

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

---

Efecto de la interacción prolactina-estrógenos en la  
plasticidad sináptica del hipocampo

---

**Teresa Campillo Ferrer**

(Curso 2018-2019, convocatoria de Julio)

Máster Universitario en Neurociencia

**Tutor: Eduardo Daniel Martín Montiel**

Instituto Cajal (CSIC), Departamento de Neurobiología Funcional y de  
Sistemas, Laboratorio de Neurofisiología y Plasticidad Sináptica



# Indice

<b>Resumen</b> .....	2
<b>Palabras clave</b> .....	2
<b>Introducción</b> .....	3
<b>Antecedentes</b> .....	3
<b>Estradiol y prolactina</b> .....	4
<b>El hipocampo y su implicación en los mecanismos de memoria y aprendizaje</b> .....	6
<b>Hipótesis y objetivos</b> .....	8
<b>Materiales y Métodos</b> .....	9
<b>Modelo animal</b> .....	9
<b>Cirugía</b> .....	9
<b>Tratamientos</b> .....	9
<b>Procedimientos ex vivo</b> .....	11
<b>Registros electrofisiológicos</b> .....	11
<b>Análisis estadístico</b> .....	13
<b>Resultados</b> .....	15
<b>Seguimiento de los pesos corporales</b> .....	15
<b>Efectividad de la ovariectomía</b> .....	16
<b>Interacción prolactina-estrógenos en la plasticidad sináptica</b> .....	18
<b>Discusión</b> .....	24
<b>Conclusiones</b> .....	28
<b>Bibliografía</b> .....	29

## **Resumen**

### **RESUMEN**

El sistema endocrino (SE), junto con el sistema nervioso central (SNC), son fundamentales para los procesos de comunicación en nuestro organismo y el mantenimiento de la homeostasis. Si bien se conoce desde hace tiempo que el SE es capaz de regular la plasticidad del cerebro, no está bien establecido si la interacción de hormonas como la prolactina (PRL) y el estradiol modifican esta propiedad del SNC. Por lo tanto, el objetivo general de este trabajo de tesis, ha sido determinar el papel de la interacción de estas hormonas en la plasticidad sináptica a corto y largo plazo en el hipocampo. Para llevar a cabo este objetivo, se emplearon técnicas electrofisiológicas extracelulares en rodajas de cerebro de ratones, utilizando un modelo de hiperprolactinemia inducido por Domperidona en animales intactos y ovariectomizados. Además, se suprimió la actividad de las aromatasas con Letrozole para inhibir la síntesis endógena de estradiol. Los datos presentados sugieren que existe una acción sinérgica entre la PRL y el estradiol que es necesaria para mantener la plasticidad sináptica a largo plazo en condiciones de supresión de la función ovárica. Estos hallazgos experimentales pueden ayudarnos a comprender la compleja regulación de la fisiología del SNC por el SE.

### **ABSTRACT**

The endocrine system (ES) and the central nervous system (CNS) are both essential to the communication throughout the body and the maintenance of homeostasis. It is well established that ES modulates brain plasticity but it is not well establishing whether hormones interaction, such as estradiol and prolactin (PRL), may regulate CNS plasticity. Therefore, the main aim of the present work was to determine the role of these hormones in the short and long term synaptic plasticity in the hippocampus. To address this issue, we employed electrophysiological techniques in brain slices of mice, using a model of hiperprolactinemia induced by Domperidone in intact and ovariectomized animals. In addition, we also suppress the aromatase activity by Letrozole in order to block the endogenous synthesis of estradiol. Present data suggest that a synergistic action between PRL and  $\beta$ -estradiol is necessary to maintain the hippocampal long term synaptic plasticity under suppression of ovarian function. These findings will help us to understanding the complex regulation of CNS physiology by ES.

### **Palabras clave**

Domperidona, estradiol, hiperprolactinemia, letrozole, LTP, transmisión sináptica.

# Introducción

## Antecedentes

Los diferentes períodos de la vida reproductiva de las mujeres que están asociados a cambios hormonales como la fase pre-menstrual, embarazo, post-parto, lactancia y menopausia, han sido relacionados con modificaciones comportamentales, emocionales, físicas y cognitivas, lo que puede tener un impacto en la vida social y laboral de ciertas personas (Spataro et al., 2016).

En los últimos años, debido al creciente aumento de la esperanza de vida en occidente, el interés general por la fase menopáusica se ha incrementado, aumentando el número de estudios enfocados en este tema. Esta, si bien ha sido asociada a múltiples factores como étnicos, psicológicos, sociales y culturales, se sabe que se encuentra definida por modificaciones endocrinas, entre las que se destaca la disminución drástica de los niveles de estrógeno circulantes (File et al, 2001). Esta última, ha sido relacionada con alteraciones cognitivas y de memoria, lo que ha dado lugar a la realización de diversos estudios clínicos que ponen a prueba las terapias de reemplazo con estrógenos en mujeres post-menopáusicas (Maki et al., 2001), la administración de agonistas de estrógenos (Fluck et al., 2002) o, incluso, de suplementos de soja, los que pueden actuar, también, como agonistas de los mismos (File et al., 2001). En todos los estudios mencionados, se encontraron mejoras en ciertas habilidades cognitivas y en la memoria, especialmente en la verbal. De manera adicional, al inducir menopausia prematura mediante cirugía (ooforectomía o histerectomía) y llevar a cabo tratamientos de sustitución hormonal en mujeres post-menopáusicas, los estrógenos han sido asociados con un efecto de protección frente a la demencia, alteraciones cognitivas y enfermedad de Alzheimer (Kawas et al., 1997; Maki et al., 2000).

En estudios realizados con animales de experimentación, los trabajos que han relacionado el estradiol con los procesos de cognición y de memoria se han enfocado en estudiar el hipocampo. Esta estructura se encuentra relacionada, principalmente, con la memoria espacial y los mecanismos de potenciación a largo plazo, los cuales se explicarán en detalle más adelante. Así, se ha observado un aumento en la densidad de las espinas dendríticas y en la magnitud de la LTP de las sinapsis en las zonas CA3-CA1 del hipocampo al administrar estradiol exógeno (Córdoba Montoya y Carrer, 1997; Foy et al., 1999; Kramár et al., 2012) y durante las fases del ciclo estral en las que se presentan niveles elevados del mismo (Warren et al., 1995; Woolley et al., 1990). A pesar de esto, en la mayor parte de los estudios donde se ha evaluado la memoria espacial a lo largo del ciclo estral de roedores, no se han encontrado efectos o se observa un peor rendimiento cuando los niveles de estradiol son elevados (Berry et al., 1997). Sin embargo, al realizar los mismos ensayos, pero administrando estradiol endógeno, se han observado mejoras, sobre todo, en el contexto de la memoria espacial de trabajo (Luine et al., 1998).

Otro de los períodos de la vida reproductiva más estudiados ha sido el embarazo y la lactancia. Durante el embarazo, también se han registrado alteraciones cognitivas y de memoria al llevar a cabo

estudios clínicos. Al contrario que durante el período de lactancia, se encuentra una disminución del rendimiento en tareas de memoria durante esta etapa, sobre todo en aquellas que requieren una alta demanda del control ejecutivo (tareas de recuerdo libre), frente a las que requieren baja demanda (tareas de reconocimiento) (Spataro et al., 2016). Otras alteraciones observadas durante el embarazo son los estados de ánimo depresivos o la disminución en la calidad y el tiempo de sueño (Mindell et al., 2015; Spataro et al., 2016). A nivel estructural, el embarazo ha sido asociado a la disminución del tamaño cerebral y cambios en la amígdala, bulbo olfatorio o hipotálamo, conocidos por formar parte del “circuito materno” (Pawluski y Galea, 2007). El hipocampo, en un principio, no era considerado un componente del mismo pero, estudios más recientes realizados con animales de experimentación, muestran que, los procesos asociados a la maternidad, podrían llevar a mejorar la memoria espacial (Love et al., 2005), en discrepancia con los resultados observados en los estudios clínicos. Trabajos adicionales han encontrado aumentos en la densidad de espinas dendríticas de CA1 asociados a la maternidad y al número de crías por camada (Pawluski y Galea, 2007). Todas estas alteraciones observadas durante estos períodos podrían ser debidas, además, al incremento de los niveles de prolactina (PRL) producido durante los mismos, el cual ha sido relacionado con la maternidad y lactancia (Freemark et al., 1996).

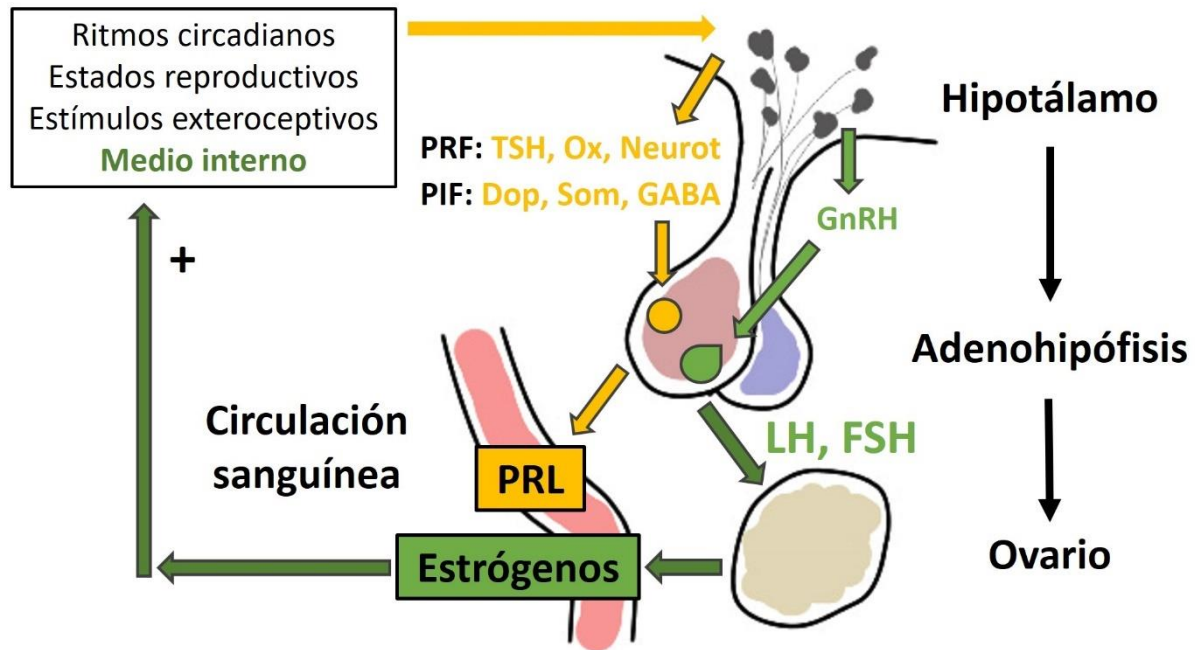
Todos estos estudios, en su conjunto, muestran la relación existente entre ciertas hormonas, como el estradiol y la PRL, y los mecanismos de plasticidad, en concreto en la zona del hipocampo.

### **Estradiol y prolactina**

El estradiol es un esteroide sexual estrogénico que procede principalmente de las gónadas y puede atravesar con facilidad la barrera hematoencefálica (Fester y Rune, 2014). Sin embargo, este también puede ser sintetizado de novo en el sistema nervioso central (SNC), por lo que es considerado un neuroesteroide. Concretamente, se ha observado la expresión de proteínas asociadas a la síntesis de estradiol, al igual que de receptores de estrógenos ER $\alpha$  y ER $\beta$ , en el hipocampo (Cole et al., 2019; Fester y Rune, 2014; Plassart-Schiess y Baulieu, 2001). La biosíntesis del mismo se inicia con el transporte del colesterol a través de la membrana mitocondrial, proceso mediado por la proteína reguladora de la estereidogénesis aguda (StAR). Mediante la actuación de una serie de rutas enzimáticas, este da lugar, finalmente, a testosterona, la cual puede ser transformada a estradiol por medio de aromatasas (Cole et al., 2019; Fester y Rune, 2014; Plassart-Schiess y Baulieu, 2001).

En cuanto al control de la liberación de estradiol, este es llevado a cabo por el eje Hipotálamo-hipófisis-gonadal (HPG; **Figura 1**). De esta manera, el hipotálamo sintetiza la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), la cual actúa a nivel de la adenohipófisis liberando, a su vez, hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH). Estas últimas hormonas, al actuar sobre las

gónadas, inducen la síntesis y liberación de estrógenos o testosterona, los cuales retroalimentan negativamente la síntesis y liberación de GnRH y LH/FSH. Adicionalmente, entran en juego otros factores como las activinas e inhibinas, que pueden sintetizarse tanto en las gónadas como en tejidos periféricos (Vadakkadath Meethal y Atwood, 2005).



**Figura 1:** Mecanismos reguladores de la síntesis de prolactina y estrógenos. Circuito en amarillo: estímulos como los ritmos circadianos, diferentes estados reproductivos, estímulos exteroceptivos o cambios en el medio interno del animal estimulan el hipotálamo, induciendo liberación de PRF y PIF, los cuales, a su vez, regulan la síntesis y liberación de PRL al incidir sobre las células lactotrofas de la adenohipófisis. Circuito en verde: Por otra parte, la hormona GnRH es liberada por el hipotálamo, incidiendo sobre la adenohipófisis e induciendo liberación de LH y FSH. Estas últimas hormonas, al actuar a nivel ovárico, aumentan la liberación de estrógenos al torrente sanguíneo, los cuales, a su vez, incrementan la síntesis de PRL. PRL: prolactina; LH: hormona luteinizante; FSH: hormona folículo estimulante; GnRH: hormona liberadora de gonadotropinas; PRF: factores liberadores de prolactina; PIF: factores inhibidores de prolactina; TSH: hormona liberadora de tirotrópina; Ox: oxitocina; Neurot: neurotensina; Dop: dopamina; Som: somatostatina; GABA: ácido gamma-aminobutírico. La adenohipófisis aparece coloreada en rojo.

