M. C. Mokrani, A. Erb, F. Gonzalez Opera, C. Calleja and V. Paris (2017). "Relationship between chronobiological thyrotropin and prolactin responses to protirelin (TRH) and suicidal behavior in depressed patients." *Psychoneuroendocrinology*, **85**: 100-109.
- Duvilanski, B. H., D. Pisera, A. Seilicovich, M. del Carmen Diaz, M. Lasaga, E. Isovich and M. O. Velardez (2000). "Interaction between substance P and TRH in the control of prolactin release." *J Endocrinol*, **166(2)**: 373-380.
- Easton, A., V. Douchamps, M. Eacott and C. Lever (2012). "A specific role for septohippocampal acetylcholine in memory?" *Neuropsychologia*, **50(13)**: 3156-3168.
- Ebrahimi-Ghiri, M., M. Rostampour, M. Jamshidi-Mehr, M. Nasehi and M. R. Zarrindast (2017). "Role of CA1 GABAA and GABAB receptors on learning deficit induced by D-AP5 in passive avoidance step-through task." *Brain Res*, **1678**: 164-173.

- Ehmann, H., C. Salzig, P. Lang, E. Friauf and H. G. Nothwang (2008). "Minimal sex differences in gene expression in the rat superior olivary complex." *Hear Res*, **245(1-2)**: 65-72.
- Eichenbaum, H. (1997). "Memory: old questions, new perspectives." *Curr Biol*, **7(1)**: R53-55.
- Ellis, L. and M. F. Picciano (1993). "Prolactin variants in term and preterm human milk: altered structural characteristics, biological activity and immunoreactivity." *Endocr Regul*, **27(4)**: 181-192.
- Ellis, L. A. and M. F. Picciano (1995). "Bioactive and immunoreactive prolactin variants in human milk." *Endocrinology*, **136(6)**: 2711-2720.
- Emanuele, N. V., J. K. Jurgens, M. M. Halloran, J. J. Tentler, A. M. Lawrence and M. R. Kelley (1992). "The rat prolactin gene is expressed in brain tissue: detection of normal and alternatively spliced prolactin messenger RNA." *Mol Endocrinol*, **6(1)**: 35-42.
- Emanuele, N. V., L. Metcalfe, L. Walloch, J. Tentler, T. C. Hagen, C. T. Beer, D. Martinson, P. W. Gout, L. Kirsteins and A. Lawrence (1987). "Extrahypothalamic brain prolactin: characterization and evidence for independence from pituitary prolactin." *Brain research*, **421(1-2)**: 255-262.
- Emerich, D. F., C. K. Cain, C. Greco, J. A. Saydoff, Z. Y. Hu, H. Liu and M. D. Lindner (1997). "Cellular delivery of human CNTF prevents motor and cognitive dysfunction in a rodent model of Huntington's disease." *Cell Transplant*, **6(3)**: 249-266.
- Enjalbert, A., F. Sladeczek, G. Guillon, P. Bertrand, C. Shu, J. Epelbaum, A. Garcia-Sainz, S. Jard, C. Lombard, C. Kordon and et al. (1986). "Angiotensin II and dopamine modulate both cAMP and inositol phosphate productions in anterior pituitary cells. Involvement in prolactin secretion." *J Biol Chem*, **261(9)**: 4071-4075.
- Epstein, R. A., E. Z. Patai, J. B. Julian and H. J. Spiers (2017). "The cognitive map in humans: spatial navigation and beyond." *Nat Neurosci*, **20(11)**: 1504-1513.
- Erdmann, S., A. Ricken, C. Merkwitz, I. Struman, R. Castino, K. Hummitzsch, F. Gaunitz, C. Isidoro, J. Martial and K. Spanel-Borowski (2007). "The expression of prolactin and its cathepsin D-mediated cleavage in the bovine corpus luteum vary with the estrous cycle." *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **293(5)**: E1365-1377.
- Eyal, O., J. B. Jomain, C. Kessler, V. Goffin and S. Handwerger (2007). "Autocrine prolactin inhibits human uterine decidualization: a novel role for prolactin." *Biol Reprod*, **76(5)**: 777-783.

- Fahie-Wilson, M. (2006). "The macroprolactinemia problem and its solution." *South Med J*, **99(11)**: 1206.
- Fairen, A. (2007). "Cajal and Lorente de No on cortical interneurons: coincidences and progress." *Brain Res Rev*, **55(2)**: 430-444.
- Farag, A. G. A., M. A. Basha, S. A. Amin, N. F. Elnaidany, N. G. Elhelbawy, M. M. T. Mostafa, S. A. Khodier, R. A. Ibrahim and R. Z. Mahfouz (2018). "Tramadol (opioid) abuse is associated with a dose- and time-dependent poor sperm quality and hyperprolactinaemia in young men." *Andrologia*, **e13026**.
- Faron-Gorecka, A., M. Kusmider, J. Solich, M. Kolasa, K. Szafran, D. Zurawek, P. Pabian and M. Dziedzicka-Wasylewska (2013). "Involvement of prolactin and somatostatin in depression and the mechanism of action of antidepressant drugs." *Pharmacol Rep*, **65(6)**: 1640-1646.
- Fellner, M. C., G. Volberg, M. Wimber, M. Goldhacker, M. W. Greenlee and S. Hanslmayr (2016). "Spatial Mnemonic Encoding: Theta Power Decreases and Medial Temporal Lobe BOLD Increases Co-Occur during the Usage of the Method of Loci." *eNeuro*, **3(6)**.
- Ferraris, J., S. Bernichtein, D. Pisera and V. Goffin (2013). "Use of prolactin receptor antagonist to better understand prolactin regulation of pituitary homeostasis." *Neuroendocrinology*, **98(3)**: 171-179.
- Fester, L. and G. M. Rune (2015). "Sexual neurosteroids and synaptic plasticity in the hippocampus." *Brain Res*, **1621**: 162-169.
- Finger, S. (2001). *Origins of Neuroscience: A history of explorations into brain function*, Oxford University Press.
- Fitzgerald, P. and T. G. Dinan (2008). "Prolactin and dopamine: what is the connection? A review article." *J Psychopharmacol*, **22(2 Suppl)**: 12-19.
- Fjell, A. M., L. McEvoy, D. Holland, A. M. Dale, K. B. Walhovd and I. Alzheimer's Disease Neuroimaging (2014). "What is normal in normal aging? Effects of aging, amyloid and Alzheimer's disease on the cerebral cortex and the hippocampus." *Prog Neurobiol*, **117**: 20-40.
- Fogwe, L. A. and F. B. Mesfin (2018). *Neuroanatomy, Hippocampus. StatPearls*. Treasure Island (FL).
- Folch, J., I. Patraca, N. Martinez, I. Pedros, D. Petrov, M. Ettcheto, S. Abad, M. Marin, C. Beas-Zarate and A. Camins (2015). "The role of leptin in the sporadic form of Alzheimer's disease. Interactions with the adipokines amylin, ghrelin and the pituitary hormone prolactin." *Life Sci*, **140**: 19-28.
- Foley, A. M., Z. M. Ammar, R. H. Lee and C. S. Mitchell (2015). "Systematic review of the relationship between amyloid-beta levels and measures of transgenic mouse cognitive deficit in Alzheimer's disease." *J Alzheimers Dis*, **44(3)**: 787-795.

- Fouquet, C., B. M. Babayan, A. Watilliaux, B. Bontempi, C. Tobin and L. Rondireig (2013). "Complementary Roles of the Hippocampus and the Dorsomedial Striatum during Spatial and Sequence-Based Navigation Behavior." *PLoS One*, **8(6)**: e67232.
- Fraga, M. C., E. G. Moura, J. O. Silva, I. T. Bonomo, C. C. Filgueiras, Y. Abreu-Villaca, M. C. Passos, P. C. Lisboa and A. C. Manhaes (2011). "Maternal prolactin inhibition at the end of lactation affects learning/memory and anxiety-like behaviors but not novelty-seeking in adult rat progeny." *Pharmacol Biochem Behav*, **100(1)**: 165-173.
- Francis, D. D., M. D. Zaharia, N. Shanks and H. Anisman (1995). "Stress-induced disturbances in Morris water-maze performance: interstrain variability." *Physiol Behav*, **58(1)**: 57-65.
- Frasch, M. G., S. Lobmaier, T. Stampalija, P. Desplats, M. E. Pallares, V. Pastor, M. Brocco, H. T. Wu, J. Schulkin, C. Herry, A. Seely, G. A. S. Metz, Y. Louzoun and M. Antonelli (2018). "Non-invasive biomarkers of fetal brain development reflecting prenatal stress: an integrative multi-scale multi-species perspective on data collection and analysis." *Neurosci Biobehav Rev*, **Epub ahead of print**.
- Freemark, M., P. Driscoll, J. Andrews, P. A. Kelly and M. Royster (1996). "Ontogenesis of prolactin receptor gene expression in the rat olfactory system: potential roles for lactogenic hormones in olfactory development." *Endocrinology*, **137(3)**: 934-942.
- Freeman, M. E., B. Kanyicska, A. Lerant and G. Nagy (2000). "Prolactin: structure, function, and regulation of secretion." *Physiol Rev*, **80(4)**: 1523-1631.
- Fried, I. (2016). "Brain Stimulation in Alzheimer's Disease." *J Alzheimers Dis*, **54(2)**: 789-791.
- Fukuda, A., C. Mori, H. Hashimoto, Y. Noda, T. Mori and K. Hoshino (1989). "Effects of prolactin during preincubation of mouse spermatozoa on fertilizing capacity in vitro." *J In Vitro Fert Embryo Transf*, **6(2)**: 92-97.
- Gage, F. H., S. B. Dunnett and A. Bjorklund (1984). "Spatial learning and motor deficits in aged rats." *Neurobiol Aging*, **5(1)**: 43-48.
- Galloway, E. G., I. T. Alemán and S. P. Fuxá (2003). Muerte neuronal excitotóxica: interacción entre las rutas de señalización del IGF-I y el glutamato, Universidad Complutense de Madrid, *Servicio de Publicaciones*.
- García-Barrado, M. J., E. J. Blanco, L. Catalano-Iniesta, V. Sánchez-Robledo, M. C. Iglesias-Osma, M. Carretero-Hernández, J. Rodríguez-Cobos, D. J. Burks and J. Carretero (2016). "Relevance of pituitary aromatase and estradiol on the maintenance of the population of prolactin-positive cells in male mice." *Steroids*, **111**: 121-126.

- García Barrado, M. J., E. J. Blanco, M. Carretero Hernandez, M. C. Iglesias Osma, M. Carretero, J. J. Herrero, D. J. Burks and J. Carretero (2014). "Local transformations of androgens into estradiol by aromatase P450 is involved in the regulation of prolactin and the proliferation of pituitary prolactin-positive cells." *PLoS One*, **9(6)**: e101403.
- García García, E. (2009). "Aprendizaje y construcción del conocimiento." *Biblioteca Nueva*, **21-44**.
- Ge, X., Y. Shi, J. Li, Z. Zhang, X. Lin, J. Zhan, H. Ge, J. Xu, Q. Yu, Y. Leng, G. Teng, L. Feng, H. Meng, Y. Tang, F. Zang, A. W. Toga and S. Liu (2015). "Development of the human fetal hippocampal formation during early second trimester." *Neuroimage*, **119**: 33-43.
- Geddes, R. I., K. Hayashi, Q. Bongers, M. Wehber, I. M. Anderson, A. D. Jansen, C. Nier, E. Fares, G. Farquhar, A. Kapoor, T. E. Ziegler, S. VadakkadathMeethal, I. M. Bird and C. S. Atwood (2017). "Conjugated Linoleic Acid Administration Induces Amnesia in Male Sprague Dawley Rats and Exacerbates Recovery from Functional Deficits Induced by a Controlled Cortical Impact Injury." *PLoS One*, **12(1)**: e0169494.
- Gellersen, B., I. A. Brosens and J. J. Brosens (2007). "Decidualization of the human endometrium: mechanisms, functions, and clinical perspectives." *Semin Reprod Med*, **25(6)**: 445-453.
- Gerlai, R., A. McNamara, D. L. Choi-Lundberg, M. Armanini, J. Ross, L. Powell-Braxton and H. S. Phillips (2001). "Impaired water maze learning performance without altered dopaminergic function in mice heterozygous for the GDNF mutation." *Eur J Neurosci*, **14(7)**: 1153-1163.
- Gillam, M. P. M. M. E. (2011). The Pituitary. Chapter 5, *Elsevier*.
- Gimenez-Llort, L., M. Ratia, B. Perez, P. Camps, D. Munoz-Torrero, A. Badia and M. V. Clos (2017). "Behavioural effects of novel multitarget anticholinesterasic derivatives in Alzheimer's disease." *Behav Pharmacol*, **28(2 and 3 - Special Issue)**: 124-131.
- Ginther, O. J. and M. A. Beg (2012). "Stimulation of a pulse of LH and reduction in PRL concentration by a physiologic dose of GnRH before, during, and after luteolysis in heifers." *Anim Reprod Sci*, **133(1-2)**: 52-62.
- Gloria, E., C. Regisford and L. S. Katz (1994). "Effects of bromocriptine treatment on the expression of sexual behavior in male sheep (*Ovis aries*)." *J Anim Sci*, **72(3)**: 591-597.
- GODOY, C., M. ACEVEDO, A. BARRERA, A. YISMEYIÁN and F. UGARTE (2009). "Hipertiroidismo en niños y adolescentes." *Revista chilena de pediatría*, **80(1)**: 21-29.
- Goffin, V., N. Binart, P. Touraine and P. A. Kelly (2002). "Prolactin: the new biology of an old hormone." *Annu Rev Physiol*, **64**: 47-67.

- Goffin, V., B. Bouchard, C. J. Ormandy, E. Weimann, F. Ferrag, P. Touraine, C. Bole-Feysot, R. A. Maaskant, P. Clement-Lacroix, M. Edery, N. Binart and P. A. Kelly (1998). "Prolactin: a hormone at the crossroads of neuroimmunoendocrinology." *Ann N Y Acad Sci*, **840**: 498-509.
- Goffin, V. and P. A. Kelly (1996). "Prolactin and growth hormone receptors." *Clin Endocrinol (Oxf)*, **45(3)**: 247-255.
- Gonzalez, L. C., L. Pinilla, M. Tena-Sempere and E. Aguilar (2000). "Regulation of prolactin secretion by alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptors in male rats." *J Endocrinol*, **166(3)**: 669-675.
- Goodlett, C. R. and S. D. Peterson (1995). "Sex differences in vulnerability to developmental spatial learning deficits induced by limited binge alcohol exposure in neonatal rats." *Neurobiol Learn Mem*, **64(3)**: 265-275.
- Grandjean, P., C. Pichery, M. Bellanger and E. Budtz-Jorgensen (2012). "Calculation of mercury's effects on neurodevelopment." *Environ Health Perspect*, **120(12)**: A452; author reply A452.
- Grattan, D. R. (2015). "60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: The hypothalamo-prolactin axis." *J Endocrinol*, **226(2)**: T101-122.
- Grattan, D. R. and I. C. Kokay (2008). "Prolactin: a pleiotropic neuroendocrine hormone." *J Neuroendocrinol*, **20(6)**: 752-763.
- Grattan, D. R., X. J. Pi, Z. B. Andrews, R. A. Augustine, I. C. Kokay, M. R. Summerfield, B. Todd and S. J. Bunn (2001). "Prolactin receptors in the brain during pregnancy and lactation: implications for behavior." *Horm Behav*, **40(2)**: 115-124.
- Grattan, D. R. and M. Selmanoff (1994). "Prolactin- and testosterone-induced inhibition of LH secretion after orchidectomy: role of preoptic and tuberoinfundibular gamma-aminobutyric acidergic neurones." *J Endocrinol*, **143(1)**: 165-174.
- Gregg, C., V. Shikar, P. Larsen, G. Mak, A. Chojnacki, V. W. Yong and S. Weiss (2007). "White matter plasticity and enhanced remyelination in the maternal CNS." *J Neurosci*, **27(8)**: 1812-1823.
- Griggs, W. S., H. F. Kim, A. Ghazizadeh, M. Gabriela Costello, K. M. Wall and O. Hikosaka (2017). "Flexible and Stable Value Coding Areas in Caudate Head and Tail Receive Anatomically Distinct Cortical and Subcortical Inputs." *Front Neuroanat*, **11**: 106.
- Grillon, S., C. Colard, P. Risold, D. Fellmann and B. Griffond (1998). "Ontogenic development of prolactin immunoreactive neurons in the rat lateral hypothalamus." *Neuropeptides*, **32(4)**: 327-332.
- Grosvenor, C. E. and N. S. Whitworth (1983). "Accumulation of prolactin by maternal milk and its transfer to circulation of neonatal rat-a review." *Endocrinol, Exp* **17(3-4)**: 271-282.



- Gruszka, A., M. D. Culler and S. Melmed (2012). "Somatostatin analogs and chimeric somatostatin-dopamine molecules differentially regulate human growth hormone and prolactin gene expression and secretion in vitro." *Mol Cell Endocrinol*, **362(1-2): 104-109**.
- Guaiana, G., R. O'Reilly and L. Grassi (2018). "A Comparison of Inpatient Adult Psychiatric Services in Italy and Canada." *Community Ment Health J*. **Epub ahead of print**.
- Gudelsky, G. A., E. Passaro and H. Y. Meltzer (1986). "Delayed activation of tuberoinfundibular dopamine neurons and suppression of prolactin secretion in the rat after morphine administration." *J Pharmacol Exp Ther*, **236(3): 641-645**.
- Guillaumot, P., E. Tabone and M. Benahmed (1996). "Sertoli cells as potential targets of prolactin action in the testis." *Mol Cell Endocrinol*, **122(2): 199-206**.
- Hachim, I. Y., M. Y. Hachim, V. M. Lopez, J. J. Lebrun and S. Ali (2016). "Prolactin Receptor Expression is an Independent Favorable Prognostic Marker in Human Breast Cancer." *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, **24(4): 238-245**.
- Haider, S., Z. Batool, S. Ahmad, R. A. Siddiqui and D. J. Haleem (2017). "Walnut supplementation reverses the scopolamine-induced memory impairment by restoration of cholinergic function via mitigating oxidative stress in rats: a potential therapeutic intervention for age related neurodegenerative disorders." *Metab Brain Dis*, **Epub ahead of print**.
- Han, Y., K. Wang, J. Jia and W. Wu (2017). "Changes of EEG Spectra and Functional Connectivity during an Object-Location Memory Task in Alzheimer's Disease." *Front Behav Neurosci*, **11: 107**.
- Harrison, P. J. (2004). "The hippocampus in schizophrenia: a review of the neuropathological evidence and its pathophysiological implications." *Psychopharmacology (Berl)*, **174(1): 151-162**.
- Hartley, T., C. Lever, N. Burgess and J. O'Keefe (2014). "Space in the brain: how the hippocampal formation supports spatial cognition." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **369(1635): 20120510**.
- Harvey, S., C. Aramburo and E. J. Sanders (2012). "Extrapituitary production of anterior pituitary hormones: an overview." *Endocrine*, **41(1): 19-30**.
- Haskins, J. T., G. A. Gudelsky, R. L. Moss and J. C. Porter (1981). "Iontophoresis of morphine into the arcuate nucleus: effects on dopamine concentrations in hypophysial portal plasma and serum prolactin concentrations." *Endocrinology*, **108(3): 767-771**.

- Hassan, M., Q. Abbas, S. Y. Seo, S. Shahzadi, H. Al Ashwal, N. Zaki, Z. Iqbal and A. A. Moustafa (2018). "Computational modeling and biomarker studies of pharmacological treatment of Alzheimer's disease (Review)." *Mol Med Rep*, **Epub ahead of print**.
- Hattori, N. (2003). "Macroprolactinemia: a new cause of hyperprolactinemia." *J Pharmacol Sci*, **92(3): 171-177**.
- Hebb (1949). "The organization of behavior." *Wiley*, New York.
- Heckers, S. and C. Konradi (2002). "Hippocampal neurons in schizophrenia." *J Neural Transm (Vienna)*, **109(5-6): 891-905**.
- Heim, M. H. (1999). "The Jak-STAT pathway: cytokine signalling from the receptor to the nucleus." *J Recept Signal Transduct Res*, **19(1-4): 75-120**.
- Hemsworth, P. H., D. J. Mellor, G. M. Cronin and A. J. Tilbrook (2015). "Scientific assessment of animal welfare." *N Z Vet J*, **63(1): 24-30**.
- Hennighausen, L. and G. W. Robinson (2008). "Interpretation of cytokine signaling through the transcription factors STAT5A and STAT5B." *Genes Dev*, **22(6): 711-721**.
- Henry Duvernoy, F. C., Pierre-Yves Risold (2013). *The Human Hippocampus: Functional Anatomy, Vascularization and Serial Sections with MRI*. Springer, **6<sup>th</sup> Edition**.
- Henry, J. F. and B. B. Sherwin (2012). "Hormones and cognitive functioning during late pregnancy and postpartum: a longitudinal study." *Behav Neurosci*, **126(1): 73-85**.
- Hevner, R. F. (2016). "Evolution of the mammalian dentate gyrus." *J Comp Neurol*, **524(3): 578-594**.
- Hirai, J., M. Nishita, N. Nakao, T. R. Saito and M. Tanaka (2013). "Regulation of prolactin receptor gene expression in the rat choroid plexus via transcriptional activation of multiple first exons during postnatal development and lactation." *Exp Anim*, **62(1): 49-56**.
- Hiyama, G., N. Kansaku, M. Kinoshita, T. Sasanami, A. Nakamura, K. Noda, A. Tsukada, K. Shimada and D. Zadworny (2009). "Changes in post-translational modifications of prolactin during development and reproductive cycles in the chicken." *Gen Comp Endocrinol*, **161(2): 238-245**.
- Hnasko, T. S. and R. M. Hnasko (2015). "The Western Blot." *Methods Mol Biol*, **1318: 87-96**.
- Hofland, L. J., R. A. Felders, W. W. de Herder and S. W. Lamberts (2010). "Pituitary tumours: the sst/D2 receptors as molecular targets." *Mol Cell Endocrinol*, **326(1-2): 89-98**.

- Horseman, N. D. and K. A. Gregerson (2014). "Prolactin actions." *J Mol Endocrinol*, **52(1)**: R95-106.
- Hu, Q., Y. Meng, H. Tian, S. Chen and H. Xiao (2015). "Cloning, expression of, and evidence of positive selection for, the prolactin receptor gene in Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*)." *J Exp Zool B Mol Dev Evol*, **324(8)**: 707-719.
- Hu, S., R. Duggavathi and D. Zadworny (2017). "Regulatory Mechanisms Underlying the Expression of Prolactin Receptor in Chicken Granulosa Cells." *PLoS One*, **12(1)**: e0170409.
- Huang, Y., Z. Zhao, X. Wei, Y. Zheng, J. Yu, J. Zheng and L. Wang (2016). "Long-term trihexyphenidyl exposure alters neuroimmune response and inflammation in aging rat: relevance to age and Alzheimer's disease." *J Neuroinflammation*, **13(1)**: 175.
- Hugo, E. R., D. C. Borcharding, K. S. Gersin, J. Loftus and N. Ben-Jonathan (2008). "Prolactin release by adipose explants, primary adipocytes, and LS14 adipocytes." *J Clin Endocrinol Metab*, **93(10)**: 4006-4012.
- i Massó, A. G. (2009). "El cerebro como máquina para aprender, recordar y olvidar." *Arbor*, **185(736)**: 451-469.
- Ibarra, M. E., M. R. Funes, F. Loidl, L. Di Ciano and F. R. Ibarra (2007). "IMAGENES EN MEDICINA." *MEDICINA (Buenos Aires)*, **67**: 727.
- Ignacak, A., M. Kasztelnik, T. Sliwa, R. A. Korbut, K. Rajda and T. J. Guzik (2012). "Prolactin--not only lactotrophin. A "new" view of the "old" hormone." *J Physiol Pharmacol*, **63(5)**: 435-443.
- Infanti, E., C. Hickey and M. Turatto (2015). "Reward associations impact both iconic and visual working memory." *Vision Res*, **107**: 22-29.
- Iovino, M., V. A. Giagulli, B. Licchelli, E. Iovino, E. Guastamacchia and V. Triggiani (2016). "Synaptic Inputs of Neural Afferent Pathways to Vasopressin- and Oxytocin-Secreting Neurons of Supraoptic and Paraventricular Hypothalamic Nuclei." *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, **16(4)**: 276-287.
- Ishida, M., M. Maehara, T. Watanabe, Y. Yanagisawa, Y. Takata, R. Nakajima, M. Suzuki and T. Harigaya (2014). "Vasoinhibins, N-terminal mouse prolactin fragments, participate in mammary gland involution." *J Mol Endocrinol*, **52(3)**: 279-287.
- Izant, J. G. and J. R. McIntosh (1980). "Microtubule-associated proteins: a monoclonal antibody to MAP2 binds to differentiated neurons." *Proc Natl Acad Sci USA*, **77(8)**: 4741-4745.
- Jabbour, H. N. and H. O. Critchley (2001). "Potential roles of decidual prolactin in early pregnancy." *Reproduction*, **121(2)**: 197-205.

- Jaffe, D. B. and R. Gutierrez (2007). "Mossy fiber synaptic transmission: communication from the dentate gyrus to area CA3." *Prog Brain Res*, **163**: 109-132.
- Jain, S. K. and D. Zelena (2013). "Role of ionotropic glutamate receptors in the control of prolactin secretion by other neurotransmitters and neuropeptides at the level of the pituitary." *Endocr Regul*, **47(2)**: 65-74.
- Janota, C. S., D. Brites, C. A. Lemere and M. A. Brito (2015). "Glio-vascular changes during ageing in wild-type and Alzheimer's disease-like APP/PS1 mice." *Brain Res*, **1620**: 153-168.
- Jaworski, R. P., P. Callahan and J. Janik (1997). "Immunoneutralization of beta-endorphin blocks prolactin release during suckling without affecting tuberoinfundibular dopaminergic neural activity." *Life Sci*, **61(13)**: 1301-1311.
- Jensen, E. (2014). "Technical review: In situ hybridization." *Anat Rec (Hoboken)*, **297(8)**: 1349-1353.
- Jett, D. A., A. C. Kuhlmann, S. J. Farmer and T. R. Guilarte (1997). "Age-dependent effects of developmental lead exposure on performance in the Morris water maze." *Pharmacol Biochem Behav*, **57(1-2)**: 271-279.
- Jiao, C. X., H. Zhou, C. X. Yang, C. Ma, Y. X. Yang, R. R. Mao, L. Xu and Q. X. Zhou (2017). "Protective efficacy of a single salvianolic acid A treatment on photothrombosis-induced sustained spatial memory impairments." *Neuropsychiatr Dis Treat*, **13**: 1181-1192.
- Jódar-Vicente, M. (2004). "Funciones cognitivas del lóbulo frontal." *Revista de neurología*, **39(2)**: 178-182.
- Johnston, A. N., W. Bu, S. Hein, S. Garcia, L. Camacho, L. Xue, L. Qin, C. Nagi, S. G. Hilsenbeck, J. Kapali, K. Podsypanina, J. Nangia and Y. Li (2018). "Hyperprolactinemia-inducing antipsychotics increase breast cancer risk by activating JAK-STAT5 in precancerous lesions." *Breast Cancer Res*, **20(1)**: 42.
- Jones, E. G. and A. Peters (2012). *Cerebral Cortex: Comparative Structure and Evolution of Cerebral Cortex*, Springer US.
- Jorgensen, H. S. (2007). "Studies on the neuroendocrine role of serotonin." *Dan Med Bull*, **54(4)**: 266-288.
- Kaiser, U. B. (2012). "Hyperprolactinemia and infertility: new insights." *J Clin Invest*, **122(10)**: 3467-3468.
- Kandel, E. R. S., J.H.; Jessell, T.M (2001). *Principios de Neurociencia*, Katz editores, 4ª Edición.

- Kanyicska, B., T. P. Burris and M. E. Freeman (1991). "The effects of endothelins on the secretion of prolactin, luteinizing hormone, and follicle-stimulating hormone are mediated by different guanine nucleotide-binding proteins." *Endocrinology*, **129(5)**: 2607-2613.
- Kawauchi, H., A. Yasuda and M. Rand-Weaver (1990). "Evolution of prolactin and growth hormone family." *Prog Clin Biol Res*, **342**: 47-53.
- Keeler, C., P. S. Dannies and M. E. Hodsdon (2003). "The tertiary structure and backbone dynamics of human prolactin." *J Mol Biol*, **328(5)**: 1105-1121.
- Keller, J. N. (2006). "Age-related neuropathology, cognitive decline, and Alzheimer's disease." *Ageing Res Rev*, **5(1)**: 1-13.
- Kappel, S., P. Hawkins and M. T. Mendl (2017). "To Group or Not to Group? Good Practice for Housing Male Laboratory Mice." *Animals (Basel)*, **7(12)**.
- Kessels, R. P., E. H. de Haan, L. J. Kappelle and A. Postma (2001). "Varieties of human spatial memory: a meta-analysis on the effects of hippocampal lesions." *Brain Res Brain Res Rev*, **35(3)**: 295-303.
- Kessels, R. P., L. Jaap Kappelle, E. H. de Haan and A. Postma (2002). "Lateralization of spatial-memory processes: evidence on spatial span, maze learning, and memory for object locations." *Neuropsychologia*, **40(8)**: 1465-1473.
- Kiefer, C., J. Slotboom, C. Buri, J. Gralla, L. Remonda, T. Dierks, W. K. Strik, G. Schroth and P. Kalus (2004). "Differentiating hippocampal subregions by means of quantitative magnetization transfer and relaxometry: preliminary results." *Neuroimage*, **23(3)**: 1093-1099.
- Kier, E. L., R. K. Fulbright and R. A. Bronen (1995). "Limbic lobe embryology and anatomy: dissection and MR of the medial surface of the fetal cerebral hemisphere." *AJNR Am J Neuroradiol*, **16(9)**: 1847-1853.
- Kier, E. L., J. H. Kim, R. K. Fulbright and R. A. Bronen (1997). "Embryology of the human fetal hippocampus: MR imaging, anatomy, and histology." *AJNR Am J Neuroradiol*, **18(3)**: 525-532.
- Kiernan, J. A. (2012). "Anatomy of the temporal lobe." *Epilepsy Res, Treat* **2012**: 176157.
- Kim, B. R., S. M. Kang, G. M. Kim and B. I. Kim (2016). "Differences in the intensity of light-induced fluorescence emitted by resin composites." *Photodiagnosis Photodyn Ther*, **13**: 114-119.
- Kim, H. F. and O. Hikosaka (2015). "Parallel basal ganglia circuits for voluntary and automatic behaviour to reach rewards." *Brain*, **138(Pt 7)**: 1776-1800.

- Kinsley, C. H., R. Trainer, G. Stafisso-Sandoz, P. Quadros, L. K. Marcus, C. Hearon, E. A. Meyer, N. Hester, M. Morgan, F. J. Kozub and K. G. Lambert (2006). "Motherhood and the hormones of pregnancy modify concentrations of hippocampal neuronal dendritic spines." *Horm Behav*, **49(2): 131-142**.
- Kitanishi, T. and N. Matsuo (2017). "Organization of the Claustrum-to-Entorhinal Cortical Connection in Mice." *J Neurosci*, **37(2): 269-280**.
- Klausberger, T. and P. Somogyi (2008). "Neuronal diversity and temporal dynamics: the unity of hippocampal circuit operations." *Science*, **321(5885): 53-57**.
- Kline, J. B. and C. V. Clevenger (2001). "Identification and characterization of the prolactin-binding protein in human serum and milk." *J Biol Chem*, **276(27): 24760-24766**.
- Knierim, J. J. and D. A. Hamilton (2011). "Framing spatial cognition: neural representations of proximal and distal frames of reference and their roles in navigation." *Physiol Rev*, **91(4): 1245-1279**.
- Knigge, U. P. (1990). "Histaminergic regulation of prolactin secretion." *Dan Med Bull*, **37(2): 109-124**.
- Knochel, C., V. Oertel-Knochel, L. O'Dwyer, D. Prvulovic, G. Alves, B. Kollmann and H. Hampel (2012). "Cognitive and behavioural effects of physical exercise in psychiatric patients." *Prog Neurobiol*, **96(1): 46-68**.
- Kokay, I. C., P. M. Bull, R. L. Davis, M. Ludwig and D. R. Grattan (2006). "Expression of the long form of the prolactin receptor in magnocellular oxytocin neurons is associated with specific prolactin regulation of oxytocin neurons." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **290(5): R1216-1225**.
- Kokay, I. C. and D. R. Grattan (2005). "Expression of mRNA for prolactin receptor (long form) in dopamine and pro-opiomelanocortin neurones in the arcuate nucleus of non-pregnant and lactating rats." *J Neuroendocrinol*, **17(12): 827-835**.
- Kombian, S. B., M. Hirasawa, D. Mougnot and Q. J. Pittman (2002). "Modulation of synaptic transmission by oxytocin and vasopressin in the supraoptic nucleus." *Prog Brain Res*, **139: 235-246**.
- Kominami, R., H. Shinohara, S. Yasutaka and M. Kishibe (2013). "The human hippocampus observed by scanning electron microscopy (SEM): the dentate gyrus is made of an array of the neuronal lamellae." *Okajimas Folia Anat Jpn*, **89(4): 157-164**.

