



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

EL PAPEL PROTECTOR DE LA PROLACTINA SOBRE EL DAÑO INDUCIDO
POR UN ESTRÉS OXIDATIVO EN ASTROCITOS DE RATA.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

MIRIAM NAYELY ULLOA ZAMUDIO

Tutores principales:

Dra. Edith Arnold Hernández
Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera Lorenzo
Instituto de Neurobiología

Comité tutor:

Dra. Teresa Edith Garay Rojas
Dr. Mauricio Díaz Muñoz
Instituto de Neurobiología

Juriquilla, Qro. Agosto 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Universidad Nacional Autónoma de México

Instituto de Neurobiología

Los miembros del Comité Tutorial certificamos que la tesis elaborada por: Miriam Nayely Ulloa Zamudio, cuyo título es: “EL PAPEL PROTECTOR DE LA PROLACTINA SOBRE EL DAÑO INDUCIDO POR UN ESTRÉS OXIDATIVO EN ASTROCITOS DE RATA” se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firma

Dra. Edith Arnold Hernández

Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera Lorenzo

Dra. Teresa Edith Garay Rojas

Dr. Mauricio Díaz Muñoz

Aprobado por el Comité Académico

Dra. Maricela Luna Muñoz

Coordinador del programa

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Endocrinología Molecular del Departamento de Neurobiología Celular y Molecular del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), bajo la dirección de la Dra. Edith Arnold Hernández y del Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera Lorenzo. Trabajo financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con el proyecto CB-254728 y número de becario 612335.

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento al Instituto de Neurobiología de la UNAM. Instituto que me brindó la oportunidad para realizar mis estudios de maestría en ciencias y de la cual siempre recibí apoyo.

A la Dra. Edith Arnold Hernández por ser la Directora principal de este proyecto, por su apoyo, guía y aportes durante la realización del mismo. Al Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera Lorenzo codirector de este trabajo, por su apoyo en la investigación y brindarme su valioso tiempo.

A la Dra. María del Carmen Clapp Jiménez Labora, titular del laboratorio de endocrinología molecular donde se realizó este trabajo, por sus valiosas asesorías y comentarios.

A la Dra. Teresa Edith Garay Rojas y al Dr. Mauricio Díaz, quienes formaron parte de mi comité tutorial durante estos 2 años y por sus buenos consejos y aportaciones al trabajo.

Al Lic. Fernando López Barrera, técnico académico del Laboratorio de endocrinología molecular, por su soporte técnico durante la realización de este trabajo.

Al M en C Gabriel Nava Ramiro Nava Pinto, quien fue técnico académico del Laboratorio de Neuroendocrinología de la Reproducción, por su asistencia técnica durante la experimentación.

A la Dra. Xarubet Ruiz Herrera, actual técnico académico del Laboratorio de Neuroendocrinología de la Reproducción, por su soporte técnico brindado en este proyecto.

A los laboratoristas Daniel Mondragón y Antonio Prado, por toda su ayuda en el proceso de desarrollo de este trabajo.

A la unidad del bioterio, en especial a la Dra. Alejandra Castilla León y a el MVZ. José Martín García Servín, por su asistencia técnica, el manejo y cuidado de los animales de experimentación.

A la unidad de Microscopia, principalmente a la Ing. En Sistemas Computacionales Elsa Nydia Hernández Ríos, por su apoyo y soporte técnico en el uso del microscopio confocal.

A la Unidad de Proteogenómica, esencialmente a la M en C Adriana González Gallardo, por su asesoría técnica en el uso del Varioskan.

A la M en C Leonor Casanova Rico, responsable de la Unidad de Enseñanza, por su increíble paciencia durante la asesoría que me brindo durante estos dos años.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Ahora quiero mencionar algunos agradecimientos más personales, para cada una de las personas que de alguna manera me ayudaron en la realización de esta tesis.

Primero que nada, agradezco a la Dra. Edith Arnold quien no solo fue mi asesora, además también se convirtió en mi amiga, siempre me ayudo cuando lo necesite y siempre estuvo dispuesta a explicarme y tenerme paciencia mientras aprendía.

También quiero agradecer a mi equipo de trabajo, a Rodrigo quien fue mi maestro cuando recién llegue y mi amigo, a Josué por sus buenas charlas y contagiarme su tranquilidad y en especial a Fer, quien fue mi amigo desde que llegue y mi compañero de aventuras y de trabajo intenso, mi confesionario (porque a él le contaba de todo) y a veces hasta fue mi Oompa Loompa.