La PRL, por otra parte, es una hormona polipeptídica cuya síntesis es llevada a cabo, mayoritariamente, por las células lactotrofas de la adenohipófisis, aunque esta función puede encontrarse en otros órganos y tejidos como el SNC y, en concreto, el hipocampo (Cabrera-Reyes et al., 2017; Freeman et al., 2000; Patil et al., 2014). Al igual que ocurría en el caso del estradiol, los receptores de PRL han sido encontrados a lo largo del SNC y en el hipocampo, si bien se conoce la presencia otros receptores específicos y adicionales que permiten el paso de la PRL a través de los plexos coroideos (Freeman et al., 2000). Aunque esta hormona ha sido clásicamente asociada a la lactancia, actualmente es considerada una hormona pleiotrópica, de la que se conocen más de 300 funciones diferentes desempeñadas por la misma, entre las que destacan las relacionadas con la reproducción y la homeostasis

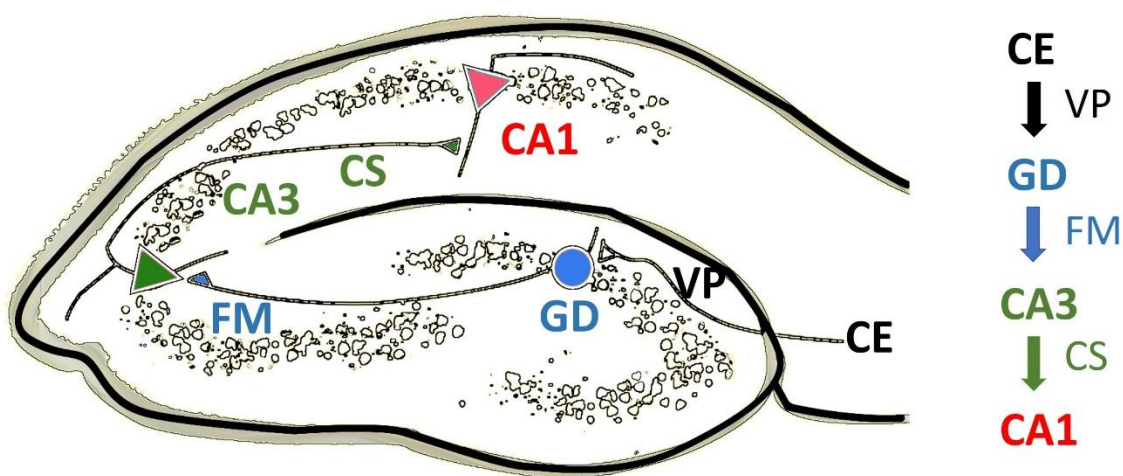
(Cabrera-Reyes et al., 2017; Freeman et al., 2000; Patil et al., 2014). Sin embargo, este carácter pleiotrópico puede resultar un inconveniente en el contexto de la investigación con animales de experimentación, ya que, las funciones que se atribuyen a la hormona, difieren según la especie objeto de estudio (Freeman et al., 2000).

Debido a que las células lactotrofas presentan actividad tónica, el hipotálamo ejerce principalmente funciones inhibitorias sobre estas, existiendo un complejo sistema de regulación alrededor de las mismas (Freeman et al., 2000; Martín-Pérez, 2005). Los niveles de PRL pueden aumentar, por lo tanto, a lo largo del día (debido a la liberación de PRL regulada por los ritmos circadianos), los diferentes estados reproductivos, en respuesta a estímulos exteroceptivos como la luz, sonidos, succión en las mamas, olores o estrés, y en respuesta al medio interno. Con respecto a esto último, los esteroides ováricos y, en concreto, el estradiol, aumentando la liberación de PRL (Freeman et al., 2000). Todos estos estímulos actúan, finalmente, a nivel de hipocampo (**Figura 1**), traducándose en la expresión de factores liberadores de PRL (PRF) o factores inhibidores de PRL (PIF). Entre los primeros, destacan la hormona liberadora de tirotropina (TSH), la oxitocina y neurotensina; entre los segundos, destacan la dopamina, somatostatina y el ácido gamma-aminobutírico (GABA). Estos factores, que también pueden ser liberados por células vecinas y otras células lactotrofas cercanas, abandonan el hipocampo y alcanzan la eminencia media o el lóbulo intermedio de la hipófisis, terminando, en último lugar, en la adenohipófisis, donde ejercen sus acciones sobre las células lactotrofas (Freeman et al., 2000; Martín-Pérez, 2005).

## **El hipocampo y su implicación en los mecanismos de memoria y aprendizaje**

El hipocampo, como ya se ha comentado, ha sido una estructura comúnmente asociada con los mecanismos de formación de la memoria y el aprendizaje, la cual se relaciona principalmente con la memoria declarativa, siendo clave en los procesos de integración de la memoria espacial y episódica (Bliss et al., 2018; Eichenbaum, 2004; Sarvey et al., 1988). Aunque el hipocampo posee una estructura compleja, se diferencia de manera principal un circuito excitatorio tri-sináptico (**Figura 2**), donde la información recibida por estructuras corticales y subcorticales viaja desde el córtex entorrinal hasta el giro dentado, transmitiéndose por medio de la vía de las fibras musgosas hacia las neuronas piramidales situadas en el área CA3 del hipocampo. Posteriormente, la información viaja, mediante los colaterales de Schaffer, hacia las neuronas piramidales de CA1 y regresa hacia estructuras corticales y subcorticales. De manera adicional, el hipocampo es capaz de recibir información con función moduladora proveniente del tronco del encéfalo, principalmente enviada desde el locus coeruleus, substantia nigra, núcleos del rafe y núcleos septales mediales (Eichenbaum, 2004; Sweatt, 2008). Cuando las sinapsis excitatorias son sometidas a una estimulación repetitiva de alta frecuencia, se produce un incremento en la eficacia sináptica que puede desencadenar procesos plásticos de corta duración (minutos), denominados

procesos de potenciación a corto plazo, o procesos que pueden llegar a durar horas y días, también llamados procesos de potenciación a largo plazo (LTP) (Bliss et al., 2018; Sweatt, 2008). Entre los procesos de potenciación a corto plazo podemos destacar la potenciación post-tetánica (PTP), durante la cual se producen modificaciones únicamente a nivel presináptico, posiblemente debidas a la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  (Sweatt, 2008). Sin embargo, la LTP, por lo general, es de origen postsináptico y ha sido utilizada como modelo celular de la formación y almacenamiento de la memoria, presentando características como especificidad, asociatividad y cooperatividad, las cuales actúan como mecanismos de filtración y coincidencia de los estímulos (Bliss et al., 2018; Eichenbaum, 2004; Malenka y Nicoll, 1999).



**Figura 2: Principal circuito excitatorio del hipocampo.** Se diferencian tres etapas: 1) La información recogida de estructuras corticales y subcorticales es transmitida por medio de la vía perforante desde el cortex entorrinal hasta las células granulares del giro dentado del hipocampo. 2) Éstas, a su vez, transmiten la información hacia las neuronas piramidales del área CA3 del hipocampo por medio de la vía de las fibras musgosas. 3) Las neuronas piramidales del área CA3 contactan con las del área CA1 por medio de la vía de los colaterales de Schaffer. Una vez procesada la información, estas últimas neuronas contactan nuevamente con las estructuras corticales y subcorticales. CE: cortex entorrinal; VP: vía perforante; GD: giro dentado; FM: fibras musgosas; CA3: área CA3 del hipocampo; CS: colaterales de Schaffer; CA1: área CA1 del hipocampo.

Aunque los mecanismos que subyacen al desarrollo de la LTP son comunes, pueden existir variaciones según la zona del SNC estudiada. En este trabajo, en concreto, se exponen los mecanismos referentes a las sinapsis de CA3-CA1. Así, en un principio, el glutamato liberado a la hendidura sináptica, actúa sobre los receptores AMPA ionotrópicos, permitiendo el paso de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  hacia el espacio intracelular. Esto produce una despolarización en la membrana celular de las espinas dendríticas, que puede ser potenciada al disminuir la inhibición mediada por interneuronas GABAérgicas. Esta despolarización permite el desbloqueo de los receptores NMDA, que hasta ahora se encontraban bloqueados por  $\text{Mg}^{2+}$ . De esta manera, se permite el paso de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el interior celular y la activación de receptores metabotrópicos de glutamato, canales de  $\text{Ca}^{2+}$  y mecanismos regulados por diferentes



quinasas como la Calcio-calmodulina quinasa II (CaMKII), Proteína quinasa A (PKA), Proteína quinasa C (PKC) o las Proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK). Estas quinasas, a su vez, pueden interactuar con los receptores AMPA y NMDA (Bliss et al., 2018; Malenka & Nicoll, 1999; Sarvey et al., 1988).

Para que se desarrolle la LTP, sin embargo, se debe llevar a cabo una estimulación de alta frecuencia. De esta manera, los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares son lo suficientemente elevados como para activar a la CaMKII de manera constitutiva (la cual se autofosforila al entrar en contacto con  $\text{Ca}^{2+}$ ), haciéndola inmune a la actuación de las fosfatasa. Si la estimulación aplicada, de lo contrario, es de baja frecuencia, los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  son insuficientes, por lo que se potencia la actuación de las fosfatasa y la internalización de los receptores de glutamato, desarrollándose depresión a largo plazo (LTD). Finalmente, las quinasas activadas durante la LTP pueden inducir la transcripción de RNAm localizado en las espinas dendríticas o transcripción de genes somáticos. Así, se lleva a cabo una síntesis de proteínas relacionadas con el mantenimiento de las sinapsis y la remodelación de las espinas dendríticas, las cuales se sabe que sufren cambios estructurales relacionados con los procesos plásticos de memoria y aprendizaje (Bliss et al., 2018; Malenka & Nicoll, 1999; Sarvey et al., 1988).

## Hipótesis y objetivos

Datos experimentales previos indican que el Sistema Endocrino ejerce una importante acción sobre la plasticidad del sistema nervioso. Diferentes estudios ponen en evidencia la presencia de PRL y sus receptores en distintas regiones del cerebro, entre ellas el hipocampo, pero su función y mecanismos de acción son totalmente desconocidos. Teniendo en cuenta estos datos y la participación del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal en la función sináptica, formulamos, como hipótesis de trabajo, que la interacción estradiol-PRL está involucrada en la regulación de la plasticidad sináptica del hipocampo.

Teniendo en cuenta esta hipótesis, planteamos como objetivo general **determinar si la PRL y su interacción con el estradiol endógeno modifican la plasticidad sináptica del hipocampo a corto y largo plazo**. Para desarrollar este objetivo general nos propusimos llevar a cabo los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar el papel que la PRL puede tener en la plasticidad sináptica a largo plazo en el hipocampo empleando un modelo de hiperprolactinemia inducido por Domperidona.
2. Analizar los efectos de la supresión de estradiol endógeno sobre la plasticidad sináptica del hipocampo en animales ovariectomizados.
3. Determinar el papel de la PRL en condiciones de inhibición del eje hipotálamo hipofisario gonadal y ausencia de estradiol endógeno.

## Materiales y Métodos

### Modelo animal

Los experimentos se realizaron con 16 ratones hembra de la cepa RjHan:NMRI, con una edad de 6/8 semanas y un peso inicial de una media de 29 g (los pesos iniciales son registrados antes de los procedimientos quirúrgicos). Estos animales conviven juntos (4 ratones por alojamiento) durante todo el período de tiempo que se encuentran en el animalario, con alimentación y bebida *Ad libitum*. La cepa se caracteriza por presentar menos del 1% de consanguinidad por generación, ser dócil y fácilmente manejable, y cumplir los estándares de SPF (libre de patógenos) y SOPF (libre de patógenos y oportunistas). Además, sus hembras tienen un mayor número de crías por camada y presentan niveles de estrés menores en el contexto de la maternidad (Ficha técnica Janvier Labs, Francia).

Todos los procedimientos experimentales fueron realizados siguiendo la normativa vigente a nivel comunitario (Directiva 2010/63/UE) y estatal (Real Decreto 53/2013), bajo la aprobación de la Consejería de Medio Ambiente, administración local y ordenación del territorio de la Comunidad de Madrid (referencia PROEX 036/18).

### Cirugía

Los 16 animales son sometidos a cirugía limpia en posición de decúbito prono y bajo anestesia inhalatoria con Isoflurano (3% inducción y 0,8-1,5% mantenimiento; Zoetis, España). Se separaron dos grupos, 7 de los animales fueron ovariectomizados (OVX), mientras que, a modo de control y bajo las condiciones anteriores, se localizan los ovarios de los 9 restantes, sin realizar la extracción de los mismos (SHAM). Posteriormente, se marca a los animales mediante incisiones en las orejas para su correcta identificación. Finalmente, se administra Meloxicam (Metacam) subcutáneo a una dosis de 2 mg/Kg como analgésico post-quirúrgico y se vigila el estado de los animales durante los siguientes días.