- Konrad, C., T. Ukas, C. Nebel, V. Arolt, A. W. Toga and K. L. Narr (2009). "Defining the human hippocampus in cerebral magnetic resonance images--an overview of current segmentation protocols." *Neuroimage*, **47(4): 1185-1195**.
- Kubie, J. L., R. J. Sutherland and R. U. Muller (1999). "Hippocampal lesions produce a temporally graded retrograde amnesia on a dry version of the Morris swimming task." *Psychobiology*, **27(3): 313-330**.
- Kusakawa, S., A. Tohei, S. Jaroenporn, G. Watanabe and K. Taya (2007). "Inhibition of stress-induced adrenocorticotropin and prolactin secretion mediating hypophysiotropic factors by antagonist of AMPA type glutamate receptor." *J Reprod Dev*, **53(3): 545-554**.
- Kutlu, M. G. and T. J. Gould (2015). "Nicotinic receptors, memory, and hippocampus." *Curr Top Behav Neurosci*, **23: 137-163**.
- Labad, J., A. Stojanovic-Perez, I. Montalvo, M. Sole, A. Cabezas, L. Ortega, I. Moreno, E. Vilella, L. Martorell, R. M. Reynolds and A. Gutierrez-Zotes (2015). "Stress biomarkers as predictors of transition to psychosis in at-risk mental states: roles for cortisol, prolactin and albumin." *J Psychiatr Res*, **60: 163-169**.
- Lafuente, A. and A. I. Esquifino (2002). "Possible role of glutamate, aspartate, glutamine, GABA or taurine on cadmium toxicity on the hypothalamic pituitary axis activity in adult male rats." *Biometals*, **15(2): 183-187**.
- Lajud, N., R. Gonzalez-Zapien, A. Roque, E. Tinajero, J. J. Valdez, C. Clapp and L. Torner (2013). "Prolactin administration during early postnatal life decreases hippocampal and olfactory bulb neurogenesis and results in depressive-like behavior in adulthood." *Horm Behav*, **64(5): 781-789**.
- Landas, S., S. A. Thompson, R. Lewis, J. F. Stampler, M. K. Raizada and M. I. Phillips (1982). "Uptake of prolactin from cerebrospinal fluid in rat brain." *Neuropeptides*, **3(2): 173-179**.
- Langan, E. A. (2018). "Prolactin and human skin-the effects of sex and site on expression and function." *Endocrine*, **59(3): 700-701**.
- Langan, E. A., Y. Ramot, A. Hanning, B. Poeggeler, T. Biro, E. Gaspar, W. Funk, C. E. Griffiths and R. Paus (2010). "Thyrotropin-releasing hormone and oestrogen differentially regulate prolactin and prolactin receptor expression in female human skin and hair follicles in vitro." *Br J Dermatol*, **162(5): 1127-1131**.
- Langan, E. A., S. Vidali, N. Pigat, W. Funk, E. Lisztes, T. Biro, V. Goffin, C. E. Griffiths and R. Paus (2013). "Tumour necrosis factor alpha, interferon gamma and substance P are novel modulators of extrapituitary prolactin expression in human skin." *PLoS One*, **8(4): e60819**.

- Larsby, B., M. Hällgren, B. Lyxell and S. Arlinger (2005). "Cognitive performance and perceived effort in speech processing tasks: effects of different noise backgrounds in normal-hearing and hearing-impaired subjects. Desempeño cognitivo y percepción del esfuerzo en tareas de procesamiento del lenguaje: Efectos de las diferentes condiciones de fondo en sujetos normales e hipoacúsicos." *International Journal of Audiology*, **44(3)**: 131-143.
- Larsen, C. M. and D. R. Grattan (2012). "Prolactin, neurogenesis, and maternal behaviors." *Brain Behav Immun*, **26(2)**: 201-209.
- Lashley (1950). "In search of the engram. In Symposium of the society for experimental biology." *Cambridge University Press*. New York **Vol.4**.
- Le Tissier, P. R., D. J. Hodson, A. O. Martin, N. Romano and P. Mollard (2015). "Plasticity of the prolactin (PRL) axis: mechanisms underlying regulation of output in female mice." *Adv Exp Med Biol*, **846**: 139-162.
- Lechner, H. A., L. R. Squire and J. H. Byrne (1999). "100 years of consolidation-remembering Muller and Pilzecker." *Learn Mem*, **6(2)**: 77-87.
- Levitt, T., J. Fugelsang and M. Crossley (2006). "Processing speed, attentional capacity, and age-related memory change." *Exp Aging Res*, **32(3)**: 263-295.
- Levy, W. B. (1996). "A sequence predicting CA3 is a flexible associator that learns and uses context to solve hippocampal-like tasks." *Hippocampus*, **6(6)**: 579-590.
- Li, C. Y., L. Zhang, J. Li, C. L. Qi, D. Y. Li, X. Liu and X. Qu (2017). "Effect of Endogenous Arginine-Vasopressin Arising from the Paraventricular Nucleus on Learning and Memory Functions in Vascular Dementia Model Rats." *Biomed Res Int*, **2017**: 3214918.
- Li, E., H. Chung, Y. Kim, D. H. Kim, J. H. Ryu, T. Sato, M. Kojima and S. Park (2013). "Ghrelin directly stimulates adult hippocampal neurogenesis: implications for learning and memory." *Endocr J*, **60(6)**: 781-789.
- Li, J., W. O. W. Li, Z. G. Jiang and H. A. Ghanbari (2013). "Oxidative stress and neurodegenerative disorders." *Int J Mol Sci*, **14(12)**: 24438-24475.
- Li, L., Q. Yu and W. Liang (2018). "Use of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride-stained brain tissues for immunofluorescence analyses after focal cerebral ischemia in rats." *Pathol Res Pract*, **214(1)**: 174-179.
- Li, X., Y. Lu, H. Luo, G. Liu and R. Zhang (2017). "Microbial stratification structure within cathodic biofilm of the microbial fuel cell using the freezing microtome method." *Bioresour Technol*, **241**: 384-390.



- Li, X., L. Yang, Y. Yang, M. Shao and Y. Liu (2017). "Preparation and Characterization of a Novel Monoclonal Antibody Against the Extracellular Domain of Human Transferrin Receptor." *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother*, **36(1)**: 1-7.
- Liang, S. L., S. C. Hsu and J. T. Pan (2014). "Involvement of dopamine D2 receptor in the diurnal changes of tuberoinfundibular dopaminergic neuron activity and prolactin secretion in female rats." *J Biomed Sci*, **21**: 37.
- Lin, C. E., C. H. Chung, L. F. Chen and M. J. Chi (2018). "Increased risk of dementia in patients with Schizophrenia: A population-based cohort study in Taiwan." *Eur Psychiatry*, **53**: 7-16.
- Lindner, M. D. (1997). "Reliability, distribution, and validity of age-related cognitive deficits in the Morris water maze." *Neurobiol Learn Mem*, **68(3)**: 203-220.
- Liu, Y., X. Su, J. Hao, M. Chen, W. Liu, X. Liao and G. Li (2016). "Overexpression of PRL7D1 in Leydig Cells Causes Male Reproductive Dysfunction in Mice." *Int J Mol Sci*, **17(1)**.
- Login, I. S., S. I. Kuan, A. M. Judd and R. M. MacLeod (1990). "Interactions of dopamine and neurotensin on calcium fluxes and prolactin release in normal rat pituitary cells." *Endocrinology*, **127(4)**: 1948-1955.
- Lorente de Nó, R. (1934). "Studies on the striation of the cerebral cortex. II: Continuation of the study of the ammonic system." *J Psychol Neurol*, **46**: 113-177.
- Loubon, C. O. and J. C. Franco (2010). "Neurofisiología del aprendizaje y la memoria. Plasticidad Neuronal." *Archivos de Medicina*.
- Love, G., N. Torrey, I. McNamara, M. Morgan, M. Banks, N. W. Hester, E. R. Glasper, A. C. Devries, C. H. Kinsley and K. G. Lambert (2005). "Maternal experience produces long-lasting behavioral modifications in the rat." *Behav Neurosci*, **119(4)**: 1084-1096.
- Lozeva, V., E. Anttila, R. K. Tuominen, M. Hippelainen, P. T. Mannisto and L. Tuomisto (1999). "Hypothalamic histamine, growth rate, plasma prolactin and growth hormone levels in rats with long-term portacaval anastomosis." *Inflamm Res*, **48(2)**: 81-85.
- Lushnikova, I. V. (2009). "[Morphological plasticity of hippocampal CA1 neurons in vitro after short-term anoxia/hypoglycemia followed by reoxygenation]." *Fiziol Zh*, **55(3)**: 109-117.
- Lv, C., C. Mo, H. Liu, C. Wu, Z. Li, J. Li and Y. Wang (2018). "Dopamine D2-like receptors (DRD2 and DRD4) in chickens: Tissue distribution, functional analysis, and their involvement in dopamine inhibition of pituitary prolactin expression." *Gene*, **651**: 33-43.

- Lv, J., H. Feng, L. Chen, W. Y. Wang, X. L. Yue and Q. H. Jin (2017). "Activation of beta-adrenoceptor facilitates active avoidance learning through enhancement of glutamate levels in the hippocampal dentate gyrus." *Neuroreport*, **28(15)**: 973-979.
- Lychkovq, A. E. and A. M. Puzikov (2014). "[Prolactin and serotonin]." *Vestn Ross Akad Med Nauk*, (1-2): 38-45.
- Lynch, V. J., K. Brayer, B. Gellersen and G. P. Wagner (2009). "HoxA-11 and FOXO1A cooperate to regulate decidual prolactin expression: towards inferring the core transcriptional regulators of decidual genes." *PLoS One*, **4(9)**: e6845.
- Maaskant, R. A., L. V. Bogic, S. Gilger, P. A. Kelly and G. D. Bryant-Greenwood (1996). "The human prolactin receptor in the fetal membranes, decidua, and placenta." *J Clin Endocrinol Metab*, **81(1)**: 396-405.
- Machado, S., C. Portella, J. Silva, B. Velasques, V. Bastos, M. Cunha, L. Basile, M. Cagy, R. Piedade and P. Ribeiro (2008). "Aprendizaje y memoria implícita: mecanismos y neuroplasticidad." *Rev Neurol*, **46(9)**: 543-549.
- MacPhee, D. J. (2010). "Methodological considerations for improving Western blot analysis." *J Pharmacol Toxicol Methods*, **61(2)**: 171-177.
- Magani, F., A. Damianich, G. Duaip, D. Rojo, A. Trigila, J. Pimentel and N. Federman (2013). "Reconocimiento de objetos por color en ratones *Mus musculus* cepa C57BL/6." *Revista Argentina de Ciencias del Comportamiento*, **5(3)**.
- Majumdar, A. and N. S. Mangal (2013). "Hyperprolactinemia." *J Hum Reprod Sci*, **6(3)**: 168-175.
- Mak, G. K. and S. Weiss (2010). "Paternal recognition of adult offspring mediated by newly generated CNS neurons." *Nat Neurosci*, **13(6)**: 753-758.
- Maragall, P. (2008). "Fundación Pascual Maragall." from <https://fpmaragall.org/la-fundacion/>.
- Marano, R. J. and N. Ben-Jonathan (2014). "Minireview: Extrapituitary prolactin: an update on the distribution, regulation, and functions." *Mol Endocrinol*, **28(5)**: 622-633.
- Marano, R. J., J. Tickner and S. L. Redmond (2013). "Prolactin expression in the cochlea of aged BALB/c mice is gender biased and correlates to loss of bone mineral density and hearing loss." *PLoS One*, **8(5)**: e63952.
- Mark, L. P., D. L. Daniels and T. P. Naidich (1993). "The fornix." *AJNR Am J Neuroradiol*, **14(6)**: 1355-1358.

- Marsman, A., R. C. W. Mandl, D. W. J. Klomp, W. Cahn, R. S. Kahn, P. R. Luijten and H. E. Hulshoff Pol (2017). "Intelligence and Brain Efficiency: Investigating the Association between Working Memory Performance, Glutamate, and GABA." *Front Psychiatry*, **8**: 154.
- Marta I. Escobar; Hernan J, P. (2006). Sistema Nervioso. *Rev. ing. univ. Medellín*, vol.8, n.15, suppl.1, pp.79-94.
- Martini, J. F., C. Piot, L. M. Humeau, I. Struman, J. A. Martial and R. I. Weiner (2000). "The antiangiogenic factor 16K PRL induces programmed cell death in endothelial cells by caspase activation." *Mol Endocrinol*, **14(10)**: 1536-1549.
- Mastronardi, C. A., A. Walczewska, W. H. Yu, S. Karanth, A. F. Parlow and S. M. McCann (2000). "The possible role of prolactin in the circadian rhythm of leptin secretion in male rats." *Proc Soc Exp Biol Med*, **224(3)**: 152-158.
- Mathey, L. I. P., J. M. Denes, V. Goffin, K. Kessal, G. E. Aranda-Abreu, C. A. Estudillo and M. H. Aguilar (2009). "Prolactina: mecanismos intracelulares involucrados en la función prostática." *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*, **9(1)**: 36-40.
- Matryba, P., L. Bozycki, M. Pawlowska, L. Kaczmarek and M. Stefaniuk (2017). "Optimized perfusion-based CUBIC protocol for the efficient whole-body clearing and imaging of rat organs." *J Biophotonics*, **Epub ahead of print**.
- Mauvais-Jarvis, F. (2016). "Role of Sex Steroids in beta Cell Function, Growth, and Survival." *Trends Endocrinol Metab*, **27(12)**: 844-855.
- McFadden, J. (2017). "Treatment of developmental stress disorder: mind, body and brain - analysis and pharmacology coupled." *J Anal Psychol*, **62(5)**: 744-755.
- McFadyen, J., M. Mermillod, J. B. Mattingley, V. Halasz and M. I. Garrido (2017). "A Rapid Subcortical Amygdala Route for Faces Irrespective of Spatial Frequency and Emotion." *J Neurosci*, **Epub ahead of print**.
- McNamara, R. K. and R. W. Skelton (1993). "The neuropharmacological and neurochemical basis of place learning in the Morris water maze." *Brain Res Brain Res Rev*, **18(1)**: 33-49.
- McNeilly, A. S. (1980). "Prolactin and the control of gonadotrophin secretion in the female." *J Reprod Fertil*, **58(2)**: 537-549.
- Mena, F., G. Hummelt, D. Aguayo, C. Clapp, G. Martinez de la Escalera and M. T. Morales (1992). "Changes in molecular variants during in vitro transformation and release of prolactin by the pituitary gland of the lactating rat." *Endocrinology*, **130(6)**: 3365-3377.

- Meng, J., C. H. Tsai-Morris and M. L. Dufau (2004). "Human prolactin receptor variants in breast cancer: low ratio of short forms to the long-form human prolactin receptor associated with mammary carcinoma." *Cancer Res*, **64(16): 5677-5682**.
- Milner, B. and D. Klein (2016). "Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions: memory and memories-looking back and looking forward." *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **87(3): 230**.
- Miller, M. J., L. P. Mark, K. C. Ho and V. M. Haughton (1996). "MR appearance of the internal architecture of Ammon's horn." *AJNR Am J Neuroradiol*, **17(1): 23-26**.
- Modersheim, T. A., T. Gorba, P. Pathipati, I. C. Kokay, D. R. Grattan, C. E. Williams and A. Scheepens (2007). "Prolactin is involved in glial responses following a focal injury to the juvenile rat brain." *Neuroscience*, **145(3): 963-973**.
- Montgomery, D. W., G. K. Shen, E. D. Ulrich, L. L. Steiner, P. R. Parrish and C. F. Zukoski (1992). "Human thymocytes express a prolactin-like messenger ribonucleic acid and synthesize bioactive prolactin-like proteins." *Endocrinology*, **131(6): 3019-3026**.
- Moore, K. L. and T. V. N. Persaud (2004). *Embriología clínica: el desarrollo del ser humano*, Harcourt Brace de Espana, S.A.
- Moraga-Amaro, R., H. Gonzalez, V. Ugalde, J. P. Donoso-Ramos, D. Quintana-Donoso, M. Lara, B. Morales, P. Rojas, R. Pacheco and J. Stehberg (2016). "Dopamine receptor D5 deficiency results in a selective reduction of hippocampal NMDA receptor subunit NR2B expression and impaired memory." *Neuropharmacology*, **103: 222-235**.
- Morales, T., M. Lorenson, A. M. Walker and E. Ramos (2014). "Both prolactin (PRL) and a molecular mimic of phosphorylated PRL, S179D-PRL, protect the hippocampus of female rats against excitotoxicity." *Neuroscience*, **258: 211-217**.
- Moran, T. H. and G. J. Schwartz (1994). "Neurobiology of cholecystokinin." *Crit Rev Neurobiol*, **9(1): 1-28**.
- Morgado Bernal, I. (2005). "Psicobiología del aprendizaje y la memoria." *CIC: cuadernos de información y comunicación*, **(10): 221-233**.
- Morphew, M. K., T. H. Giddings, Jr. and J. R. McIntosh (2017). "Immunolocalization of Proteins in Fission Yeast by Electron Microscopy." *Cold Spring Harb Protoc*, **2017(1): pdb prot091322**.
- Morris, R. (1984). "Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat." *J Neurosci Methods*, **11(1): 47-60**.
- Morris, R., P. Garrud, J. Rawlins and J. O'Keefe (1982). "Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions." *Nature*, **297(5868): 681-683**.

- Moser, M. B., D. C. Rowland and E. I. Moser (2015). "Place cells, grid cells, and memory." *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **7(2)**: a021808.
- Mravian, S. R. (1993). "[Physiologic and molecular mechanisms of action of endogenous opioid peptides]." *Patol Fiziol Eksp*, **Ter(3)**: 58-60.
- Mulder, G. B. and K. Pritchett (2003). "The Morris water maze." *Contemp Top Lab Anim Sci*, **42(2)**: 49-50.
- Munoz, P., C. Estay, P. Diaz, C. Elgueta, A. O. Ardiles and P. A. Lizana (2016). "Inhibition of DNA Methylation Impairs Synaptic Plasticity during an Early Time Window in Rats." *Neural Plast*, **2016**: 4783836.
- Muñoz Marrón, E. P. M., Jose Antonio (2012). Fundamentos del aprendizaje y el lenguaje. Barcelona, *Editorial UOC*.
- Myers, C. E. and H. E. Scharfman (2011). "Pattern separation in the dentate gyrus: a role for the CA3 backprojection." *Hippocampus*, **21(11)**: 1190-1215.
- Myhrer, T. (2003). "Neurotransmitter systems involved in learning and memory in the rat: a meta-analysis based on studies of four behavioral tasks." *Brain Res Brain Res Rev*, **41(2-3)**: 268-287.
- Nakayama, Y., N. Hattori, H. Otani and C. Inagaki (2006). "Gamma-aminobutyric acid (GABA)-C receptor stimulation increases prolactin (PRL) secretion in cultured rat anterior pituitary cells." *Biochem Pharmacol*, **71(12)**: 1705-1710.
- Neidhart, M. (1997). "Bromocriptine has little direct effect on murine lymphocytes, the immunomodulatory effect being mediated by the suppression of prolactin secretion." *Biomed Pharmacother*, **51(3)**: 118-125.
- Neil, C. R. and K. Mowry (2018). "Fluorescence In Situ Hybridization of Cryosectioned Xenopus Oocytes." *Cold Spring Harb Protoc*. **Epub ahead of print**.
- Neisser, U. (1967). Cognitive psychology. New York, *Appleton-Century-Crofts*.
- Netter, F. H. and A. Brass (1994). Sistema Nervioso, Tomo I: Parte 1. Anatomía y Fisiología, *Ediciones Científicas y Técnicas*.
- Neumann, R. and H. J. Eggers (1988). "The technic of "in situ hybridization" *Fortschr Med*, **106(15)**: 317-319.
- Nevalainen, M. T., E. M. Valve, T. Ahonen, A. Yagi, J. Paranko and P. L. Harkonen (1997). "Androgen-dependent expression of prolactin in rat prostate epithelium in vivo and in organ culture." *FASEB J*, **11(14)**: 1297-1307.
- Nikishina, Y. O., A. Y. Saponova and M. V. Ugrumov (2016). "The Effect of Dopamine Secreted by the Brain into the Systemic Circulation on Prolactin Synthesis by the Pituitary gland in Ontogenesis." *Acta Naturae*, **8(3)**: 111-117.

- Nogami, H., R. Hoshino, K. Ogasawara, S. Miyamoto and S. Hisano (2007). "Region-specific expression and hormonal regulation of the first exon variants of rat prolactin receptor mRNA in rat brain and anterior pituitary gland." *J Neuroendocrinol*, **19(8)**: 583-593.
- Nolin, J. M. and R. J. Witorsch (1976). "Detection of endogenous immunoreactive prolactin in rat mammary epithelial cells during lactation." *Endocrinology*, **99(4)**: 949-958.
- Nouri-Aria, K. T. (2008). "In situ Hybridization." *Methods Mol Med*, **138**: 331-347.
- Novak, J. D. (2003). "The promise of new ideas and new technology for improving teaching and learning." *Cell Biol Educ*, **2(2)**: 122-132.
- Nyberg, F., P. Roos and L. Wide (1981). "Purification and characterization of high molecular weight human pituitary prolactin." *Prep Biochem*, **11(4)**: 437-466.
- O'Keefe, J. and J. Dostrovsky (1971). "The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat." *Brain Res*, **34(1)**: 171-175.
- Oakes, S. R., R. L. Rogers, M. J. Naylor and C. J. Ormandy (2008). "Prolactin regulation of mammary gland development." *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, **13(1)**: 13-28.
- Ocampo Daza, D. and D. Larhammar (2018). "Evolution of the growth hormone, prolactin, prolactin 2 and somatolactin family." *Gen Comp Endocrinol*, **Epub ahead of print**.
- Oess, T., J. L. Krichmar and F. Rohrbein (2017). "A Computational Model for Spatial Navigation Based on Reference Frames in the Hippocampus, Retrosplenial Cortex, and Posterior Parietal Cortex." *Front Neurobot*, **11**: 4.
- Ogmen, H. and M. H. Herzog (2016). "A New Conceptualization of Human Visual Sensory-Memory." *Front Psychol*, **7**: 830.
- Ojeda del Valle, M. (2012). "El sueño en la edad preescolar y su repercusión en el desarrollo, la conducta y el aprendizaje." *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, **50(2)**: 198-204.
- Olivares, J. D. J. E. G., F. (2015). "hippocampus: neurogenesis and learning." *Revista médica de la Universidad de Veracruz*, **15**: 20-28.
- Ollivier-Bousquet, M., G. Kann and G. Durand (1993). "Prolactin transit through mammary epithelial cells and appearance in milk." *Endocr Regul*, **27(3)**: 115-124.
- Oomen, C. A., P. Bekinschtein, B. A. Kent, L. M. Saksida and T. J. Bussey (2014). "Adult hippocampal neurogenesis and its role in cognition." *Wiley Interdiscip Rev Cogn Sci*, **5(5)**: 573-587.

- Overgaard, M. and S. M. Pedersen (2017). "Serum prolactin revisited: parametric reference intervals and cross platform evaluation of polyethylene glycol precipitation-based methods for discrimination between hyperprolactinemia and macroprolactinemia." *Clin Chem Lab Med*, **55(11): 1744-1753**.
- Paepegaey, A. C., L. Veron, M. C. Wimmer and S. Christin-Maitre (2016). "[Misleading diagnosis of hyperprolactinemia in women]." *Gynecol Obstet Fertil*, **44(3): 181-186**.
- Pan, J. T., Y. Tian, K. J. Lookingland and K. E. Moore (1992). "Neurotensin-induced activation of hypothalamic dopaminergic neurons is accompanied by a decrease in pituitary secretion of prolactin and alpha-melanocyte-stimulating hormone." *Life Sci*, **50(25): 2011-2017**.
- Panchal, M. and K. Muralidhar (2008). "Purification of monomeric prolactin charge isoform from buffalo pituitaries." *Prep Biochem Biotechnol*, **38(1): 94-104**.
- Pankov Yu, A. and V. Butnev (1986). "Multiple forms of pituitary prolactin, a glycosylated form of porcine prolactin with enhanced biological activity." *Int J Pept Protein Res*, **28(2): 113-123**.
- Paquette, C., E. Franzen, G. M. Jones and F. B. Horak (2011). "Walking in circles: navigation deficits from Parkinson's disease but not from cerebellar ataxia." *Neuroscience*, **190: 177-183**.
- Parra-Medina, R. and J. F. Polo (2017). "Inmunofluorescencia en tejidos fijados y preservados en parafina (IF-P). Una mirada desde la patología quirúrgica." *Repertorio de Medicina y Cirugía*. **Epub ahead of print**.
- Parrott, R. F., I. S. Ebenezer, B. A. Baldwin and H. L. Buttle (1995). "Intravenous administration of cholecystokinin (CCK) stimulates prolactin and growth hormone release in the pig." *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, **17(8): 529-533**.
- Parsaei, L., A. Torkaman-Boutorabi, F. Asadi and M. R. Zarrindast (2016). "Interaction between dorsal hippocampal NMDA receptors and lithium on spatial learning consolidation in rats." *Brain Res Bull*, **127: 1-10**.
- Pathipati, P., T. Gorba, A. Scheepens, V. Goffin, Y. Sun and M. Fraser (2011). "Growth hormone and prolactin regulate human neural stem cell regenerative activity." *Neuroscience*, **190: 409-427**.
- Patil, M., M. Henry, V. Goffin and A. Akopian (2016). "(300) Prolactin regulates sensory neurons in a female-specific manner at their peripheral and central terminals and not at their cell bodies." *J Pain*, **17(4S): S51**.
- Pawluski, J. L., S. K. Walker and L. A. Galea (2006). "Reproductive experience differentially affects spatial reference and working memory performance in the mother." *Horm Behav*, **49(2): 143-149**.

- Penfield, W. and B. Milner (1958). "Memory deficit produced by bilateral lesions in the hippocampal zone." *AMA Arch Neurol Psychiatry*, **79(5)**: 475-497.
- Pereira Suarez, A. L., G. Lopez-Rincon, P. A. Martinez Neri and C. Estrada-Chavez (2015). "Prolactin in inflammatory response." *Adv Exp Med Biol*, **846**: 243-264.
- Perkel, J. M. (2016). "Immunohistochemistry for the 21st Century." *Science*, **351(6277)**: 1098-1100.
- Perimenis, P., T. Bouckenooghe, J. Delplanque, E. Moitrot, E. Eury, S. Lobbens, P. Gosset, L. Devisme, B. Duvillie, A. Abderrahmani, L. Storme, P. Fontaine, P. Froguel and A. Vambergue (2014). "Placental antiangiogenic prolactin fragments are increased in human and rat maternal diabetes." *Biochim Biophys Acta*, **1842(9)**: 1783-1793.
- Phelps, J. Y., E. M. Bugg, M. J. Shablott, N. P. Vlahos, J. Whelan and H. A. Zacur (2003). "Prolactin gene expression in human ovarian follicular cells." *Fertil Steril*, **79(1)**: 182-185.
- Pi, X. J. and D. R. Grattan (1998). "Differential expression of the two forms of prolactin receptor mRNA within microdissected hypothalamic nuclei of the rat." *Brain Res Mol Brain Res*, **59(1)**: 1-12.
- Piaget, J. and L. Vigotsky (2008). "Teorías del aprendizaje." El niño: Desarrollo y Proceso de Aprendizaje", *Pixel-Bit. Revista de Medios y Educación*, **174-204**.
- Pirolì, G. G., J. Cassataro, L. Pietranera, C. A. Grillo, M. Ferrini, V. Lux-Lantos and A. F. De Nicola (2001). "Progestin regulation of galanin and prolactin gene expression in oestrogen-induced pituitary tumours." *J Neuroendocrinol*, **13(3)**: 302-309.
- Poolton, J. M., R. S. Masters and J. P. Maxwell (2005). "The relationship between initial errorless learning conditions and subsequent performance." *Hum Mov Sci*, **24(3)**: 362-378.
- Potter, G. D., D. J. Skene, J. Arendt, J. E. Cade, P. J. Grant and L. J. Hardie (2016). "Circadian Rhythm and Sleep Disruption: Causes, Metabolic Consequences, and Countermeasures." *Endocr Rev*, **37(6)**: 584-608.
- Pratt, S. L., S. M. Calcaterra, H. M. Stowe, M. A. Dimmick, F. N. Schrick, S. K. Duckett and J. G. Andrae (2015). "Identification of bovine prolactin in seminal fluid, and expression and localization of the prolactin receptor and prolactin-inducible protein in the testis and epididymis of bulls exposed to ergot alkaloids." *Theriogenology*, **83(4)**: 662-669.
- Prevarskaya, N. B., R. N. Skryma, P. Vacher, N. Daniel, J. Djiane and B. Dufy (1995). "Role of tyrosine phosphorylation in potassium channel activation. Functional association with prolactin receptor and JAK2 tyrosine kinase." *J Biol Chem*, **270(41)**: 24292-24299.



- Puig, J. M. (2009). "Aprendizaje servicio (APS)." Educación y compromiso cívico. *Editorial Grao*. Barcelona.
- Ramon y Cajal, S. (1909-1911). *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés*, *Maloine*.
- Ratovondrahona, D., M. Fahmi, B. Fournier, M. F. Odessa, R. Skryma, N. Prevarskaya, J. Djiane and B. Dufy (1998). "Prolactin induces an inward current through voltage-independent Ca<sup>2+</sup> channels in Chinese hamster ovary cells stably expressing prolactin receptor." *J Mol Endocrinol*, **21(1)**: 85-95.
- Reber, P. J. (2013). "The neural basis of implicit learning and memory: a review of neuropsychological and neuroimaging research." *Neuropsychologia*, **51(10)**: 2026-2042.
- Remondes, M. and E. M. Schuman (2004). "Role for a cortical input to hippocampal area CA1 in the consolidation of a long-term memory." *Nature*, **431(7009)**: 699-703.
- Ren, J., J. I. Koenig and S. C. Hooi (1999). "Stimulation of anterior pituitary galanin and prolactin gene expression in suckling rats." *Endocrine*, **11(3)**: 251-256.
- Renschler, C. L. and L. A. Harrah (1983). "Determination of quantum yields of fluorescence by optimizing the fluorescence intensity." *Analytical Chemistry*, **55(4)**: 798-800.
- Respondek, M. and E. Buszman (2015). "[Regulation of neurogenesis: factors affecting of new neurons formation in adult mammals brain]." *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, **69**: 1451-1461.
- Rey-Sanchez, P., J. M. Lavado-Garcia, M. L. Canal-Macias, M. A. Gomez-Zubeldia, R. Roncero-Martin and J. D. Pedrera-Zamorano (2009). "Ultrasound bone mass in schizophrenic patients on antipsychotic therapy." *Hum Psychopharmacol*, **24(1)**: 49-54.
- Richa, V., G. Rahul and A. Sarika (2010). "Macroprolactin; a frequent cause of misdiagnosed hyperprolactinemia in clinical practice." *J Reprod Infertil*, **11(3)**: 161-167.
- Riedel, G., J. Micheau, A. G. Lam, E. L. Roloff, S. J. Martin, H. Bridge, L. de Hoz, B. Poeschel, J. McCulloch and R. G. Morris (1999). "Reversible neural inactivation reveals hippocampal participation in several memory processes." *Nat Neurosci*, **2(10)**: 898-905.
- Rivero-Segura, N. A., E. Flores-Soto, S. Garcia de la Cadena, I. Coronado-Mares, J. C. Gomez-Verjan, D. G. Ferreira, E. A. Cabrera-Reyes, L. V. Lopes, L. Massieu and M. Cerbon (2017). "Prolactin-induced neuroprotection against glutamate excitotoxicity is mediated by the reduction of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> overload and NF-kappaB activation." *PLoS One*, **12(5)**: e0176910.

- Robberecht, W., M. Andries and C. Denef (1992). "Stimulation of prolactin secretion from rat pituitary by luteinizing hormone-releasing hormone: evidence against mediation by angiotensin II acting through a (Sar1-Ala8)-angiotensin II-sensitive receptor." *Neuroendocrinology*, **56(2)**: 185-194.
- Robert I. Grossman, D. M. Y., Robert D. Zimmerman (2010). *Neuroradiology: The Requisites*, Springer, 3<sup>a</sup> Edition.
- Rodríguez Palmero, M. L. (2004). "Theory, Methodology, Technology". *Proc. of the First Int. Conference on Concept Mapping*. Universidad Pública de Navarra, Pamplona, Spain, pp. 535-544.
- Roky, R., J. L. Valatx, L. Paut-Pagano and M. Jouvet (1994). "Hypothalamic injection of prolactin or its antibody alters the rat sleep-wake cycle." *Physiol Behav*, **55(6)**: 1015-1019.
- Roselli, C. E., S. Bocklandt, H. L. Stadelman, T. Wadsworth, E. Vilain and F. Stormshak (2008). "Prolactin expression in the sheep brain." *Neuroendocrinology*, **87(4)**: 206-215.
- Roxo, M. R., P. R. Franceschini, C. Zubarán, F. D. Kleber and J. W. Sander (2011). "The limbic system conception and its historical evolution." *ScientificWorldJournal*, **11**: 2428-2441.
- Ruiz-Herrera, X., E. A. de Los Rios, J. M. Diaz, R. M. Lerma-Alvarado, L. Martínez de la Escalera, F. Lopez-Barrera, M. Lemini, E. Arnold, G. Martínez de la Escalera, C. Clapp and Y. Macotela (2017). "Prolactin Promotes Adipose Tissue Fitness and Insulin Sensitivity in Obese Males." *Endocrinology*, **158(1)**: 56-68.
- Sackmann-Sala, L. and V. Goffin (2015). "Prolactin-induced prostate tumorigenesis." *Adv Exp Med Biol*, **846**: 221-242.
- Sackmann-Sala, L., J. E. Guidotti and V. Goffin (2015). "Minireview: prolactin regulation of adult stem cells." *Mol Endocrinol*, **29(5)**: 667-681.
- Salameh, S., D. Nouel, C. Flores and D. Hoops (2018). "An optimized immunohistochemistry protocol for detecting the guidance cue Netrin-1 in neural tissue." *MethodsX*, **5**: 1-7.
- Samson, W. K., F. L. Huang and R. J. Fulton (1995). "Opposing neuroendocrine actions of the natriuretic peptides: C-type and A-type natriuretic peptides do not interact with the same hypothalamic cells controlling prolactin secretion." *J Neuroendocrinol*, **7(10)**: 759-763.
- Samson, W. K., M. M. Taylor and J. R. Baker (2003). "Prolactin-releasing peptides." *Regul Pept*, **114(1)**: 1-5.
- Sandilyan, M. B. and T. Dening (2015). "Brain function, disease and dementia." *Nurs Stand*, **29(39)**: 36-42.