Dicen que la vida es mejor con amigos y pues el apoyo de ellos ha sido muy importante durante este tiempo, por lo que le quiero agradecer a Miri 1 o Miri Tovar, por ser mi amiga y mi compañera de maestría, por tratar de mantenerme despierta durante las clases, aunque pocas veces lo lograba, a la Gina por ser esa gran persona que escucha y aconseja, además de ser súper divertida y bulleadora/carrilluda, a la Dra. Ximena por sus consejos y su entusiasmo al decirme las cosas y por ultimo a Jose y a Frei quienes aunque llegaron al final de mi maestría, fueron parte de las sobremesas que teníamos todos juntos después de la comida. Además, quiero agradecer al resto de mis compañeros de laboratorio por su ayuda, comentarios y consejos.

También quiero agradecer a mi amiga María la del Mar (Marymar), por todo su apoyo, sus consejos, su ayuda y por ser mi compañera de viajes y a Ramsés por su alegría contagiosa y sus comentarios extraños que alegraban mi día. En especial a Emmanuel por convertirse en una persona tan importante para mí y que quiero mucho, le agradezco por su compañía, su cariño, su amistad, por su ayuda en muchas dudas que a veces tenía sobre mi proyecto y en general por ser de gran apoyo emocional.

Agradezco también a Original uno de mis mejores amigos desde la prepa y que a pesar del tiempo sigue estando ahí para mí, con sus consejos y su apoyo y ahora siendo mi compañero otra vez en la maestría y a mi amigo Chino quien a pesar de la distancia siempre ha estado presente aguantando mis dramas y mis crisis existenciales, las cuales son muy seguidas.

Por ultimo le agradezco a mi mama y a mis abuelos principalmente y a mi familia por su apoyo incondicional durante todo este tiempo.

DEDICATORIA

Con todo mi amor a mi madre y abuelos por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como en la vida, por su incondicional apoyo mantenido a través del tiempo.

Todo este trabajo ha sido posible gracias a ellos.

Y a mis amigos que siempre me han dado apoyo emocional y me motivan a seguir aun cuando sea difícil el camino...

INDICE

Contenido de figuras	ii
Contenido de tablas:	ii
ABSTRACT	1
RESUMEN	2
1.- ROS y RL de interés biológico.	6
1.1 Generación de ROS y RL de oxígeno.....	6
1.2 Papel fisiológico de las ROS.....	7
2.- Estrés oxidativo y neurodegeneración.	7
2.1 Mecanismos de regulación para el estado de óxido-reducción.	7
2.1.1 Estrés oxidativo.	8
2.1.2 Desequilibrio del estado óxido-reducción y neurodegeneración.	9
2.2 Astrocitos.	10
2.1 Astrocitos y estrés oxidativo.	12
3.- La hormona prolactina.	14
3.1 Receptor de PRL (R-PRL).....	15
3.2 Vías de señalización canónicas del R-PRL.....	17
4.- ANTECEDENTES	19
4.1 La PRL y el sistema nervioso central (SNC).....	19
4.2 Antecedente directo	21
II.- JUSTIFICACIÓN	22
III.- HIPÓTESIS	22
IV.- OBJETIVO GENERAL	22
1.- OBJETIVOS PARTICULARES	23
V.- MATERIALES Y MÉTODOS	23
5.1.- Animales experimentales	23
5.2.- Métodos	23
5.2.1 Aislamiento de cultivos primarios de astrocitos corticales de rata.	23
5.2.2 Caracterización del cultivo primario.	24
5.2.3 Análisis de la expresión del R-PRL y PRL.	25
5.2.4 Establecimiento del modelo de estrés oxidativo con H ₂ O ₂	26
5.2.5 Evaluación del efecto protector de la PRL sobre los astrocitos.....	27
5.2.6 Análisis morfológicos de los astrocitos.	27