### Tratamientos

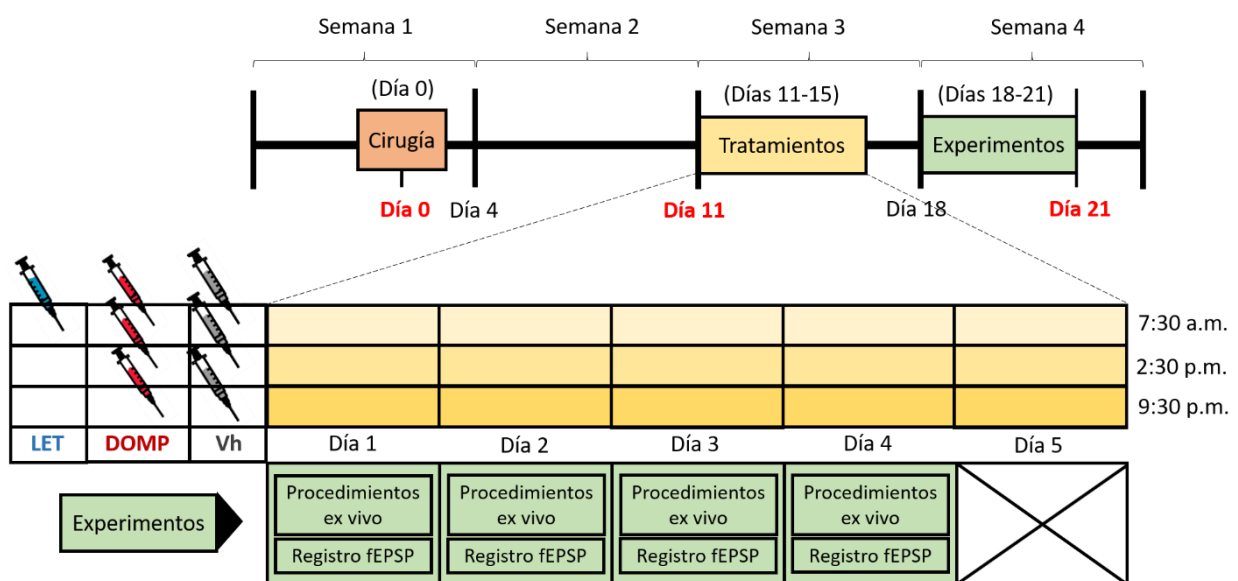
Los días 11-15 después de la cirugía se llevan a cabo los tratamientos correspondientes, formando 6 grupos experimentales (**Tabla 1**), randomizados al azar. Además, durante los tratamientos, se realizó un seguimiento diario del peso corporal de los animales (7:30 a.m.). Con los pesos registrados el día de la cirugía y el día del procedimiento *ex vivo*, se calcula el peso relativo (diferencia de peso entre ambos días) de cada animal. Tanto los ratones OVX como sus controles SHAM, fueron tratados intraperitonealmente (**Tabla 1 y Figura 3**) con 20 µg/g peso corporal de Domperidona (Tocris, USA)

(OVX-DOMP y DOMP, respectivamente), Domperidona más Letrozole (10 µg/g peso corporal, Tocris, USA) (OVX-DOMP IP+LET y DOMP, respectivamente) o con el vehículo correspondiente [DMSO (Sigma-Aldrich, Alemania) y suero salino (Sigma-Aldrich, Alemania)], a modo de control (OVX-Vh y CTRL-Vh, respectivamente). Se administraron 3 inyecciones diarias (7:30 a.m., 2:30 p.m. y 9:30 p.m.) de Domperidona o vehículo y una inyección diaria (7:30) de Letrozole. En todos los casos, el volumen total administrado en cada inyección fue de 100 µl por cada 10 gramos de peso corporal (**Figura 3**).

**Tabla 1: Grupos experimentales según tipo de tratamiento.**

SHAM	CTRL-Vh	DOMP	DOMP+LET
	Vehículo (Suero salino + DMSO)	Domperidona	Domperidona + Letrozole
Vía administración	Intraperitoneal	Intraperitoneal	Intraperitoneal
Volumen administrado	100 µl/10g	100 µl/10g	100 µl/10g
Dosis administrada		20 µg/g	Domp 20 y Let 10 µg/g
OVX	OVX-Vh	OVX-DOMP	OVX-DOMP+LET
	Vehículo (Suero salino + DMSO)	Domperidona	Domperidona + Letrozole
Vía administración	Intraperitoneal	Intraperitoneal	Intraperitoneal
Volumen administrado	100 µl/10g	100 µl/10g	100 µl/10g
Dosis administrada		20 µg/g	Domp 20 y Let 10 µg/g

**Figura 3: Diseño experimental:**



## Procedimientos ex vivo

Los ratones fueron pesados y sacrificados rápidamente mediante decapitación. Previa craneotomía y posterior laparotomía, se extrajeron, respectivamente, los cerebros y úteros.

1. Obtención de rodajas de cerebro: Tras la craneotomía, los cerebros fueron sumergidos inmediatamente en líquido cefalorraquídeo artificial (LCRA) compuesto por (en mM) NaCl 124, KCl 2.69, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.25, MgSO<sub>4</sub> 2, NaHCO<sub>3</sub> 26, CaCl<sub>2</sub> 2 y glucosa 10, (Sigma-Aldrich, Alemania). Este LCRA fue gaseado con carbógeno (95% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub>), ajustado a pH de 7,4 y enfriado a 4°C. Posteriormente, se realizaron cortes transversales de cerebro (350 µm de espesor), en los que se incluía el hipocampo, con un vibrátomo (The Vibratome Company, EEUU). Las rodajas fueron transferidas a una cámara de incubación, con LCRA gaseado continuamente con carbógeno a temperatura ambiente durante aproximadamente 60 minutos.

2. Extracción del útero: Tras la histerectomía, los úteros fueron secados ligeramente sobre papel de filtro, pesados con una báscula de precisión y fotografiados sobre papel milimetrado para establecer su volumen y dimensiones. Esto, nos permitió comprobar la efectividad de las ovariectomías y del tratamiento con Letrozole. Una vez registrados los pesos, se calcularon los índices organosomáticos (IO) de los úteros (calculados como el cociente del peso de cada útero en mg y el peso corporal del animal en g correspondiente). Posteriormente, haciendo uso de las fotografías y con ayuda de Photoshop CC 2018, se calcula y promedia la longitud y anchura (en la zona media) de los dos cuernos uterinos de cada útero, normalizando las medidas con la cuadrícula del papel milimetrado.

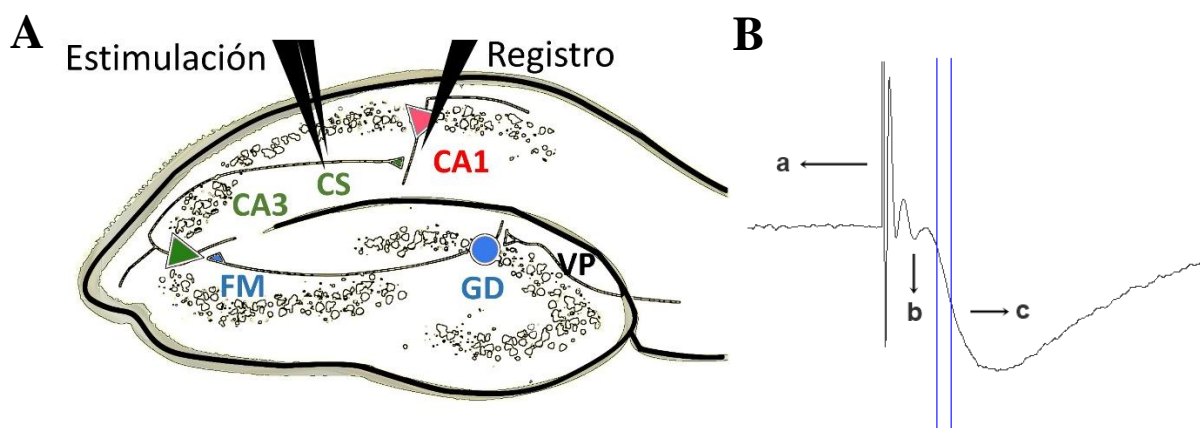
## Registros electrofisiológicos

Las rodajas fueron transferidas a una cámara de inmersión para registro y perfundidas continuamente (2-2,5 ml/min) con LCRA a 30°C, gaseado con carbógeno. A continuación, se realizaron registros electrofisiológicos extracelulares en la zona del hipocampo, estimulando las fibras colaterales de Schaffer mediante un electrodo bipolar de tungsteno colocado en el stratum radiatum de CA1 (**Figura 4A**). De esta manera, se registraron los potenciales de campo postsinápticos excitadores (fEPSPs) a través de un electrodo de fibra de carbono, colocado en el stratum radiatum de la capa dendrítica de CA1 (**Figura 4A y B**).

Una vez colocados los electrodos, se aumenta progresivamente la intensidad de estimulación (0-10 V) y se observa la respuesta de los fEPSPs para evaluar la transmisión sináptica basal de las rodajas en cada experimento. Se descartaron registros contaminados con una espiga poblacional de campo o aquellos con una amplitud de los fEPSPs inferior a 1,0 V. Una vez establecidos los valores máximos de estimulación para cada caso, se ajustó la misma a un 60-70% de la intensidad necesaria

para provocar la amplitud máxima de los fEPSPs. Una vez estabilizados los registros (45-70 min.), se establece una curva de respuesta entrada-salida (curva I-O, **Figura 5**), midiendo la pendiente de los fEPSPs al estimular las rodajas con intensidades crecientes.

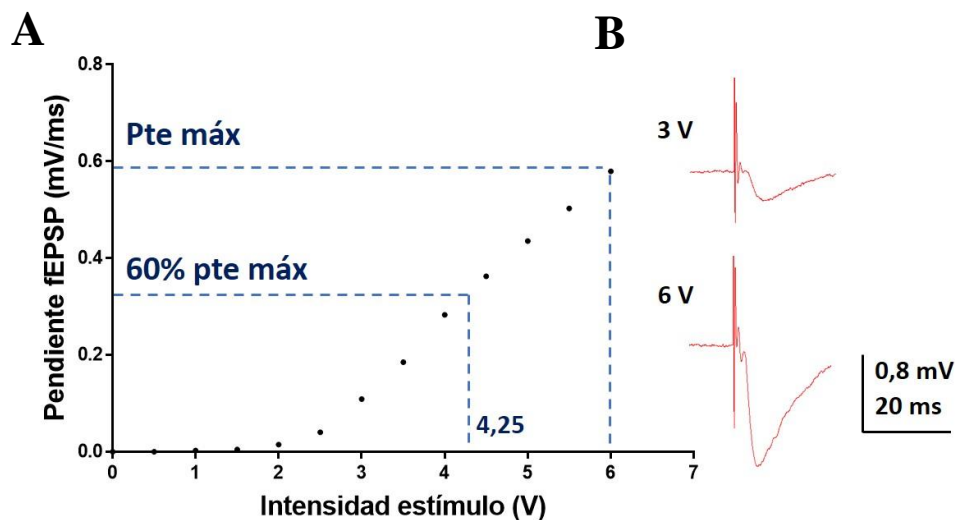
Seguidamente, se ajusta la intensidad de estimulación a la necesaria para observar el 60% de la pendiente máxima de los fEPSPs en el registro. Con esta intensidad se adquieren registros de fEPSPs basales durante 5-10 minutos y, a continuación, se induce una LTP mediante un protocolo de estimulación, empleando trenes de pulsos a la frecuencia del ritmo theta hipocampal (Theta-Burst, TBS). Este protocolo consiste en la aplicación de 4 trenes de 1 s de duración separados por 30 s. Cada tren está compuesto por 10 ráfagas de pulsos (1 ms, 10 Hz), separadas a su vez por 200 ms (**Figura 6A**). Una vez finalizado el protocolo, se estimulaba de manera continua, nuevamente, para registrar los cambios en los fEPSPs post-TBS durante 60 minutos. Las rodajas cuyos registros eran inestables, fueron descartadas.



**Figura 4:** Representación gráfica de la localización de los electrodos de registro y estimulación en el hipocampo. **A.** El electrodo de estimulación (bipolar) se encuentra sobre el stratum radiatum del área CA1 del hipocampo, por donde transcurren los axones (colaterales de Schaffer) de las neuronas piramidales de CA3. El electrodo de registro se sitúa sobre el stratum radiatum del área dendrítica de CA1, donde se establecen sinapsis entre CA3 y el árbol dendrítico de CA1. CE: cortex entorrinal; VP: vía perforante; GD: giro dentado; FM: fibras musgosas; CA3: área CA3 del hipocampo; CS: colaterales de Schaffer; CA1: área CA1 del hipocampo. **B.** Registro extracelular donde se puede distinguir: (a) artefacto, (b) potencial de acción presináptico, (c) potencial de campo postsináptico excitador (fEPSP). El fragmento lineal del fEPSP (zona delimitada en azul) se corresponde con la ventana utilizada para calcular la pendiente del mismo.

Los registros extracelulares se realizaron en un puesto de electrofisiología situado sobre una mesa flotante neumática, alojado en el interior de una jaula de Faraday conectada a tierra para minimizar las vibraciones mecánicas y las interferencias electromagnéticas. Sobre la mesa se disponía la cámara de registro, dos micromanipuladores (NMN-21, Narishige International, Japón) y un microscopio (BX51WI, Japón). El sistema de perfusión estaba conectado a una bomba peristáltica continua (Minipuls

3, Francia), fuera de la jaula, que permitía mantener un flujo constante de aCSF en la cámara de registro durante todo el experimento, y a un controlador de temperatura automático TC-324B (Warner instrument corporation, EEUU). El electrodo de fibra de carbono (0.4-1.2 M $\Omega$ ; Carbostar-1, Kation Scientific, EEUU) fue conectado a un amplificador (AC/DC Differential Amplifier 3000, A-M Systems, EEUU) y a un filtro activo de 50-60Hz (HumBug, Quest Scientific, Canadá). La señal obtenida se digitalizaba a través de un sistema de adquisición de datos (Digidata 1440A, Molecular Devices, EEUU) conectado a un ordenador personal, donde se visualizaba y almacenaba la misma haciendo uso del paquete de programas pClamp 10 (Molecular Devices, EEUU).