- Sangeeta Devi, Y. and J. Halperin (2014). "Reproductive actions of prolactin mediated through short and long receptor isoforms." *Mol Cell Endocrinol*, **382(1): 400-410**.
- Santander, J., P. Santander and J. E. Berner (2012). "[The contribution of Jose Juan Bruner to Chilean psychiatry]." *Rev Med Chil*, **140(11): 1495-1500**.
- Santín-Núñez, L. J., S. Rubio, A. Begega, R. Miranda-García and J. L. Arias (2017). "Aprendizaje espacial e hipocampo." *RevNeurol*, **31(05): 0455-0462**.
- Saygin, M., M. F. Ozguner, O. Onder, D. K. Doguc, I. Ilhan and Y. Peker (2017). "The impact of sleep deprivation on hippocampal-mediated learning and memory in rats." *Bratisl Lek Listy*, **118(7): 408-416**.
- Schennink, A., J. F. Trott, R. Manjarin, D. G. Lemay, B. A. Freking and R. C. Hovey (2015). "Comparative genomics reveals tissue-specific regulation of prolactin receptor gene expression." *J Mol Endocrinol*, **54(1): 1-15**.
- Schmitt, A., R. Csiki, A. Tron, B. Saldamli, J. Tubel, K. Florian, S. Siebenlist, E. Balmayor and R. Burgkart (2017). "Optimized protocol for whole organ decellularization." *Eur J Med Res*, **22(1): 31**.
- Schoenenberger, P., J. O'Neill and J. Csicsvari (2016). "Activity-dependent plasticity of hippocampal place maps." *Nat Commun*, **7: 11824**.
- Schunk, D. H. (1997). Teorías del aprendizaje, *Pearson Educación*.
- Seltzer, E. (1977). "A comparison between John Dewey's theory of inquiry and Jean Piaget's genetic analysis of intelligence." *J Genet Psychol*, **130(2d Half): 323-335**.
- Shao, J., L. Qiao and J. E. Friedman (2004). "Prolactin, progesterone, and dexamethasone coordinately and adversely regulate glucokinase and cAMP/PDE cascades in MIN6 beta-cells." *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **286(2): E304-310**.
- Shekarforoush, S., Z. Fatahi and F. Safari (2016). "The effects of pentobarbital, ketamine-pentobarbital and ketamine-xylazine anesthesia in a rat myocardial ischemic reperfusion injury model." *Lab Anim*, **50(3): 179-184**.
- Shelly, S., M. Boaz and H. Orbach (2012). "Prolactin and autoimmunity." *Autoimmun Rev*, **11(6-7): A465-470**.
- Sherazi, N. A., M. Z. Baig and A. H. Khan (2018). "Frequency of Macroprolactin in Hyperprolactinemia." *J Coll Physicians Surg Pak*, **28(2): 93-97**.
- Shi, D. S., J. Wang, Y. Yang, F. H. Lu, X. P. Li and Q. Y. Liu (2012). "DGAT1, GH, GHR, PRL and PRLR polymorphism in water buffalo (*Bubalus bubalis*)." *Reprod Domest Anim*, **47(2): 328-334**.

- Shibaya, M., S. Murakami, Y. Tatsukawa, D. J. Skarzynski, T. J. Acosta and K. Okuda (2006). "Bovine corpus luteum is an extrapituitary site of prolactin production." *Mol Reprod Dev*, **73(4)**: 512-519.
- Shin, S. H. (1978). "Dopamine-induced inhibition of prolactin release from cultured adenohypophysial cells: spare receptors for dopamine." *Life Sci*, **22(1)**: 67-73.
- Shingo, T., C. Gregg, E. Enwere, H. Fujikawa, R. Hassam, C. Geary, J. C. Cross and S. Weiss (2003). "Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin." *Science*, **299(5603)**: 117-120.
- Siemens, G. (2004). "Conectivismo: Una teoría de aprendizaje para la era digital." Recuperado el 15. Este trabajo está publicado bajo una Licencia *Creative Commons 2.5*
- Silvers, J. A., D. S. Lumian, L. Gabard-Durnam, D. G. Gee, B. Goff, D. S. Fareri, C. Caldera, J. Flannery, E. H. Telzer, K. L. Humphreys and N. Tottenham (2016). "Previous Institutionalization Is Followed by Broader Amygdala-Hippocampal-PFC Network Connectivity during Aversive Learning in Human Development." *J Neurosci*, **36(24)**: 6420-6430.
- Singh, S., H. Kaur and R. Sandhir (2016). "Fractal dimensions: A new paradigm to assess spatial memory and learning using Morris water maze." *Behav Brain Res*, **299**: 141-146.
- Skinner, B. F. (1964). "Skinner on Theory." *Science*, **145(3639)**: 1385-1387.
- Slomianka, L., I. Amrein, I. Knuesel, J. C. Sorensen and D. P. Wolfer (2011). "Hippocampal pyramidal cells: the reemergence of cortical lamination." *Brain Struct Funct*, **216(4)**: 301-317.
- Sloviter, R. S. (2005). "The neurobiology of temporal lobe epilepsy: too much information, not enough knowledge." *C R Biol*, **328(2)**: 143-153.
- Sloviter, R. S. and T. Lomo (2012). "Updating the lamellar hypothesis of hippocampal organization." *Front Neural Circuits*, **6**: 102.
- Smiley, K. O. and E. Adkins-Regan (2016). "Prolactin is related to individual differences in parental behavior and reproductive success in a biparental passerine, the zebra finch (*Taeniopygia guttata*)." *Gen Comp Endocrinol*, **234**: 88-94.
- Smirnova, O. V. (2011). "[Prolactin osmoregulatory function in fishes and its projection on mammals]." *Usp Fiziol Nauk*, **42(4)**: 59-75.
- Sommer, W. (October 1880). "Erkrankung des Ammonshorns als aetiologisches Moment der Epilepsie." *Arch Psychiatr Nurs*, **Volume 10, Issue 3**, pp 631-675.

- Song, C., P. Deng and L. Que (2018). "Rapid multiplexed detection of Beta-amyloid and Total-tau as biomarkers for Alzheimer's disease in cerebrospinal fluid." *Nanomedicine*, **Epub ahead of print**.
- Sorin, B., A. M. Vacher, J. Djiane and P. Vacher (2000). "Role of protein kinases in the prolactin-induced intracellular calcium rise in Chinese hamster ovary cells expressing the prolactin receptor." *J Neuroendocrinol*, **12(9): 910-918**.
- Sperber, G. H., S. M. Sperber and G. D. Guttmann (2010). Craniofacial Embryogenetics and Development, *People's Medical Publishing House USA*.
- Sperling, M. and A. Nehlig (2018). "An interview with Divyanshu Dubey, 2018 Epilepsia Prize winner for clinical research." *Epilepsia*. **Epub ahead of print**.
- Spielmeyer. (1930). "The anatomic substratum of the convulsive state." *Arch Neurol Psychiatry*, **23:869-875**.
- Spoov, J., P. E. Bredbacka and U. H. Stenman (2010). "An abnormal relation between basal prolactin levels and prolactin response to 12.5 microg TRH i.v. in drug-naive patients with first-episode schizophrenia." *Schizophr Res*, **119(1-3): 41-46**.
- Squire, L. R. (1992). "Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans." *Psychol Rev*, **99(2): 195-231**.
- Squire, L. R. and S. Zola-Morgan (1991). "The medial temporal lobe memory system." *Science*, **253(5026): 1380-1386**.
- Standley, C. A. (1999). "N-methyl-D-aspartate receptor binding is altered and seizure potential reduced in pregnant rats." *Brain Res*, **844(1-2): 10-19**.
- Standring, S. (2015). Gray's Anatomy E-Book: The Anatomical Basis of Clinical Practice, *Elsevier Health Sciences*.
- Staley, L. A., M. T. Ebbert, S. Parker, M. Bailey, I. Alzheimer's Disease Neuroimaging, P. G. Ridge, A. M. Goate and J. S. Kauwe (2016). "Genome-wide association study of prolactin levels in blood plasma and cerebrospinal fluid." *BMC Genomics*, **17 Suppl 3: 436**.
- Stawarska, R., J. Smyczynska, M. Hilczer and A. Lewinski (2014). "Changes in circadian rhythm of prolactin in short children are dependent on growth hormone secretion." *Ann Agric Environ Med*, **21(2): 445-449**.
- Stawarska, R., J. Smyczynska, M. Hilczer, A. Lewinski and M. Karasek (2008). "High repeatability of circadian prolactin rhythm assessment results in children." *Neuro Endocrinol Lett*, **29(6): 889-894**.
- Sternberg, R. J. (2000). Handbook of Intelligence, *Cambridge University Press*.

- Sun, Y., P. Ip and A. Chakrabarty (2017). "Simple Elimination of Background Fluorescence in Formalin-Fixed Human Brain Tissue for Immunofluorescence Microscopy." *J Vis, Exp*(127).
- Suzuki, K., A. Harada, H. Suzuki, C. Capuani, A. Ugolini, M. Corsi and H. Kimura (2018). "Combined treatment with a selective PDE10A inhibitor TAK-063 and either haloperidol or olanzapine at subeffective doses produces potent antipsychotic-like effects without affecting plasma prolactin levels and cataleptic responses in rodents." *Pharmacol Res Perspect*, **6(1)**.
- Suzuki, W. A. and H. Eichenbaum (2000). "The neurophysiology of memory." *Ann NY Acad Sci*, **911: 175-191**.
- Svensson, L. A., K. Bondensgaard, L. Norskov-Lauritsen, L. Christensen, P. Becker, M. D. Andersen, M. J. Maltesen, K. D. Rand and J. Breinholt (2008). "Crystal structure of a prolactin receptor antagonist bound to the extracellular domain of the prolactin receptor." *J Biol Chem*, **283(27): 19085-19094**.
- Swaminathan, G., B. Varghese and S. Y. Fuchs (2008). "Regulation of prolactin receptor levels and activity in breast cancer." *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, **13(1): 81-91**.
- Sweeney, P. and Y. Yang (2017). "Neural Circuit Mechanisms Underlying Emotional Regulation of Homeostatic Feeding." *Trends Endocrinol Metab*, **Epub ahead of print**.
- Szczesna, M. and D. A. Zieba (2015). "Phenomenon of leptin resistance in seasonal animals: the failure of leptin action in the brain." *Domest Anim Endocrinol*, **52: 60-70**.
- Szegedi, V., M. Paizs, E. Csakvari, G. Molnar, P. Barzo, G. Tamas and K. Lamsa (2016). "Plasticity in Single Axon Glutamatergic Connection to GABAergic Interneurons Regulates Complex Events in the Human Neocortex." *PLoS Biol*, **14(11): e2000237**.
- Tabata, H., M. Kobayashi, J. H. Ikeda, N. Nakao, T. R. Saito and M. Tanaka (2012). "Characterization of multiple first exons in murine prolactin receptor gene and the effect of prolactin on their expression in the choroid plexus." *J Mol Endocrinol*, **48(2): 169-176**.
- Takada, M. and M. Kasai (2003). "Growth hormone is a weaker candidate than prolactin for the hormone responsible for the development of a larval-type feature in cultured bullfrog skin." *J Exp Biol*, **206(Pt 7): 1137-1142**.

- Takamizawa, T., T. Satoh, T. Miyamoto, Y. Nakajima, T. Ishizuka, T. Tomaru, S. Yoshino, A. Katano-Toki, A. Nishikido, S. Sapkota, T. Watanabe, T. Okamura, E. Ishida, K. Horiguchi, S. Matsumoto, S. Ishii, A. Ozawa, N. Shibusawa, S. Okada and M. Yamada (2018). "Transducin beta-like 1, X-linked and nuclear receptor co-repressor cooperatively augment the ligand-independent stimulation of TRH and TSHbeta gene promoters by thyroid hormone receptors." *Endocr J*. **Epub ahead of print**.
- Taveira, K. V., K. T. Carraro, C. H. Catalao and S. Lopes Lda (2012). "Morphological and morphometric analysis of the hippocampus in Wistar rats with experimental hydrocephalus." *Pediatr Neurosurg*, **48(3): 163-167**.
- Teilum, K., J. C. Hoch, V. Goffin, S. Kinet, J. A. Martial and B. B. Kragelund (2005). "Solution structure of human prolactin." *J Mol Biol*, **351(4): 810-823**.
- Telleria, C. M., L. Zhong, S. Deb, R. K. Srivastava, K. S. Park, N. Sugino, O. K. Park-Sarge and G. Gibori (1998). "Differential expression of the estrogen receptors alpha and beta in the rat corpus luteum of pregnancy: regulation by prolactin and placental lactogens." *Endocrinology*, **139(5): 2432-2442**.
- Terry, A. V., Jr. (2009). Spatial Navigation (Water Maze) Tasks. Methods of Behavior Analysis in Neuroscience. J. J. Buccafusco. Boca Raton (FL).
- Terry, L. C., W. R. Crowley, C. Lynch, C. Longserre and M. D. Johnson (1982). "Role of central epinephrine in regulation of anterior pituitary hormone secretion." *Peptides*, **3(3): 311-318**.
- Thacker, J. S., D. H. Yeung, W. R. Staines and J. G. Mielke (2016). "Total protein or high-abundance protein: Which offers the best loading control for Western blotting?" *Anal Biochem*, **496: 76-78**.
- Thompson, S. A. (1982). "Localization of immunoreactive prolactin in ependyma and circumventricular organs of rat brain." *Cell Tissue Res*, **225(1): 79-93**.
- Tohei, A., B. VandeGarde, L. A. Arbogast and J. L. Voogt (2000). "Calcitonin inhibition of prolactin secretion in lactating rats: mechanism of action." *Neuroendocrinology*, **71(5): 327-332**.
- Torner, L. (2016). "Actions of Prolactin in the Brain: From Physiological Adaptations to Stress and Neurogenesis to Psychopathology." *Front Endocrinol (Lausanne)*, **7: 25**.
- Torner, L., S. Karg, A. Blume, M. Kandasamy, H. G. Kuhn, J. Winkler, L. Aigner and I. D. Neumann (2009). "Prolactin prevents chronic stress-induced decrease of adult hippocampal neurogenesis and promotes neuronal fate." *J Neurosci*, **29(6): 1826-1833**.

- Torner, L., R. Maloumby, G. Nava, J. Aranda, C. Clapp and I. D. Neumann (2004). "In vivo release and gene upregulation of brain prolactin in response to physiological stimuli." *Eur J Neurosci*, **19(6)**: 1601-1608.
- Torner, L., E. Tinajero, N. Lajud, A. Quintanar-Stephano and E. Olvera-Cortes (2013). "Hyperprolactinemia impairs object recognition without altering spatial learning in male rats." *Behav Brain Res*, **252**: 32-39.
- Torner, L., N. Toschi, A. Pohlinger, R. Landgraf and I. D. Neumann (2001). "Anxiolytic and anti-stress effects of brain prolactin: improved efficacy of antisense targeting of the prolactin receptor by molecular modeling." *J Neurosci*, **21(9)**: 3207-3214.
- Torres, J. S. d. (2006). "Procesos psicológicos básicos", *McGraw Hill/ Interamericana de España*. 2ª Edición
- Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon (1992). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979." *Biotechnology*, **24**: 145-149.
- Treves, A., A. Tashiro, M. P. Witter and E. I. Moser (2008). "What is the mammalian dentate gyrus good for?" *Neuroscience*, **154(4)**: 1155-1172.
- Tromp, D., A. Dufour, S. Lithfous, T. Pebayle and O. Despres (2015). "Episodic memory in normal aging and Alzheimer disease: Insights from imaging and behavioral studies." *Ageing Res Rev*, **24(Pt B)**: 232-262.
- Tuazon, P. T., M. Y. Lorenson, A. M. Walker and J. A. Traugh (2002). "p21-activated protein kinase gamma-PAK in pituitary secretory granules phosphorylates prolactin." *FEBS Lett*, **515(1-3)**: 84-88.
- Tulving, E. (2002). "Episodic memory: from mind to brain." *Annu Rev Psychol*, **53**: 1-25.
- Untergasser, G., H. Rumpold, E. Plas, M. Witkowski and P. Berger (2001). "Seminal plasma factors induce in vitro PRL secretion in smooth muscle cells of the human prostate." *J Clin Endocrinol Metab*, **86(11)**: 5577-5584.
- Valentim, A. M., S. R. Guedes, A. M. Pereira and L. M. Antunes (2016). "Euthanasia using gaseous agents in laboratory rodents." *Lab Anim*, **50(4)**: 241-253.
- Van Dam, D., G. Lenders and P. P. De Deyn (2006). "Effect of Morris water maze diameter on visual-spatial learning in different mouse strains." *Neurobiol Learn Mem*, **85(2)**: 164-172.
- van Rijn, C. M., H. Krijnen, S. Menting-Hermeling and A. M. Coenen (2011). "Decapitation in rats: latency to unconsciousness and the 'wave of death'." *PLoS One*, **6(1)**: e16514.



- Vandenbroucke, A. R., I. G. Sligte, A. B. Barrett, A. K. Seth, J. J. Fahrenfort and V. A. Lamme (2014). "Accurate metacognition for visual sensory memory representations." *Psychol Sci*, **25(4)**: 861-873.
- Vanderwolf, C. H. (2001). "The hippocampus as an olfacto-motor mechanism: were the classical anatomists right after all?" *Behav Brain Res*, **127(1-2)**: 25-47.
- Varvel, S. A. and A. H. Lichtman (2002). "Evaluation of CB1 receptor knockout mice in the Morris water maze." *J Pharmacol Exp Ther*, **301(3)**: 915-924.
- Vega, C., B. Moreno-Carranza, M. Zamorano, A. Quintanar-Stephano, I. Mendez, S. Thebault, G. Martinez de la Escalera and C. Clapp (2010). "Prolactin promotes oxytocin and vasopressin release by activating neuronal nitric oxide synthase in the supraoptic and paraventricular nuclei." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **299(6)**: R1701-1708.
- Vera-Lastra, O., L. J. Jara and L. R. Espinoza (2002). "Prolactin and autoimmunity." *Autoimmun Rev*, **1(6)**: 360-364.
- Vergara-Castaneda, E., D. R. Grattan, H. Pasantes-Morales, M. Perez-Dominguez, E. A. Cabrera-Reyes, T. Morales and M. Cerbon (2016). "Prolactin mediates neuroprotection against excitotoxicity in primary cell cultures of hippocampal neurons via its receptor." *Brain Res*, **1636**: 193-199.
- Veselinovic, T., I. Vernaleken, P. Cumming, U. Henning, L. Winkler, P. Kaleta, M. Paulzen, C. Luckhaus and G. Grunder (2018). "Antidopaminergic medication in healthy subjects provokes subjective and objective mental impairments tightly correlated with perturbation of biogenic monoamine metabolism and prolactin secretion." *Neuropsychiatr Dis Treat*, **14**: 1125-1138.
- Vicens, P., L. Heredia, M. Torrente and J. L. Domingo (2017). "Behavioural effects of PNU-282987 and stress in an animal model of Alzheimer's disease." *Psychogeriatrics*, **17(1)**: 33-42.
- Vicens, P., R. Redolat and M. D. C. Carrasco (2003). "Aprendizaje espacial y laberinto de agua: metodología y aplicaciones." *Psicothema*, **15(4)**: 539-544.
- Viengchareun, S., H. Bouzinba-Segard, J. P. Laigneau, M. C. Zennaro, P. A. Kelly, A. Bado, M. Lombes and N. Binart (2004). "Prolactin potentiates insulin-stimulated leptin expression and release from differentiated brown adipocytes." *J Mol Endocrinol*, **33(3)**: 679-691.
- Vogliotti, A. and V. Macchiarola (2003). Teorías implícitas, innovación educativa y formación profesional de docentes. Ponencia Congreso Latinoamericano de Educación Superior. Argentina: *Universidad de San Luis*.

- Volpi, R., P. Chiodera, D. Gramellini, C. Cigarini, C. Papadia, G. Caffarri, G. Rossi and V. Coiro (1994). "Endogenous opioid mediation of the inhibitory effect of ethanol on the prolactin response to breast stimulation in normal women." *Life Sci*, **54(11)**: 739-744.
- Vorhees, C. V. and M. T. Williams (2006). "Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory." *Nat Protoc*, **1(2)**: 848-858.
- Vorhees, C. V. and M. T. Williams (2014). "Assessing spatial learning and memory in rodents." *ILAR J*, **55(2)**: 310-332.
- Vorhees, C. V. and M. T. Williams (2014). "Value of water mazes for assessing spatial and egocentric learning and memory in rodent basic research and regulatory studies." *Neurotoxicol Teratol*, **45**: 75-90.
- Voytek, B., M. A. Kramer, J. Case, K. Q. Lepage, Z. R. Tempesta, R. T. Knight and A. Gazzaley (2015). "Age-Related Changes in 1/f Neural Electrophysiological Noise." *J Neurosci*, **35(38)**: 13257-13265.
- Walker, T. L., J. Vukovic, M. M. Koudijs, D. G. Blackmore, E. W. Mackay, A. M. Sykes, R. W. Overall, A. S. Hamlin and P. F. Bartlett (2012). "Prolactin stimulates precursor cells in the adult mouse hippocampus." *PLoS One*, **7(9)**: e44371.
- WALSH, R. J., F. J. SLABY and B. I. POSNER (1987). "A receptor-mediated mechanism for the transport of prolactin from blood to cerebrospinal fluid." *Endocrinology*, **120(5)**: 1846-1850.
- Wang, R. and E. Spelke (2002). "Human spatial representation: insights from animals." *Trends Cogn Sci*, **6(9)**: 376.
- Wang, W., Y. W. Pan, T. Wietecha, J. Zou, G. M. Abel, C. T. Kuo and Z. Xia (2013). "Extracellular signal-regulated kinase 5 (ERK5) mediates prolactin-stimulated adult neurogenesis in the subventricular zone and olfactory bulb." *J Biol Chem*, **288(4)**: 2623-2631.
- Wang, Y. F., J. W. Liu, M. Mamidi and A. M. Walker (1996). "Identification of the major site of rat prolactin phosphorylation as serine 177." *J Biol Chem*, **271(5)**: 2462-2469.
- Watson, J. B. (Mar 1913). "Psychology as the behaviorist views it." *Psychological Review*, **Vol 20(2)**: 158-177.
- Webster, S. J., A. D. Bachstetter, P. T. Nelson, F. A. Schmitt and L. J. Van Eldik (2014). "Using mice to model Alzheimer's dementia: an overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models." *Front Genet*, **5**: 88.

- Weinhaus, A. J., L. E. Stout, N. V. Bhagroo, T. C. Brelje and R. L. Sorenson (2007). "Regulation of glucokinase in pancreatic islets by prolactin: a mechanism for increasing glucose-stimulated insulin secretion during pregnancy." *J Endocrinol*, **193(3)**: 367-381.
- Weinhaus, A. J., L. E. Stout and R. L. Sorenson (1996). "Glucokinase, hexokinase, glucose transporter 2, and glucose metabolism in islets during pregnancy and prolactin-treated islets in vitro: mechanisms for long term up-regulation of islets." *Endocrinology*, **137(5)**: 1640-1649.
- Whitfield, D. R., P. T. Francis, C. Ballard and G. Williams (2018). "Associations between ZnT3, tau pathology, agitation, and delusions in dementia." *Int J Geriatr Psychiatry*. **Epub ahead of print**.
- Wilkanowska, A., A. Mazurowski, S. Mroczkowski and D. Kokoszynski (2014). "Prolactin (PRL) and prolactin receptor (PRLR) genes and their role in poultry production traits." *Folia Biol (Krakow)*, **62(1)**: 1-8.
- Williams, P. L. B., Lawrence H; Berry, Martin M; Collins, Patricia; Dyson, Mary; Dussek, Julian E; Ferguson, Mark WJ (1998). Anatomía de Gray, Tomo II, *Harcourt Brace de España, S.A*, **38ª Edición**.
- Wilson, D. M., 3rd, N. V. Emanuele, J. K. Jurgens and M. R. Kelley (1992). "Prolactin message in brain and pituitary of adult male rats is identical: PCR cloning and sequencing of hypothalamic prolactin cDNA from intact and hypophysectomized adult male rats." *Endocrinology*, **131(5)**: 2488-2490.
- Wiltgen, B. J. and K. Z. Tanaka (2013). "Systems consolidation and the content of memory." *Neurobiol Learn Mem*, **106**: 365-371.
- Xu, D., L. Lin, X. Lin, Z. Huang and Z. Lei (2010). "Immunoregulation of autocrine prolactin: suppressing the expression of costimulatory molecules and cytokines in T lymphocytes by prolactin receptor knockdown." *Cell Immunol*, **263(1)**: 71-78.
- Yang, X. and A. Friedl (2015). "A positive feedback loop between prolactin and STAT5 promotes angiogenesis." *Adv Exp Med Biol*, **846**: 265-280.
- Yang, X., K. Meyer and A. Friedl (2013). "STAT5 and prolactin participate in a positive autocrine feedback loop that promotes angiogenesis." *J Biol Chem*, **288(29)**: 21184-21196.
- Yeung, M. Y., S. Gabardi and M. H. Sayegh (2017). "Use of polyclonal/monoclonal antibody therapies in transplantation." *Expert Opin Biol Ther*, **17(3)**: 339-352.
- Yilmaz, U. (2015). "Alzheimer's disease." *Radiologe*, **55(5)**: 386-388.
- Yoshimoto, M., O. Ludkovski, J. Good, C. Pereira, R. J. Gooding, J. McGowan-Jordan, A. Boag, A. Evans, M. S. Tsao, P. Nuin and J. A. Squire (2018). "Use of multicolor fluorescence in situ hybridization to detect deletions in clinical tissue sections." *Lab Invest*, **Epub ahead of print**.

- Young, M. B., S. D. Norrholm, L. M. Khoury, T. Jovanovic, S. A. M. Rauch, C. M. Reiff, B. W. Dunlop, B. O. Rothbaum and L. L. Howell (2017). "Inhibition of serotonin transporters disrupts the enhancement of fear memory extinction by 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA)." *Psychopharmacology (Berl)*, **Epub ahead of print**.
- Yu, J., F. Xiao, Q. Zhang, B. Liu, Y. Guo, Z. Lv, T. Xia, S. Chen, K. Li, Y. Du and F. Guo (2013). "PRLR regulates hepatic insulin sensitivity in mice via STAT5." *Diabetes*, **62(9): 3103-3113**.
- Zagrebelsky, M., N. Lonnemann, S. Fricke, Y. Kellner, E. Preuss, K. Michaelsen-Preusse and M. Korte (2017). "Nogo-A regulates spatial learning as well as memory formation and modulates structural plasticity in the adult mouse hippocampus." *Neurobiol Learn Mem*, **138: 154-163**.
- Zarrindast, M. R. and F. Khakpai (2015). "The Modulatory Role of Dopamine in Anxiety-like Behavior." *Arch Iran Med*, **18(9): 591-603**.
- Zeidman, P. and E. A. Maguire (2016). "Anterior hippocampus: the anatomy of perception, imagination and episodic memory." *Nat Rev Neurosci*, **17(3): 173-182**.
- Zhang, F., L. Wang, Z. Liu, Z. Xing, H. Wang and Z. Li (2010). "Insulin-like growth factor-1 modulates Ca<sup>2+</sup> homeostasis and apoptosis of cultured dorsal root ganglion neurons with excitotoxicity induced by glutamate." *Pharmazie*, **65(1): 5-8**.
- Zinger, M., M. McFarland and N. Ben-Jonathan (2003). "Prolactin expression and secretion by human breast glandular and adipose tissue explants." *J Clin Endocrinol Metab*, **88(2): 689-696**.
- Zuniga, A., J. B. Navarro, P. Lago, F. Olivas, E. Muray and M. Crespo (2013). "Evaluation of needs among patients with severe mental illness. A community study." *Actas Esp Psiquiatr*, **41(2): 115-121**.



*VI Concurso de Fotografía científica USAL.*

*"El árbol de la sabiduría"*

*VIRGINIA SÁNCHEZ ROBLEDO*

*"Tis the mind that makes the body rich"*

W. Shakespeare

## **7. ENGLISH SUMMARY**



**UNIVERSITY OF SALAMANCA**  
**DEPARTAMENT OF PHYSIOLOGY AND PHARMACOLOGY**  
**DOCTORAL THESIS (SUMMARY)**  
**INTERNATIONAL MENTION**



**VNiVERSiDAD**  
**Đ SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

**ANALYSIS OF THE PRESENCE AND POSSIBLE SYNTHESIS  
OF PRL AND ITS RECEPTOR IN THE HIPPOCAMPUS.  
POSSIBLE INVOLVEMENT IN THE PROCESSES OF  
LEARNING AND CONSOLIDATION OF MEMORY**

**Dña. Virginia Sánchez Robledo**

Supervised by:

Dra. María Josefa García Barrado

Dr. José Carretero González

Dra. María del Carmen Iglesias Osma

Salamanca, June 15<sup>th</sup> 2018





## 7.1. INTRODUCTION

### 7.1.1. *HIPPOCAMPUS*

The hippocampus is a neuroanatomical structure of the brain derived from the medial region of the telencephalon, located in the medial part of both temporal lobes.

It is fraction of the limbic system as part of a functional complex called hippocampal formation. It is composed of the Cornu Ammonis (CA), gyrus dentatus (GD), subiculum, and the entorhinal cortex (EC).

Anatomically, the hippocampus has a "C" shape. It is medially concave around the mesencephalon and measures between 4 - 4.5 cm.

Macroscopically it is divided into three parts: the body, formed by the CA; the head, which includes GD and the tail.

- **CA** is composed of a trilaminar archicortex and a single layer of cells.

They are called the pyramidal cells with plexiform layers above and below. This region is divided into 3 distinct anatomical fields: CA1, CA2, CA3. Occasionally, another anatomical field is also mentioned, CA4 (although there is not clear evidence of its existence).

In the CA, several stratified layers are differentiated, from its ventricular face: ependyme, alveus, oriens stratum, pyramidal stratum, lucido stratum, radiatum stratum and lacunosomolecular stratum.

- **The GD** is composed of three layers: molecular layer, granular layer and polymorphic layer (from more external to more internal)

\* The granular layer is formed by the granular cells' soma. The dendrites of these cells penetrate on the molecular layer, in that place is where they branch.

\*The molecular layer, the granular cells dendrites establish synapse with afferents from the entorhinal cortex, with commissural association and axon afferents ascending from the polymorphic layer and with various local interneurons.

The axons' cells of the granulosal layer cross the polymorphic layer and enter the hippocampus as mossy fibers.

These fibers get synapse with dendrites of pyramidal cells. Granular cells are mainly excitatory.

It is such a studied region throughout the times. The main function of the hippocampus seems to be related to memory and learning, especially in the consolidation of long-term memory from immediate memory and short-term memory, though it is also, involved in cognition, particularly in semantic memory (memory of facts and concepts), episodic memory (collection of conscious events and relationship between them) and spatial memory processes (spatial recognition).

It has great importance in cognition processes, neurogenesis, with a relevant role in endocrinologic stress-regulation. It presents such great neuronal plasticity and participates in the emotional behaviour regulation.

The hippocampus has been implicated in neuropsychiatric pathologies. Injuries in this structure produce some symptoms most related to memory loss and decreased learning.

However, we find various diseases related to it such as brain degeneration (aging), stress, epilepsy and schizophrenia (Aggleton 2012, Destrieux, Bourry et al. 2013, Bose, Agarwal et al. 2014, Aggleton and Christiansen 2015, Zeidman and Maguire 2016, Winton-Brown, Schmidt et al. 2017, Fogwe and Mesfin 2018, Joyce and Barbas 2018, Pilz, Bottes et al. 2018).

### **7.1.2. MEMORY IN THE HIPPOCAMPUS**

Memory is a function of the brain that allows the organism to code, store and retrieve information from the past. It arises from the repeated synaptic connections between neurons, forming a neural network.

Depending on the temporal scope, it can be classified as: short-term memory (new memory or recent information) or medium and long-term memory (old information memory).

It is already known that the hippocampus has a critical role in learning and memory.

The information starts from the isocortical zones that converge towards the entorhinal area and from there it goes to the hippocampus.

Thus, the newly acquired information crosses the pathways of this organ before being fixed in the isocortex and makes it possible to distinguish the memory of new or recent elements that depend on the hippocampus.