5.2.7 Análisis de la expresión de las enzimas antioxidantes y factores responsivos a estrés oxidativo.....	28
5.2.8 Determinación de la respuesta de astrogliosis.....	30
5.2.9 Análisis de la capacidad antioxidante total.	31
5.2.10 Análisis de la transducción de señales del R-PRL involucradas en el efecto protector de la PRL en los astrocitos.	32
5.2.11 Análisis estadístico.	33
VI.- RESULTADOS	34
6.1 Establecimiento de cultivos de astrocitos corticales de rata.....	34
6.2 Caracterización del cultivo de astrocitos corticales de rata.	35
6.3 Determinación de la expresión de la PRL y del R-PRL en astrocitos corticales de rata.....	36
6.4 Establecimiento de un modelo de estrés oxidativo <i>in vitro</i>	37
6.5 Evaluación del efecto protector de la PRL sobre la supervivencia de lo astrocitos ante el estrés oxidativo.	38
6.6 Cambios morfológicos en los astrocitos inducidos por el estrés oxidativo.....	41
6.8 Cambios en la expresión de enzimas antioxidantes.	44
6.9 Análisis de la capacidad antioxidante total de los astrocitos.	48
6.10 La PRL y el H ₂ O ₂ aumentan la expresión de GFAP.....	49
6.11 Cambios en la expresión de otros factores relacionados al daño inducido por H ₂ O ₂	52
6.12 Análisis de la transducción de señales del R-PRL en respuesta a la PRL en los astrocitos corticales.....	52
VII.- DISCUSIÓN	54
VIII.- CONCLUSIONES	61
REFERENCIAS	62

Contenido de figuras

Figura 1. Reacciones de Fenton y Haber-Weiss.....	7
Figura 2. Clasificación de astrocitos por morfología.....	11
Figura 3. Estructura terciaria de la PRL.....	14
Figura 4. Isoformas del receptor de PRL.....	16
Figura 5. Activación del receptor de PRL.....	17
Figura 6. Principales vías de señalización desencadenadas por la activación de las isoformas largas y cortas del R-PRL.....	19
Figura 7. Efecto protector de la PRL sobre los astrocitos sometidos a un daño oxidativo con H ₂ O ₂	21
Figura 8. Cultivo primario de astrocitos corticales de rata neonata.....	34
Figura 9. Establecimiento de cultivos primarios de astrocitos corticales de rata neonata.....	35
Figura 10. Caracterización de cultivos primarios de astrocitos.....	35
Figura 11. Expresión del gen de la PRL y del receptor de PRL en cultivos de astrocitos corticales de rata.....	36
Figura 12. Expresión del R-PRL y PRL mediante qPCR.....	37
Figura 13. El estrés oxidativo inducido por H ₂ O ₂ reduce la viabilidad de los astrocitos de manera dosis dependiente.....	38
Figura 14. La prolactina protege a los astrocitos del daño inducido por H ₂ O ₂	39
Figura 15. La prolactina protege a los astrocitos del daño inducido por H ₂ O ₂	40
Figura 16. Determinación de los cambios en la morfología celular de los astrocitos en respuesta al H ₂ O ₂	41
Figura 17. La PRL y el H ₂ O ₂ producen un rearrreglo en las fibras de actina de los astrocitos.....	43
Figura 18. Expresión del R-PRL ante un daño oxidativo.....	44
Figura 19. La PRL induce un aumento en la expresión de enzimas antioxidantes en condiciones basales y se exagera bajo estrés oxidativo.....	46
Figura 20. Capacidad antioxidante de los astrocitos tratados con PRL y bajo un daño oxidativo.....	49
Figura 21. La PRL y el H ₂ O ₂ aumenta la expresión de GFAP.....	50
Figura 22. Determinación de la astrogliosis en respuesta a el H ₂ O ₂ y la PRL.....	51
Figura 23. Aumento de la expresión de Nrf2 bajo un ambiente pro-oxidante.....	52
Figura 24. La PRL activa la fosforilación de STAT5 y STAT3.....	53
Figura 25. La PRL activa los factores de transcripción STAT5 y STAT3.....	54

Contenido de tablas:

Tabla 1: Iniciadores de PRL y R-PRL.....	26
Tabla 2: Iniciadores de enzimas antioxidantes.....	30
Tabla 3: Cuantificación de la intensidad de rojo para GFAP.....	51