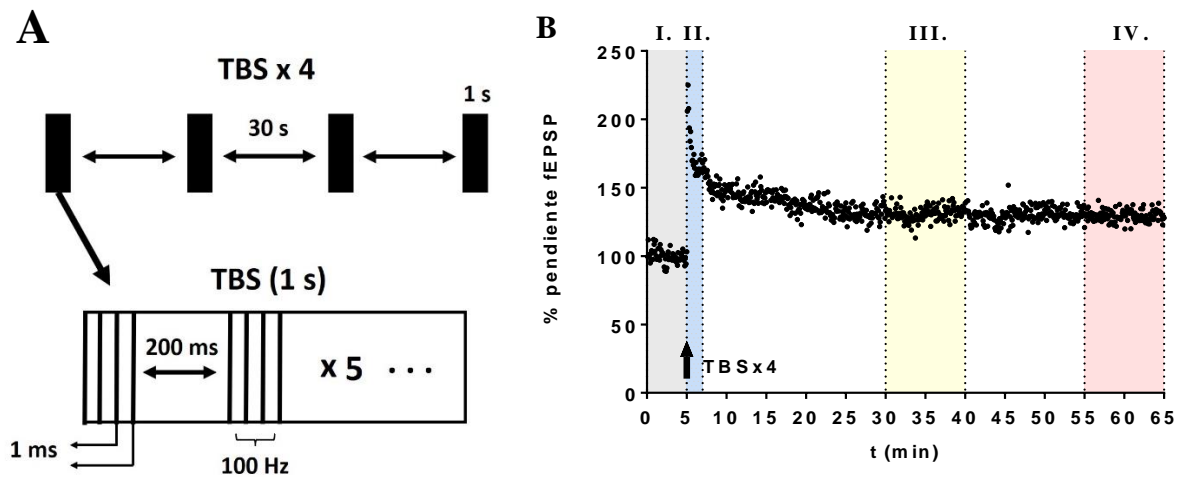
**Figura 5:** Curva de respuesta entrada-salida (I-O). **A.** Se observa la relación entre la pendiente de los fEPSPs (mV/ms) y la intensidad de estímulo aplicada de manera creciente (0-6 V). Se presentan los valores de intensidad de estimulación para los cuales la pendiente de los fEPSPs es máxima (6 V) o del 60% (4,25 V). **B.** Registros representativos de los fEPSPs obtenidos al estimular a 3 V y 6 V.

### Análisis estadístico

El análisis de los datos se lleva a cabo con el programa GraphPad Prism 7. Antes de ser analizados, los datos obtenidos durante los registros electrofisiológicos son promediados de manera que se obtiene un valor para cada rodaja por cada período del registro analizado (5' Basal, 2' PTP, 10' LTP int y 10' LTP; **Figura 6B** para más información).

Para establecer las diferencias entre los registros basales y los diferentes períodos del registro analizados, se realizaron test de *t*-student, haciendo uso de tests paramétricos en caso de que los datos presentaran distribución normal y varianzas iguales, del Test de Mann-Whitney en caso de que los datos no presentaran una distribución normal, y del Test de Welch en caso de que los datos presentaran

varianzas diferentes. De la misma manera, se analizaron los datos referentes a la longitud y anchura de los úteros pertenecientes al grupo SHAM y OVX.



**Figura 6. Inducción de la potenciación a largo plazo.** **A.** Protocolo de estimulación a frecuencia Theta (TBS). Duración del tren de pulsos=1 s, intervalo entre trenes de pulsos=30 s, N° de repeticiones del tren=4 (TBSx4), N° de Burst por tren=10, intervalo entre Burst= 200 ms, frecuencia de estimulación dentro de los Burst=100 Hz, duración de los estímulos dentro del Burst=1 ms. **B.** Curso temporal de la LTP. Los valores fueron normalizados con respecto al promedio de las pendientes de los fEPSPs obtenidas durante el período basal. Los períodos de tiempo escogidos para llevar a cabo análisis estadísticos fueron: **I.** 5 minutos de registro basal (5' Basal), **II.** 2 minutos del registro correspondiente con la fase de PTP (2' PTP, minutos 0-2 posteriores al TBS), **III.** 10 minutos del registro correspondiente con la fase intermedia de la LTP (10' LTP int, minutos 25-35 posteriores al TBS) y **IV.** 10 minutos del registro correspondiente con la fase final de la LTP (10' LTP, minutos 50-60 posteriores al TBS).

El resto de datos son analizados mediante ANOVA de una vía, haciendo uso del Test de Turkey. En caso de obtener  $P < 0.9$  en este y no observarse resultados significativos u obtener resultados significativos débiles, se analizan los grupos experimentales correspondientes mediante *t*-student.

## Resultados

Diversos estudios experimentales previos, indican que la plasticidad sináptica es modificada por la acción de distintas hormonas en general y el estradiol en particular (Córdoba Montoya y Carrer, 1997; Pawluski y Galea, 2007). No obstante, se desconoce la interacción entre las hormonas sexuales y aquellas implicadas en procesos fisiológicos particulares como la gestación y la lactancia. En concreto, el efecto de la interacción entre estradiol y PRL sobre la plasticidad sináptica es desconocido. Para dilucidar esta cuestión, estudiamos esta posible interrelación en la potenciación sináptica a corto y largo plazo en el hipocampo, una estructura que ha sido asociada con la memoria espacial y episódica (Eichenbaum, 2004).

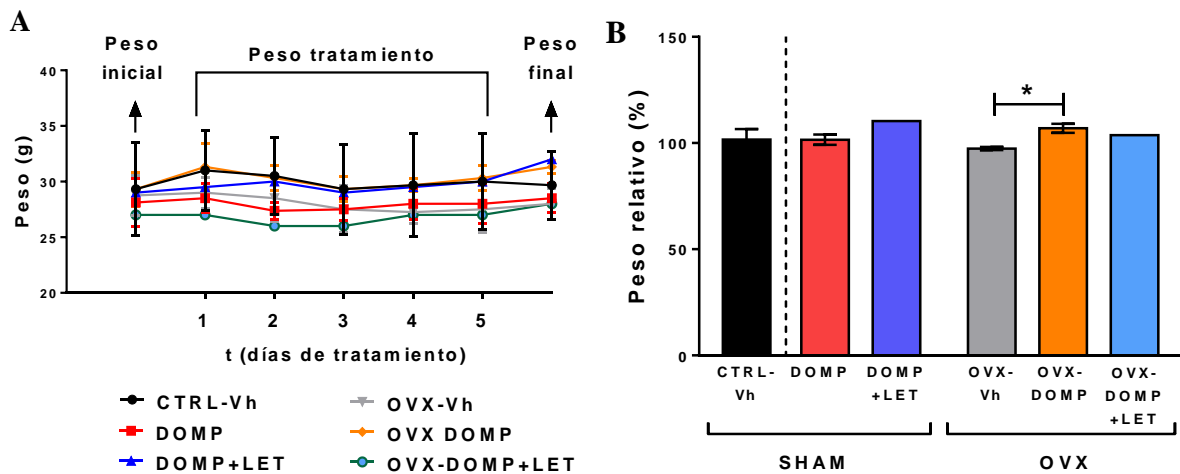
Para determinar el efecto de los estrógenos sobre la plasticidad sináptica en nuestras condiciones experimentales, empleamos hembras ovariectomizadas para suprimir la producción endógena de estradiol. Por otra parte, se establecieron grupos experimentales a los que se les suministró Letrozole, un potente inhibidor de las aromatasas (Fester y Rune, 2014), con el objeto de impedir la síntesis endógena de estrógenos extra-ovárica. El N experimental en estos últimos es bajo (1 animal en cada caso), ya que constituyeron una serie de experimentos preliminares realizados con la idea de darle continuidad futura al presente trabajo. Ambos grupos experimentales fueron tratados, a su vez, con Domperidona, un antagonista dopaminérgico que incrementa los niveles de PRL en suero (Nasello et al., 1997), para establecer los efectos de esta hormona sobre la transmisión sináptica y su interacción con los estrógenos.

### Seguimiento de los pesos corporales

En primer lugar, se determinó la evolución del peso corporal de los ratones sometidos a los distintos tratamientos para establecer el impacto de los mismos sobre el estado general de los animales. Para ello, se realizó un control del peso corporal (**Figura 3 y Figura 7A**) el día de la cirugía (peso inicial), durante el tratamiento con los distintos fármacos o vehículos (peso tratamiento) y el día del procedimiento ex vivo (peso final). En general, se observa un mantenimiento del peso de los animales (**Figura 7A**) después de realizar las cirugías. Una vez iniciados los tratamientos, estos disminuyen en la mayor parte de los grupos experimentales durante los 2 primeros días, posiblemente debido al estrés causado por la ausencia de habituación al procedimiento, aunque se recuperan a lo largo de los días restantes de tratamiento y hasta el día del procedimiento ex vivo. Adicionalmente, si se analizan las ganancias o pérdidas de peso (peso relativo, **Figura 7B**) que presentan los animales a lo largo de todo el experimento (peso final-peso inicial) no se observan grandes cambios, obteniéndose únicamente diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales OVX-Vh y OVX-DOMP



(Test de *t*-student,  $P < 0,0443$ ). Estos datos nos indican que los distintos tratamientos no repercuten en el estado general de los animales, excepto en el caso de los ratones OVX.

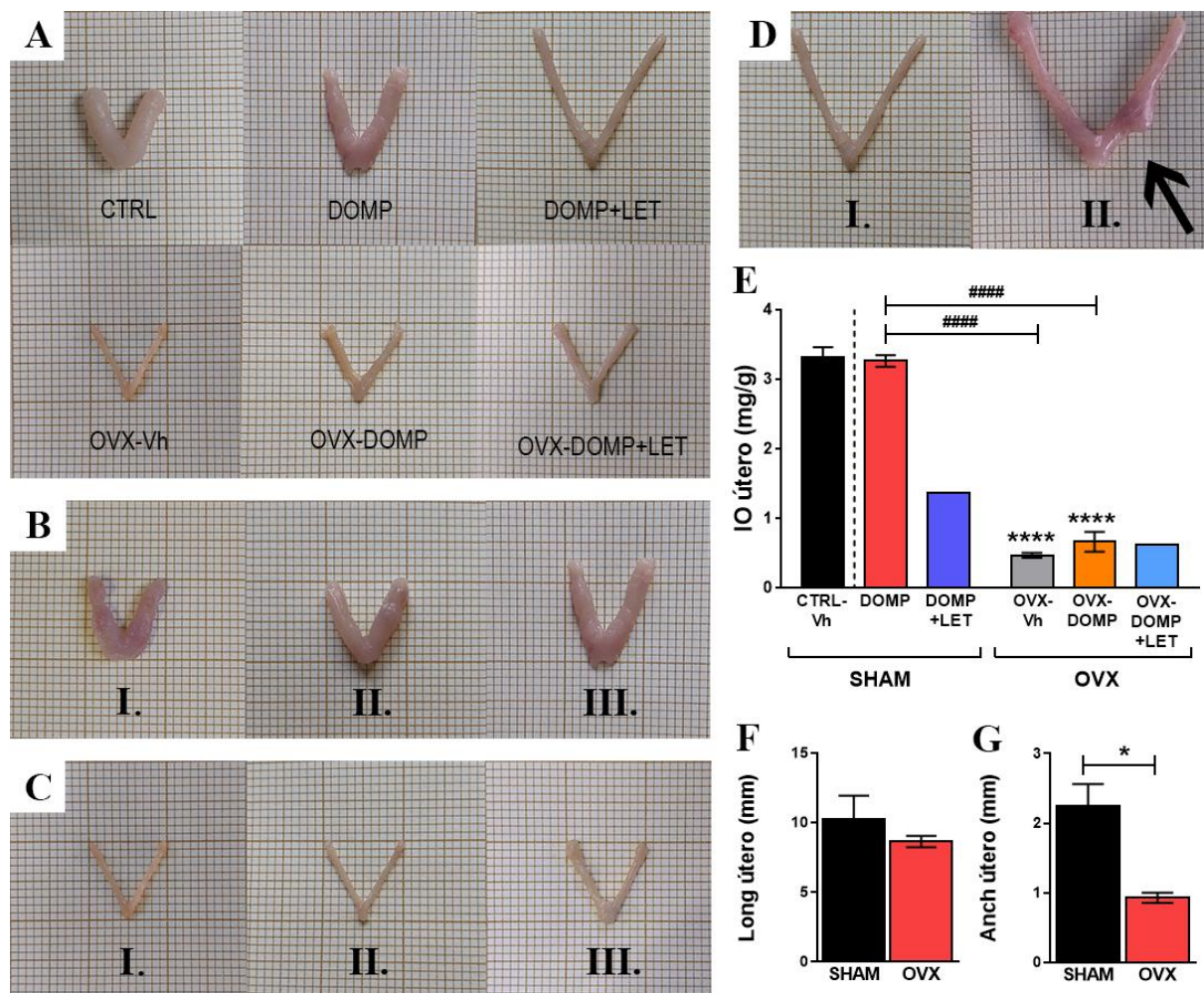


**Figura 7: Evolución del peso corporal en los distintos grupos experimentales.** **A.** Curso temporal de los valores medios ( $\pm$  SEM) del peso corporal (g) de los animales de cada grupo experimental (CTRL-Vh N = 3; DOMP N = 4; DOMP+LET N = 1; OVX-Vh N = 2; OVX-DOMP N = 3; OVX-DOMP+LET N = 1). Peso inicial = peso el día de la cirugía; Peso tratamiento = pesos registrados durante cada uno de los días de tratamiento; Peso final = peso el día de los experimentos ex vivo. **B.** Valores medios ( $\pm$  SEM) del peso relativo (g) de los animales de cada grupo experimental SHAM: CTRL-Vh N = 3, DOMP N = 4, DOMP+LET N=1 y OVX: OVX-Vh N = 2, OVX-DOMP N = 3, OVX-DOMP+LET N = 1, calculado como la diferencia entre el peso final y el inicial (\* $P < 0,0443$ ; test de *t*-student).