Nevertheless, keep in mind that this brain region has very high cognitive functions too, the neurons have a remarkable plasticity and even, repeated stimulations or events produce different modifications in their physiological state, being able to produce new neurons throughout life.

At the present time, for some authors, the most accepted hypothesis is that the hippocampus is necessary for the initial phase of acquisition of explicit knowledge but it is not, however, a memory storage system.

Even when it seems that the process of consolidating explicit memory depends on the exchange between the hippocampus and various cortical areas through bidirectional systems of cortico-hippocampal connections.

The storage of the memory would be located at the cortical level, the organization and its use would depend on the hippocampal structure.

On the other hand, when there has been a consolidation of memory, it is because there has been learning behind that action.

Whenever there has been a change in behavior as a result of an experience, when skills have been acquired, artfulness and abilities, knowledge or behaviors as a result of a study or observations and they endure over time. It is because individuals have gained the ability to learn.

Therefore, in practical terms, memory or rather memories are the expression that learning has occurred.

Hence, both processes memory and learning are difficult to study separately. They are correlated processes capable of undergoing modifications according to environmental stimuli.

They are two closely linked brain processes that cause adaptive changes in the organism's behaviour.

One involves the acquisition of knowledge and skills (learning) and the other, the retention of information (memory). They cannot be separated or distinguished within the neural circuit (Rugg, Vilberg et al. 2012, Ritchey, Libby et al. 2015, Axelrud, Santoro et al. 2018, Jeye, MacEvoy et al. 2018, Vanz, Bicca et al. 2018, Zhao, Zheng et al. 2018).

### **7.1.3. PROLACTIN**

Prolactin is a polypeptide hormone synthesized mainly by the lactotroph cells of the pituitary gland.

There are also other organs and tissues in which the PRL is expressed and secreted. The gene that codes for this hormone can be found in all vertebrate.

Its release is regulated, mainly, by the inhibitory control of dopamine produced in tuberoinfundibular dopaminergic neurons (TIDA) located in the arcuate nucleus of the hypothalamus. The PRL acts through a feedback system to regulate its release.

In addition to the synthesis of PRL in the adenohypophysis, its local expression and release occurs in various regions of the brain including the hypothalamus (paraventricular nucleus).

Likewise, PRL can cross the blood-brain barrier via receptor-mediated transport in the choroid plexus and therefore can exert central effects.

The PRL receptors (RPRL) are widely distributed in the organism and SNC areas.

Previous studies have demonstrated the presence of RPRL in the hippocampus.

When PRL binds to its receptor, it causes its dimerization, which initiates the activation of a tyrosine kinase called Janus kinase 2 (JAK-2) that in turn phosphorylates a family of proteins STATs (signal transducer and activator of transcription).

Of the 8 members of this family, STAT1, STAT3 and especially STAT5 have been identified as transducing molecules of the PRL receptor. Joined RPRL also promotes the activation of other kinases such as MAPK, Src kinasa, PI3K, PKC and PKA.

This hormone has this name because of its role in lactation. Although it has great versatility in its functions, it has biological actions in different tissues and organs.

Among its many functions you can find, implications in the electrolyte balance, in the reproductive system, growth and development, in homeostasis, as well as in the regulation of the immune system and the modulation of neuroendocrine functions in the adult.

Specifically in the CNS, PRL is involved in diverse functions such as the modulation of electrophysiological properties in hypothalamic neurons, the maternal behaviour stimulation and re-myelination stimulating the generation of oligodendrocytes that are part of the myelin sheath. It is interesting to highlight the role of PRL in the suppression of stress responses and its participation in neurogenesis in the adult hippocampus under conditions of chronic stress.

Also, it has been described that the peripheral and central administration of PRL or its secretion induced by pheromones increases neurogenesis in the adult in the subventricular zone.

Moreover, PRL has been identified as a regulator of astroglial proliferation and of oligodendrocyte progenitors.

Another important function of this hormone in the CNS is its participation in neuroprotection and in the decrease of cell damage in hippocampus' areas in an epilepsy model, which suggests that it could modulate input signals to the hippocampus and, thus, regulate excitability.

Recent studies indicate that mice deficient in PRL have reduction in the number of precursors in the hippocampus and they show alterations in tasks related to memory and learning.

These reports reinforce the role of PRL in the stimulation of neurogenesis in the adult hippocampus.

There is quite knowledge related to extrahypophyseal PRL on cellular functions but not enough information is currently available about the role and implications of this hormone and its receptor on behavior, neuronal plasticity, and memory-learning abilities.

Therefore, in the current doctoral thesis we have considered what could be the role played by PRL and its receptor at the different regions of the rat hippocampus after performing behaviour tasks.

Furthermore, learning and its possible consolidation of memory in the Morris Water Maze, as well as what would be its involvement in these functions were also studied (Garcia-Barrado, Blanco et al. 2017, Anagnostou, Reyes-Mendoza et al. 2018, Borba, Zandman-Goddard et al. 2018, Farfel, Werner et al. 2018, Ocampo Daza and Larhammar 2018, Oclon, Solomon et al. 2018).

## 7.2. AIMS

The **general objective** is to analyze whether prolactin in the hippocampus is related to learning and short and long term memory.

For this, we propose specific objectives:

**First objective:** Analysis of the behavior and learning of healthy male rats after a behavioral test in the Morris Water Maze.

Studying its involvement in spatial memory and in the consolidation of short and long-term memory. To know how much time is needed and how long the consolidation of memory lasts in these animals.

**Second objective:** To analyze the presence of PRL in the hippocampus in healthy male rats trained in the MWM, and their modifications related to the possible consolidation of memory at 9,16 and 25 days.

**Third objective:** In the event that PRL is present in the hippocampus and is related to memory consolidation, study the expression of PRL mRNA in the different regions of the hippocampus of healthy male rats trained in the MWM.

**Fourth objective:** If in PRL mRNA is expressed in the hippocampus, we will analyze its relationship with the presence of the PRL receptor in the same areas of the hippocampus.

## 7.3. MATERIALS AND METHODS

### 7.3.1. ANIMALS

Adult male (2.5 months old) Wistar rats were used throughout this work. All the experimental protocols were approved by the Bioethics Committee of the Faculty of Medicine, at the Universidad of Chile as well as at the Universidad of Salamanca.

The animals had free access to drink and food. They were kept in rooms at a temperature of 20°C with constant light / dark lighting system (12h/ 12h).

### 7.3.2. WATER MAZE TRAINING

Rats were trained in a circular water maze (1.33 m diameter, 75 cm deep). Rats were taught for 1-min-periods three times daily, followed by relaxation between session and session.

To assess spatial acuity, the pool was subdivided by imaginary lines into four equal quadrants (1-4), the hidden platform was located in quadrant 3 or in imaginary circular areas, one more external (periphery) and another more central (center) without platform.

The escape latency, average speed, distance travelled, stay time during each trial and the percentage of permanence in specific regions of the pool was assessed with a software-coupled video camera (HVS Imagen®). Space acuity was calculated as the product of the percentage of permanence in quadrant 3 (Morris, Garrud et al. 1982, Adasme, Haeger et al. 2011).

Different groups were established.

- Free swim control group: the animals swam freely throughout the pool without a platform. The training was performed during 3 consecutive days. The possible existence of cognitive deficiencies in learning and retention memory (sensorimotor problems) was valued.



- Movable invisible platform group: the working memory and the stress created by the exercise was determined, the rats swam through the four quadrants.

The animals did the homework for 4 consecutive days, the escape platform varied daily.

- Learning group 6 days: To force rats to locate the platform using spatial memory, a hidden platform was placed in a fixed location in the pool during the course of training.

Unable rats to find the platform within 1 min in the first trial were guided to it by the experimenter. These animals were subjected for 6 consecutive days to three swimming trials daily with platform in quadrant 3.

- Memory group: the consolidation of the memory was evaluated at 9, 16 and 25 days.

It was a spatial preference test. If the animal has consolidated the memory, he would swim more time on quadrant 3. There was a single session with 1 min swimming without a platform at 9, 16 and 25 days after the start of the learning.

After testing in MWM, the hippocampus were removed, 6h after the last session.

### **7.3.3. BRAIN SACRIFICE AND EXTRACTION**

After performing the MWM, the animals were slaughtered using two sacrifice techniques: intracardiac perfusion and decapitation technique.

#### **7.3.3-1 INTRACARDIAC PERFUSION TECHNIQUES**

Intracardiac perfusion technique is a fixation method (Matryba, Bozycki et al. 2017, Schmitt, Csiki et al. 2017).

The animals were asleep with 3% isoflurane, they underwent thoracotomy for discovering the heart; afterwards, the left ventricle was sectioned and saline solution (150mM NaCl, pH 7.8) and fixing solution (4% paraformaldehyde (PFA)) was perfused in this area.

Then, a craniotomy was performed for extracting the brain.

The rat brains were placed in 4% PFA / 4% sucrose for 30 min, and then placed in 30% sucrose.

This method was used in order to perform immunohistochemical studies, so, all brain structures were preserved.

Later, histological sections (20  $\mu$ m thick) were made in a freezing microtome at -37°C, and the tissue samples were stored at 4 °C with PBS1x (137 mM NaCl; 3 mM KCl; 0.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O; 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.3) and sodium azide.

### **7.3.3-2 EUTHANASIA BY DECAPITATION**

Euthanasia by decapitation is a sacrificial method to obtain nervous tissue without fixing (van Rijn, Krijnen et al. 2011).

The animals were anesthetized by intraperitoneal injection with sodium pentobarbital (50 mg / Kg), and were decapitated with guillotine; then, a craniotomy was performed and the rat brain was extracted.

After embedding in ASCF solution (124 mM NaCl; 3mM KCl; 1.25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 28mM NaHCO<sub>3</sub>), the two hippocampi were dissected and frozen in liquid nitrogen, storing them in Trizol® for using later.

### **7.3.4. *PROTEIN AND RNAm DETECTION***

#### **7.3.4-1 INMUNOFLUORESCENCE**

Immunofluorescence studies were carried out using brain tissue sections in flotation (Munoz, Estay et al. 2016).

Free-floating sections were bathed in permeabilization / blocking buffer (20% Triton X-100 (PBS-TX), 0.1% sodium borohydride, and 10% donkey serum) overnight at 4°C.

The sections were later incubated with primary rabbit monoclonal antibodies against PRL (dilution 1:100, Abcam®), a rabbit anti-RPRL monoclonal antibody antibodies RPRL (dilution 1:250, Abcam®), a mouse monoclonal antibodies

biotin (1:300, Dako®) or with a mouse monoclonal MAP2 antibody (1:400, Merck) overnight at 4°C in 20% PBS-TX and 10% donkey serum.

After exposing the sections to the primary antibodies, they were washed (PBS 1x) and incubated for two hours with goat-anti-rabbit Alexa Fluor 488 (1:400, Abcam®), goat-Alexa Fluor 647 anti-mouse (1:400, Abcam®), goat-anti-mouse Alexa Fluor 488 (1:600, Abcam®), goat-anti-rabbit Cy3 (1:1000, Abcam®) antibodies, depending on the primary antibody that was used.

All secondary antibodies were obtained from Molecular Probes®. Nuclei were stained by using Hoechst® 33258 according to the manufacturer's instructions (Molecular Probes®).

Images were obtained using a confocal microscope (Leica®, TCS SP2) with 3 laser excitation lines. Fluorescence intensity and the quantitative analyses were measured by using ImageJ free software.

#### **7.3.4-2 WESTERN BLOTTING**

The immunoblot analyses of the hippocampus were carried out in 15% and 4.5% SDS polyacrylamide gels, loading 40 µg of protein per lane.

Proteins determination was carried out by the sulfosalicylic acid method after obtaining the tissue homogenate (lysis buffer: 20 mM MPOS-Tris, 0.3M sucrose, 2 mM EDTA, 2mM EGTA, 1% NP-40, 0.1% SDS).

Resolved proteins were then transferred to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes.

Non-specific binding of proteins to the PVDF membranes was blocked by incubating in blocking solution containing 0.2% TBST – 5% skim milk for 1 h at room temperature.

The PVDF membranes were then incubated overnight at 4 ° C with one of the following antibodies: primary monoclonal antibodies against PRL (1:1000, Abcam®), and β-actin (1:5000, Sigma-Aldrich®).

Reactive bands were revealed using horseradish peroxidase-linked mouse-anti-rabbit and goat-anti- mouse; secondary antibody was from Jackson ImmunoResearch® (1.5000).

An enhanced chemiluminescence detection system (LAS-4000 Luminiscence Image Analyzer, FujiFilm®) was used to visualize the bands.

The images obtained were processed by the specific program Image Reader LAS-4000, FujiFilm®. The intensity ratio for each protein was normalized to that of  $\beta$ -actin.

### **7.3.4-3 "In Situ" HYBRIDIZATION**

The study was performed using a non-isotopic method involving the immunohistochemical detection of biotin by fluorescence procedures.

To perform in situ hybridization, the biotinylated oligonucleotide 5' BIO-ctc agt tcc atc cag gca gat tca ggc 3' (Sigma-Aldrich®), 100% specific rat PRL according to GenBank data base was used as probe.

The slides were prehybridized in Omnibuffer™ for 1 h at 39°C; hybridization with the biotinylated probe (25 ng/ $\mu$ l in Omnibuffer™) was carried out overnight at 55°C using a Hybaid thermal cycler.

The reaction was stopped by washes in 4x SSC (0.6M NaCl; 0.007M  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ ; 1.5 mM DEPC) at 30°C for 10 min and other decreasing washes of SSC (2x; 1x; 0.5x and 0.1x) at room temperature for 5 min.

To continue with a serial treatment of alcohols for 3 min, 70%, 96%, 100%, 96% and 70% ethanol.

Endogenous immunoglobulins were blocked with non-immune pig serum (1:30 in 0.05x TBS). Biotin was detected using anti-biotin monoclonal antibodies (Dako®, diluted 1:300 in 1x TBS) overnight at 4 ° C in a humidity chamber.

Then, the slices were incubated with goat anti-mouse Alexa Fluor 488 (1:600 in TBS, Abcam®) secondary antibody for 60 min at room temperature.

The slides were counterstained using Mayer's acid hematoxylin.

As controls, omission of the probe, pretreatment with RNase and in situ hybridization with a detection probe and incubation with sense probe (5' gcc tga

atc tgc ctg gat gga act gag 3' )(Sigma-Aldrich®) no reaction was found in any case.

### **7.3.5. STATISTIC ANALYSIS**

Results were expressed as means  $\pm$  SEM. To calculate the statistical significance of the differences between groups, the Student's *t*-test for paired/unpaired was used, and for the comparison between groups, the Bonferroni's test was used by ANOVA.

## 7.4. RESULTS

### 7.4.1. DETERMINATION OF BEHAVIOR, LEARNING AND MEMORY

#### 7.4.1-1 ANIMALS BEHAVIOR

Learning and memory are two intimately related processes. Therefore, it is very difficult to separate them. Thanks to them, we acquire new knowledge, behaviors and aptitudes.

In addition, not only do we learn new things but also we are able to modify what we have learned to improve it and adapt ourselves effectively to different situations and times.

Mouse and rat models have been widely used for studies in learning and memory.

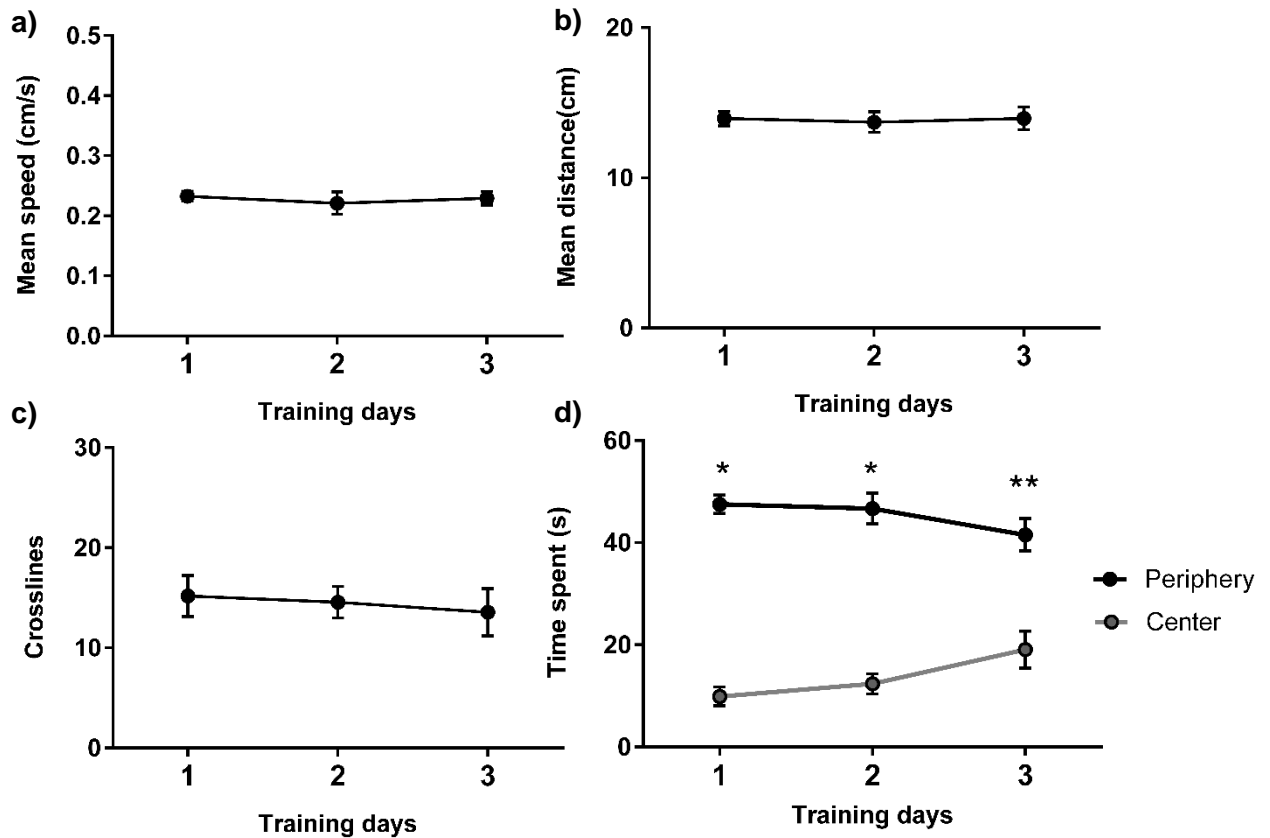
One of the most effective methods to evaluate these characteristics has been the Morris Water Maze (MWM). The use of this challenging technique for rodents explains spatial learning.

Sometimes cognitive deficiencies (spatial learning and memory) are sometimes confused by motor or motivational impediments.

For this reason, the first step of our study was to evaluate the sensory-motor capacity, the acoustic absence startles and visual acuity, the stress influence on the test and the motivation of our rodents towards swimming in the MWM.

These factors were evaluated with the free swim control group, measuring the mean distance, the mean speed, the crosslines and the time spent in the periphery and in the center.

Data that indicate the animals' good condition in order to achieve learning.



**Figure ES-1.** Behavioral parameters to validate sensory-motor capacity, cognitive function, stress in front of the task and accommodation for acquisition in the formation of memory and learning in male rats free swimming control. a) Mean speed (cm/s); b) Mean distance (cm); c) Crossline and d) Temporal evolution of the time of permanence (s). The values are represented by the mean  $\pm$  SEM of  $n = 10$  animals. They were analyzed by ANOVA, using the Bonferroni's multiple comparison test (\*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.0001$ ).

In the graphs of Figure ES-1 a constant course in the parameters is observed throughout the days, this is a sign that there is not locomotor or sensory problem.

The crossing line has a slight decrease in the length of the task, indicating that the animals have become accustomed to the environment and are ready for learning.

While the temporal evolution in the time of permanence marks a correct accommodation of perception towards the environment where the test is carried out (adequate cognitive function), indicating that the stress caused by the test will

not influence the acquisition capacity in memory formation and spatial learning by our study individuals.

To assess the working memory, the invisible movable platform group was created.

This group was made to know what was the influence of the platform was before the exercise and if all the cognitive functions were not affected.

As in the previous case, visual acuity, stresses, locomotor and motivational capacity in pre-training were evaluated.

These control animals were subjected to 4 consecutive days to three swimming trials daily with platform, the platform location varied daily.

It was determined, average speed, average distance traveled, distance to the platform to know if there is learning by the rodents using visual keys even if it was removed.

Besides, the time of permanence in each quadrant was found to rule out a possible trend by some quadrant.

In Figure ES-2, a constant speed is observed throughout the training days, a sign that there is not motor incoordination.

There is shown a decrease in the distance traveled by the animals because they find the platform before as they spend the days of pre-training. These data suggest the possible existence of learning in the later phase.

As in the previous parameter, the distance platform was usually kept constant, and was slightly lowered on day 4 of pre-training, indicating that the individuals have adapted correctly to the environment.

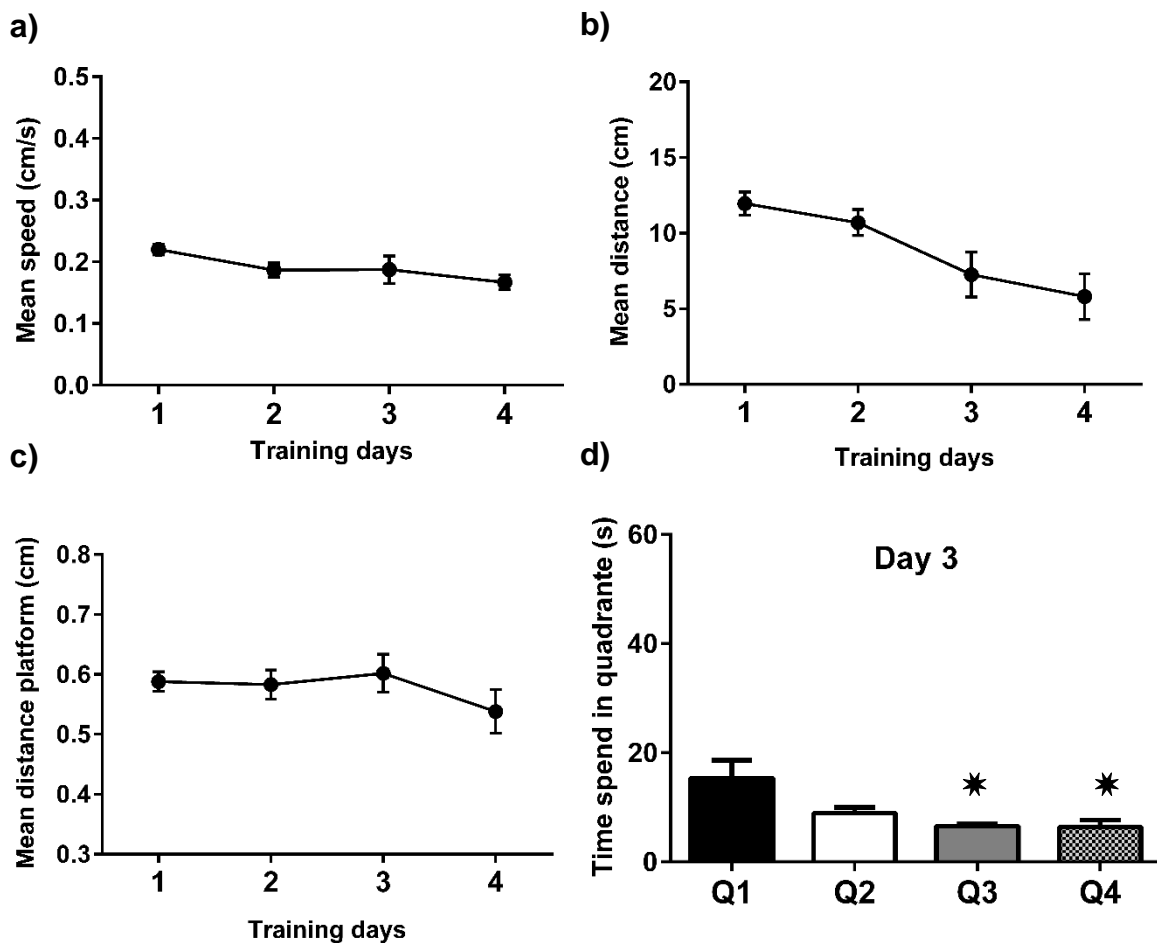
The tendency for some quadrant was almost null according to the evaluation of the time of permanence in each quadrant, and there was a slight predilection for quadrant 1 because this was the place where rats were launched, although, we did not consider it in our analysis.



Therefore, with the results obtained in this pre-training before starting the training test.

It was determined that the animals did not present sensory-motor problems, the influence of stress was minimal, cognitive problems were ruled out and there was not a tendency for any specific quadrant.

All this indicated that the rodents had the optimal capacity and did not have deficits that could prevent a good swimming performance so that learning or consolidation of memory in later tests could be developed



**Figure ES-2.** Evaluation of the working memory during a period of 4 days in the invisible moving platform control group. a) average speed (cm / s); b) distance traveled in the swim (cm); c) distance traveled by the animal towards the platform (cm); d) Time spend in quadrante (s) at day 3, Quadrant data for all days of the trip are similar to day 3. The values represent the mean  $\pm$  SEM of n = 10 animals. They were analyzed by ANOVA, using the Bonferroni's

#### 7.4.1-2 EVALUATION ABOUT LEARNING

Animals are able to interact with changing environments during their lives.

They process new information about their surroundings, remembering that information and create success situations in response, that is to say, they are able to learn and retain what they have assimilated.

After having done the pre-training and being aware that the animals were able to continue with the learning process.

The next step was to take the learning test during a period of 6 consecutive days. With this group, not only do we value the ability to learn but also the reference memory.

This task was mainly based on the time it takes the rodent to find the platform, its position never changed since the platform was always located in quadrant number 3.

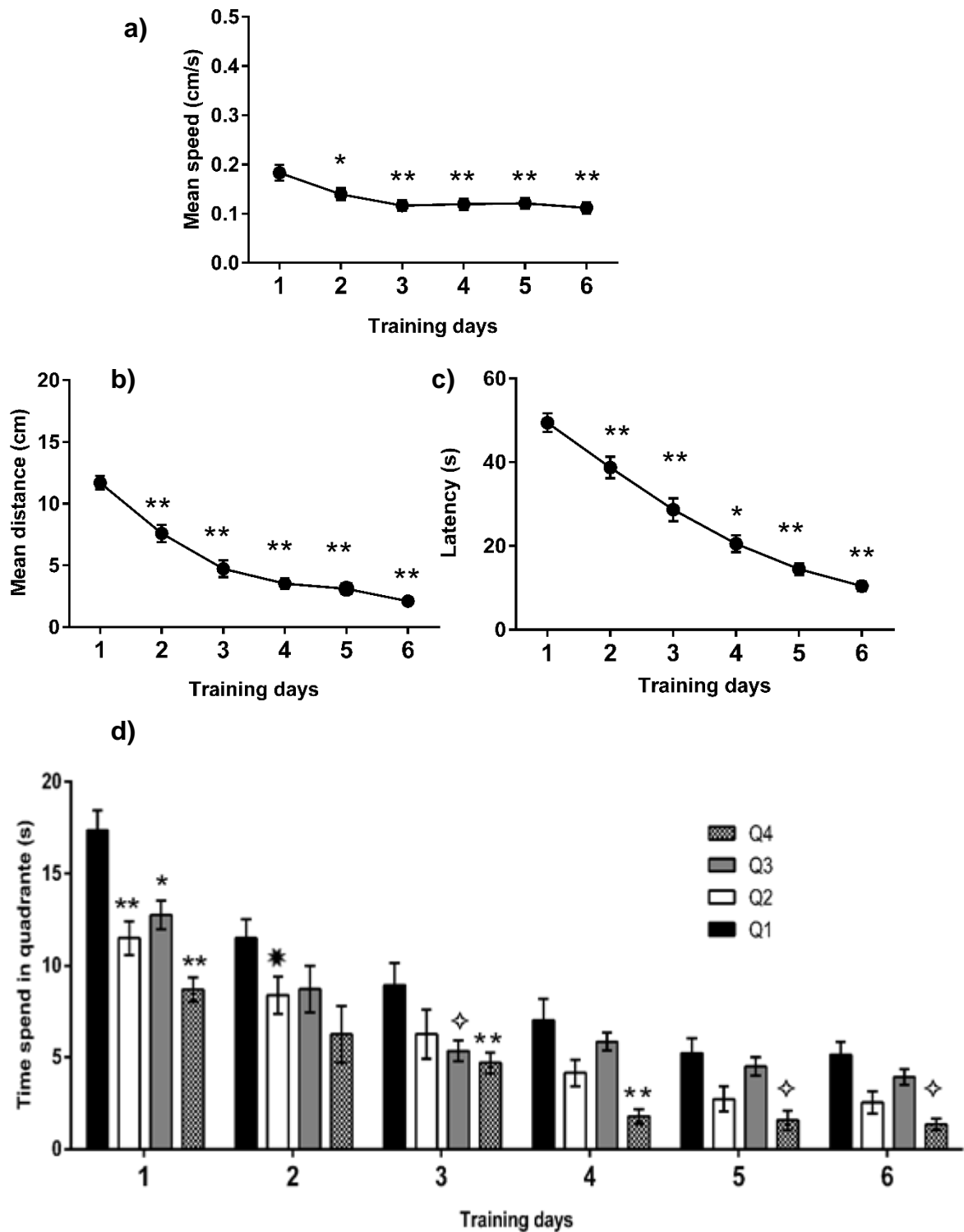
As a reference parameter to quantify spatial memory and learning, exhaust latency was used. Occasionally, escape latency is confused with swimming speed. It is known that it is most appropriate to use the length of the trajectory (escape latency) as a cognitive factor since it is more reliable to estimate spatial learning.

As is shown in Figure ES-3, the average speed (cm/s) was analyzed, observing that there was a relaxation in the animals throughout the training days until the speed was monotonous and constant.

This is indicative that our rodents did not manifest sensory-motor or cognitive problems.

The distance traveled suffered a clear decrease throughout the test-period. There is appreciated how the rats the first day of swimming walked more distance due to the ignorance of the task to be diminished in the last three days.

It was a result expected because the individuals were learning the location of the platform and climbed to it. In this way, the distance was less and less.



**Figure ES-3.** Evaluation of learning ability, male group rats learning 6 days. (a) mean speed (cm/s); (b) mean distance (cm); (c) latency, n=10 animals. (d) Time spent in the quadrant, n=40 animals. The values represent the mean  $\pm$  SEM, and were analyzed by ANOVA, comparing with day 1 or Q1 when corresponded by the Bonferroni multiple comparisons test (\* $p < 0.05$ ,  $\diamond p < 0.01$ , \* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.0001$ ).

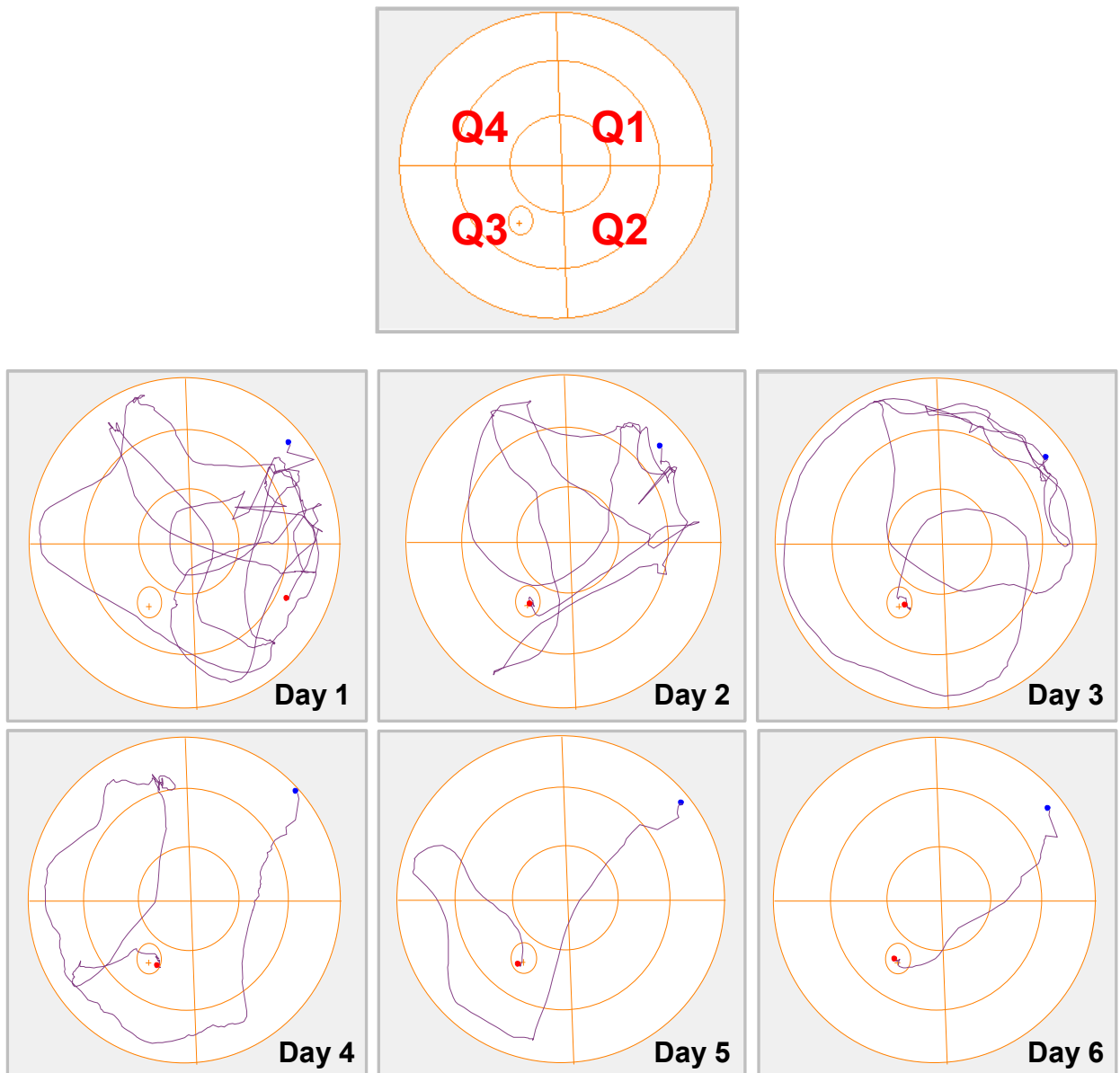
Noteworthy, the most reliable parameter to determine spatial learning is the escape latency as this factor, along with the permanence time in each quadrant, indicated whether the animals accomplished learning.