ABSTRACT

Astrocytes are cells of the central nervous system that preserve the homeostasis of the brain maintaining synaptic integrity, providing both neuronal protection and metabolic support, eliminating waste products that can be cytotoxic, regulating inflammatory responses and promoting cell survival under oxidantive conditions by increasing the transcriptional response that leads to the synthesis of protective factors. Several conditions such as stress, injuries and brain diseases induce mitochondrial dysfunction resulting in an increased oxidative stress that leads to astrocytic cell death. Prolactin (PRL) is a hormone related to stress responses that limits gliosis and degeneration of the neural retina. In this work, we investigated whether PRL has a protective effect in cortical astrocytes against oxidative stress and cell death. Primary cultures of cortical astrocytes were isolated from the brain of neonatal rats, and characterized by an immunocytochemistry for GFAP, a marker for astrocytes. The long isoform of the PRL receptor was detected in cortical astrocytes by qRT-PCR. The astrocytes were incubated with increasing concentrations of PRL during 24 h, and exposed to oxidative stress induced by hydrogen peroxide (H₂O₂) for 3 h. PRL inhibited the H₂O₂-induced cytotoxicity in cortical astrocytes in a dose-dependent manner, as evaluated by the MTT assay. In addition, PRL induced an increase in the expression of its receptor and of GFAP under oxidantive conditions, as well as an increase in the expression of antioxidant enzymes such as: Mn and Cu/Zn superoxide dismutases, peroxirredoxins 1 and 6, glutathione peroxidase 1 and glutathione S-transferases μ 1 under basal conditions in astrocytes, and these changes were exacerbated after H₂O₂-induced oxidative stress. Catalase, glutathione S-transferases μ 3 and hemoxygenase 1 expression increased only by effect of H₂O₂. These changes were evaluated by qRT-PCR. Moreover, PRL increased the total antioxidant capacity of the cultures in basal and oxidative conditions. Finally, PRL receptor activation was determine through the evaluation of phosphorylated forms of STAT5 and STAT3, by Western blot. These results indicate that PRL can act through its receptor, directly on astrocytes to protect them against injuries due to oxidative stress.

RESUMEN

Los astrocitos son células del sistema nervioso central que se encargan de conservar la homeostasis del cerebro manteniendo la integridad sináptica, proporcionando protección y apoyo metabólico a las neuronas por medio de la eliminación de sustancias de desecho que pueden ser citotóxicas; regulan las respuestas inflamatorias y promueven la supervivencia celular en condiciones oxidantes aumentando la respuesta transcripcional que lleva a la síntesis de factores protectores. Varios tipos de estrés, lesiones y enfermedades cerebrales inducen la disfunción mitocondrial aumentando el estrés oxidativo que conduce a la muerte de los astrocitos. La prolactina (PRL) es una hormona relacionada con el estrés que limita la gliosis y la degeneración de la retina neural. En este trabajo nosotros investigamos si la PRL posee un efecto protector en los astrocitos corticales contra el estrés oxidativo y la muerte celular. Se aislaron cultivos primarios de astrocitos corticales del cerebro de ratas Wistar neonatas, los cuales fueron caracterizados mediante una inmunocitoquímica para GFAP como marcador de astrocitos. En astrocitos corticales se detectó la isoforma larga del receptor de la PRL por qRT-PCR. Los astrocitos se trataron con concentraciones crecientes de PRL y 24 h después fueron expuestos al estrés oxidativo inducido con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) durante 3 h. La incubación de astrocitos corticales con PRL inhibió la citotoxicidad inducida por H_2O_2 , evaluada por el ensayo de MTT, de manera dosis-dependiente. Además, el tratamiento con PRL indujo un aumento en la expresión de su receptor, de la GFAP, así como un aumento en la expresión de enzimas antioxidantes Mn y Cu/Zn superóxido dismutasas, la peroxirredoxina 1 y 6, la glutatión peroxidasa 1 y la glutatión S-transferasas $\mu 1$ en condiciones basales en astrocitos y este cambio se exacerbó después del daño oxidativo con H_2O_2 ; mientras que la catalasa, la glutatión S-transferasas $\mu 3$ y la hemoxigenasa 1 aumentaron únicamente por efecto del H_2O_2 , evaluado por qRT-PCR. Además se observó un aumento en la capacidad antioxidante de los cultivos tratados con PRL y con H_2O_2 . Por último, se detectó la activación del receptor a través de las formas fosforiladas de STAT5 y STAT3, por Western blot. Estos resultados indican que la PRL puede

actuar a través de su receptor, directamente sobre astrocitos para protegerlos contra lesiones por estrés oxidativo.