## Efectividad de la ovariectomía

Para llevar a cabo un control de la eficacia de las ovariectomías y el tratamiento con Letrozole, los cuales disminuyen el tamaño del útero por ausencia del efecto trófico del estradiol (Evans et al., 1941), los úteros fueron extraídos, pesados y fotografiados tras la decapitación. El cálculo del índice IO de los úteros (**Figura 8E**) permite detectar las variaciones en el peso de este órgano teniendo en cuenta la variabilidad en cuanto al peso corporal de los animales. De esta manera, se observó una disminución estadísticamente significativa de los IO de los úteros entre los grupos experimentales OVX y SHAM (OVX-Vh, N = 2 vs. CTRL-Vh, N = 3,  $P < 0,0001$ ; OVX-Vh, N = 2 vs. DOMP, N = 4,  $P < 0,0001$ ; OVX-DOMP, N = 3 vs. CTRL-Vh, N = 3,  $P < 0,0001$ ; OVX-DOMP, N = 3 vs. DOMP, N = 4,  $P < 0,0001$ ; ANOVA de 1 vía, Test de Turkey para todos los casos). Debido al número de muestras (N = 1), los IO de los úteros de los grupos experimentales tratados con Letrozole no se analizaron estadísticamente. No obstante, el IO del útero del grupo OVX-DOMP+LET sigue la tendencia del resto de animales OVX, mientras que el del grupo experimental DOMP+LET disminuye hasta presentar unos valores de aproximadamente el 50% del IO de los úteros del resto de animales SHAM.

Adicionalmente, al observar las fotografías tomadas de los úteros extraídos (**Figura 8A**), se encontraron diferencias cualitativas en cuanto a su morfología y color al comparar diferentes grupos experimentales. Uno de los cambios visuales más relevantes fue el marcado aumento de la consistencia, irregularidad de la forma y viraje de color hacia tonos más rosados que presentaron los úteros pertenecientes a los animales DOMP (**Figura 8B I, II y III**), en comparación con el resto de grupos experimentales. Además, la disminución del IO de los úteros extraídos de animales OVX frente a SHAM fue a expensas, mayormente, del grosor de los cuernos uterinos y no de su longitud (**Figura 8A**). Curiosamente, en los animales SHAM tratados con letrozole, aumentaba marcadamente la longitud (**Figura 8A y D**).



**Figura 8:** Características cualitativas y cuantitativas de los úteros para los distintos grupos experimentales **A**. Fotografías representativas de cada grupo experimental (SHAM, fila superior, y OVX, fila inferior). **B**. Fotografías de 3 de los úteros extraídos del grupo experimental DOMP. **C**. Fotografías de los 3 úteros extraídos del grupo experimental OVX-Vh. El útero III fue excluido de los experimentos. **D**. Fotografías de los 2 úteros extraídos del grupo experimental DOMP+LET. El útero II fue excluido de los experimentos, la flecha negra señala la tumoración que presentaba. **E**. Valores medios ( $\pm$  SEM) de los índices organosomáticos (IO útero) calculados como el cociente del peso de cada útero (mg) y el peso corporal del animal (g), para cada grupo experimental (SHAM: CTRL-Vh N = 3, DOMP N = 4, DOMP+LET N = 1; OVX: OVX-Vh N = 2, OVX-DOMP N = 3, OVX-DOMP+LET N = 1). Valores estadísticamente significativos establecidos por ANOVA de 1 vía, Test de

Turkey a  $***P = 0,0004$ ,  $****P < 0,0001$ ,  $###P = 0,0004$ ,  $####P = 0,0001$ . Valores medios ( $\pm$  SEM) de la longitud (**F**) y anchura (**G**) de los cuernos uterinos (mm) para cada grupo experimental (SHAM, N = 5 y OVX, N = 5). La anchura es calculada en la zona media de los cuernos, y ambas medidas se calculan haciendo uso de las fotografías y Photoshop CC 2018, normalizando estas con la cuadrícula del papel milimetrado. (\* $P = 0,0125$ ; test de *t*-student).

Por ello, se decidió contrastar estos datos visuales de manera estadística, calculando por cada útero la media de la longitud y anchura de sus dos cuernos uterinos, obteniendo así un valor para cada variable (**Figuras 8F y 8G**, respectivamente). Como se esperaba, no se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar la longitud de los mismos entre los grupos OVX y SHAM, pero sí al comparar su anchura ( $P = 0,0125$ ; SHAM, N = 5; OVX, N = 5; test de *t*-student).

Por lo tanto, todos estos datos analizados, en su conjunto, permitieron discriminar aquellos animales en los que el estradiol endógeno disminuyó significativamente, ya sea por la ovariectomía o el tratamiento con Letrozole. Así, se detectó un animal perteneciente al grupo OVX-Vh que realmente conservaba los ovarios y cuyo IO del útero no se encontraba disminuido, por lo que fue asignado como CTRL-Vh. Otro animal del grupo OVX-Vh fue excluido de los experimentos debido a que, aunque el IO del útero se encontraba dentro de la media de los valores para este grupo experimental, su morfología se encontraba modificada, presentando un grosor mayor (**Figura 8C, III**) con respecto al resto de úteros OVX-Vh (**Figura 8C, I y II**). Finalmente, un animal del grupo DOMP+LET fue excluido debido a que el tratamiento con Letrozole no provocó una disminución del IO, e incluso aumentó por encima de lo esperado, presentando una tumoración en el cuerno izquierdo (**Figura 8D, II**). De manera adicional, su coloración fue similar a la observada en los úteros extraídos de animales DOMP.

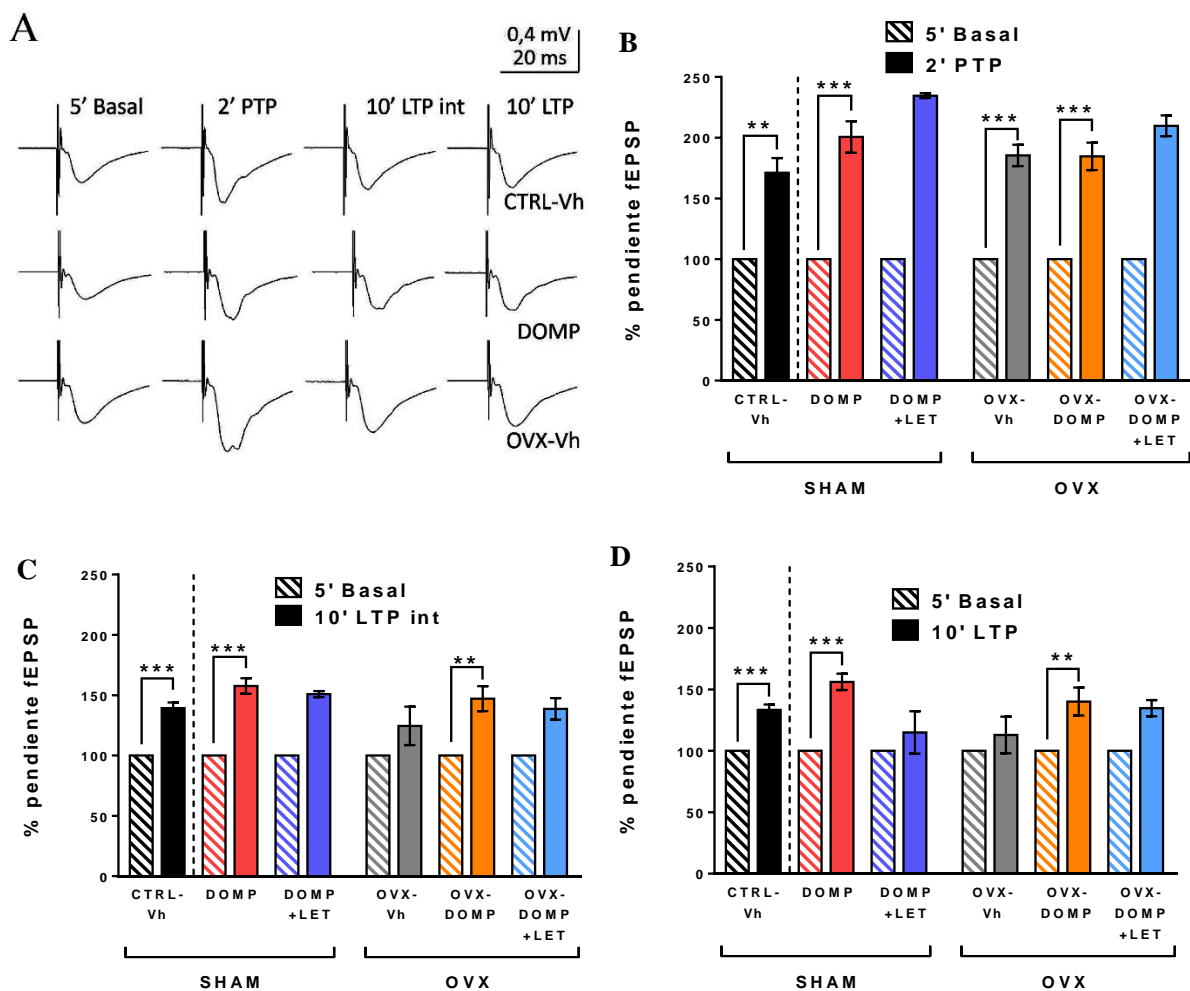
### **Interacción prolactina-estrógenos en la plasticidad sináptica**

La LTP es una forma clásica de estudiar las propiedades plásticas de la sinapsis, ya que se considera un correlato celular del aprendizaje asociativo (Malenka y Nicoll, 1999). Para establecer el papel de la correlación entre el estradiol y la PRL en la plasticidad sináptica, se utilizó un protocolo estandarizado de estimulación eléctrica por trenes de pulso a una frecuencia del ritmo theta hipocampal (TBS, **Figura 4A**) en la conexión entre CA3 y CA1 (ver Materiales y Métodos).

Una vez estabilizado el registro (40-70 min), se adquirieron los fEPSPs durante 5 minutos, estimulando a la intensidad necesaria para obtener el 60% del valor máximo de pendiente de los fEPSPs. Estos valores basales (5' Basal) sirvieron para establecer comparaciones con las magnitudes de potenciación obtenidas tras la aplicación del TBS. De este modo, se realizaron análisis incluyendo los 2 minutos iniciales del registro, correspondientes a la fase de PTP (2' PTP), 10 minutos de la fase intermedia de la LTP (10' LTP int), entre los 25 y 35 min posteriores al TBS, y 10 minutos de la fase

final de la LTP (10' LTP), entre los 50 y 60 min posteriores al TBS, tal como se muestra en la **Figura 6B**. Los datos se expresaron en porcentajes de la pendiente de los fEPSPs, donde el 100% es el promedio de todos los valores obtenidos durante los 5' de registro basal para cada una de las rodajas. Así, se pudo establecer si, tras la inducción de LTP, la pendiente de los fEPSPs aumentaba por encima de los niveles basales (habiendo potenciación, > 100%), se mantenía o disminuía por debajo de los niveles basales.

Los resultados obtenidos muestran un aumento en la pendiente de los fEPSPs durante 2' PTP con respecto a 5' Basal en todos los casos (**Figuras 9A y 9B**), encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre ambas fases para los grupos CTRL-Vh, DOMP, OVX-Vh y OVX-DOMP (CTRL-Vh,  $n = 6$  y  $N = 3$ ,  $P = 0,0020$ ; DOMP,  $n = 7$  y  $N = 4$ ,  $P = 0,0002$ ; OVX-Vh,  $n = 5$  y  $N = 2$ ,  $P = 0,0006$ ; OVX-DOMP,  $n = 8$  y  $N = 3$ ,  $P = 0,0001$ ; test de Welch, para todos los casos, donde  $n$  = número de rodajas de hipocampo y  $N$  = número de animales). Este incremento también se observó en los grupos tratados con Domperidona+Letrozole, pero la  $N$  insuficiente en los experimentos no permite realizar un análisis completo de estos datos.



**Figura 9:** Comparación de los registros basales con las fases de PTP y LTP. **A.** Trazos representativos de los registros de los fEPSP obtenidos en rodajas de hipocampo de los grupos experimentales CTRL-Vh, DOMP y OVX-Vh durante los períodos de 5' Basal, 2' PTP, 10' LTP int y 10' LTP. **B-D.** Los gráficos muestran los valores medios ( $\pm$  SEM) del porcentaje de la

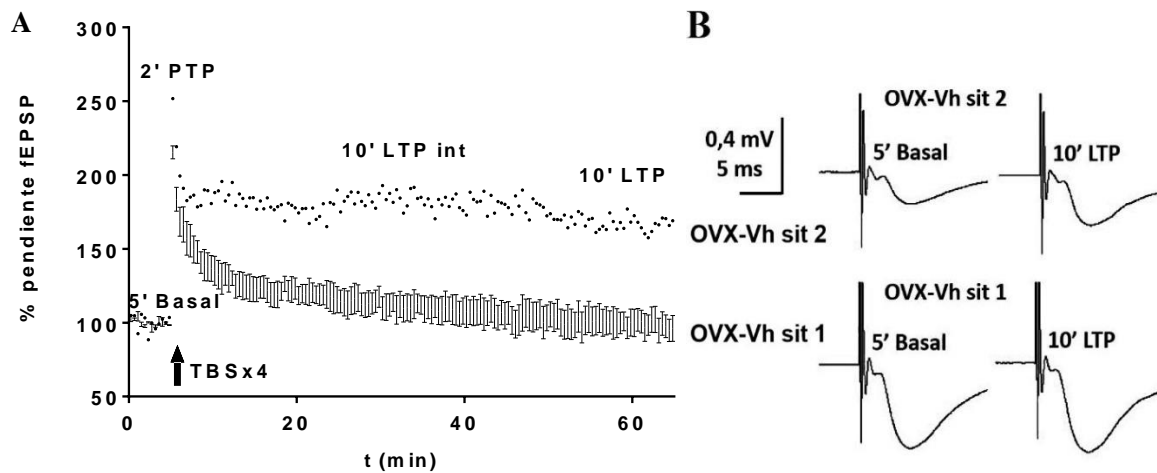
pendiente de los fEPSPs (donde el 100% se refiere al promedio de la misma durante 5' Basal) en diferentes períodos del registro (5' Basal, 2' PTP, 10' LTP int y 10' LTP). En cada uno de estos períodos se promedian todos los valores obtenidos para cada una de las rodajas de hipocampo utilizadas en los experimentos (SHAM: CTRL-Vh n = 6 y N = 3, DOMP n = 7 y N = 4, DOMP+LET n = 2 y N = 1; OVX: OVX-Vh n = 5 y N = 2, OVX-DOMP n = 8 y N = 3, OVX-DOMP+LET n = 3 y N = 1; n = número de rodajas de hipocampo y N = número de animales) y sus valores medios ( $\pm$  SEM) graficados, comparándose: **B.** 5' Basal con 2' PTP. (CTRL-Vh,  $**P = 0,0020$ ; DOMP,  $***P = 0,0002$ ; OVX-Vh,  $***P = 0,0006$ ; OVX-DOMP,  $***P = 0,0001$ ; test de Welch, para todos los casos). **C.** 5' Basal con 10' LTP int (CTRL-Vh,  $***P = 0,0004$ ; DOMP,  $***P = 0,0001$ ; OVX-DOMP,  $**P = 0,0027$ ; test de Welch, para todos los casos). **D.** 5' Basal con 10' LTP (CTRL-Vh,  $***P = 0,0007$ ; DOMP,  $***P = 0,0004$ ; OVX-DOMP,  $**P = 0,0095$ ; test de Welch, para todos los casos).