Figure ES-3c and d shows how the time spent in swimming was less from day 1 to day 6, while the time spent in the target quadrant on the last day was higher than in the rest of the quadrants (the Q1 data, as the launch quadrant, were discard).

Both results revealed that the training and learning period in the experiment caused a significant decrease in the escape latency and a significant increase in the time spent on the target quadrant Q3, related to good performance in the spatial learning test.

Thus, we make sure that the male rats of our study have managed to learn the escape platform location and to get on it, requiring less time to find it with a constant speed.

In the pictogram of figure ES-4 the route carried out by the rats is represented, where a distance diagram reduction in the training day can be visualized as indicated above

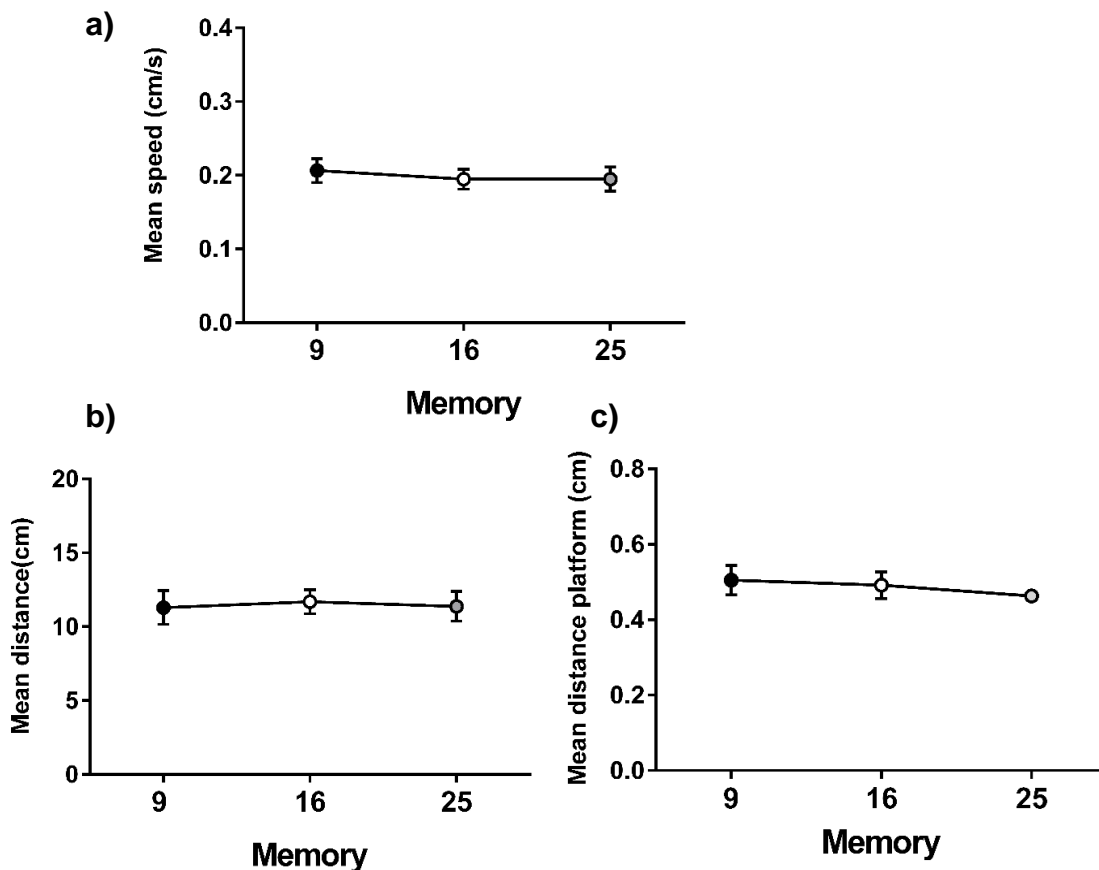


**Figure ES-4.** Pictogram of the journey made by male rats learning 6 days. Spatial learning test. The first image indicates the location of the quadrants in the MWM. It is observed how the route decreased during the training day. Images elaborated and analyzed by the software ANY-maze®.

### 7.4.1-3 CONSOLIDATION MEMORY

Spatial memory in neuroscience is part of creating a cognitive map. We can find both short-term memory and long-term memory. This type of memory can be evaluated using animal models, the solution of the task depends on the spatial information that the animal already has through a previous training phase.

To verify the existence of memory consolidation in the animals of our study, they were subjected to a resting state and cessation of all types of tests after training. It was observed if they remembered the position of the platform (eliminated from the MWM for the realization of the test) in a single session at 9, 16 and 25 days after the start of training.



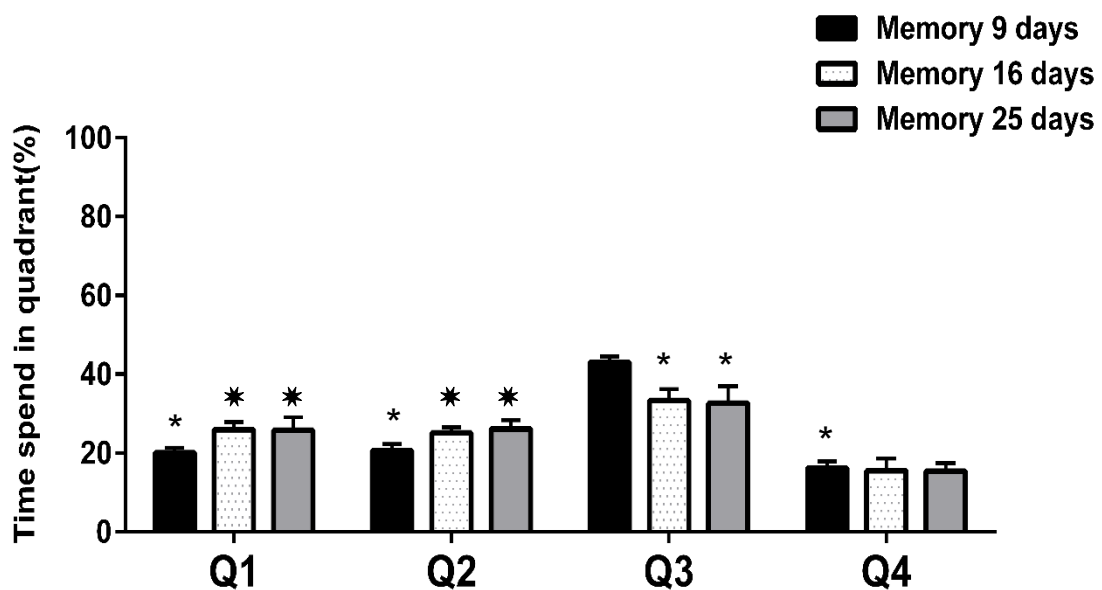
**Figure ES-5.** Memory consolidation for groups 9, 16 and 25 days. Indicator of locomotor and cognitive activity, a) Mean speed (cm/s); b) mean distance (cm) and c) mean distance platform (cm). The values represent the mean  $\pm$  SEM  $n=10$  animals of each group. They were analyzed by ANOVA and do not present significant differences.

Different parameters were evaluated, swimming speed (cm/s), mean distance (cm), mean distance fictitious platform (cm) and time spend in quadrant (%).

This last term indicates the existence of spatial memory in animals.

There was consolidation when the rats shaped an orientation map, by marking a continuous path around the objective quadrant (Q3) and the time spent in quadrant must have been much greater than in the others

As we can see in figure ES-5 both average speed, distance traveled and platform distance revealed that the three groups have been constant and continuous in the parameters, demonstrating the non-existence of locomotor, emotional or cognitive deficit as had already been happening in all the groups of our research. All the animals were able to consolidate memory.



**Figure ES-6.** Memory consolidation respect % time spent in quadrant. Memory group at 9, 16 and 25 days. The values represent the mean  $\pm$  SEM, n=10 animals of each group were analyzed by ANOVA, comparing Q1 (memory 9 days) and Q4 (memory 16 and 25 days), by the Bonferroni's multiple comparisons test (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$ ).

When we assessed the percentage of permanence in each quadrant ES-6 it is shown that there were no significant differences when analyzing any of the quadrants.

These results suggest that all the groups selected for our work had spatial memory at days 9, 16, and 25, seen that the time of permanence in Q3 was greater than in the rest of quadrants.

We have assessed the existence of differences among the groups: the animals at 9 days remembered better the position of the platform if we compare it with the groups at 16 and 25 days.

In the latter two groups, the spatial memory consolidation decreased slightly as the waiting time for the performance of the test elapsed, and the animals remembered where the platform was located, as an evidence that they had consolidated the memory.

Individuals at 16 and 25 days did not present differences in the memory consolidation, as the results in both groups were similar: they showed levels of permanence with quite similarity, suggesting that the consolidation of memory was equally.

In view of the results obtained during the tests in the MWM, it was determined that the male rats of this study did not present any issue in the sensori-motor coordination, motivational, cognitive, auditory or deficiencies caused by the stress.

Therefore, they were appropriate animals, and well-adapted after a process of pre-training and training for obtaining spatial memory.

The trained animals stayed longer in Q3 (study quadrant). The evaluation of this test determined that there was a greater memory consolidation at 9 days than at 16 or 25 days; although, all the groups in the study remembered where the escape platform was located and, therefore, had spatial memory.

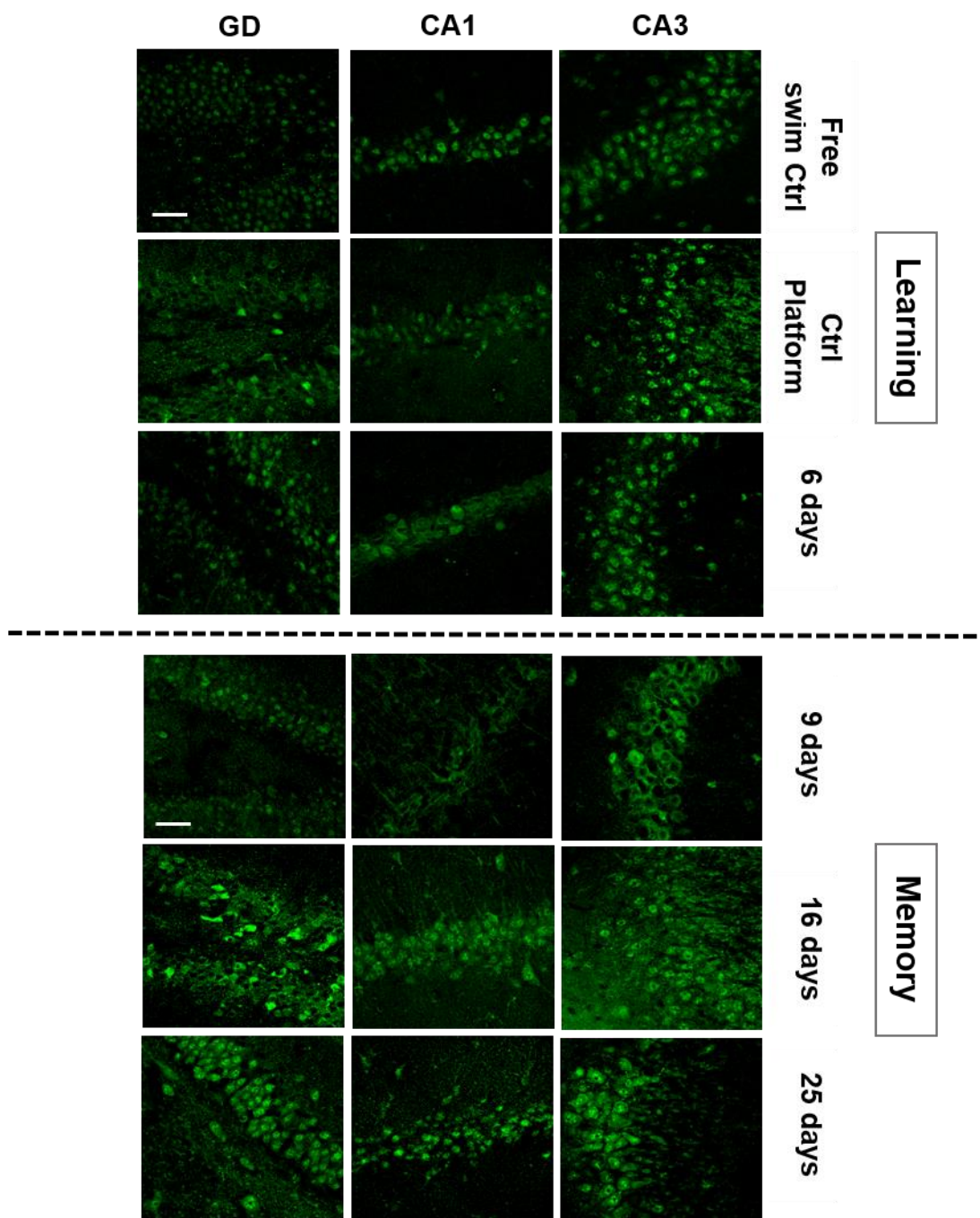
#### **7.4.2. PROLACTIN IN THE HIPPOCAMPUS**

The hippocampus has an important role in learning and spatial memory in rodents. It is the structure by which the cognitive map is formed, allowing the animals to navigate in space and together with the frontal lobe they plan the route during navigation (Epstein, Patai et al. 2017).



As the hippocampus is involved in learning and memory, and knowing that among the variety of functions related to PRL this hormone could play a relevant role in this topic, we followed researching on this field.

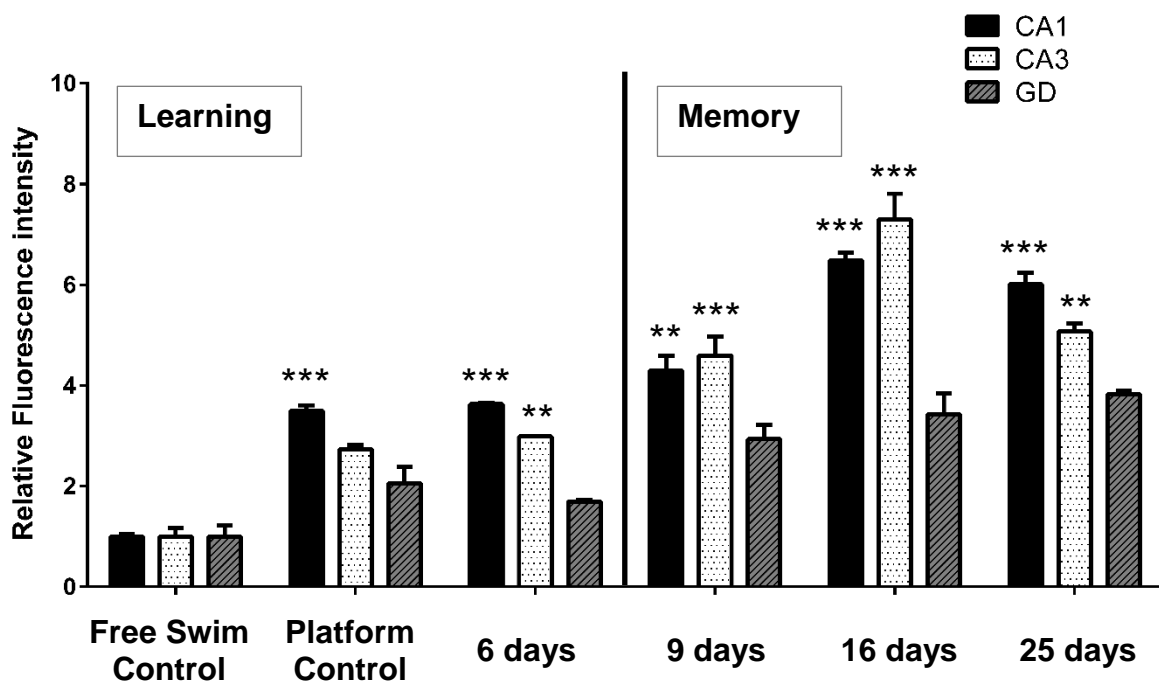
After the behavioral results, and knowing that our rats had consolidated the memory, firstly we continued with the established groups to study if PRL was present in the hippocampus in the animals already evaluated.



**Figure ES-7.** Confocal immunofluorescence of PRL in hippocampal sections in male rats. The cuts are from zones CA1, CA3 and GD. Scale bar 20  $\mu$ m.

Thus, we decided to determine the possible presence of PRL in the hippocampus and to know how it was distributed in the different anatomical parts of this organ. Using confocal immunofluorescence, we studied CA1, CA3 and GD hippocampal areas in histological sections (Figure ES-7).

It is appreciated that all the groups of our study (pre-learning, learning and memory consolidation) had the PRL protein present in the study areas. This molecule was found in Pyramidal cells, Oriens and Radiated stratum when referred to CA, while also was present in the Granular, Molecular and Polymorphic layer if we refer to GD.



**Figure ES-8.** . Relative Fluorescence intensity. The values represent the mean  $\pm$  SEM n=5 animals for each group. Normalized with the free swim control group. They were analyzed by ANOVA, comparing GD with the Bonferroni's test (\*\*p<0.001, \*\*\*p<0.0001).

The fluorescence intensity for PRL was not the same for all groups, since there were differences among them, as shown in Figure ES-8. Noteworthy, there

were also differences among the regions within the hippocampus. Besides, there was not the same quantity of protein, as is observed in CA1, CA3 or GD.

The immunolocalization showed an increased intensity for our protein in all the hippocampus regions studied, as the memory was consolidated after training, reaching maximum values in the memory group of 16 days with a slight decrease in the memory group of 25 days.

Both values are greater than the results presented by the group of 9 days.

This increase in the PRL marker did not manifest in all hippocampal regions equally.

CA3 was the area with more fluorescent relative intensity in rats with memory, predominantly those of 16 days.

The PRL levels in the CA1 region were very remarkable, with higher levels in rats that had consolidated memory.

At the same time, in GD sections the PRL amount also increased with respect to trained rats, suffering a slight raise but without significant differences in the group of 25 days with respect to the others.

However, if we analyze the ES-7 images, the PRL distribution by the strata of each region was not the same in all the zones, and there was not similarity among the conditions.

We observed a non-homogeneous localization of PRL.

We found the presence of this protein in the cell nucleus, in the cytoplasm, or both at the same time, though its presence in some cells could not be detected.

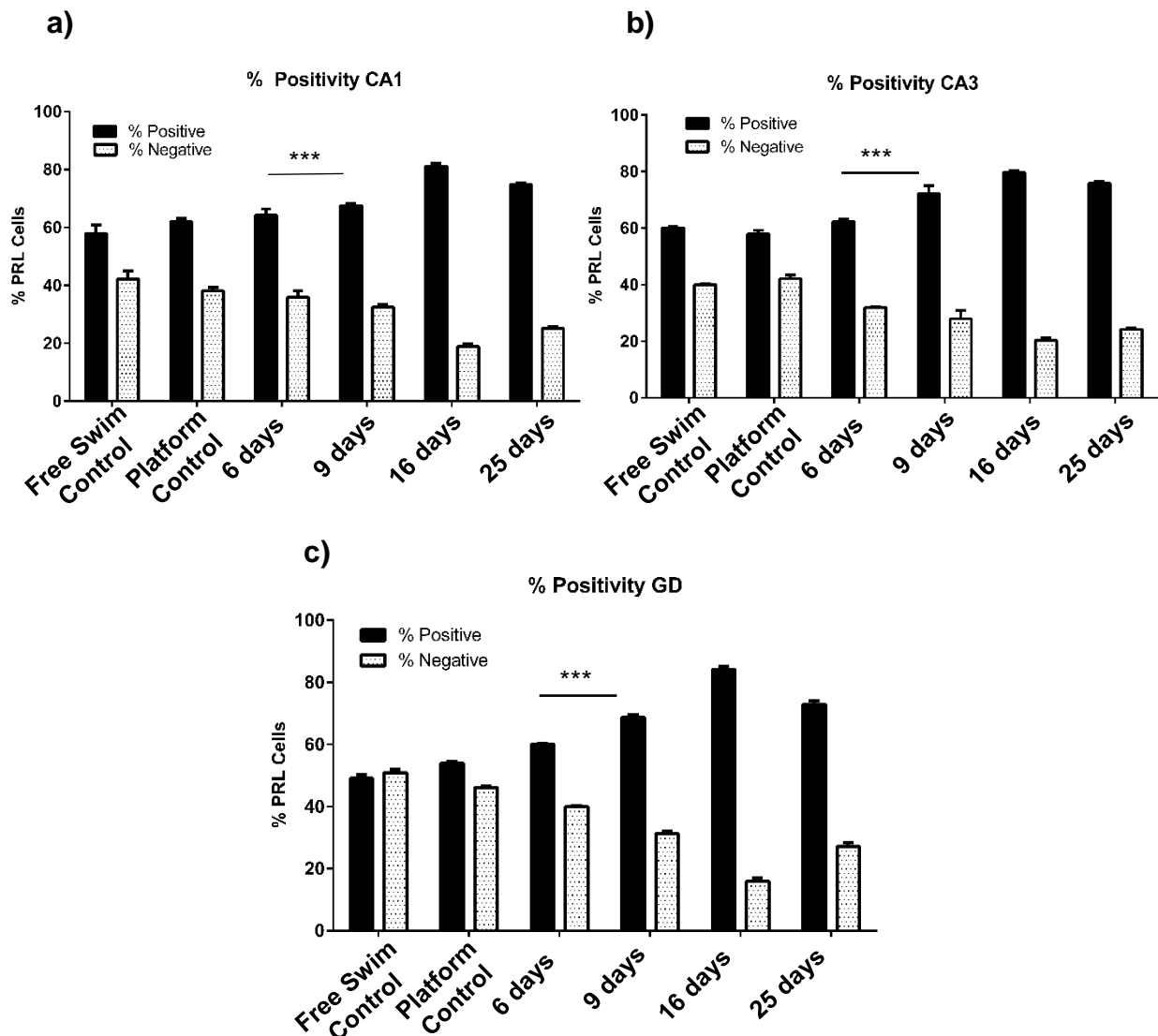
Therefore, the percentage of positivity to this marker was analyzed in all the hippocampal regions after establishing differences among the groups (Figure ES-9), at the same time that a positivity study was done in the different strata for CA1, CA3 and GD, to determine the presence of PRL in those areas (Figure ES-10).

ES-9 shows a very high percentage of positive cells with respect to negative ones in all groups and in all the hippocampus regions. The positivity had a gradual

increase as the training phase developed, and until the animal consolidated the memory.

We found values close to 80% in the memory group of 16 days. Significant differences were observed among the groups with respect to the controls.

These results indicate that the existence of memory in the rats trained in the MWM increases the PRL quantity in the hippocampal regions CA1, CA3 and GD.



**Figure ES-9.** % PRL cells. Represented in black the positive cells and white the negative cells. The values represent the mean  $\pm$  SEM  $n=5$  for each group. a) Positivity in CA1 region; b) Positivity in CA3 and c) Positivity in GD. Analyzed by ANOVA and the Bonferroni's test. Significant differences were observed regarding free swimming control for all groups (\*\* $p < 0.0001$ ).

The cell positivity was different depending on the layer and the hippocampal region analyzed.

The statistical study for ES-10 images was performed by ANOVA using the Bonferroni's multiple comparisons test, and the values represent the mean  $\pm$  SEM for n=5 immunohistochemical sections for each condition.

We compared if there was a significant difference among the groups.

At the same time, we studied the possible significant differences (with respect to the positive cells in the nucleus) that could exist related to the presence or absence of PRL, in the nucleus, the cytoplasm or both. Of each hippocampal region (CA1, CA3, and GD), separated by the layers that form those regions (pyramidal-granular, oriens-molecular, and radiated-polymorphic) within the same group.

ES-10A shows the positive cells in the pyramidal or granular layer of CA1, CA3 and GD.

Among the groups, no significant differences were found, but the PRL presence within each group presented significant differences.

In CA1, the number of positive cells in the nucleus was remarkably increased in the rats that preserved the memory at 9, 16 and 25 days.

We found the presence of PRL in the cytoplasm of cells, especially at 25 days and after learning at 6 days.

In all the groups studied, the coexistence of this protein highlighted both in the cytoplasm as well as in the nucleus.

In CA3 and in GD, the presence of PRL inside the nucleus was lower than in CA1. Within these regions, its coexistence (cytoplasm + nucleus) was more evident in rats that consolidated memory. It was noteworthy the increase of PRL in the cytoplasm in these two regions compared to CA1.

On the other hand, when analyzing the Oriens layer of the CA and the molecular layer of the GD, we also found significant differences within the groups but not among them, similar as observed in the other layers.

Indeed, ES-10B shows a large increase in negative cells in all conditions with respect to positive ones, with learning cases in CA1 being very prominent.

In this hippocampal region, the cells that are positive, are positive at the nuclear zone. Only the 25<sup>st</sup> day, memory group displayed PRL in the cytoplasm.

However, at CA3 the rats that consolidate the memory and have had pre-training at 6 days showed positive cells both in the cytoplasm and in the nucleus.

On the other hand, GD had an increase in positivity among its neuronal cells that was not observed in CA1 or CA3, highlighting the positive cells in the nucleus and in the cytoplasm; although, there were significant differences with respect to the negative ones in the memory groups.

When the statistical analysis was performed in the radiated or polymorphic layer, as in the previous cases, no significant differences were observed among the groups in any of the layers. However, there were clear significant differences according to the position of PRL within the cell.

In ES-10C, the number of negative cells is very high for the pre-training and learning control groups around 80% in both layers CA1, CA3. This data decreased for the polymorphic layer of GD, as only negative cells were found about 40% for free-platform swim controls and about 60% for trained rats at 6 days and memory at 25 days.

The learning group at 6 days had minimum values for the nuclear presence of PRL in both CA1, CA3 and GD.

In the latter, there was 20% increase in cytoplasmic positive cells.

In the graphs ES-10C, it is seen that the cellular positivity of the rats with memory consolidation is both in the cytoplasm and in the nucleus in the CA1 and CA3 region.

Conversely, if we refer to GD, there is observed more presence of PRL in the cytoplasm than in the rest of the cell parts.

This cytoplasmic positivity was similar in all the groups of our study, and around 20% without differences between control-trained rats and memory.

In summary, our results show that there are not significant differences among the groups.

However, it has to be assessed the layers CA1, CA3 and GD for all groups, since there were differences among them.

Focusing on the pyramidal layer of CA or the granular layer in GD, about 80% of positive cells were observed in these layers.

This positivity was greater for the presence of PRL in the nucleus for all regions, being most notable at CA1.

An increase of the positive cells in cytoplasm is also seen for CA3 and GD, which highlights the presence of our protein at cytoplasm + nucleus in all areas, especially in the memory groups of CA3 and GD.

On the other hand, when we analyzed the oriens layer and the molecular layer, the level of negativity increased considerably in the rats that had undergone a pre-learning; the memory groups showed higher expression compared to what was observed in the pyramidal-granular layer.

The CA3 region was noteworthy for the large number of neurons positive in the cytoplasm + nucleus in the memory groups, while GD increased its positivity in cells with the presence of PRL in the cytoplasm.

At the same time, the radiated and polymorphic layer of CA and GD presented more negative cells than positive ones, as occurred in molecular-oriens but unlike pyramidal-granular.

Although, it is worth of mention that the polymorphic layer of GD had a large PRL amount in the neurons' cytoplasm.

This event was repeated in all groups with the absence of cells that have the hormone in the cytoplasm and in the nucleus at the same time.

Otherwise, in CA1 and in CA3 it was observed that the number of neuronal cells' positive for cytoplasm + nucleus was increased in the memory groups and non-existent for the pre-trained.

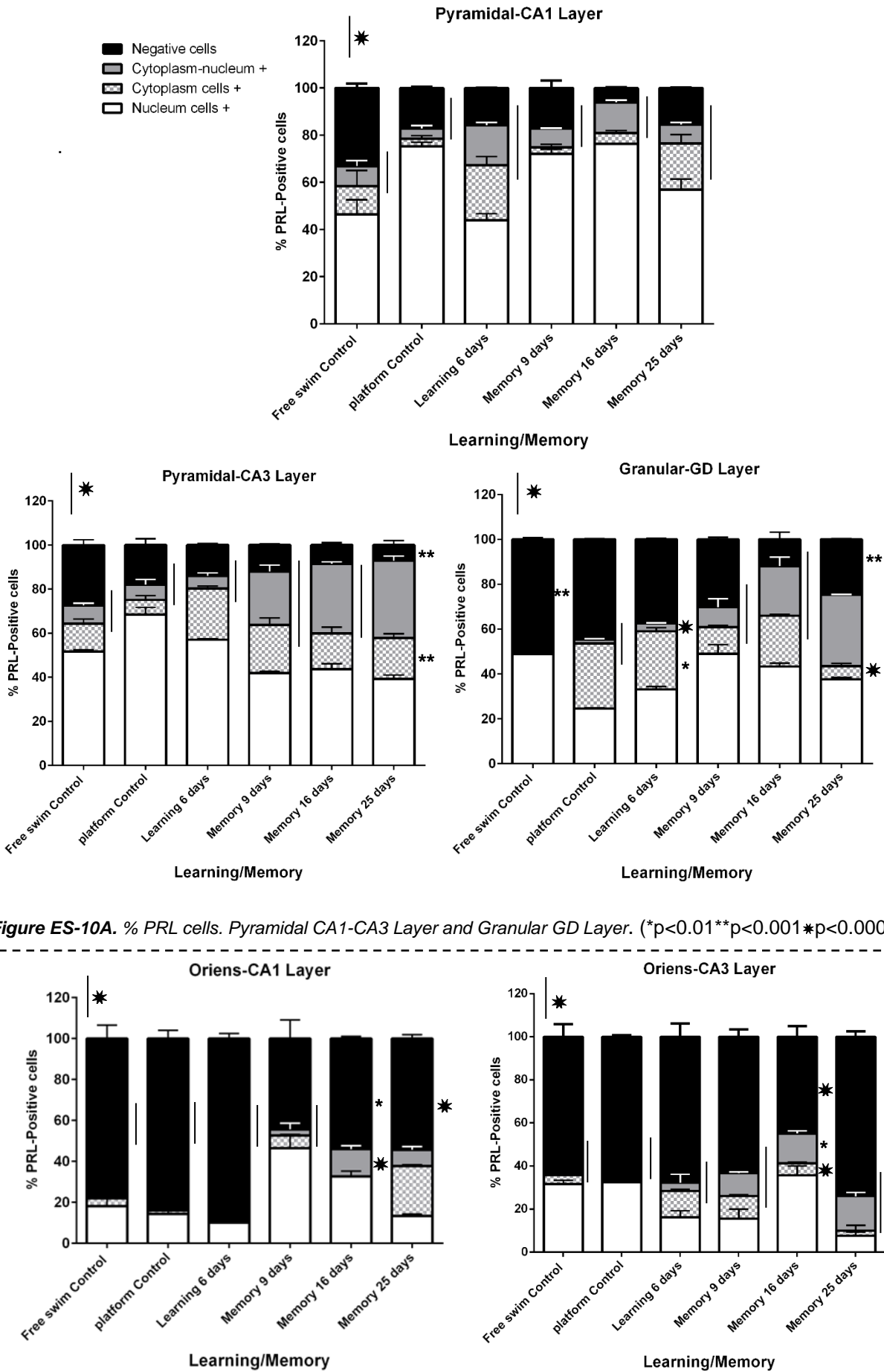


Figure ES-10A. % PRL cells. Pyramidal CA1-CA3 Layer and Granular GD Layer. (\*p<0.01\*\*p<0.001\*p<0.0001)



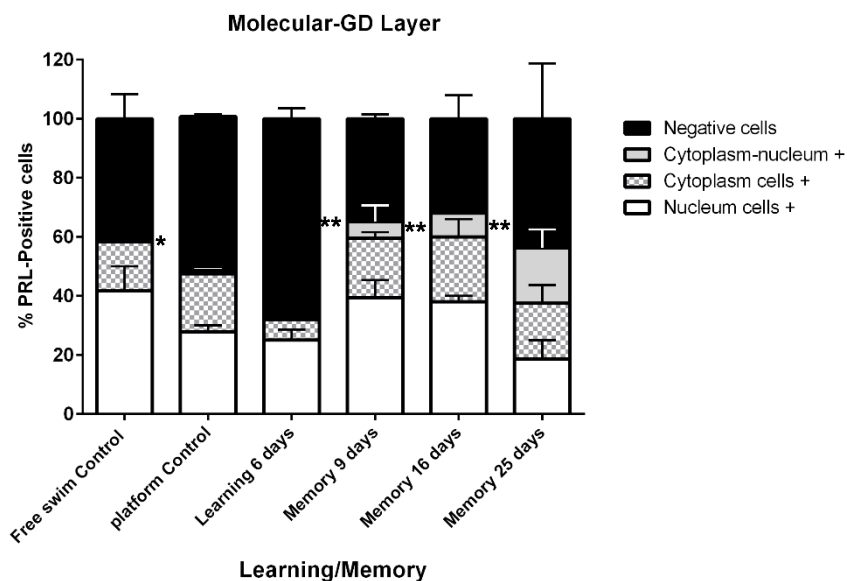


Figure ES-10B. % PRL cells. Oriens CA1-CA3 Layer and Molecular GD Layer. (\*p<0.01\*\*p<0.001\*p<0.0001).