I.- INTRODUCCIÓN

El cerebro consume alrededor del 20% del oxígeno (O₂), teniendo una tasa metabólica cerebral de oxígeno (CMRO₂: Cerebral Metabolic Rate of Oxygen) de entre 1.3 y 1.8 μmol/g, lo que hace a las neuronas más vulnerables a la hipoxia, por su dependencia del metabolismo oxidativo de la glucosa para obtener energía (Gil, N., Gomez, J., Gomez, 2008). Además, las células utilizan el O₂ y generan como productos secundarios especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés) y radicales libres (RL) cuya reactividad y potencial citotóxico deben ser controlados. Para contrarrestar los efectos de las ROS y los RL, a lo largo de la evolución han surgido mecanismos moleculares muy efectivos como las enzimas antioxidantes, que eliminan a las ROS para mantener el equilibrio de óxido-reducción en el organismo (Angoa Pérez M, 2007; Concha et al., 2010). Sin embargo, este proceso normal puede verse alterado por lesiones en el sistema nervioso causadas por un trauma, un daño axonal difuso o por la isquemia seguida de una reperfusión. Además existen otros factores que aumentan la formación de ROS, como son las alteraciones nutricionales y metabólicas, la exposición a contaminantes en el medio, procesos de sobrecarga física y el envejecimiento, así como diversas patologías como el cáncer (Angoa-Pérez & Selva-Rivas, 2007; Cerdá Micó et al., 2010).

El exceso de pro-oxidantes, y principalmente de ROS y RNS (especies reactivas de nitrógeno) que no pueden ser contrarrestadas por los sistemas antioxidantes generan un estado de estrés oxidativo (Angoa-Pérez & Selva-Rivas, 2007; Butterfield, 2011). Bajo condiciones patológicas, se presenta un estado de estrés oxidativo, donde el metabolismo celular aumenta la producción de ROS y RL. La generación de especies reactivas conlleva además a lesiones secundarias, tales como la peroxidación lipídica, la desnaturalización de proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos, modificando así su estructura y su función, lo que promueve la muerte celular por necrosis o apoptosis (Angoa-Pérez & Selva-Rivas, 2007; Cerdá Micó et al., 2010). La evidencia indica que el estrés oxidativo amplifica y propaga el daño celular, promoviendo la progresión de enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer, el Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica y el Huntington (Angoa-Pérez & Selva-Rivas, 2007; Cerdá Micó et al., 2010).

En el cerebro las neuronas son mantenidas y protegidas por los astrocitos, los cuales son las células gliales más abundantes, hasta nueve veces más que las neuronas (Kimelberg & Nedergaard, 2010; Molofsky A. V. et al., 2012). Dentro de sus funciones, proveen soporte estructural, trófico y metabólico a las neuronas, participan en el control de la migración axonal, modulan la actividad sináptica y la homeostasis del tejido neural mediante la eliminación de RL, el transporte de agua, la producción de citosinas y óxido nítrico, regulan el pH e intervienen en la formación y mantenimiento de la barrera hematoencefálica (BHE) (Chen & Swanson, 2003; Verkhratsky & Parpura, 2016).

También, cumplen con distintas funciones que promueven la supervivencia neuronal, responden ante un daño tisular, infección o trauma, a través de promover una respuesta neuroinflamatoria. Al ser activados se propicia su proliferación, cambios morfológicos y un aumento de la expresión de la proteína gliofibrilar ácida (GFAP por sus siglas en inglés) mediante el proceso denominado astrogliosis. Este proceso es distintivo en las enfermedades neurodegenerativas, pudiendo ser benéfico en cuanto a la producción de factores de crecimiento y neurotrofinas que aumentan el soporte neuronal o perjudicial provocando una hipertrofia y la formación de cicatrices gliales (Robel, Berninger, & Götz, 2011; Saijo et al., 2009).

Se ha propuesto utilizar a los astrocitos como un blanco terapéutico debido a la protección que brindan a las neuronas ante algún daño como la exposición al estrés oxidativo. La utilización de distintos antioxidantes ha dado buenos resultados en modelos animales experimentales, pero no así en humanos (Gil N. et al., 2008). En la búsqueda de posibles alternativas se ha observado que los astrocitos aumentan su actividad transcripcional que da lugar a la síntesis de elementos de supervivencia y en respuesta a la acción de diversos factores de crecimiento y neurotróficos como es el caso de la PRL (Blackburn, Sargsyan, Monk, & Shaw, 2009; DeVito, Stone, & Shamgochian, 1995; DeVito, Avakian, Stone, & Okulicz, 1993; DeVito & Stone, 1999; Mangoura, Pelletiere, Leung, Sakellaridis, & Wang, 2000) .

A continuación, se describen antecedentes generales sobre las ROS y RL, su generación y su regulación, así como el desequilibrio en el estado óxido-reducción

y su relación con la neurodegeneración, los astrocitos y su relación con el estrés oxidativo, la estructura y función de la PRL y su receptor.

1.- ROS y RL de interés biológico.

Para entender mejor los fenómenos fisiológicos y patológicos que se encuentran implicados en el desarrollo y la progresión de algunas enfermedades neurodegenerativas se deben tener claros algunos conceptos que están fuertemente relacionados a dichas patologías, como lo son los RL y las ROS.