Al comparar la pendiente de los fEPSPs durante la LTP con respecto a 5' Basal (**Figuras 9C y D**), se observa que los valores de potenciación para los distintos grupos experimentales mantienen su significancia estadística, excepto para el grupo OVX-Vh. Esto es evidente al comparar 5' Basal con los períodos de 10' LTP int (CTRL-Vh, n = 6 y N = 3,  $P = 0,0004$ ; DOMP, n = 7 y N = 4,  $P = 0,0001$ ; OVX-DOMP, n = 8 y N = 3,  $P = 0,0027$ ; test de Welch, para todos los casos, donde n = número de rodajas de hipocampo y N = número de animales) y 10' LTP (CTRL-Vh, N = 3, n = 6,  $P = 0,0007$ ; DOMP, N = 4, n = 7,  $P = 0,0004$ ; OVX-DOMP, N = 3, n = 8,  $P = 0,0095$ ; test de Welch, para todos los casos). Por otro lado, los grupos tratados con Domperidona+Letrozole mantuvieron valores por encima de las condiciones basales, pero menores que los observados entre 2' PTP y 5' Basal. Como en el caso anterior, los resultados obtenidos no pueden ser analizados estadísticamente debido a la N insuficiente.

Analizando en detalle el grupo de animales OVX-Vh, pudo observarse que presentan un alto índice de error al comparar la pendiente de los fEPSPs durante 10' LTP int y 10' LTP con 5' Basal. Esto es debido a que, durante los experimentos, las rodajas de hipocampo provenientes de estos animales respondían igual a la fase de inducción de la LTP (2' PTP), pero se comportaban de modo diferente en cuanto al mantenimiento de la misma, pudiéndose distinguir dos situaciones. Primero, había un grupo en el que, durante las fases de 10' LTP int y 10' LTP, la pendiente de los fEPSPs disminuía hasta alcanzar los niveles basales (**Figura 10, OVX-Vh sit 1**). Por el contrario, en el otro grupo de rodajas de hipocampo, la pendiente de los fEPSPs permanecía en el mismo nivel durante las fases de 10' LTP int y 10' LTP, sin disminuir en ningún momento (**Figura 10, OVX-Vh sit 2**). Esta dispersión de los datos puede ser debida a los niveles de estradiol endógeno dentro del SN, o a una actividad diferente de las aromatasas en respuesta a la ovariectomía.

Una vez analizada la diferencia entre cada una de las fases de la LTP y la situación basal dentro de cada caso particular, se realizaron comparaciones entre los diferentes grupos experimentales. En primer lugar, se compararon las pendientes de los fEPSPs en las situaciones basales de cada uno de los grupos experimentales, para comprobar si los registros parten de una situación inicial estable y equivalente. Los resultados muestran registros basales muy similares y con un índice de error casi

inexistente (**Figura 11A**). Este hecho fue apoyado estadísticamente, no encontrándose diferencias significativas entre el registro basal de ninguno de los grupos experimentales con respecto al resto.

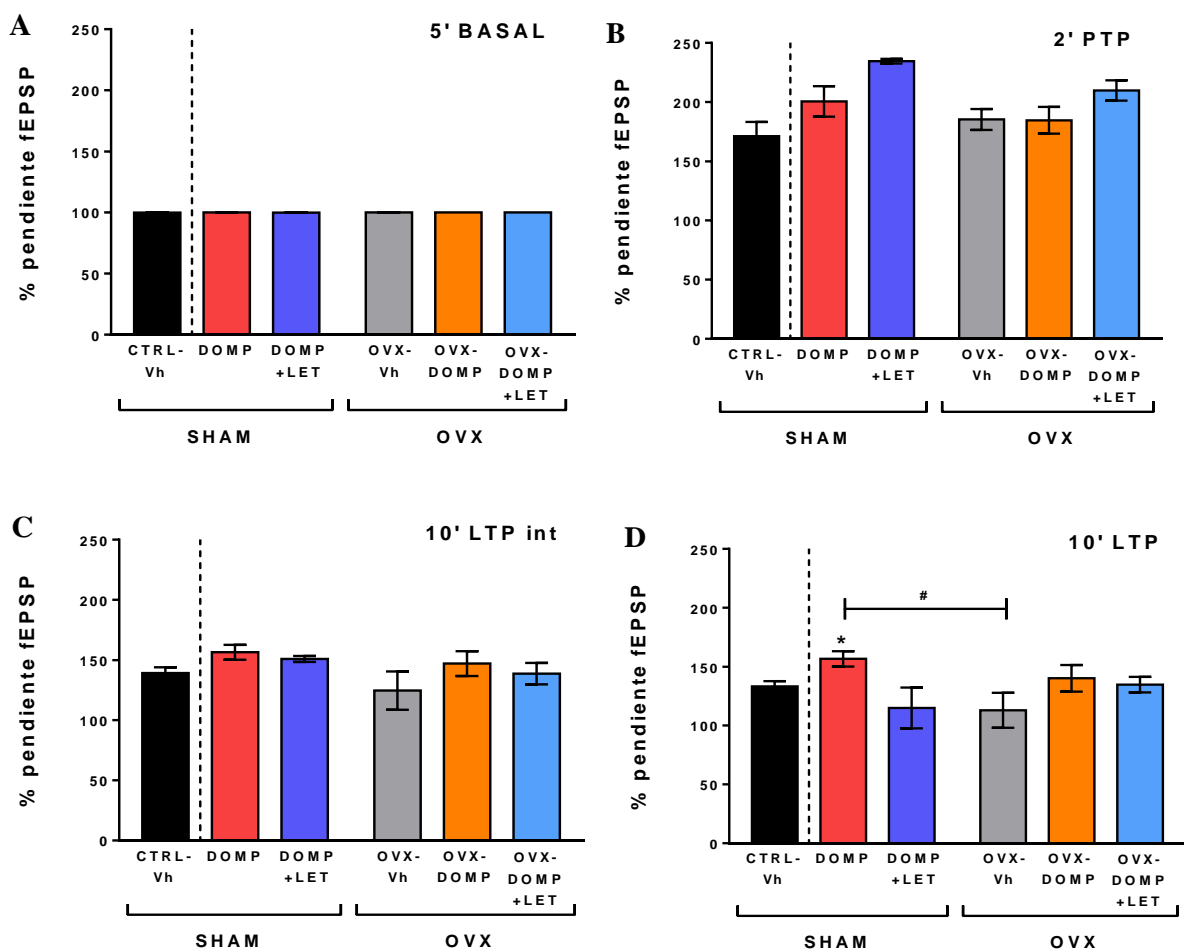


**Figura 10:** Dispersión en el curso temporal de la LTP en animales OVX-Vh. **A.** Curso temporal de la potenciación de los fEPSPs (donde el 100% se refiere al promedio de la misma durante 5' Basal) en rodajas de hipocampo provenientes del grupo experimental OVX-Vh (n = 5, N = 2) durante diferentes períodos del registro (5' Basal, 2' PTP, 10' LTP int y 10' LTP) y en dos situaciones distintas: OVX-Vh sit 1 (n = 4, N = 2) y OVX-Vh sit 2 (n = 1, N = 1). Nótese el grado de dispersión de los datos para algunas condiciones experimentales en animales ovariectomizados. **B.** Trazos representativos del promedio los registros de los fEPSP del grupo experimental OVX-Vh durante los períodos de 5' Basal y 10' LTP en ambas situaciones.

Seguidamente, se comparó la pendiente de los fEPSPs de los diferentes grupos experimentales entre sí durante 2' PTP y 10' LTP int (**Figura 11B y 11C**). Aunque no se obtuvieron diferencias significativas, sí se observaron ciertas tendencias. Durante 2'PTP, los grupos SHAM tratados con Domperidona se potenciaban hasta un nivel mayor que los OVX correspondientes (**Figura 11B**). Además, los grupos tratados con Domperidona+Letrozole, eran los que más se potenciaban durante esta fase, encontrándose por encima de los tratados con Domperidona únicamente. Sin embargo, nuevamente, no pudieron llevarse a cabo análisis estadísticos debido a la N insuficiente. En contraposición, las rodajas provenientes de animales OVX-Vh se potenciaban más que las provenientes de animales CTRL-Vh.

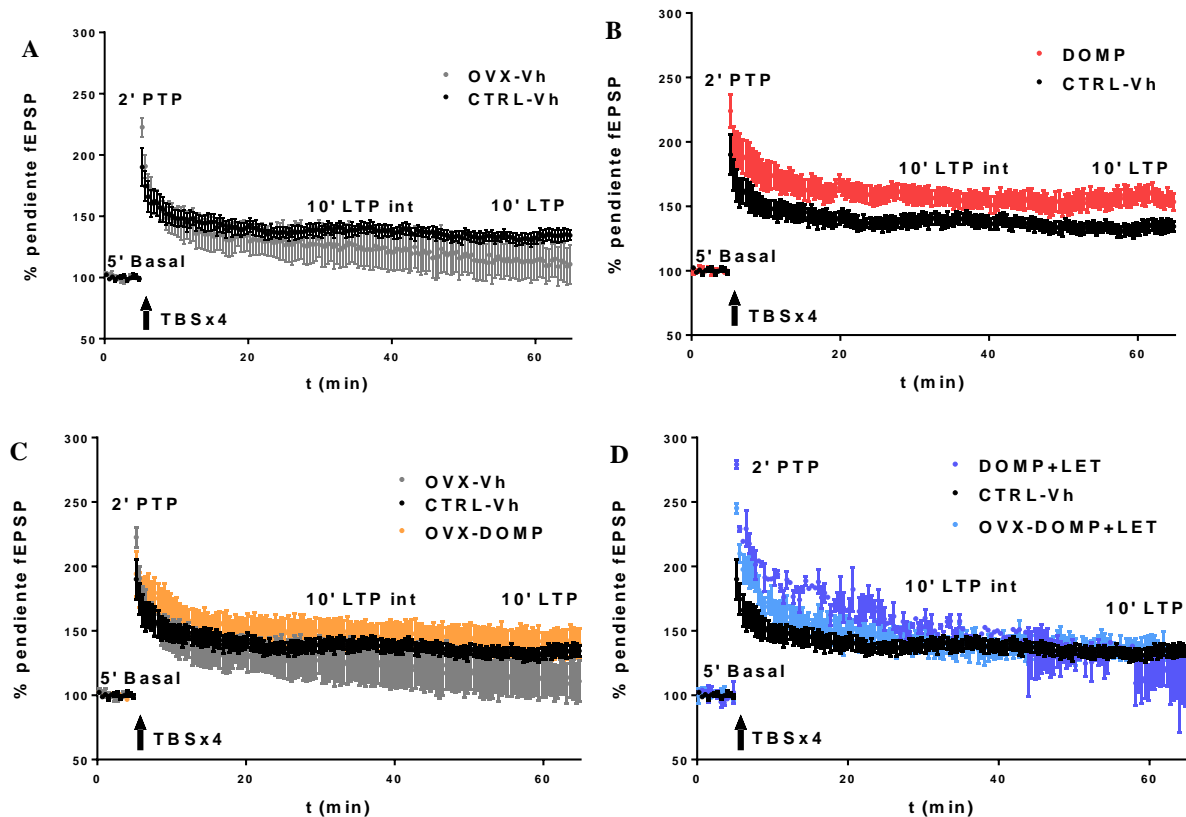
En la fase de 10' LTP int (**Figura 11C**), no existen diferencias entre los grupos SHAM y los OVX tratados con Domperidona. Sin embargo, sí se observaba una disminución de la pendiente de los fEPSPs en rodajas de animales OVX-Vh en relación con las de animales CTRL-Vh y aquellos tratados con Domperidona, aunque el índice de error se incrementaba debido a lo ya explicado y representado anteriormente (**Figura 10**). En los grupos tratados con Domperidona+Letrozole, a diferencia de lo observado durante 2' PTP, la magnitud de la pendiente de los fEPSPs se encontraba por debajo de los grupos tratados únicamente con Domperidona, aunque siguiendo la relación anterior.