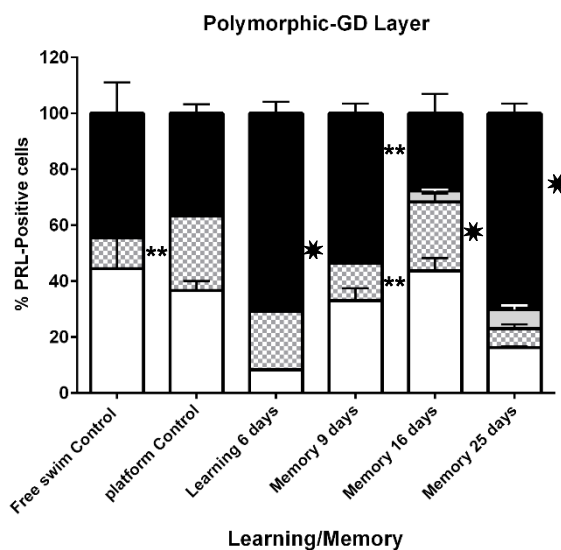
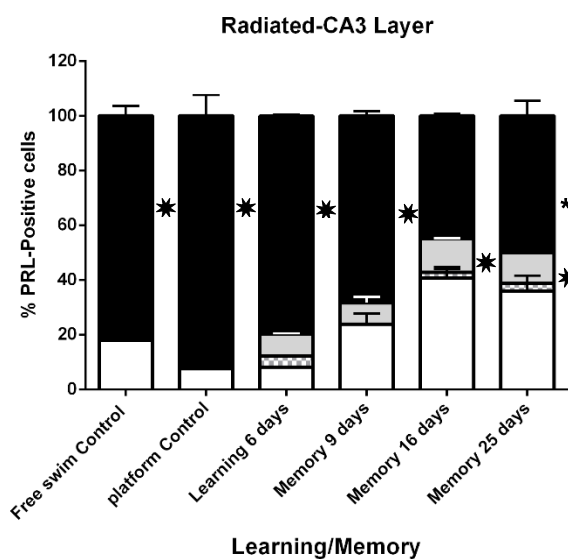
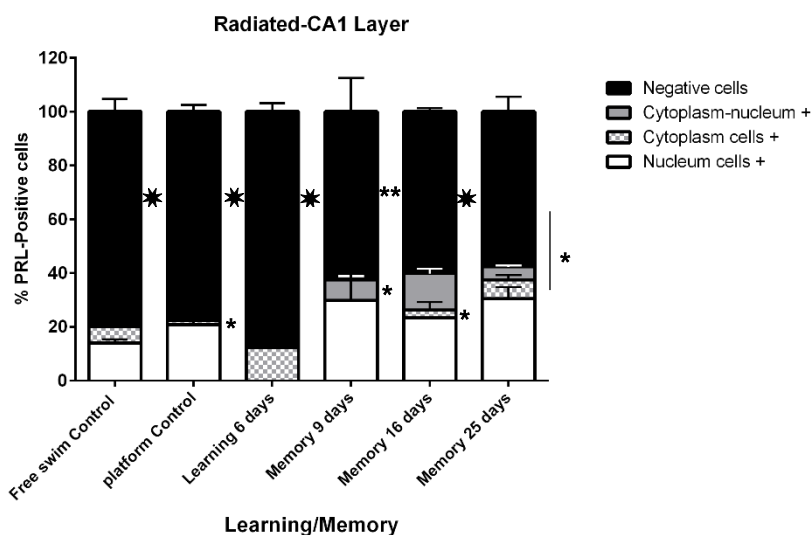


Figure ES-10C. % PRL cells. Radiated CA1-CA3 Layer and Polymorphic GD Layer. (\*p<0.01\*\*p<0.001\*p<0.0001)

### 7.4.3. PROTEIN CONTENT OF PRL

After analysing in the behaviour' process and spatial memory consolidation at 9, 16 and 25 days in rats trained in the MWM and knowing how the distribution of PRL is found in all the regions of the hippocampus and in their layers.

The next step to follow was to determine the PRL protein content in hippocampal tissue after culling of the male rats at 6 hours after having performed the task.

This process was performed using the Western blot technique with neuronal lysates, the content of this protein was normalized with  $\beta$ -actin with respect to the Naive group (group taken from the animal without treatment).

In the WB, bands have been seen in all the categories studied (Figure ES-11A). You saw different bands in all the wells, and in all the groups.

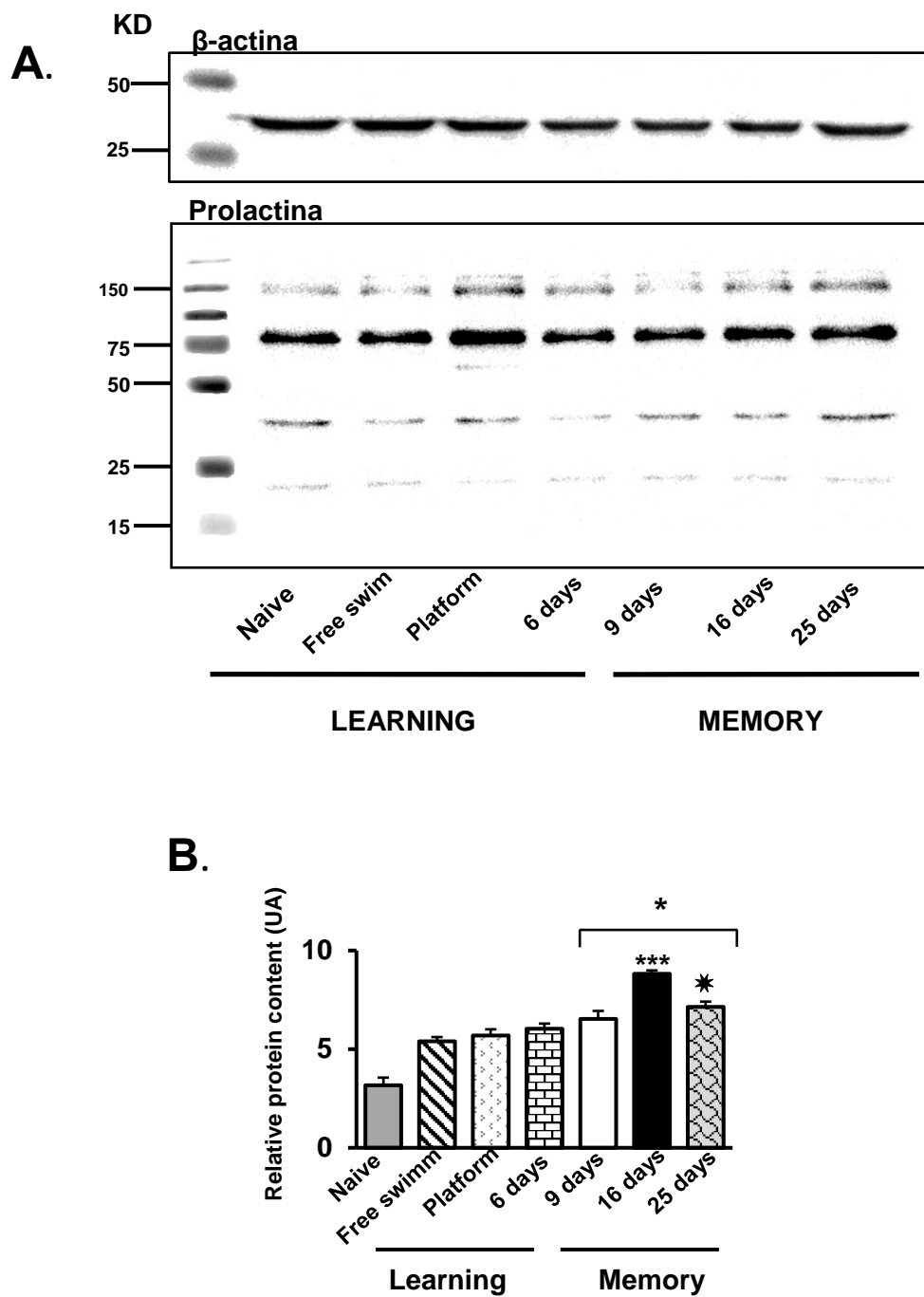
Thus, there were bands at 23 kDa, 46 KDa, close to 90 KDa and less than 150 KDa. Very striking the band next to 90 KDa.

The electrophoresis of  $\beta$ -actin could be observed as charge control. Giving, a band at 43 kDa. These bands ensure that the transfer of the gel to the membrane has been satisfactory.

The bands present in the WB, do belong to the PRL protein, in a monomeric, dimeric and macroprolactin form. The oligomeric form (80-90 kDa) predominated compared to the other types.

The relative protein content of PRL in hippocampal tissue (Figure ES-11B) (medium gray UA) showed an increasing increase in protein content from control groups to memory groups. with significant increase in Memory 16 days and 25 days comparing it with free swim control and platform.

The highest protein content of PRL was observed in the group that consolidated the memory at 16 days and to a lesser extent at Memory 25 days



**Figure ES-11.** (A)Western blotting on polyacrylamide gel at 15% and 4.5%. PRL expression in homogenates of hippocampal tissues of the learning and memory groups. first well, ladder.  $\beta$ -actin was used as a load control. (B) Relative protein content, the values represent the mean  $\pm$  SEM  $n=5$  for each group. Normalized with the Naive group and comparing the results with the free swim control group. Analyzed by ANOVA and the Bonferroni's test (( $*p<0.05$ ,  $*p<0.01$ \*\*\* $p<0.0001$ ).

#### **7.4.4. QUANTIFICATION AND LOCALIZATION OF mRNA LEVELS BY HYBRIDIZATION “*In situ*”.**

In view of the results obtained in the localization and detection of the PRL protein by immunofluorescence and Western Blotting.

PRL was present in the hippocampal region in the samples analyzed and the different strata had differences among them.

The next step was to observe the presence or absence of the PRL mRNA sequence using the hybridization “*in situ*” technique with the specific probes. Four areas of the hippocampus were analyzed CA1, CA3, CA4 and GD

Fluorescent “*in situ*” hybridization in histological sections of animals in this study showed the presence of mRNA in the CA1 region (lateral and septal CA1), CA3 (CA3a, CA3b and CA3c) and GD (peak GD, cranial band of the dorsal GD region and basal band of the ventral GD region) of the hippocampus.

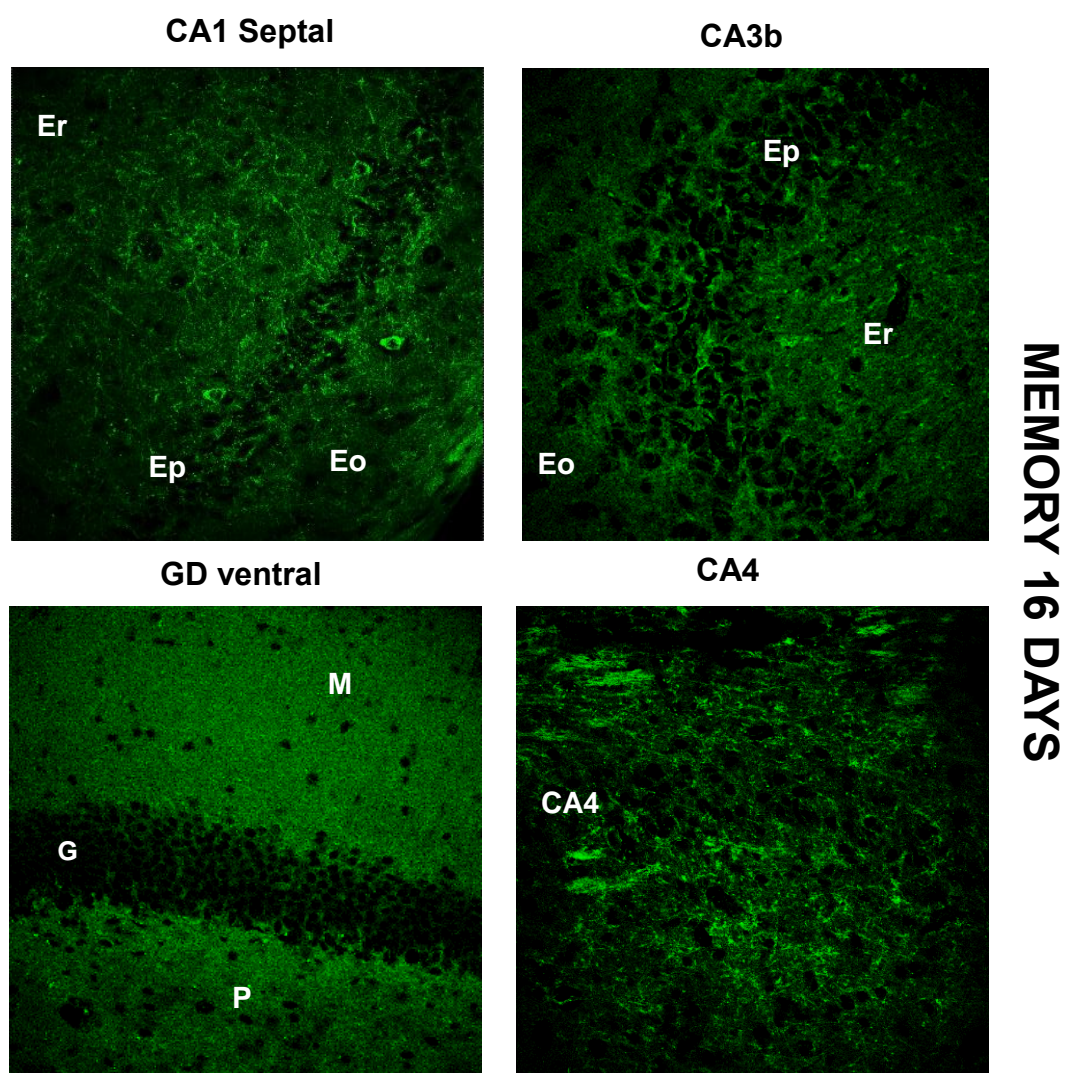
The immunolocalization of the PRL mRNA expression (green) in all the study groups and in the four areas studied, showed a positive reaction to the mRNA (Figure ES-12).

The immunofluorescence was higher in the Memory group than in the learning group. Greater fluorescent intensity was seen in Memory 16 days in all regions of the hippocampus.

The reaction appeared in a granular form, distributed through the cytoplasm of the neuron, especially in the regions near the nucleus. Not all the observed cells had a reaction, and that reaction was not homogeneous.

Fibrillar bundles, nerve terminals and positive interneurons were also, observed to the marker of PRL mRNA in the Oriens layer and radiated from CA, together with the molecular and polymorphic layer of GD.

The Figure ES-12 is representative of all the regions studied. The results showed that CA1, CA3, CA4 and GD with the analysis of all the groups of this work were reactive to the expression of PRL mRNA. Memory achieved at 16 days was chosen for being the most reactive group.



**Figure ES-12.** Immunolocalization of the presence of PRL mRNA from the CA1 Septal region, CA3b, basal band of ventral GD and CA4 in hippocampus of male rats trained in the MWM, in the Memory group of 16 days. Er, stratus radiatus, Eo, stratus oriens, Ep, stratus pyramidal, G, granular layer, M, molecular layer and P, polymorphic layer. Scale bar, 75  $\mu\text{m}$ .

The percentage of reactive area (%), the number of molecules per total area ( $\text{pix}^2$ ) (arbitrarily assuming that 9  $\text{pix}^2$  correspond to one molecule), and the reactive area corresponding to 100,000  $\text{pix}^2$ , using the software Image J have been measured.

In relation to the percentage of reactive area, a significant increase was observed from the control groups to those who had had consolidation of the memory.

In CA1, the Memory at 16 days condition was statistically significantly greater in Lateral CA1. However, in the CA1 Septal region, both the Memory 16 days and Memory 25 days presented similar results but higher than the rest of the study groups.

In CA3, Memory at 16 days had a significant increase with respect to the study groups in the CA3a region. While in CA3b and CA3c, Memory was 25 days longer than the rest of the groups.

In GD, the group Memory of 25 days showed a significant increase in the region of the peak and in the cranial band of the dorsal DG with respect to the other groups. At the same time, in the basal band of ventral GD the results for Memory at 16 and 25 days were similar.

CA4 presented a higher percentage of reactive cells in Memory 16 days compared to the rest of the groups.

The results for the number of molecules per total area ( $\text{pix}^2$ ) and the reactive area in  $100,000 \text{ pix}^2$  were similar to those shown for the percentage of reactive cells for all regions, CA1 (Lateral and Septal); CA3 (CA3a, CA3b and CA3c); GD (peak, dorsal and ventral) and finally CA4.

Figure ES-13 shows only the most representative parameters of some of the conditions.

Only the CA1 Septal, CA3b and cranial bands of the dorsal DG were chosen for the summary of the results. However, these graphs were only a sample of the results.

It has been demonstrated by "in situ" hybridization that there is PRL synthesis in the CA1, CA3, GD and CA4 regions of the hippocampus. The reaction in these regions was not for all areas equally.

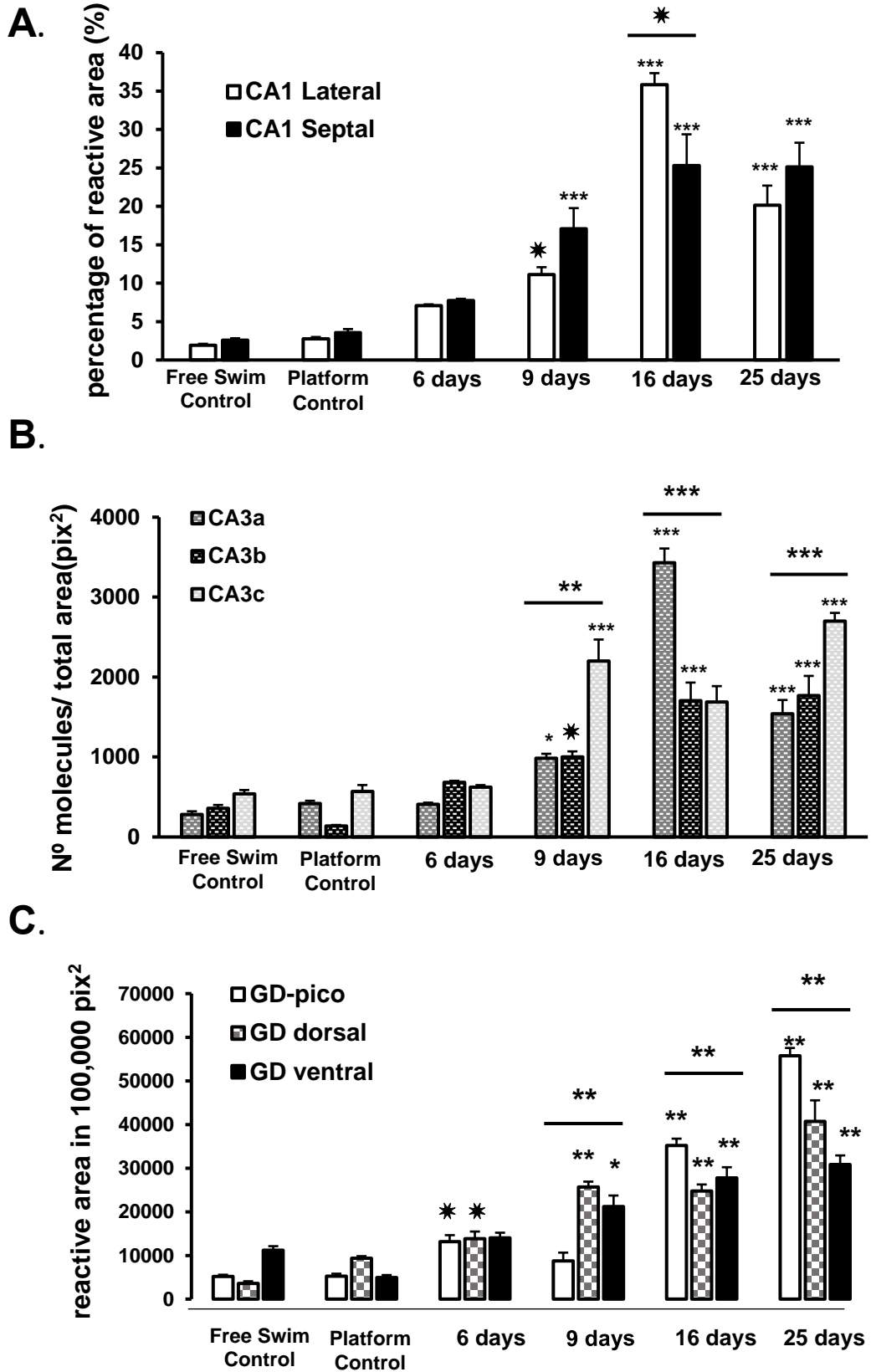


Figure ES-13. Immunolocalization of the presence p-value (\*p<0.05, \*\*p<0.001\*\*\*p<0.0001).

The results revealed that, there was an increase of the reaction for the cases in which, the animals had consolidated the memory. Existed, an increasing increase from the Platform controls to Memory at 25 days.

It was observed that, Lateral CA1, increased considerably in the Memory condition 16 days, while, in the other groups, CA1 Septal was the most reactive to “in situ” hybridization.

When comparing all the conditions, both Lateral and Septal CA1, these zones, suffered a considerable increase in the Memory groups, becoming maximum at 16 days and decreasing slightly at 25 days, both in the Pyramidal stratum, Radiated stratum and Oriens.

In relation to the CA3 region. This zone, experienced similar results to CA1. Progressive growth from the control groups to those who had consolidated the Report.

In this region, an increase of cells positive to the PRL mRNA sequence was highlighted in the CA3a region of Memory at 16 days with respect to the other two zones, CA3b and CA3c. In contrast to what was observed in Memoria at 9 days and 25 days, CA3c is the region with the highest positive growth in the reaction.

The Pyramidal stratum in CA3a was more intensively reactive than the rest of the strata. While, the Radiated stratum and Oriens had greater intensity in CA3c.

However, the localization of PRL mRNA sequences in the GD region had higher synthesis of mRNA in the memory condition of 25 days for the three regions studied, the GD peak, the cranial band of the dorsal GD and the basal band of the ventral GD.

With increased reaction intensity, in the Granular layer of the dorsal area. However, the Molecular and Polymorphic layer had a higher reactive level in the peak region.

Finally, the CA4 region experienced an increase in molecules and reactive area in the individuals of Learning 6 days and Memory 16 days. Having a greater intensity of the reaction those who consolidated their memory at 16 days.



Therefore, this thesis work shows that not only the PRL hormone is located in the studied hippocampus regions, as we had seen in previous sections, but in these zones also, there is a synthesis of the PRL mRNA sequence.

However, the greatest localization of PRL is in the memory condition of 16 days, at the same time, as this condition has the greatest presence of mRNA synthesis for this hormone.

Therefore, the PRL protein and its synthesis with the expression of PRL mRNA in the areas of the hippocampus studied, suggest that PRL could play an important role in the consolidation of declarative memory by learning through visual cues, with a possible relationship in potentiation of long-term memory.

#### ***7.4.5. QUANTIFICATION AND LOCALIZATION OF mRNA LEVELS AND RPRL. ", DOUBLE MARKING.***

Having analyzed the results of "in situ" hybridization for PRL and knowing that the synthesis of the study hormone occurs.

It was proposed, the combination of two techniques. Hybridization "in situ" to know the PRL mRNA and the immunohistochemistry of the prolactin receptor (RPRL).

Thus, a possible relationship between the two molecules and the possible role that both play in learning and memory would be studied.

As in the previous case, four hippocampal areas CA1, CA3, CA4 and GD were analyzed. With their respective strata in the Ammon horn or layers in the GD.

Only images and graphs of a small part of the results are represented. The CA1 Septal region, CA3b, basal band of ventral GD and CA4 was chosen. The Memory group at 16 days was chosen as, the most representative for its high positivity to the reaction in the mRNA and RPRL marker.

For the rest of the groups and regions studied, the same parameters were evaluated, the same analysis was carried out as for the pre-trained groups and memory consolidation.

The result of all the groups and regions of this study will be assessed.

The images of "in situ" hybridization to PRL together with the immunohistochemistry of the RPRL (Figure ES-14).

They showed in a qualitative way, the presence of the mRNA synthesis for PRL in the histological sections of the study groups (in green), both in learning and in memory, as had already been demonstrated in other experiments.

At the same time, we observed the existence of the RPRL (in red) for all conditions, NL control, Platform control, Learning 6 days, Memory at 9, 16 and 25 days, from the CA1 (Lateral and Septal), CA3 (CA3a, CA3b and CA3c), CA4 and GD (peak, cranial band of the dorsal GD, basal band of the ventral GD).

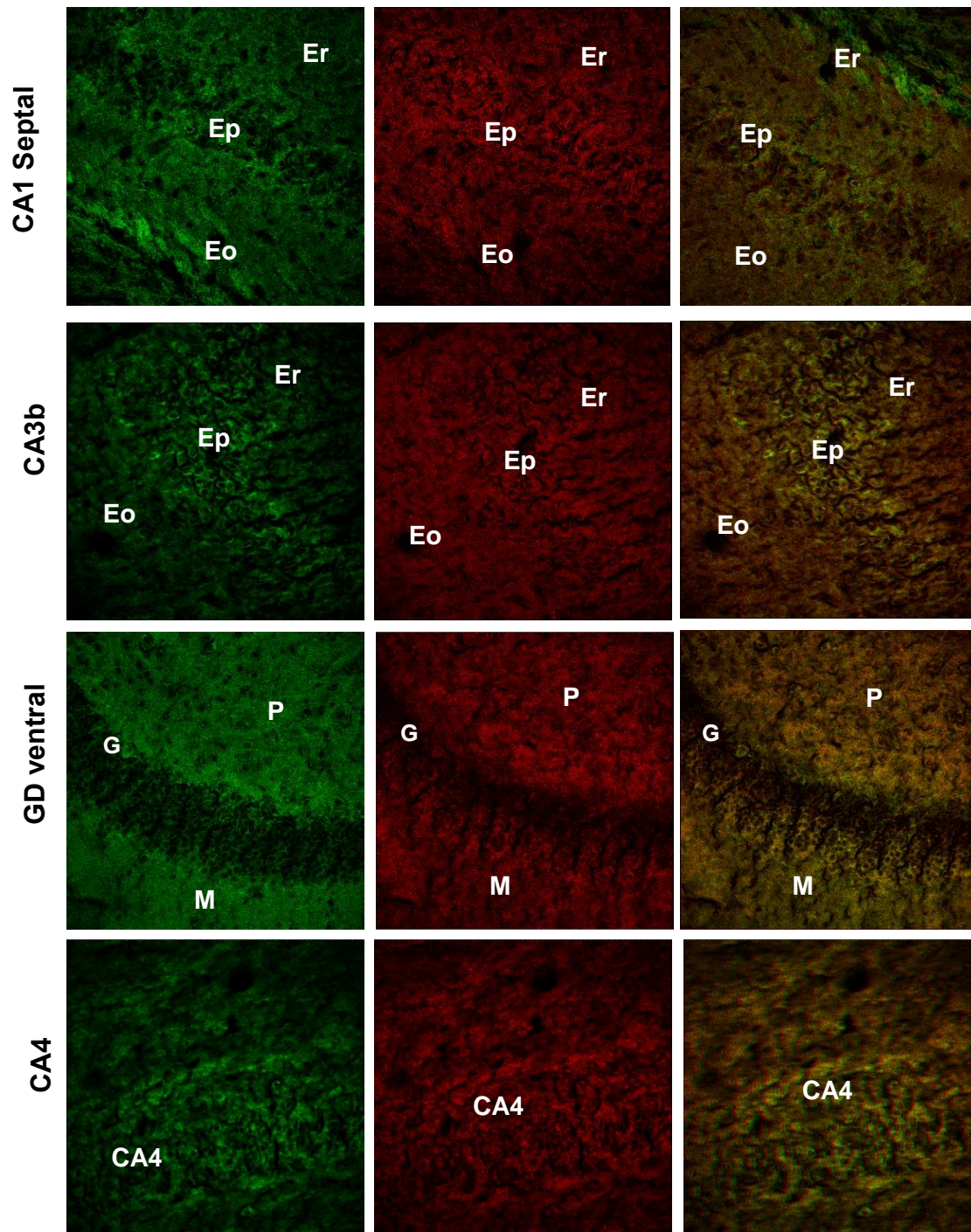
The morphology of the cells in the synthesis of mRNA for PRL, manifested in a granular, punctuated manner, within the surface of the neuronal cytoplasm, especially in the Pyramidal layer of the Ammon horn.

However, the immunohistochemistry for RPRL was more uniform, without presence of granules, occupying the cytoplasm.

Fibers and positive interneurons were observed between the layers

In GD, it is shown a cell morphology in a row like bunches. There was observed a greater intensity of reaction close to the molecular layer if referring to the basal band of the ventral GD and close to the polymorphic layer regarding about the cranial band of the dorsal GD.

When the merge of the images was studied, an orange-yellow color was observed. Indicator that both analyzed molecules were in the same place, coinciding and coexisting.



**Figure ES-14.** Immunolocalization of the presence of PRL mRNA and RPRL from the CA1 Septal region, CA3b, basal band of ventral GD and CA4 in hippocampus of male rats trained in the MWM, in the Memory group of 16 days. Er, stratum radiatum, Eo, stratum oriens, Ep, stratum pyramidale, G, granular layer, M, molecular layer and P, polymorphic layer. Scale bar, 75  $\mu$ m.

After observing the images in the confocal microscope, the reactive percentage (%), the number of reactive molecules per total area (pix<sup>2</sup>) and the reactive area found in 100,000 pix<sup>2</sup> were quantified (Figure ES-14).

In reference to the percentage of reactive area. In CA1 Septal and in CA1 Lateral, a significant increase was observed in the Memory group of 16 days for both RPRL and PRL mRNA compared to the rest of the conditions. Obtaining similar values for both regions.

Generally, there was a greater increase in the percentage reactive for the synthesis of PRL with respect to the presence of its receptor in all the groups.

In the same way, the statistical study for the number of molecules and the reactive area in 100,000 pix<sup>2</sup> was similar to the percentage.

There was an increasing significant increase for PRL synthesis in almost all regions of CA3 compared to the percentage of RPRL.

CA3a and CA3c, showed higher percentage for PRL mRNA in the memory group 16 days. On the other hand, CA3b evidenced a significant increase for the memory conditions in both molecules. Although the values for Memory at 16 days and Memory at 25 days were similar among them.

The number of reactive CA3 molecules in the analyzed area showed different results to CA1.

In CA3a and CA3c, there was a considerable increase in the RPRL in the groups, which had consolidated the memory, in comparison with the pre-training. But, CA3b did not have that increase in RPRL. Having higher values the PRL synthesis.

Although, CA3b had an increasing proliferation of both molecules, from the controls to the memory groups. With higher values for 25 days memory.

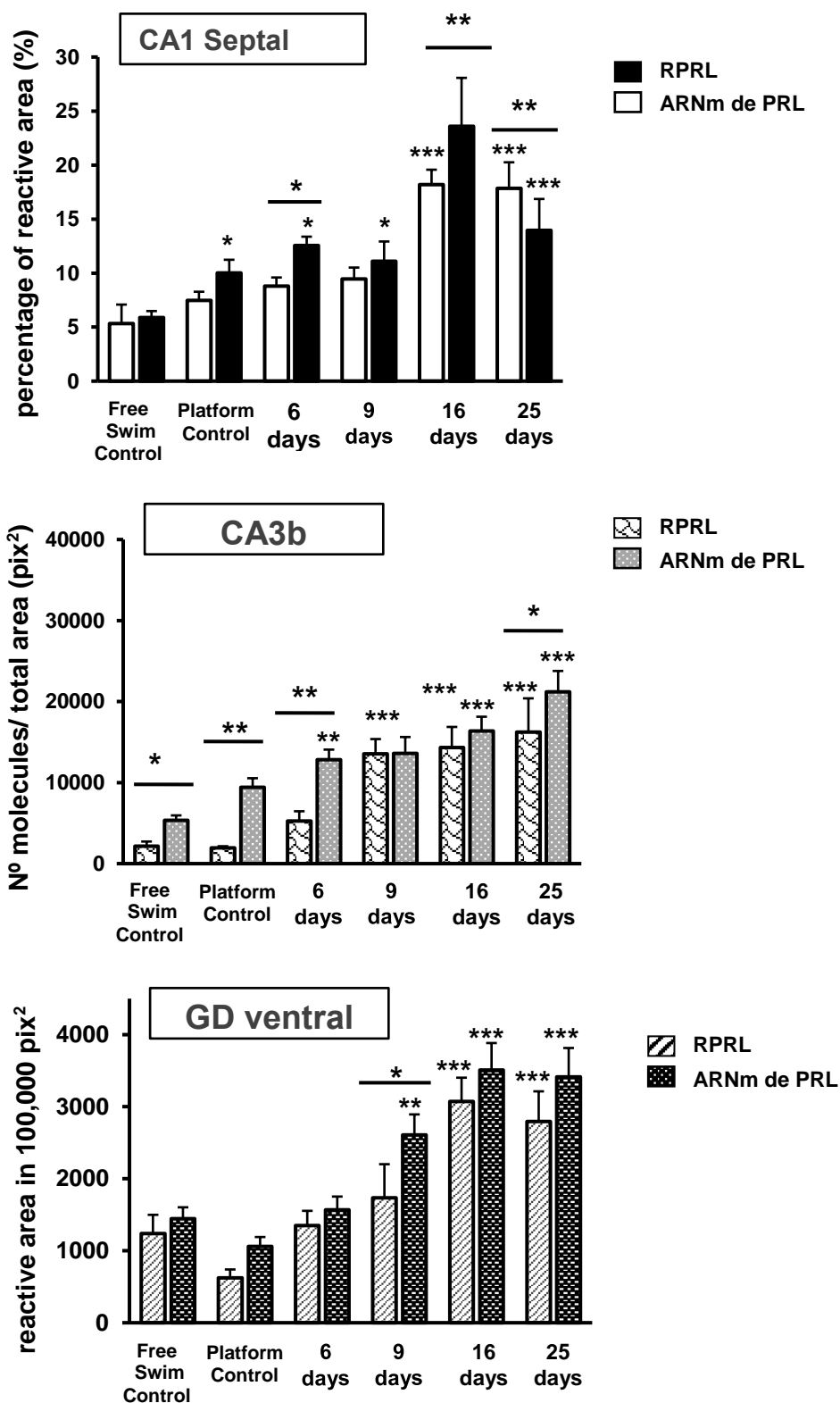


Figure ES-13. Immunolocalization of the presence p-value (\*p<0.05, \*\*p<0.001\*\*\*p<0.0001).

The reactive area in 100,000 pix<sup>2</sup> had a significant increase in the Memory condition in relation to what was seen in the pre-trained animals.

CA3a was the most reactive of the three regions in memory at 16 days. While CA3b and CA3c were also elevated but more similar.

In the three DG regions studied, the reactive percentage, the number of molecules and the area at 100.00 pix<sup>2</sup> showed a significant increase in these parameters for 16 and 25 days.

As happened in the CA4 region. The three parameters indicated an increase in the memory groups.

Summarizing;

When making a general assessment, on the quantification of cells positive for the expression of PRL mRNA, together with the presence of the RPRL in regions of the Ammon horn and GD of the hippocampus, after a double fluorescent label for both molecules.

The presence of PRL synthesis and its receptor in the CA1, CA3, GD and CA4 regions of the hippocampus has been confirmed. Furthermore, a possible joint role in learning and short-term and long-term memory consolidation.

The results revealed an increasing increase in the expression of mRNA for PRL in all the regions studied and in its strata, in a similar way as it had already been seen when it was quantified in isolation.

At the same time, they also indicated an increase in the reaction intensity for the RPRL from the NL control groups to the animals that had consolidated the memory.

## 7.5. DISCUSSION

In recent years other researchers have used the MWM to study the neurochemical basis of learning and memory. Above all, with regard to the ability to dissociate deficits in the formation of memory by sensory, motor, motivational and recovery problems (Bannerman, Good et al. 1995).

The MWM has been shown to be a robust and reliable test that is strongly correlated with synaptic plasticity of the hippocampus and NMDA receptor function (Parsaei, Torkaman-Boutorabi et al. 2016).

Navigation is the capacity of organisms to learn to find their way through the environment without getting lost, which requires memory to locate and make routes.

Without this ability, no one could survive. For this reason, this capacity has evolved in almost all species (Vorhees and Williams 2014).

Neurophysiological contributions, made in rats, have indicated that the hippocampus, retrosplenial cortex and posterior parietal cortex contribute to the formation of spatial navigation strategies and, therefore, are involved in memory (Oess, Krichmar et al. 2017).

Thus, experiments carried out in the MWM as the one in this work, can be demonstrative and used as a model of behavioral findings in both humans and rats.

As has happened with our results in rodents, we can know how memory has persisted over time, while there are studies that evaluate human behavior and how the ME is established in them.

Studying navigation in rodents is homologous to the study, not only of the discovery of routes, but also of implicit memory in human beings. Encompassing, procedural learning and memory, including skilful behaviors such as driving a car, riding a bicycle, throwing and catching a ball and other highly trained performances that become semi-automatic (Vorhees and Williams 2006, Vorhees and Williams 2014, Oess, Krichmar et al. 2017).

Other researchers verified how stress affects EM and cognitive functions in MWM in different ways.

From the separation of the maternal route in childhood, the anxiety produced by over-exercise with running rats (Banqueri, Mendez et al. 2017), the effects of age as neurodegenerative disorders (Botha, Grace et al. 2012), or the administration of certain drugs (Haider, Batool et al. 2017), both in healthy rats and in rats with amnesia (Batool, Sadir et al. 2016).

There is evidence to suggest that stressed animals have a poorer performance in the MWM. Therefore, environmental factors that can cause stress, such as temperature, light and noise, should be monitored and kept constant during the task (Bromley-Brits, Deng et al. 2011).

The benefits of new therapies for the treatment of Alzheimer's disease have been evaluated, using the MWM in different strains of rodents of different ages and with severe pathologies (Adasme, Haeger et al. 2011, Bromley-Brits, Deng et al. 2011, Webster, Bachstetter et al. 2014, Foley, Ammar et al. 2015).

For these reasons, these results have been novel, to verify that the ME still lasts at 16 and 25 days from the beginning of learning.

On the other hand, it is known that PRL plays different functional roles in vertebrates, as we have indicated during this work. In addition, its great expression in the pituitary and other extrapituitary tissues (Adasme, Haeger et al. 2011, Bromley-Brits, Deng et al. 2011, Marano and Ben-Jonathan 2014, Webster, Bachstetter et al. 2014, Ben-Jonathan and Hugo 2015, Foley, Ammar et al. 2015, Cabrera-Reyes, Limon-Morales et al. 2017).

PRL is a peptide hormone synthesized and secreted mainly by the anterior pituitary gland, but also by the extrahypophysial tissues, where it acts as a local autocrino-paracrine factor (Harvey, Aramburo et al. 2012).

Through immunohistochemistry, the presence of PRL has been demonstrated in regions of the CNS of different species (Freeman, Kanyicska et al. 2000, Ben-Jonathan, Khurana et al. 2002).

There is evidence of PRL synthesis in the brain and expression of its mRNA by "in situ" hybridization in different animal models. Its mRNA has been detected



in paraventricular, supraoptic nuclei in the hypothalamus of female rats by PCR (Clapp, Torner et al. 1994, Freeman, Kanyicska et al. 2000, Ben-Jonathan, Khurana et al. 2002, Torner, Tinajero et al. 2013).

A study in turkeys showed that the sequence of PRL mRNA was located predominantly within the pituitary gland, although it was also observed within the extrahypophyseal areas of the brain, including the cerebellum, the nucleus accumbens, the lateral septum, the anterior hypothalamic nucleus, the lateral hypothalamus, the paraventricular nucleus, the ventromedial nucleus, and the infundibular nuclear complex (Chaiseha, Ngernsoungnern et al. 2012).

Other studies in brains of adult and developing sheep, suggested that the local synthesis of PRL and its release within the brain itself, could act together with that acquired in the circulation, for the modulation of homeopathic and behavioral neuroendocrine responses (Diakonova 2015).

It was considered that it could be produced locally by the CNS and enter the brain through specific transporters located in the choroidal plexus membrane (Brown, Kokay et al. 2016, Brown, Wyatt et al. 2016, Nikishina, Saponova et al. 2016).

In the same way, the RPRL with its isoforms is expressed in the pituitary gland, in peripheral tissues and constantly in various regions of the brain, such as the cerebral cortex, olfactory bulb, hypothalamus, hippocampus and amygdala (Carretero, Sanchez-Robledo et al. 2018)

There are numerous studies that have demonstrated the existence of PRL, RPRL and its local synthesis, in pituitary and other areas of the brain.

Nevertheless, the first work that analyzes the modifications of the presence of PRL and its mRNA in the hippocampus of male rats trained in the MWM.

At the same time, its distribution was studied in the different regions of the Ammon and GD horn, analyzing the differences produced in its strata.

It is known that exogenous and circulating PRL in adult mice is necessary for learning and memory, improves cognitive performance and spatial memory, increases social memory and its focus, necessary for behavior in society (Babb, Carini et al. 2014).

Improves neurogenesis (Lin, Chung et al. 2018), cell proliferation and neuroprotection (Walker, Vukovic et al. 2012).

It can be thought that the fibers positive for mRNA synthesis that showed the results of this research could be related to neuroplasticity and dendritic remodeling, as had been seen in other studies during pregnancy and postpartum (Le Tissier, Hodson et al. 2015).

Genomic studies of PRL levels in blood plasma and cerebrospinal fluid (CSF) have been developed to explain how their expression levels are in both biological fluids, through the development of a meta-analysis.

Thus, it has been known as genetic markers that affected the expression of PRL in plasma or CSF, providing researchers with a basis for a better understanding of the regulation of PRL, and in turn understand the role it plays in multiple tissues in the human body and how it affects health (Staley, Ebbert et al. 2016).

In the brain, PRL and its receptor have been linked to sexual behaviour (Nogami, Hoshino et al. 2007), behavior of the mother (Sangeeta Devi and Halperin 2014), neuroprotection (Li, Yang et al. 2017) and neurogenesis (Fester and Rune 2015).

At the same time, we have seen an overexpression of PRL and RPRL in the brain and in the pituitary gland in lactation (Walker, Vukovic et al. 2012), stress (Ignacak, Kasztelnik et al. 2012) and, exposure to injuries induced by hypoxia or ischemia (Modersheim, Gorba et al. 2007).

Overexpression of the PRL gene in neurogenesis and LRPP in women may contribute to adaptive behaviors during mating, pregnancy and postpartum (Lajud, Gonzalez-Zapien et al. 2013).

Another function that is being evaluated in recent times is the relationship of PRL and RPRL mRNA in neurodevelopment in fetal sheep (60-135 days of gestation) and adults (Roselli, Bocklandt et al. 2008).

PRL participates significantly in the neuroplasticity observed during pregnancy and lactation. It is also important in the neuroprotection of the

hippocampus, causing a decrease in the excitatory glutamatergic activity in the hippocampus and in the cerebral cortex during lactation (Standley 1999).

It is involved in excitotoxic processes, because the release of PRL in the systemic circulation mediated by its receptor (Doretto, Oliveira-e-Silva et al. 2003).

With all these precedents, the results obtained in the quantification of positive cells to PRL mRNA in the hippocampal regions, make us assess the possible involvement of the presence of PRL together with the increase of its synthesis in the consolidation of memory long-term.

This growth in the synthesis of PRL, opens a door to research to understand the relative functionality of PRL in cognition, memory and learning, and the possible regulatory system in the process of consolidation of memory, for its relevance in clinical processes, due that could affect illness related to memory loss, such as Alzheimer's disease or another type of dementias.

There are limited number of studies related to the presence of the synthesis of PRL and its receptor, in the different regions of the hippocampus. What is the relation between PRL and RPRL with the learning and consolidation of memory?

This work is relevant and pioneer in manifesting the biological action of memory, cognition and learning by the hormone PRL mediated by its receptor, with the possible local synthesis of this protein in relation to self-regulation in processes of memory maintenance, and long-term study in healthy pre-trained male rats in the MWM.

At the same time, the results showed a significant increase in the groups of animals that had consolidated their memory, with respect to the controls and pre-trained, both of the presence of PRL, of the RPRL and of the synthesis of PRL locally in the CA1, CA3, GD and CA4 regions of the hippocampus.

Making a detailed study of these factors, in the different strata of the Ammon horn, Pyramidal stratum, Radiated and Oriens of Lateral and Septal CA1; CA3a, CA3b and CA3c; CA4. At the same time, the same analysis was developed for the GD, Granular, Molecular and Polymorphic layers in the peak regions of the GD; Cranial band of the dorsal GD and cranial band of the ventral GD.

## 7.6. CONCLUSIONS

After individually and jointly analyzing the results obtained in the study presented, and comparing them with the existing literature on the subject, we have obtained the following conclusions:

**First conclusion:** The animals subjected to behavioral test and spatial learning in the Morris Water Maze develop a learning process that from the six days is consolidated memoristically, so that at sixteen, mainly, and even at twenty-five days the memory persists.

*It suggests the consolidation of what has been learned in long-term memory. This is the first study that demonstrates the consolidation of memory at twenty-five days in rats subjected to the MWM test.*

**Second conclusion:** The hippocampus' neurons, Ammon horn and Giro Dentate, synthesize Prolactin, as suggested by the presence of Prolactin mRNA detected by in situ hybridization.

*It suggests that it is not necessary that Prolactin present in the blood have to reach the neurons through its filtering in the choroid plexus into the cerebrospinal fluid or through a specific transporter located in the vascular walls.*

**Third conclusion:** The prolactin synthesis in the pyramidal neurons of the Ammon horn and in the granules of the Giro Dentate is modified during the learning process and in the consolidation of short-term and long-term memory.

*It suggests that Prolactin may be necessary in the process of formation and reinforcement of the hippocampal circuits involved in both processes, acting through an autocrine or paracrine regulation.*

**Fourth conclusion:** The translational process in the prolactin synthesis in the Hippocampus is accompanied by the translation process, since both western blotting and immunocytochemistry demonstrate the presence of the hormone in the Ammon horn and the Giro dentate; just as the mRNA was expressed.

*It suggests that the synthesis of Prolactin is an active and continuous process and that the hormone is an important regulator in the responses of the Hippocampus to learning and memory.*

**Fifth conclusion:** The same regions that express the mRNA of Prolactin and the hormone have receptors for Prolactin, as demonstrated by the immunocytochemical study of our work. The receptors are located in the three strata analyzed: oriens, pyramidal and radiated, in the Ammon horn, and molecular, granular and polymorphic, in the Giro Dentate.

*It suggests that Prolactin develops a physiological role in the neurons of the Hippocampus.*

**Sixth conclusion:** The presence of Prolactin receptors in the Hippocampus increases gradually depending on whether the animals are in training, learning, short-term memory or long-term memory.

*It suggests that the increase in Prolactin and its synthesis is related to the action of the hormone on its receptor, and confirms a relevant role of Prolactin during learning and memory consolidation.*

**Seventh conclusion:** This is the first study that confirms the coexistence of Prolactin mRNA and the hormone receptor in hippocampal neurons. In addition, there is evidence that coexistence is greater in the process of consolidation of long-term memory than in previous stages.

*By knowing that the same cells that synthesize Prolactin have their receptor, rule out that the reaction to Prolactin in neurons is due to the systemic hormone binding to the receptor and its internalization.*

*All this suggests that hippocampal prolactin can play a self-paracrine regulatory role in the hippocampal neurons and that its effects, among others, are related to the learning processes and memory consolidation through a short or ultra-short loop of regulation, probably by stimulating the neurogenesis and neuroprotection.*

## 7.7. REFERENCES

- Adasme, T., P. Haeger, A. C. Paula-Lima, I. Espinoza, M. M. Casas-Alarcon, M. A. Carrasco and C. Hidalgo (2011). "Involvement of ryanodine receptors in neurotrophin-induced hippocampal synaptic plasticity and spatial memory formation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(7): 3029-3034.
- Aggleton, J. P. (2012). "Multiple anatomical systems embedded within the primate medial temporal lobe: implications for hippocampal function." *Neurosci Biobehav Rev* 36(7): 1579-1596.
- Aggleton, J. P. and K. Christiansen (2015). "The subiculum: the heart of the extended hippocampal system." *Prog Brain Res* 219: 65-82.
- Anagnostou, I., J. Reyes-Mendoza and T. Morales (2018). "Glial cells as mediators of protective actions of prolactin (PRL) in the CNS." *Gen Comp Endocrinol*.
- Axelrud, L. K., M. L. Santoro, D. S. Pine, F. Talarico, A. Gadelha, G. G. Manfro, P. M. Pan, A. Jackowski, F. Picon, E. Brietzke, R. Grassi-Oliveira, R. A. Bressan, E. C. Miguel, L. A. Rohde, H. Hakonarson, Z. Pausova, S. Belangero, T. Paus and G. A. Salum (2018). "Polygenic Risk Score for Alzheimer's Disease: Implications for Memory Performance and Hippocampal Volumes in Early Life." *Am J Psychiatry*: appiajp201717050529.
- Babb, J. A., L. M. Carini, S. L. Spears and B. C. Nephew (2014). "Transgenerational effects of social stress on social behavior, corticosterone, oxytocin, and prolactin in rats." *Horm Behav* 65(4): 386-393.
- Bannerman, D. M., M. A. Good, S. P. Butcher, M. Ramsay and R. G. Morris (1995). "Distinct components of spatial learning revealed by prior training and NMDA receptor blockade." *Nature* 378(6553): 182-186.
- Banqueri, M., M. Mendez and J. L. Arias (2017). "Spatial memory-related brain activity in normally reared and different maternal separation models in rats." *Physiol Behav* 181: 80-85.
- Batool, Z., S. Sadir, L. Liaquat, S. Tabassum, S. Madiha, S. Rafiq, S. Tariq, T. S. Batool, S. Saleem, F. Naqvi, T. Perveen and S. Haider (2016). "Repeated administration of almonds increases brain acetylcholine levels and enhances memory function in healthy rats while attenuates memory deficits in animal model of amnesia." *Brain Res Bull* 120: 63-74.
- Ben-Jonathan, N. and E. Hugo (2015). "Prolactin (PRL) in adipose tissue: regulation and functions." *Adv Exp Med Biol* 846: 1-35.
- Ben-Jonathan, N., S. Khurana and R. Hnasko (2002). *Brain prolactin. Hormones, Brain and Behavior*, Elsevier: 97-120.
- Borba, V. V., G. Zandman-Goddard and Y. Shoenfeld (2018). "Prolactin and Autoimmunity." *Front Immunol* 9: 73.
- Bose, A., S. M. Agarwal, S. V. Kalmady and G. Venkatasubramanian (2014). "Cognitive mapping deficits in schizophrenia: a critical overview." *Indian J Psychol Med* 36(1): 9-26.
- Botha, M., L. Grace, K. Bugarith, V. A. Russell, M. Kidd, S. Seedat and S. M. Hemmings (2012). "The impact of voluntary exercise on relative telomere length in a rat model of developmental stress." *BMC Res Notes* 5: 697.
- Bromley-Brits, K., Y. Deng and W. Song (2011). "Morris water maze test for learning and memory deficits in Alzheimer's disease model mice." *J Vis Exp*(53).

- Brown, R. S., I. C. Kokay, H. R. Phillipps, S. H. Yip, P. Gustafson, A. Wyatt, C. M. Larsen, P. Knowles, S. R. Ladyman, P. LeTissier and D. R. Grattan (2016). "Conditional Deletion of the Prolactin Receptor Reveals Functional Subpopulations of Dopamine Neurons in the Arcuate Nucleus of the Hypothalamus." *J Neurosci* **36**(35): 9173-9185.
- Brown, R. S., A. K. Wyatt, R. E. Herbison, P. J. Knowles, S. R. Ladyman, N. Binart, W. A. Banks and D. R. Grattan (2016). "Prolactin transport into mouse brain is independent of prolactin receptor." *FASEB J* **30**(2): 1002-1010.
- Cabrera-Reyes, E. A., O. Limon-Morales, N. A. Rivero-Segura, I. Camacho-Arroyo and M. Cerbon (2017). "Prolactin function and putative expression in the brain." *Endocrine* **57**(2): 199-213.
- Carretero, J., V. Sanchez-Robledo, M. Carretero-Hernandez, L. Catalano-Iniesta, M. J. Garcia-Barrado, M. C. Iglesias-Osma and E. J. Blanco (2018). "Prolactin system in the hippocampus." *Cell Tissue Res*.
- Chaiseha, Y., P. Ngernsoungnern, N. Sartsoongnoen, N. Prakobsaeng and M. E. El Halawani (2012). "Presence of prolactin mRNA in extra-pituitary brain areas in the domestic turkey." *Acta Histochem* **114**(2): 116-121.
- Clapp, C., L. Torner, G. Gutierrez-Ospina, E. Alcantara, F. J. Lopez-Gomez, M. Nagano, P. A. Kelly, S. Mejia, M. A. Morales and G. Martinez de la Escalera (1994). "The prolactin gene is expressed in the hypothalamic-neurohypophyseal system and the protein is processed into a 14-kDa fragment with activity like 16-kDa prolactin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(22): 10384-10388.
- Destrieux, C., D. Bourry and S. Velut (2013). "Surgical anatomy of the hippocampus." *Neurochirurgie* **59**(4-5): 149-158.
- Diakonova, M. (2015). *Advances in Experimental Medicine and Biology: Recent Advances in Prolactin Research*. Switzerland, Springer International.
- Doretto, M. C., M. Oliveira-e-Silva, D. L. Ferreira-Alves, S. G. Pires, N. Garcia-Cairasco and A. M. Reis (2003). "Effect of lactation on the expression of audiogenic seizures: association with plasma prolactin profiles." *Epilepsy Res* **54**(2-3): 109-121.
- Epstein, R. A., E. Z. Patai, J. B. Julian and H. J. Spiers (2017). "The cognitive map in humans: spatial navigation and beyond." *Nat Neurosci* **20**(11): 1504-1513.
- Farfel, A., H. Werner and Z. Laron (2018). "Prolactin - Not Only a "Milk Hormone" Prolactin - Growth Hormone Relationships with Emphasis on Cancer." *Pediatr Endocrinol Rev* **15**(3): 216-222.
- Fester, L. and G. M. Rune (2015). "Sexual neurosteroids and synaptic plasticity in the hippocampus." *Brain Res* **1621**: 162-169.
- Fogwe, L. A. and F. B. Mesfin (2018). *Neuroanatomy, Hippocampus*. StatPearls. Treasure Island (FL).
- Foley, A. M., Z. M. Ammar, R. H. Lee and C. S. Mitchell (2015). "Systematic review of the relationship between amyloid-beta levels and measures of transgenic mouse cognitive deficit in Alzheimer's disease." *J Alzheimers Dis* **44**(3): 787-795.
- Freeman, M. E., B. Kanyicska, A. Lerant and G. Nagy (2000). "Prolactin: structure, function, and regulation of secretion." *Physiol Rev* **80**(4): 1523-1631.
- Garcia-Barrado, M. J., E. J. Blanco, M. C. Iglesias-Osma, M. Carretero-Hernandez, L. Catalano-Iniesta, V. Sanchez-Robledo, M. Carretero, J. J. Herrero, S. Carrero and J. Carretero (2017). "Relation among Aromatase P450 and Tumoral Growth in Human Prolactinomas." *Int J Mol Sci* **18**(11).

- Haider, S., Z. Batool, S. Ahmad, R. A. Siddiqui and D. J. Haleem (2017). "Walnut supplementation reverses the scopolamine-induced memory impairment by restoration of cholinergic function via mitigating oxidative stress in rats: a potential therapeutic intervention for age related neurodegenerative disorders." *Metab Brain Dis*.
- Harvey, S., C. Aramburo and E. J. Sanders (2012). "Extrapituitary production of anterior pituitary hormones: an overview." *Endocrine* **41**(1): 19-30.
- Ignacak, A., M. Kasztelnik, T. Sliwa, R. A. Korbut, K. Rajda and T. J. Guzik (2012). "Prolactin--not only lactotrophin. A "new" view of the "old" hormone." *J Physiol Pharmacol* **63**(5): 435-443.
- Jeye, B. M., S. P. MacEvoy, J. M. Karanian and S. D. Slotnick (2018). "Distinct regions of the hippocampus are associated with memory for different spatial locations." *Brain Res*.
- Joyce, M. K. P. and H. Barbas (2018). "Cortical Connections Position Primate Area 25 as a Keystone for Interoception, Emotion, and Memory." *J Neurosci* **38**(7): 1677-1698.
- Lajud, N., R. Gonzalez-Zapien, A. Roque, E. Tinajero, J. J. Valdez, C. Clapp and L. Torner (2013). "Prolactin administration during early postnatal life decreases hippocampal and olfactory bulb neurogenesis and results in depressive-like behavior in adulthood." *Horm Behav* **64**(5): 781-789.
- Le Tissier, P. R., D. J. Hodson, A. O. Martin, N. Romano and P. Mollard (2015). "Plasticity of the prolactin (PRL) axis: mechanisms underlying regulation of output in female mice." *Adv Exp Med Biol* **846**: 139-162.
- Li, X., L. Yang, Y. Yang, M. Shao and Y. Liu (2017). "Preparation and Characterization of a Novel Monoclonal Antibody Against the Extracellular Domain of Human Transferrin Receptor." *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother* **36**(1): 1-7.
- Lin, C. E., C. H. Chung, L. F. Chen and M. J. Chi (2018). "Increased risk of dementia in patients with Schizophrenia: A population-based cohort study in Taiwan." *Eur Psychiatry* **53**: 7-16.
- Marano, R. J. and N. Ben-Jonathan (2014). "Minireview: Extrapituitary prolactin: an update on the distribution, regulation, and functions." *Mol Endocrinol* **28**(5): 622-633.
- Matryba, P., L. Bozycki, M. Pawlowska, L. Kaczmarek and M. Stefaniuk (2017). "Optimized perfusion-based CUBIC protocol for the efficient whole-body clearing and imaging of rat organs." *J Biophotonics*.
- Modersheim, T. A., T. Gorba, P. Pathipati, I. C. Kokay, D. R. Grattan, C. E. Williams and A. Scheepens (2007). "Prolactin is involved in glial responses following a focal injury to the juvenile rat brain." *Neuroscience* **145**(3): 963-973.
- Morris, R., P. Garrud, J. Rawlins and J. O'Keefe (1982). "Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions." *Nature* **297**(5868): 681-683.
- Munoz, P., C. Estay, P. Diaz, C. Elgueta, A. O. Ardiles and P. A. Lizana (2016). "Inhibition of DNA Methylation Impairs Synaptic Plasticity during an Early Time Window in Rats." *Neural Plast* **2016**: 4783836.
- Nikishina, Y. O., A. Y. Saponova and M. V. Ugrumov (2016). "The Effect of Dopamine Secreted by the Brain into the Systemic Circulation on Prolactin Synthesis by the Pituitary gland in Ontogenesis." *Acta Naturae* **8**(3): 111-117.
- Nogami, H., R. Hoshino, K. Ogasawara, S. Miyamoto and S. Hisano (2007). "Region-specific expression and hormonal regulation of the first exon variants of rat prolactin receptor mRNA in rat brain and anterior pituitary gland." *J Neuroendocrinol* **19**(8): 583-593.
- Ocampo Daza, D. and D. Larhammar (2018). "Evolution of the growth hormone, prolactin, prolactin 2 and somatolactin family." *Gen Comp Endocrinol*.



- Oclon, E., G. Solomon, Z. Hayouka, T. M. Salame, V. Goffin and A. Gertler (2018). "Novel reagents for human prolactin research: large-scale preparation and characterization of prolactin receptor extracellular domain, non-pegylated and pegylated prolactin and prolactin receptor antagonist." *Protein Eng Des Sel* 31(1): 7-16.
- Oess, T., J. L. Krichmar and F. Rohrbein (2017). "A Computational Model for Spatial Navigation Based on Reference Frames in the Hippocampus, Retrosplenial Cortex, and Posterior Parietal Cortex." *Front Neurobot* 11: 4.
- Parsaei, L., A. Torkaman-Boutorabi, F. Asadi and M. R. Zarrindast (2016). "Interaction between dorsal hippocampal NMDA receptors and lithium on spatial learning consolidation in rats." *Brain Res Bull* 127: 1-10.
- Pilz, G. A., S. Bottes, M. Betizeau, D. J. Jorg, S. Carta, B. D. Simons, F. Helmchen and S. Jessberger (2018). "Live imaging of neurogenesis in the adult mouse hippocampus." *Science* 359(6376): 658-662.
- Ritchev, M., L. A. Libby and C. Ranganath (2015). "Cortico-hippocampal systems involved in memory and cognition: the PMAT framework." *Prog Brain Res* 219: 45-64.
- Roselli, C. E., S. Bocklandt, H. L. Stadelman, T. Wadsworth, E. Vilain and F. Stormshak (2008). "Prolactin expression in the sheep brain." *Neuroendocrinology* 87(4): 206-215.
- Rugg, M. D., K. L. Vilberg, J. T. Mattson, S. S. Yu, J. D. Johnson and M. Suzuki (2012). "Item memory, context memory and the hippocampus: fMRI evidence." *Neuropsychologia* 50(13): 3070-3079.
- Sangeeta Devi, Y. and J. Halperin (2014). "Reproductive actions of prolactin mediated through short and long receptor isoforms." *Mol Cell Endocrinol* 382(1): 400-410.
- Schmitt, A., R. Csiki, A. Tron, B. Saldamli, J. Tubel, K. Florian, S. Siebenlist, E. Balmayor and R. Burgkart (2017). "Optimized protocol for whole organ decellularization." *Eur J Med Res* 22(1): 31.
- Staley, L. A., M. T. Ebbert, S. Parker, M. Bailey, I. Alzheimer's Disease Neuroimaging, P. G. Ridge, A. M. Goate and J. S. Kauwe (2016). "Genome-wide association study of prolactin levels in blood plasma and cerebrospinal fluid." *BMC Genomics* 17 **Suppl 3**: 436.
- Standley, C. A. (1999). "N-methyl-D-aspartate receptor binding is altered and seizure potential reduced in pregnant rats." *Brain Res* 844(1-2): 10-19.
- Torner, L., E. Tinajero, N. Lajud, A. Quintanar-Stephano and E. Olvera-Cortes (2013). "Hyperprolactinemia impairs object recognition without altering spatial learning in male rats." *Behav Brain Res* 252: 32-39.
- van Rijn, C. M., H. Krijnen, S. Menting-Hermeling and A. M. Coenen (2011). "Decapitation in rats: latency to unconsciousness and the 'wave of death'." *PLoS One* 6(1): e16514.
- Vanz, F., M. A. Bicca, V. F. Linartevischi, M. Giachero, L. J. Bertoglio and T. C. Monteiro de Lima (2018). "Role of dorsal hippocampus kappa opioid receptors in contextual aversive memory consolidation in rats." *Neuropharmacology*.
- Vorhees, C. V. and M. T. Williams (2006). "Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory." *Nat Protoc* 1(2): 848-858.
- Vorhees, C. V. and M. T. Williams (2014). "Assessing spatial learning and memory in rodents." *ILAR J* 55(2): 310-332.
- Walker, T. L., J. Vukovic, M. M. Koudijs, D. G. Blackmore, E. W. Mackay, A. M. Sykes, R. W. Overall, A. S. Hamlin and P. F. Bartlett (2012). "Prolactin stimulates precursor cells in the adult mouse hippocampus." *PLoS One* 7(9): e44371.

- Webster, S. J., A. D. Bachstetter, P. T. Nelson, F. A. Schmitt and L. J. Van Eldik (2014). "Using mice to model Alzheimer's dementia: an overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models." *Front Genet* **5**: 88.
- Winton-Brown, T., A. Schmidt, J. P. Roiser, O. D. Howes, A. Egerton, P. Fusar-Poli, N. Bunzeck, A. A. Grace, E. Duzel, S. Kapur and P. McGuire (2017). "Altered activation and connectivity in a hippocampal-basal ganglia-midbrain circuit during salience processing in subjects at ultra high risk for psychosis." *Transl Psychiatry* **7**(10): e1245.
- Zeidman, P. and E. A. Maguire (2016). "Anterior hippocampus: the anatomy of perception, imagination and episodic memory." *Nat Rev Neurosci* **17**(3): 173-182.
- Zhao, Z. H., G. Zheng, T. Wang, K. J. Du, X. Han, W. J. Luo, X. F. Shen and J. Y. Chen (2018). "Low-level Gestational Lead Exposure Alters Dendritic Spine Plasticity in the Hippocampus and Reduces Learning and Memory in Rats." *Sci Rep* **8**(1): 3533.



# Prolactin system in the hippocampus

José Carretero<sup>1,2,3</sup> · Virginia Sánchez-Robledo<sup>3,4</sup> · Marta Carretero-Hernández<sup>1</sup> · Leonardo Catalano-Iniesta<sup>1,2,3</sup> · María José García-Barrado<sup>2,3,4</sup> · María Carmen Iglesias-Osma<sup>2,3,4</sup> · Enrique J. Blanco<sup>1,2,3</sup>

Received: 25 January 2018 / Accepted: 11 May 2018  
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

## Abstract

Among the more than 300 biological actions described for prolactin, its role in the neurogenic capacity of the hippocampus, which increases synaptogenesis and neuronal plasticity, consolidates memory and acts as a neuronal protector against excitotoxicity—effects mediated through its receptors are more recently known. The detection of prolactin in the hippocampus and its receptors, specifically in the Ammon's horn and dentate gyrus, opened up a new field of study on the possible neuroprotective effect of hormones in a structure involved in learning and memory, as well as in emotional and behavioral processes. It is currently known, although controversial, that prolactin may be related to sex and age and that the hormone could be synthesized in the hippocampus itself. However, the regulatory mechanisms of changes in prolactin or in its hippocampal receptors still remain unknown. This review introduces the reader to general aspects concerning prolactin and its receptors and to what is currently known about the role prolactin plays in the brain and, in particular, in the hippocampus.