Por último, durante la fase de 10' LTP (**Figura 11D**) se observaba más claramente cómo la pendiente de los fEPSPs en animales DOMP era mayor que en animales CTRL-Vh. Lo contrario ocurría con los animales OVX-Vh. Se observaba, además, la recuperación que sufrían los animales OVX al ser tratados con Domperidona. Sin embargo, a pesar de todas estas tendencias comentadas, únicamente se encontraron diferencias significativas entre los grupos DOMP frente al CTRL-Vh y al OVX-Vh (DOMP, n = 7 y N = 4 vs. CTRL-Vh, n = 6 y N = 3,  $P = 0,0143$ ; DOMP, n = 7 y N = 4 vs. OVX-Vh, n = 5 y N = 2,  $P = 0,0187$ ; Test de *t*-student para ambos casos, donde n = número de rodajas de hipocampo y N = número de animales). En cuanto a los animales tratados con Domperidona+Letrozole, durante esta fase se invertía la relación observada hasta ahora. Por lo tanto, se observaban menores niveles en la pendiente de los fEPSPs en el grupo DOMP+LET con respecto al grupo OVX-DOMP+LET.



**Figura 11:** Comparación de los registros basales y la evolución de la PTP y LTP entre los distintos grupos experimentales. Los gráficos representan los valores medios ( $\pm$  SEM) del porcentaje de la pendiente de los fEPSPs en diferentes períodos del registro (5' Basal, 2' PTP, 10' LTP int y 10' LTP) para cada grupo experimental (SHAM: CTRL-Vh n = 6, N = 3, DOMP n = 7 y N = 4, DOMP+LET n = 2 y N = 1; y OVX: OVX-Vh n = 5 y N = 2, OVX-DOMP n = 8 y N = 3, OVX-DOMP+LET n = 3 y N = 1, donde n = número de rodajas de hipocampo y N = número de animales) comparándose: **A.** El período de 5' Basal de todos los grupos experimentales entre sí. **B.** El período de 2' PTP de todos los grupos experimentales

entre sí. **C.** El período de 10' LTP int de todos los grupos experimentales entre sí. **D.** El período de 10' LTP de todos los grupos experimentales entre sí (\* $P = 0,0143$ , # $P = 0,0187$ ; test de  $t$ -student).



**Figura 12:** Curso temporal de la potenciación a largo plazo para cada grupo experimental. **A.** OVX-Vh ( $n = 5$ ,  $N = 2$ ) y CTRL-Vh ( $n = 6$  y  $N = 3$ ); **B.** DOMP ( $n = 7$  y  $N = 4$ ) y CTRL-Vh ( $n = 6$  y  $N = 3$ ); **C.** OVX-Vh ( $n = 5$  y  $N = 2$ ), CTRL-Vh ( $n = 6$  y  $N = 3$ ) y OVX-DOMP ( $n = 8$  y  $N = 3$ ); **D.** DOMP+LET ( $n = 2$  y  $N = 1$ ), CTRL-Vh ( $n = 6$  y  $N = 3$ ) y OVX-DOMP+LET ( $n = 3$  y  $N = 1$ ), donde  $n$  = número de rodajas de hipocampo y  $N$  = número de animales.

Aunque estadísticamente se hayan comparado las fases de 5' Basal, 2' PTP, 10' LTP int y 10' LTP, en la **Figura 12** puede observarse el curso temporal de la magnitud de la potenciación de los fEPSPs en los diferentes grupos experimentales. De esta manera, se observa claramente la estabilidad de los registros basales, a excepción de los grupos experimentales tratados con Letrozole, donde los registros obtenidos al aplicar el TBS son también inestables (**Figura 12D**). Adicionalmente, las diferencias entre los grupos experimentales tratados únicamente con Domperidona y otros grupos (CTRL-Vh y OVX-Vh) aparecen claramente desde el período de PTP (**Figura 12B y C**), mientras que las diferencias entre el grupo experimental OVX-Vh y otros grupos (CTRL-Vh y OVX-DOMP) aparecen de manera más progresiva a lo largo de la evolución de la LTP (**Figura 12A y C**).

Analizados en su conjunto, estos datos indican que niveles elevados de PRL mejoran la plasticidad sináptica en el hipocampo incluso en condiciones en las que hay una deficiencia de estradiol endógeno



## Discusión

Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que, tanto la prolactina como el estradiol, tienen un papel regulador sobre los mecanismos de plasticidad sináptica a largo plazo. Este hallazgo puede correlacionarse con trabajos previos, donde se muestra que, el aumento de los niveles de estradiol o los cambios asociados al embarazo (posiblemente causados por niveles elevados de PRL), incrementan la densidad de las espinas dendríticas en la zona de CA1 del hipocampo (Brake et al., 2001; Kinsley et al., 2006). En el caso específico del estradiol, su aumento ha sido relacionado, en múltiples ocasiones, con un incremento en la magnitud de la LTP en CA1 (Córdoba Montoya y Carrer, 1997; Foy et al., 1999; Kramár et al., 2012). Adicionalmente, se han asociado ambas hormonas con alteraciones en la memoria y cognición, tanto en experimentos realizados con roedores como en estudios clínicos (Love et al., 2005; Maki et al., 2001).

Nuestros datos muestran diferencias significativas entre los grupos DOMP y los grupos CTRL-Vh y OVX-Vh, si bien los valores de significancia se encuentran por debajo de lo esperado cuando los animales son tratados con PRL (150 µg/día durante 7 días) administrada subcutáneamente (datos del grupo en elaboración para su publicación). Esto podría ser debido, en parte, al diseño experimental del estudio. Así, se sabe que, tanto con un tratamiento agudo con Domperidona (como el utilizado en este trabajo), como crónico, los niveles de PRL se incrementan en suero hasta producir un estado de hiperprolactinemia en ratas. Sin embargo, únicamente aparecen cambios en cuanto al comportamiento sexual de los animales mediante la administración crónica del tratamiento (> de 5 días; Nasello et al., 1997). Adicionalmente, Nasello et al. (1997) encuentran que, la disminución en la receptividad sexual como respuesta al tratamiento con Domperidona, no se debe únicamente a sus efectos sobre las gónadas, pudiendo implicar que la hormona actúa a nivel de SNC para ejercer estas funciones. Por lo tanto, es factible que sea necesario aumentar la duración del tratamiento con Domperidona para obtener un efecto marcado a nivel del SNC. De hecho, otro indicativo de que la concentración de PRL en el SNC puede no haber alcanzado niveles adecuados, se refleja en el análisis del seguimiento del peso corporal. Se sabe que, la administración sistémica de PRL de manera crónica (Sauvé y Woodside, 1996) pero no aguda (Fleming, 1976), produce un aumento de la ingesta de comida en ratas, lo que podría incrementar el peso de las mismas. Esto indica, nuevamente, que es necesaria una administración crónica para observar respuestas al tratamiento con PRL a nivel de SNC. En nuestro caso, se observó un aumento del peso únicamente en los animales OVX-DOMP con respecto a los OVX-Vh y con un nivel de significancia  $p < 0.0443$ , indicando probablemente niveles insuficientes de PRL a nivel de SNC.

Otro posible fallo en el diseño experimental que podría ser responsable de observar niveles de significancia menores, es el tiempo transcurrido entre la finalización de los tratamientos y la realización de los procedimientos *ex vivo* (de 2 a 5 días, dependiendo del animal). Durante estos días, los niveles de prolactina podrían haber disminuido, revirtiéndose parcialmente el estado de hiperprolactinemia.

Aunque existen trabajos donde la administración de Domperidona 3 veces al día a lo largo de 5 días es suficiente para desarrollar un estado de hiperprolactinemia (durante, al menos, 30 días), los niveles de PRL en suero que presentaron estos animales pueden no ser exactamente extrapolables a nuestro estudio, ya que estos últimos fueron realizados con ratas macho y difieren marcadamente las dosis administradas (Ochoa-Amaya et al., 2015). Por este motivo, sería conveniente realizar un seguimiento de los niveles de PRL en suero en futuras investigaciones para correlacionarlos con los estudios electrofisiológicos.

Por otra parte, si bien el aumento en la magnitud de la LTP es evidente en el tratamiento agudo con estrógenos, tanto en estudios *in vivo* (Córdoba Montoya y Carrer, 1997) como *in vitro* (Foy et al., 1999; Kramár et al., 2012), no se observan modificaciones de la LTP al administrar crónicamente esta hormona (Barraclough et al., 1999). De igual manera, en estudios donde se ha comparado la potenciación tras la inducción de LTP en animales intactos frente a OVX, al igual que en nuestro trabajo, no se han encontrado diferencias significativas (Vierk et al., 2012), aunque sí cierta tendencia a la disminución y diferencias significativas en cuanto a la densidad de espinas dendríticas (Murphy y Segal, 1996). La discrepancia en los resultados observados con tratamientos agudos o crónicos también queda reflejada en trabajos donde se evalúa el rendimiento de los animales frente a tareas de memoria espacial. En estos trabajos, el tratamiento agudo no induce una mejora en este tipo de aprendizaje, mientras que el tratamiento crónico sí, concretamente al llevar a cabo tareas de memoria espacial de trabajo con respecto a las de la memoria espacial de referencia (Luine et al., 1998). El hecho de que el tratamiento crónico con esta hormona no modifique la magnitud de la LTP, pero el agudo sí, podría implicar que existe una estabilización del sistema a lo largo de los días de tratamiento. Aplicado a lo observado durante las ovariectomías, el sistema podría haberse estabilizado durante los días posteriores a la extracción de las gónadas ante la disminución de los niveles séricos de estradiol, supliéndose la función de los estrógenos ováricos en cierta medida con la actuación de estrógenos endógenos a nivel del SNC. Así, podrían explicarse las dos situaciones encontradas en estos animales (donde la potenciación se mantenía en un caso y no en otro), como una mayor o menor actuación de los estrógenos endógenos, variable entre animales y condiciones experimentales. En relación a esto, Vierk et al. (2012) encuentran una disminución significativa de la LTP en animales tratados con Letrozole, sugiriendo que es el estradiol endógeno el que regula, en su mayor parte, los procesos de plasticidad en el hipocampo.

De manera adicional, un factor limitante que podría estar alterando los resultados obtenidos en nuestro estudio, es el bajo número de animales OVX-Vh utilizado durante los experimentos. Al encontrar la ineficacia de las ovariectomías en dos de estos ratones, la N de este grupo experimental fue menor con respecto al resto de grupos experimentales. No obstante, la tendencia a la disminución de la magnitud de la LTP en animales OVX-Vh, se recupera al llevar a cabo el tratamiento con Domperidona, resaltándose, nuevamente, los efectos que ejerce la PRL sobre la plasticidad sináptica en el hipocampo.

Observando, en su conjunto, los efectos provocados por ambas hormonas sobre la potenciación a corto y a largo plazo, se pone de manifiesto que su implicación en los mecanismos de plasticidad sináptica afecta al mantenimiento de los mismos y no a su inducción. Esto es consistente con estudios que demuestran la relación entre los receptores de glutamato tipo NMDA, implicados en el desarrollo de la LTP, aunque no de la PTP (Sweatt, 2008), y los estrógenos. Así, se sabe que, el aumento de la magnitud de la LTP producido por el estradiol, se debe al incremento de la expresión de los receptores NMDA (Brake et al., 2001; Foy et al., 1999) y, en concreto, al aumento en el número y funcionalidad de las subunidades NR2B en CA1 (Vierk et al., 2012). Además, se ha sugerido que, el aumento en la expresión de estos receptores, podría deberse a la regulación por parte del estradiol sobre las interneuronas inhibitorias hipocampales de la misma zona (Brake et al., 2001). Es, precisamente, la modulación de estas interneuronas, la que se ha propuesto como causante del fallo en el aumento de la magnitud de la LTP durante el tratamiento crónico con estradiol (Barraclough et al., 1999).

De manera contraria, se ha sugerido que la PRL podría actuar modulando la expresión y actividad de los receptores de NMDA, pero provocando la disminución del calcio intracelular (Rivero-Segura et al., 2019). Esta hormona también ha sido asociada a los receptores de NMDA debido al papel regulador que podrían tener estos sobre los factores de liberación e inhibición de la PRL (Bregonzio et al., 1998). Aunque aún no se conoce claramente la dirección de esta regulación, se ha propuesto que podría ser estimuladora, pudiendo variar según el estado emocional y hormonal del animal (Bregonzio et al., 1998). Esto último, podría implicar la existencia de efectos sinérgicos entre la PRL y el estradiol. Sin embargo, futuras investigaciones serán necesarias para determinar la actuación conjunta de estas hormonas. De esta manera, partiendo de los resultados expuestos en este trabajo, se podrían realizar experimentos adicionales donde se aumentasen simultáneamente la PRL y estradiol, o en los que se administrase estradiol bloqueando adicionalmente los efectos de la PRL.

Por otra parte, los experimentos preliminares realizados con Letrozole, podrían servir como base para el desarrollo de futuras investigaciones. Aunque los resultados obtenidos deban ser contrastados, estos refuerzan la idea de que el tratamiento con Domperidona recupera la tendencia a la disminución de la eficacia sináptica observada con la ovariectomía. Sin embargo, un hecho que debe ser destacado es que, en el animal DOMP+LET, se extrajo un útero de mayor tamaño que en el OVX-DOMP+LET, indicando que el tratamiento con Letrozole no había disminuido al máximo los niveles de estradiol exógenos, por lo que deberían aumentarse las dosis administradas o el número de días de tratamiento. Además, se obtiene una magnitud menor de la LTP en el animal DOMP+LET, a pesar de presentar mayores niveles de estradiol exógeno, con respecto al animal OVX-DOMP+LET. Esto podría ser debido a los niveles de estradiol endógeno. Si bien se podía comprobar la eficacia del tratamiento con Letrozole en los animales SHAM, esto era imposible para los animales OVX, donde la ovariectomía en sí ya disminuía al máximo el peso de los úteros. Por lo tanto, podría ser que el tratamiento realizado con Letrozole en el animal OVX-DOMP+LET fuese ineficaz, no disminuyendo los niveles de estradiol

endógenos y presentándose mayor eficacia sináptica en estos con respecto a los DOMP+LET. Esto implicaría, como afirmaba Vierk et al. (2012), que el estradiol endógeno juega un papel principal en los procesos de memoria y aprendizaje mediados por el estradiol, a diferencia del estradiol exógeno.