**Keywords** Prolactin · Hippocampus · Prolactin receptor · Neuroprotection · Learning and memory

## Prolactin and its receptor

Prolactin (PRL) is a peptide hormone present in all vertebrates. It is phylogenetically well-conserved (Brooks 2012) and is known to have more than 300 different biological functions, including the stimulation of neurogenesis, modulation of stress responses, calcium transport, immune system regulation and

reduction of anxiety, among others (Larsen and Grattan 2012; Ferraris et al. 2013; Patil et al. 2014).

The synthesis of prolactin occurs mainly in the anterior pituitary and it is released into the peripheral blood in a pulsatile manner.

Prolactin acts on its specific receptor, PRLR, which belongs to the transmembrane type I cytokine receptor superfamily. PRLR is encoded by a single gene located on chromosomes 5, 15 and 2 in humans, mice and rats, respectively, with multiple specific variants in numerous tissues and cell types (Patil et al. 2014; Sangeeta Devi and Halperin 2014).

This gene has a complex genomic structure, which includes the presence of a promoter region and multiple first exons whose alternative activation regulates the transcription of the gene (Swaminathan et al. 2008). Up to five first exons have been described in rat, designated E11, E12, E13, E14 and E15, where exon E14 seems to be responsible for the expression of the PRLR gene throughout development and especially in the choroidal plexuses during postnatal development and lactation (Tejadilla et al. 2010; Hirai et al. 2013).

Variants of the receptor can be generated by alternative splicing of the first transcript or by post-transcriptional division, obtaining different isoforms that share a large part of the structure and that constitute the two halves of the complete

---

José Carretero and Virginia Sánchez-Robledo contributed equally to this work

---

✉ José Carretero  
jcar@usal.es

<sup>1</sup> Department of Human Anatomy and Histology, Faculty of Medicine, University of Salamanca, Salamanca, Spain

<sup>2</sup> Laboratory of Neuroendocrinology, Institute of Neurosciences of Castilla y León (INCyL), University of Salamanca, Salamanca, Spain

<sup>3</sup> Laboratory of Neuroendocrinology and Obesity, Institute for Biomedical Research of Salamanca (IBSAL), University of Salamanca, Salamanca, Spain

<sup>4</sup> Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Medicine, University of Salamanca, Salamanca, Spain

receptor (Patil et al. 2014). In humans, up to five membrane-bound and soluble isoforms of the receptor have been described: the long form (PRL-RL); the intermediate form (PRL-RI), present in humans but not in mice (Sangeeta Devi and Halperin 2014); and the three short isoforms (PRL-RS)  $\Delta$ S1, S1a and S1b, which share a common extracellular domain but have a divergent intracellular domain. On the contrary, fewer isoforms have been described in rodents, although the main isoforms, PRL-RL and PRL-RS, have been found in rats and mice (Ben-Jonathan and Hugo 2015).

The PRL-RL isoform is the prototype receptor of this family and is involved in the complete signaling spectrum and actions attributed to prolactin, including its proliferative and neuroprotective effects (Swaminathan et al. 2008; Wagner et al. 2009; Sangeeta Devi and Halperin 2014). It has an extracellular domain that acts as a ligand-binding, transmembrane and intracellular domain.

The extracellular domain includes two regions, designated S1 and S2 (or D1 and D2) and together they form the ligand binding site. The transmembrane domain is the place of union between the extracellular and intracellular domains (Fig. 1). Lastly, the intracellular domain contains the receptor signaling unit and consists of two main regions, Box1 and Box2, separated by the variable V-Box domain. The X-Box region acts as an extension of the Box2 region.

Box1 is hydrophobic and has a tyrosine-protein kinase Janus 2 (Jak2) binding domain and the C-terminal end of this region contains some tyrosine residues, crucial for the binding and activation of the signal transducer and activator of transcription 5, STAT5 (Morales et al. 2014; Swaminathan et al. 2008).

The remaining isoforms exhibit different properties, due to a reduced C-terminal tail. In this way, the isoforms S1a and S1b lack the Box2 and X-Box regions and therefore STAT5. The intermediate isoform, on the other hand, does contain these regions and the isoform  $\Delta$ S1 has an entire deletion of the S1 region, which is attributed to its low affinity for prolactin that is seven times lower than that of the long isoform (Swaminathan et al. 2008).

The distribution of these isoforms in the tissue is asymmetric, where the PRL-RL isoform is more highly expressed in the hippocampus and in certain types of cancer (Swaminathan et al. 2008; Torner et al. 2009; Tejadilla et al. 2010; Kang et al. 2014; Harvey et al. 2015), which could be related to cell proliferation.

Additionally, a form of the receptor, the prolactin-binding protein (PLR-BP), has also been detected in humans and contains a freely circulating extracellular domain. This domain is capable of binding up to 36% of the prolactin circulating in blood, which is why it is considered to be a natural prolactin antagonist (Swaminathan et al. 2008; Ben-Jonathan and Hugo 2015).

The relative amount of the different isoforms of the receptor, expressed in various tissues, could help to explain the different biological actions of prolactin. It has been thought

that prolactin modulates its activity in target cells by inducing internalization and degradation of its own receptor and by regulating the expression of receptor isoforms (Ferraris et al. 2012). In addition, taking into account that a large number of cells expressing the prolactin receptor also express the estrogen receptor, it is possible that estradiol may also regulate the expression of the prolactin receptor (Grattan 2015; Harvey et al. 2015). Therefore, many of the actions carried out by prolactin through its receptor may be dependent not only on prolactin itself but also on the presence of estradiol.

In order for a receptor to become activated, the isoforms must first dimerize. In this way, the union of the same or different isomers forms PRLR homodimers or heterodimers that are activated through the binding of PRL to the receptor (Fig. 1). This in turn constitutes a functional heterotrimer capable of initiating the actions attributed to prolactin.

In some cases, the correct dimerization of the isoforms and the binding of PRL are not sufficient for generating a fully functional receptor. The PRL-RS isoform shows a natural tendency to polymerize with PRL-RL and also the ability to inhibit its activation (Ferraris et al. 2012).

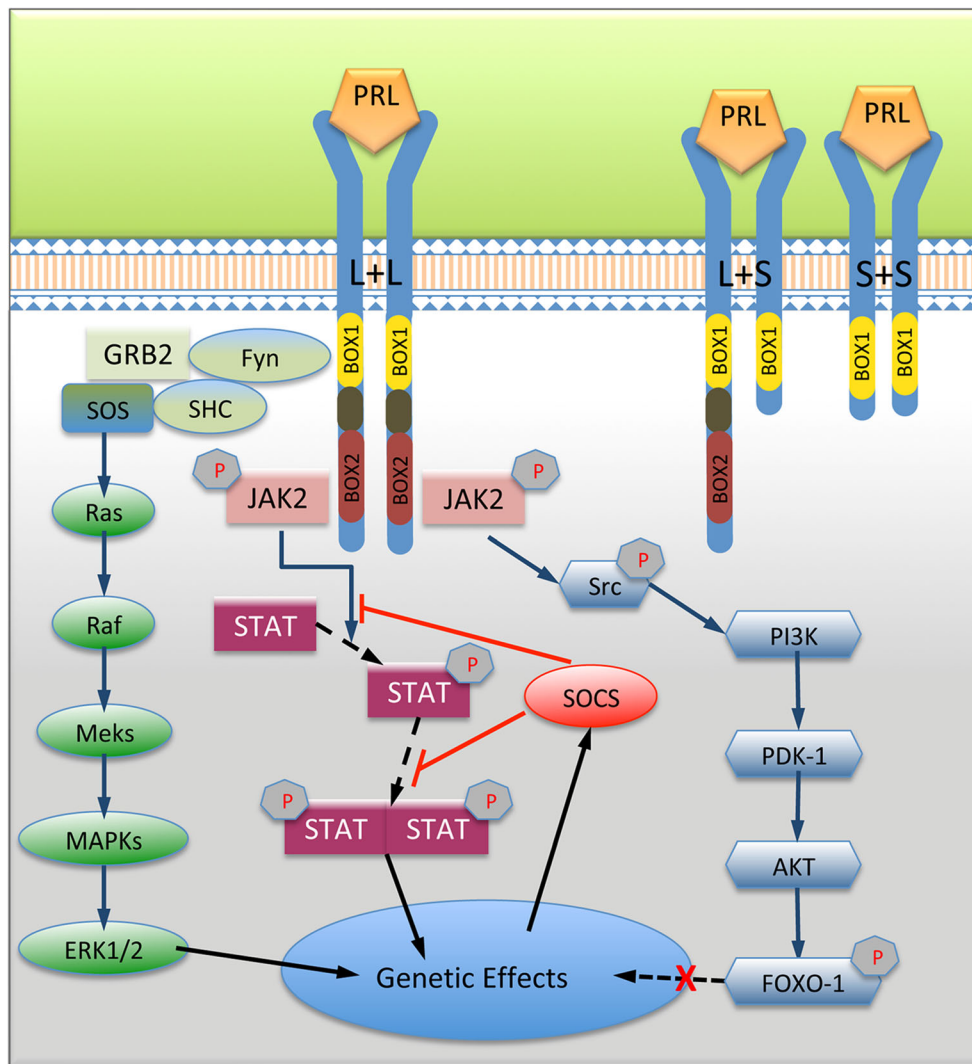
This is because the presence of a tyrosine 580 residue located in the cytoplasmic tail of the intracellular domain is required for phosphorylation of STAT5. Since only the long isoform of the receptor contains this residue and because it is necessary that each receptor monomer has its own tyrosine 580, the heterodimer consisting of PRL-RL and PRL-RS would not have an effective binding site for the phosphorylation of STAT5. Therefore, the heterodimer would not be functional and the activity induced by PRL-RL would be insufficient for the activation of the expression of PRL response genes (Kang et al. 2014).

This theory is further supported by observations in which the elimination of the S1 domain changes the affinity of the PRL-RS isoform, in such a way that its ability to bind to the PRL-RL isoform is decreased. This situation favors the dimerization of PRL-RS with itself, increasing the formation of PRL-RS homodimers (Brooks 2012; Kang et al. 2014). Although this hypothesis would substantiate the formation of receptor dimers independently of the ligand, most likely both types of dimerization, dependent or independent of PRL, are involved in the formation of a functional receptor.

The binding of PRL to PRLR produces its activation, initiating the processes responsible for the biological activities of the hormone.

The proximity of PRL to the S1 and S2 regions of the extracellular domain within the receptor allows PRL to bind to the binding pocket. This in turn causes the receptor to move in a piston-like manner, which leads to a structural change in the intracellular domain that promotes the activation of the signaling cascade (Brooks 2012).

This would facilitate the coupling of Jak2 to the Box1 region (Fig. 1), causing Jak2 to autophosphorylate and



**Fig. 1** Image showing the typical intracellular signaling pathways activated by the binding of prolactin to its receptor (partially modified and amplified from Furigo et al. 2016). There are three main routes, MAPK, STAT and PI3K, through which prolactin can induce long-lasting genomic responses. In addition, there are three forms of dimerization for the long (L) and short (S) isoforms of the receptor: L + L, L + S and S + S. The effects of prolactin can be affected depending on the type of association between the isoforms. AKT, ak strain transforming/protein kinase B; ERK1/2, extracellular signal-regulated kinases; FOXO-1, forkhead box protein O1; Fyn, proto-oncogene tyrosine-protein kinase

Fyn; GRB2, growth factor receptor-bound protein 2; JAK2, janus kinase-2; MAPKs, mitogen-activated protein kinases; Meks, mitogen-activated protein kinase kinases; P, phosphate; PDK-1, phosphoinositide-dependent kinase-1; PI3K, phosphatidylinositol-4-5-biphosphate 3-kinase; PRL, prolactin; Raf, raf proto-oncogene serine/threonine-protein kinase; Ras, family of small GTPase; SHC, SHC-transforming protein; SOCS, suppressor of cytokine signaling; SOS, son of sevenless (set of genes encoding guanine nucleotide exchange factors); Src, proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src; STAT, signal transducer and activator of transcription

phosphorylate numerous proteins, such as STAT5, which is the main mediator of the prolactin signal (Sangeeta Devi and Halperin 2014) and the way in which PRL increases the expression of its own receptor (Kavarthapu et al. 2014). Although this seems to be the main cascade induced by prolactin for initiating proliferation and neurogenesis (Patil et al. 2014), associated mainly with the PRL-RL isoform due to the presence of the STAT5 binding site in the cytoplasmic tail of the intracellular domain (Hirai et al. 2013), other pathways can also be activated, such as the MAP-kinases pathway, the

phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathway, Src-kinase, NeK3-kinase or ERK1 (Swaminathan et al. 2008; Ferraris et al. 2012, 2013; Sangeeta Devi and Halperin 2014).

Given that the PRL-RS isoform has lost the Box2 junction region of STAT5 but has the Box1 binding domain for Jak2, it has been hypothesized that the activation of PRL-RS can phosphorylate Jak2 activating the MAP-kinase pathways, ERK1 and PI3K (Fig. 1). This would be consistent with the results of an analysis carried out on cells containing homodimer and heterodimer receptors, where the levels of

phosphorylated Jak2 are constant, while there is a marked reduction in the levels of STAT5 in homodimers and heterodimers comprising PRL-RS isoforms (Kang et al. 2014).

## Prolactin and its receptor in the brain

It is known that prolactin receptors are present in the choroid plexuses (Clemens and Sawyer 1974; Tejadilla et al. 2010; Larsen and Grattan 2012; Ferraris et al. 2013; Hirai et al. 2013; Patil et al. 2014) and also at varying levels in cerebrospinal fluid, being similar to those of peripheral PRL (Tejadilla et al. 2010; Grattan 2015). Consequently, it has been suggested that circulating prolactin in blood is capable of crossing the blood-brain barrier, reaching the cerebrospinal fluid through the choroid plexus by a mechanism of saturable transport mediated by its receptor (Fig. 2). Hence, prolactin could inhibit its production and release through a negative feedback mechanism facilitated by an increase in dopamine from the arcuate nucleus (Torner et al. 2009; Larsen and Grattan 2012; Ferraris et al. 2013; Patil et al. 2014; Sangeeta Devi and Halperin 2014; Grattan 2015).

However, the presence of prolactin in the brain of PRL receptor knockout mice has been observed (Brown et al. 2016), suggesting that PRL can pass from blood through the blood vessels, involving a not yet been described carrier, or that the hormone is synthesized in cells of the nervous system (Fig. 2).

In addition to prolactin being synthesized by the pituitary, it has also been described to be synthesized in other tissues. Furthermore, the possibility of prolactin production in the central nervous system, which would act locally, has also been reported (Ben-Jonathan et al. 1996). However, this has not been conclusively proven and discrepancies exist among authors (see Brown et al. 2016, for more detailed information).

## Neural roles for prolactin

### Neurogenesis

Neurogenesis is a complex process that includes the activation, proliferation, differentiation and migration of neural and glial stem cells, as well as the synaptic integration of new cells in existing neural networks (Walker et al. 2012).

There are two areas of the brain where neurogenesis has been described in adults: the subventricular zone (SVZ), which adjacently extends to the wall of the lateral ventricles and whose newly formed cells migrate through the so-called rostral migratory current to reach, for the most part, the granular and perigranular layers of the olfactory bulb and the subgranular zone (SGZ) located in the granular cell layer of the dentate gyrus of the hippocampus, which generates neurons that migrate short distances to make dentate granular cells that are

directly related to learning, memory, object recognition and spatial orientation (Lévy et al. 2011). The hippocampus is, therefore, a region where neurogenesis persists in the adult.

The influence of hormones on neurogenesis is well-known, where the steroid hormones, androgens and estrogens, are efficient enhancers of neurogenesis in the hippocampus, as well as enhancers of synaptogenesis and memory consolidation, effects they achieve through their receptors (Fester and Rune 2015).

Prolactin (PRL) has also been linked to similar neurogenic processes in adults, especially to the SVZ (Larsen and Grattan 2012) and SGZ (Cabrera et al. 2009) where it has been shown to produce neuroprotection (Torner et al. 2009).

### Neuroprotection

The oxidative damage produced in biomolecules is due to an alteration of the pro-oxidant-antioxidant equilibrium of the body that favors the pro-oxidant state, a situation called oxidative stress. Oxidative stress is due to an excess in the intracellular production of reactive oxygen species (ROS) and nitrogen (RNS), historically known as free radicals and to exposure to these highly reactive chemical species. Also, oxidative stress may be due to a partial inhibition of cellular antioxidant defenses, enzymatic and non-enzymatic, where glutathione (GSH) is the main non-enzymatic cellular antioxidant defense.

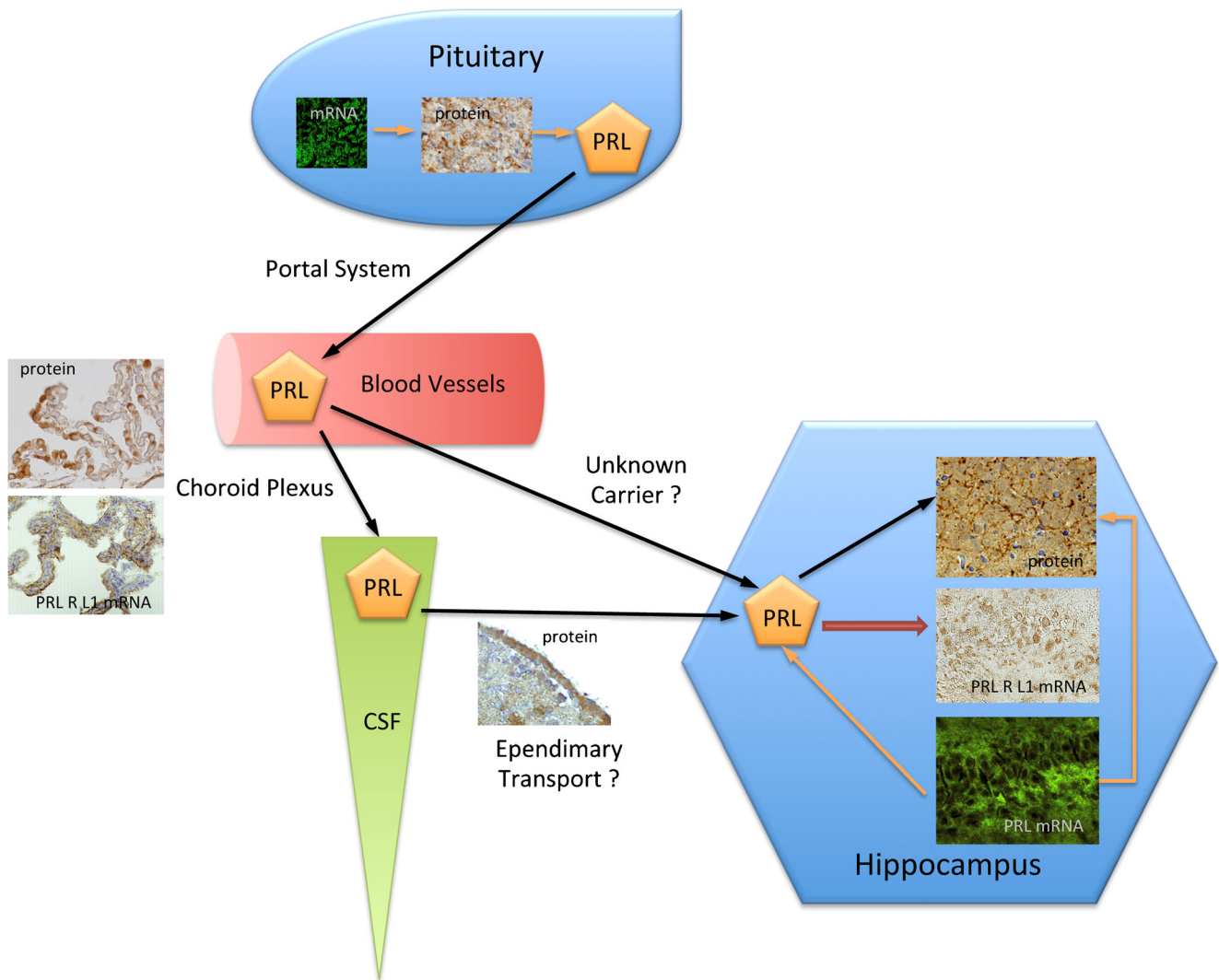
The brain is highly vulnerable to oxidative stress and therefore extremely susceptible to oxidative damage. This is due, above all, to the high rate of oxygen consumption that occurs in this organ, which increases the production of ROS; to the high content of polyunsaturated fatty acids, which are easily oxidizable; to the fact that antioxidant defenses are relatively weak and because the brain mainly comprises differentiated postmitotic cells (Mariani et al. 2005; Li et al. 2013).

The decline in brain function associated with aging is largely due to oxidative stress causing damage in different biomolecules (lipids, proteins, carbohydrates and nucleic acids), which can alter cellular function and affect the functioning of the central nervous system. In fact, oxidative stress is recognized as being a fundamental cause of various neurodegenerative diseases associated with aging, such as Alzheimer's, Parkinson's, amyotrophic lateral sclerosis and Huntington's diseases (Mariani et al. 2005).

In relation to prolactin, antioxidant effects have been described for the hormone in parts of the central nervous system, such as the retina (Thébault 2017), although these effects have not been studied in the hippocampus.

## Prolactin and hippocampus

During pregnancy and lactation, serum prolactin levels are elevated, which seems to be related to the maternal behavior of pregnant females (Ferraris et al. 2013; Patil et al. 2014;



**Fig. 2** Image showing the different non-mutually exclusive theories that try to explain the presence of prolactin in the hippocampus. The prolactin synthesized and released from the pituitary gland goes to the peripheral blood through the portal system. From the peripheral blood, prolactin could pass through the choroid plexuses to the cerebrospinal fluid (CSF), be captured by ependymocytes, and from there spread via the neuropil to act on the neurons of the hippocampus at a distance.

Sangeeta Devi and Halperin 2014). It is precisely in this phase of physiological hyperprolactinemia when the most significant effects of the hormone in relation to neuroprotection and neurogenesis have been observed. The neurogenic effects associated with the hormone take place through the activation of its receptor, which has been detected in both the subventricular zone and in the hippocampus (Torner et al. 2009; Larsen and Grattan 2012).

Different studies have shown that prolactin is capable of reducing cell death by excitotoxicity, including hippocampal neurons (Cabrera et al. 2009; Tejadilla et al. 2010; Morales et al. 2014; Vergara-Castañeda et al. 2016). It has also been proven that prolactin is able to induce cell proliferation and reduce neuronal damage associated with stress in the

hippocampus (Cabrera et al. 2009; Torner et al. 2009) and the toxic action of high levels of glucocorticoids present during gestation as a mechanism to ensure the supply of energy to the fetus. Inconsistencies have been found in the literature regarding the effects of prolactin throughout the life of an organism. Although it has been described that exogenous prolactin administered to rats during the neonatal period decreases neurogenesis in the hippocampus (Lajud et al. 2013), it has also been reported that endogenous prolactin could be necessary in the hippocampus of adult rats for learning and memory (Walker et al. 2012). Prolactin, particularly in the hippocampus, could improve cognitive performance and spatial memory, neurodevelopment (Pardo et al. 2016), neurogenesis, cell

proliferation and neuroprotection (Morales et al. 2014; Reyes-Mendoza and Morales 2016; Rivero-Segura et al. 2017) and neuroplasticity and dendritic remodeling during gestation and postpartum (Kinsley et al. 2006; Brusco et al. 2008).

Overall, the results described relate circulating prolactin to possible neuroprotective and neurogenic effects in adults that seem to be associated mainly with pregnancy and maternal postpartum behavior.

Without discarding a neuronal role for circulating pituitary prolactin, it could be considered that the expression and probably the synthesis of the hormone in the hippocampus do occur, since the presence of the protein, detected by RIA and immunocytochemistry and mRNA, detected by RT-PCR and RT-qPCR, have been described (De Vito 1988; Emanuele et al. 1992; Fields et al. 1993; Roselli et al. 2008; Cabrera-Reyes et al. 2015).

The existence of a specialized type of neuron expressing prolactin still remains to be ascertained, as well as its possible relationship to the presence of any receptor isoform and if the hormone only acts locally or functionally intervenes in any of the afferent or efferent connections of the hippocampus.

In addition, it is currently unknown whether the regulation of the presence and synthesis of the hormone in the hippocampus develops independently of the level of prolactin in the blood. And, it is unclear if there are possible local or remote neuronal regulators that could influence prolactin in the hippocampus.

In summary, although there is evidence supporting the presence of a prolactin system in the hippocampus and some of its actions, there is still much to be explored regarding its organization and regulation, as well as its possible involvement in neurodegenerative pathologies and the influence that the presence of pituitary prolactinomas could have on this system.

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- Ben-Jonathan N, Hugo E (2015) Prolactin (PRL) in adipose tissue: regulation and functions. In: Diakonova M (ed) *Advances in experimental medicine and biology*, vol 846. Springer International Publishing, Cham, pp 1–35
- Ben-Jonathan N, Mershonf JL, Allen DL, Steinmetz RW (1996) Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocr Rev* 17:639–669
- Brooks CL (2012) Molecular mechanisms of prolactin and its receptor. *Endocr Rev* 33:504–525
- Brown RS, Wyatt AK, Herbison RE, Knowles PJ, Ladyman SR, Binart N, Banks WA, Grattan DR (2016) Prolactin transport into mouse brain is independent of prolactin receptor. *FASEB J* 30:1002–1010
- Brusco J, Wittmann R, de Azevedo M, Lcion A, Franci C, Giovenardi M, Rasia-Filho AA (2008) Plasma hormonal profiles and dendritic spines density and morphology in the hippocampal CA1 stratum radiatum, evidenced by light microscopy, of virgin and postpartum female rats. *Neurosci Lett* 438:346–350
- Cabrera V, Cantú D, Ramos E, Vanoye-Carlo A, Cerbón M, Morales T (2009) Lactation is a natural model of hippocampus neuroprotection against excitotoxicity. *Neurosci Lett* 461:136–139
- Cabrera-Reyes EA, Vergara-Castañeda E, Rivero-Segura N, Cerbón M (2015) Sex differences in prolactin and its receptor expression in pituitary, hypothalamus, and hippocampus of the rat. *Rev Mex Endocrinol Metab Nutr* 2:60–67
- Clemens JA, Sawyer BD (1974) Identification of prolactin in cerebrospinal fluid. *Exp Brain Res* 21:399–402
- De Vito W (1988) Distribution of immunoreactive prolactin in the male and female rat brain: effects of hypophysectomy and intraventricular administration of colchicine. *Neuroendocrinology* 47:284–289
- Emanuele N, Jurgens J, Halloran M, Tentler J, Lawrence A, Kelley M (1992) The rat prolactin gene is expressed in brain tissue: detection of normal and alternatively spliced prolactin messenger RNA. *Mol Endocrinol* 6:35–42
- Ferraris J, Boutillon F, Bernadet M, Seilicovich A, Goffin V, Pisera D (2012) Prolactin receptor antagonism in mouse anterior pituitary: effects on cell turnover and prolactin receptor expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 302:E356–E364
- Ferraris J, Bernichtein S, Pisera D, Goffin V (2013) Use of prolactin receptor antagonist to better understand prolactin regulation of pituitary homeostasis. *Neuroendocrinology* 98:171–179
- Fester L, Rune GM (2015) Sexual neurosteroids and synaptic plasticity in the hippocampus. *Brain Res* 1621:162–169
- Fields K, Kulig E, Lloyd R (1993) Detection of prolactin messenger RNA in mammary and other normal and neoplastic tissues by polymerase chain reaction. *Lab Invest* 68:354–360
- Furigo IC, Ramos-Lobo AM, Frazao R, Donato J Jr (2016) Brain STAT5 signaling and behavioral control. *Mol Cell Endocrinol* 438:70–76
- Grattan DR (2015) The hypothalamo-prolactin axis. *J Endocrinol* 226:T101–T122
- Harvey S, Martínez-Moreno CG, Luna M, Arámburo C (2015) Autocrine/paracrine roles of extrapituitary growth hormone and prolactin in health and disease: an overview. *Gen Comp Endocrinol* 220:103–111
- Hirai J, Nishita M, Nakao N, Saito TR, Tanaka M (2013) Regulation of prolactin receptor gene expression in the rat choroid plexus via transcriptional activation of multiple first exons during postnatal development and lactation. *Exp Anim* 62:49–56
- Kang J-H, Hassan SA, Zhao P, Tsai-Morris CH, Dufau ML (2014) Impact of subdomain D1 of the short form S1b of the human prolactin receptor on its inhibitory action on the function of the long form of the receptor induced by prolactin. *Biochim Biophys Acta* 1840:2272–2280
- Kavarthapu R, Tsai Morris C-H, Dufau ML (2014) Prolactin induces up-regulation of its cognate receptor in breast cancer cells via transcriptional activation of its generic promoter by cross-talk between ER $\alpha$  and STAT5. *Oncotarget* 5:9079–9091
- Kinsley CH, Trainer R, Stafisso-Sandoz G, Quadros P, Marcus LK, Hearon C, Meyer EA, Hester N, Morgan M, Kozub FJ, Lambert KG (2006) Motherhood and the hormones of pregnancy modify concentrations of hippocampal neuronal dendritic spines. *Horm Behav* 49:131–142
- Lajud N, González-Zapien R, Roque A, Tinajero E, Valdez JJ, Clapp C, Tomer L (2013) Prolactin administration during early postnatal life decreases hippocampal and olfactory bulb neurogenesis and results in depressive-like behavior in adulthood. *Horm Behav* 64:781–789
- Larsen CM, Grattan DR (2012) Prolactin, neurogenesis, and maternal behaviors. *Brain Behav Immun* 26:201–209
- Lévy F, Gheusi G, Keller M (2011) Plasticity of the parental brain: a case for neurogenesis. *J Neuroendocrinol* 23:984–993
- Li J, Li W, Jiang ZG, Ghanbari HA (2013) Oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Int J Mol Sci* 14:24438–24475



- Mariani E, Polidori MC, Cherubini A, Mecocci P (2005) Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: an overview. *J Chromatography B* 827:65–75
- Morales T, Lorensen M, Walker AM, Ramos E (2014) Both prolactin (PRL) and a molecular mimic of phosphorylated PRL, S179D-PRL, protect the hippocampus of female rats against excitotoxicity. *Neuroscience* 258:211–217
- Pardo GV, Goularte JF, Hoefel AL, de Castro AL, Kucharski LC, da Rosa AA, Lucion AB (2016) Effects of sleep restriction during pregnancy on the mother and fetuses in rats. *Physiol Behav* 1:66–76
- Patil MJ, Henry MA, Akopian AN (2014) Prolactin receptor in regulation of neuronal excitability and channels. *Channels (Austin)* 8:193–202
- Reyes-Mendoza J, Morales T (2016) Post-treatment with prolactin protects hippocampal CA1 neurons of the ovariectomized female rat against kainic acid-induced neurodegeneration. *Neuroscience* 328:58–68
- Rivero-Segura NA, Flores-Soto E, García de la Cadena S, Coronado-Mares I, Gómez-Verjan JC, Ferreira DG, Cabrera-Reyes EA, Lopes LV, Massieu L, Cerbón M (2017) Prolactin-induced neuroprotection against glutamate excitotoxicity is mediated by the reduction of  $[Ca^{2+}]_i$  overload and NF- $\kappa$ B activation. *PLoS One* 12:e0176910
- Roselli CE, Bocklandt S, Stadelman HL, Wadsworth T, Vilain E, Stormshak F (2008) Prolactin expression in the sheep brain. *Neuroendocrinology* 87:206–215
- Sangeeta Devi Y, Halperin J (2014) Reproductive actions of prolactin mediated through short and long receptor isoforms. *Mol Cell Endocrinol* 382:400–410
- Swaminathan G, Varghese B, Fuchs SY (2008) Regulation of prolactin receptor levels and activity in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 13:81–91
- Tejadilla D, Cerbón M, Morales T (2010) Prolactin reduces the damaging effects of excitotoxicity in the dorsal hippocampus of the female rat independently of ovarian hormones. *Neuroscience* 169:1178–1185
- Thébault S (2017) Potential mechanisms behind the anti-oxidant actions of prolactin in the retina. *Exp Eye Res* 160:56–61
- Tomer L, Karg S, Blume A, Kandasamy M, Kuhn HG, Winkler J, Aigner L, Neumann ID (2009) Prolactin prevents chronic stress-induced decrease of adult hippocampal neurogenesis and promotes neuronal fate. *J Neurosci* 29:1826–1833
- Vergara-Castañeda E, Grattan DR, Pasantes-Morales H, Pérez-Domínguez M, Cabrera-Reyes EA, Morales T, Cerbón M (2016) Prolactin mediates neuroprotection against excitotoxicity in primary cell cultures of hippocampal neurons via its receptor. *Brain Res* 1636:193–199
- Wagner K, Couillard-Despres S, Lehner B, Brockhoff G, Rivera FJ, Blume A, Neumann I, Aigner L (2009) Prolactin induces MAPK signalling in neural progenitors without alleviating glucocorticoid-induced inhibition of in vitro neurogenesis. *Cell Physiol Biochem* 24:397–406
- Walker TL, Vukovic J, Koudijs MM, Blackmore DG, Mackay EW, Sykes AM, Overall RW, Hamlin AS, Bartlett PF (2012) Prolactin stimulates precursor cells in the adult mouse hippocampus. *PLoS One* 7:1–11