Con respecto a los cambios morfológicos observados en los úteros extraídos de los grupos experimentales DOMP, trabajos previos relacionan la adenomiosis uterina en ratones con niveles elevados de prolactina en plasma (Ficicioglu et al., 1995; Mori et al., 1991). Esta, es considerada una condición patológica benigna donde se produce el crecimiento ectópico de tejido endometrial dentro del miometrio (Mori et al., 1991), por lo que esta situación podría ser la responsable de los cambios en la consistencia, coloración e irregularidades de la forma que presentaban los úteros tratados con Domperidona. El hecho de no encontrar estas alteraciones en aquellos animales ovariectomizados, es consistente con los resultados de Ficicioglu et al (1995), donde observaron que se desarrollan adenomiomas ante la exposición a PRL únicamente en ratas sin castrar. Esto indica que las modificaciones observadas se deben a la acción de la PRL a nivel ovárico, posiblemente por un desbalance hormonal. Adicionalmente, se debe tener en cuenta la tumoración presentada por el útero extraído del animal donde el tratamiento con Letrozole fue ineficaz, pudiendo ser esta, precisamente, un adenomioma.

Por último, un factor que podría estar incrementando la variabilidad es el ciclo estral de los animales del grupo experimental CTRL-Vh. Son conocidos los cambios en los niveles de estradiol y prolactina a lo largo del ciclo estral, presentándose un pico en la liberación de estradiol durante la tarde del proestro (Smith et al., 1975) y PRL durante la tarde del estro (Butcher et al., 1973). La fase de proestro, en concreto, ha sido asociada a aumentos de la densidad de las espinas dendríticas en neuronas piramidales de CA1 en ratas (Woolley et al., 1990) y en la magnitud de la LTP en las sinapsis de CA3-CA1 (Warren et al., 1995), aunque estos resultados no se correlacionan con los encontrados al evaluar la memoria espacial de los animales (Berry et al., 1997). Por lo tanto, para eliminar este factor de nuestro estudio, se llevaron a cabo mediciones de la apertura vaginal de los animales, tal como muestran Byers et al. (2012), pero no se observaron diferencias entre las mismas. La opción de realizar frotis vaginales fue rechazada debido a la respuesta de estrés y agresividad provocada en los ratones, que alteraba el bienestar de los animales y, adicionalmente, podría aumentar los niveles de PRL en los mismos (Meerlo et al., 2001). La falta de diferencias entre las aperturas vaginales de los animales, podría ser debida a la convivencia de los mismos en el animalario, ya que se pueden producir pseudoembarazos o supresión del estro en ratones hembra agrupados, incrementándose el nivel de PRL sistémico (Reynolds y Keverne, 1979; Van der Lee y Boot, 1955). Este aumento de PRL debe ser tenido en cuenta, ya que podría estar ocultando las diferencias encontradas entre los resultados obtenidos para los diferentes grupos experimentales del trabajo. En futuros experimentos, por lo tanto, las hembras deberían situarse en el animalario cerca de ratones macho, lo que reestablecería la aparición de ciclos estrales normales (Reynolds y Keverne, 1979).

## Conclusiones

1. Niveles elevados de prolactina en animales tratados con Domperidona modifican la plasticidad sináptica a largo plazo en el hipocampo, pero no producen cambios plásticos a corto plazo.
2. La supresión de los niveles de estradiol sistémico tiende a reducir la magnitud de la LTP, indicando que puede participar en los mecanismos de mantenimiento de la misma. Esta tendencia también se observa cuando se modifican los niveles de estradiol por la inhibición de las aromatasas.
3. La prolactina tiende a recuperar la eficacia sináptica en el hipocampo en presencia de niveles bajos de estradiol, lo que sugiere que ambas hormonas pueden tener un efecto sinérgico sobre la plasticidad sináptica. Experimentos complementarios serán necesarios para establecer su relevancia en condiciones hormonales particulares como el climaterio.
4. Estos hallazgos contribuyen a comprender mejor la participación de las distintas hormonas en la fisiología sináptica, revelando la compleja regulación que ejerce el Sistema Endocrino sobre la plasticidad del Sistema Nervioso.

## Bibliografía

1. Barraclough DJ, Ingram CD, Brown MW (1999), Chronic treatment with oestradiol does not alter in vitro LTP in subfield CA1 of the female rat hippocampus. *Neuropharmacology* 38:65-71.
2. Berry B, McMahan R, Gallagher M (1997), Spatial learning and memory at defined points of the estrous cycle: effects on performance of a hippocampal-dependent task. *Behav Neurosci* 111:267-274.
3. Bliss TVP, Collingridge GL, Morris RGM, Reymann KG (2018), Long-term potentiation in the hippocampus: discovery, mechanisms and function. *Neuroforum* 24:A103-A120.
4. Brake WG, Alves SE, Dunlop JC, Lee SJ, Bulloch K, Allen PB, Greengard P, McEwen BS (2001), Novel target sites for estrogen action in the dorsal hippocampus: an examination of synaptic proteins. *Endocrinology* 142:1284-9.
5. Bregonzio C, Navarro CE, Donoso AO (1998), NMDA receptor antagonists block stress-induced prolactin release in female rats at estrus. *Eu J Pharmacol* 350:259-265.
6. Butcher RL, Collins WE, Fugo NW (1974), Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17 $\beta$  throughout the 4-day estrous cycle of the rat. *Endocrinology* 94:1704-1708.
7. Byers SL, Wiles MV, Dunn SL, Taft RA (2012), Mouse estrous cycle identification tool and images. *PLoS One* 7:e35538.
8. Cabrera-Reyes EA, Limón-Morales O, Rivero-Segura NA, Camacho-Arroyo I, Cerbón M (2017), Prolactin function and putative expression in the brain. *Endocrine* 57:199-213.
9. Cole TJ, Short KL, Hooper SB (2019), The science of steroids. *Semin Fetal Neonatal Med* 24:170-175.
10. Córdoba Montoya DA, Carrer HF (1997), Estrogen facilitates induction of long term potentiation in the hippocampus of awake rats. *Brain Res* 778:430-438.
11. Eichenbaum H (2004), Hippocampus: cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory. *Neuron* 44:109-120.
12. Evans JS, Varney RF, Koch FC (1941), The mouse uterine weight method for the assay of estrogens. *Endocrinology*, 28:747-752.
13. Fester L, Rune GM (2014), Sexual neurosteroids and synaptic plasticity in the hippocampus. *Brain Res* 1621:162-169.
14. Ficiocioglu C, Tekin HI, Ariglou PF, Okar I (1995), A murine model of adenomyosis: the effects of hyperprolactinemia induced by fluoxetine hydrochloride, a selective serotonin reuptake inhibitor, on adenomyosis induction in Wistar albino rats. *Acta Eur Fertil* 26:75-79.
15. File SE, Jarrett N, Fluck E, Duffy R, Casey K, Wiseman H (2001), Eating soya improves human memory. *Psychopharmacology* 157:430-406.
16. Fleming AS (1976), Control of food intake in the lactating rat: role of suckling and hormones. *Physiol Behav*, 17:841-808
17. Fluck E, File SE, Rymer J (2002), Cognitive effects of 10 years of hormone-replacement therapy with tibolone. *J Clin Psychopharmacol* 22:62-67.
18. Foy MR, Xu J, Xie X, Brinton RD, Thompson RF, Berger TW (1999), 17beta-estradiol enhances NMDA receptor-mediated EPSPs and long-term potentiation. *J Neurophysiol* 81:925-929.
19. Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G (2000), Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev* 80:1523-1631.
20. Freemark M, Driscoll P, Andrews J, Kelly PA, Royster M (1996), Ontogenesis of prolactin receptor gene expression in the rat olfactory system: potential roles for lactogenic hormones in olfactory development. *Endocrinology* 137:934-942.
21. Kawas C, Resnick S, Morrison A, Brookmeyer R, Corrada M, Zonderman A, Bacal C, Lingle DD, Metter E (1997), A prospective study of estrogen replacement therapy and the risk of developing Alzheimer's disease: the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Neurology* 48:1517-1521.
22. 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.
23. Kramár EA, Chen LY, Lauterborn JC, Simmons DA, Gall CM, Lynch G (2012), BDNF upregulation rescues synaptic plasticity in middle-aged ovariectomized rats. *Neurobiol Aging* 33:708-719.
24. Love G, Torrey N, McNamara I, Morgan M, Banks M, Hester NW, Glasper ER, Devries AC, Kinsley CH, Lambert KG (2005), Maternal experience produces long-lasting behavioral modifications in the rat. *Behav Neurosci* 119:1084-1096.
25. Luine VN, Richards ST, Wu VY, Beck KD (1998), Estradiol enhances learning and memory in a spatial memory task and effects levels of monoaminergic neurotransmitters. *Horm Behav* 34:149-162.

26. Maki PM, Resnick SM (2000), Longitudinal effects of estrogen replacement therapy on PET cerebral blood Flow and cognition. *Neurobiol Aging* 21:373-383.
27. Maki PM, Zonderman AB, Resnick SM (2001), Enhanced verbal memory in nondemented elderly women receiving hormone-replacement therapy. *Am J Psychiatry* 158:227-233.
28. Malenka RC, Nicoll RA (1999), Long-term potentiation-A decade of progress? *Science* 285:1870-1874.
29. Martín-Pérez J (2010) Fisiología de la prolactina. In: *Fisiología Humana, parte IX: Fisiología del sistema endocrino*. Ed: McGraw-Hill, p871-879.
30. Meerlo P, Easton A, Bergmann BM, Turek FW (2001), Restraint increases prolactin and REM sleep in C57BL/6J mice but not in BALB/cJ mice. *Am J Physiol* 281:846-854.
31. Mindell JA, Cook RA, Nikolovski J (2015), Sleep patterns and sleep disturbances across pregnancy. *Sleep Med* 16:483-488.
32. Mori T, Singtripop T, Kawashima S (1991), Animal model of uterine adenomyosis: is prolactin a potent inducer of adenomyosis in mice? *Am J Obstet Gynecol* 165:232-234.
33. Murphy DD, Segal M (1996), Regulation of dendritic spine density in cultured rat hippocampal neurons by steroid hormones. *J Neurosci* 16:4059-4068.
34. Nasello AG, Vanzeler ML, Madureira EH, Felicio LF (1997), Effects of acute and long-term domperidone treatment on prolactin and gonadal hormone levels and sexual behavior of male and female rats. *Pharmacol Biochem Behav* 58:1089-1094.
35. Ochoa-Amaya JE, Hamasato EK, Tobaruela CN, Queiroz-Hazarbassanov N, Anselmo Franci JA, Palermo-Neto J, Greiffo FR, de Britto AA, Vieira RP, Ligeiro de Oliveira AP, Massoco Cde O, Felicio LF (2015), Short-term hyperprolactinemia decreases allergic inflammatory response of the lungs. *Life Sci* 142:66-75.
36. Patil MJ, Henry MA, Akopian AN (2014), Prolactin receptor in regulation of neuronal excitability and channels. *Channels* 8:193-202.
37. Pawluski JL, Galea LA (2007), Reproductive experience alters hippocampal neurogenesis during the postpartum period in the dam. *Neuroscience* 149:53-67.
38. Plassart-Schiess E, Baulieu EE (2001), Neurosteroids: recent findings. *Brain Res Brain Res Rev* 37:133-140.
39. Reynolds J, Keverne EB (1979), The accessory olfactory system and its role in the pheromonally mediated suppression of oestrus in grouped mice. *J Reprod Fert* 57:31-35.
40. Rivero-Segura NA, Flores-Soto E, García de la Cadena S, Coronado-Mares I, Gomez-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<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> overload and NF-κB activation. *PLoS One* 12:e0176910.
41. Sarvey JM, Burgard EC, Decker G (1988), Long-term potentiation: studies in the hippocampal slice. *J Neurosci Methods* 28:109-124.
42. Sauvé D, Woodside B (1996), The effect of central administration of prolactin on food intake in virgin female rats is dose-dependent, occurs in the absence of ovarian hormones and the latency to onset varies with feeding regimen. *Brain Res* 729:75-81.
43. Smith MS, Freeman ME, Neill JD (1975), The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin, and steroid levels associated with the rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology* 96:219-226.
44. Spataro P, Saraulli D, Oriolo D, Costanzi M, Zanetti H, Cestari V, Rossi-Arnaud C (2016), Memory in pregnancy and post-partum: Item specific and relational encoding processes in recall and recognition. *Scand J Psychol* 57:271-277.
45. Sweatt JD (2008) Molecular Mechanisms of memory. In: *Learning and memory: a comprehensive reference*, vol. 4, pp 295-326.
46. Vadakkadath Meethal S, Atwood CS (2005), The role of hypothalamic-pituitary-gonadal hormones in the normal structure and functioning of the brain. *Cell Mol Life Sci* 62:257-270.
47. Van der Lee S, Boot LM (1955), Spontaneous pseudo-pregnancy in mice. *Acta Physiol Pharmac* 4:442-443.
48. Vierk R1, Glassmeier G, Zhou L, Brandt N, Fester L, Dudzinski D, Wilkars W, Bender RA, Lewerenz M, Gloger S, Graser L, Schwarz J, Rune GM (2012), Aromatase inhibition abolishes LTP generation in female but not in male mice. *J Neurosci* 32: 8116-8126
49. Warren SG, Humphreys AG, Juraska JM, Greenough WT (1995), LTP varies across the estrous cycle: enhanced synaptic plasticity in proestrus rats. *Brain Res* 703:26-30.
50. Woolley CS, Gould E, Frankfurt M, McEwen BS (1990), Naturally occurring fluctuation in dendritic spine density on adult hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci* 10:4035-4039.