Los radicales libres: Se definen como cualquier molécula o átomo que contiene al menos un electrón desapareado. En general son muy reactivos hacia otras moléculas, lo que les confiere inestabilidad y vida media muy corta (Cabiscol, 2014). En los seres vivos podemos encontrar radicales libres como: el radical hidroxilo ($\text{HO}\cdot$), el radical metilo ($\text{CH}_3\cdot$), el anión superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$), el óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) y el radical alcoxilo ($\text{RO}\cdot$).

Las especies reactivas de oxígeno: Son especies químicas de vida media corta altamente oxidantes ya que tienden a captar electrones de otras moléculas (D'Autréaux & Toledano, 2007; Dorado-Martínez, Rugerio-Vargas, & Rivas-Arancibia, 2003; Leza, 2005). En sistemas vivos podemos encontrar el anión superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo ($\text{HO}\cdot$), óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$), ácido peroxinitroso (ONOOH), peroxilo ($\text{ROO}_2\cdot$), hidroperóxido $\text{ROOH}\cdot$, oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$) y ácido hipocloroso (HOCl).

1.1 Generación de ROS y RL de oxígeno.

La mitocondria es el principal productor de ROS durante los procesos oxidativos normales del metabolismo a través de las reacciones de óxido-reducción que ocurren en los complejos de transferencia de electrones y que tienen al oxígeno como el último aceptor de electrones (D'Autréaux & Toledano, 2007; Macedo-Márquez, 2012). Otros organelos donde se pueden producir ROS son los peroxisomas, en las cadenas de transporte de electrones en el retículo endoplasmático, en la membrana plasmática y en el empaquetamiento dentro de las cisternas del aparato de Golgi. (Boveris, Oshino, & Chance, 1972).

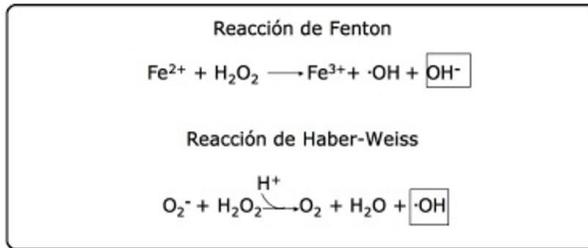


Figura 1. Reacciones de Fenton y Haber-Weiss, en las cuales se produce el radical hidroxilo (Macedo-Márquez, 2012).

Existen otras reacciones generadoras de ROS como son la reacción de Fenton y la reacción de Haber-Weiss (Fig. 1). Estas parten de la reacción del H_2O_2 con metales de transición reducidos generando el radical hidroxilo ($\text{HO}\cdot$), uno de los oxidantes

más potentes de la naturaleza (Macedo-Márquez, 2012).

1.2 Papel fisiológico de las ROS.

Las ROS y los RL en las células no son únicamente productos secundarios del metabolismo celular, sino que también desempeñan un papel importante en la fisiología de la célula. Muchos de estos, como el mismo H_2O_2 , participan en la renovación de las membranas, fenómenos plásticos celulares, sobrevivencia de células en sistema nervioso durante etapas embrionarias, mitosis, migración celular, síntesis y liberación de hormonas, aumento en la transcripción de citosinas durante procesos inflamatorios, participación en señalización celular, transducción de señales y mecanismos de segundos mensajeros, así como en la regulación y activación de células inmunes y la remodelación vascular (Angelova & Abramov, 2018; Angoa-Pérez & Selva-Rivas, 2007; Dorado-Martínez et al., 2003; Rani, Mishra, Yadav, Yadav, & Kohli, 2015).

2.- Estrés oxidativo y neurodegeneración.

2.1 Mecanismos de regulación para el estado de óxido-reducción.

Como ya se mencionó, las reacciones bioquímicas del metabolismo celular bajo condiciones fisiológicas generan ROS, cuya reactividad y potencial citotóxico deben ser controlados. Para contrarrestar los efectos de las ROS y los RL, a lo largo de la evolución han surgido mecanismos moleculares muy efectivos conocidos como antioxidantes de los cuales existe una gran variedad que proporciona una protección eficaz al organismo (Cerdá Micó et al., 2010). Los antioxidantes son aquellas moléculas capaces de prevenir y evitar la oxidación de otra molécula, ya sea por la interacción y estabilización de las ROS o bien por la transformación de estas en

configuraciones más estables o de baja reactividad. En términos generales, los antioxidantes pueden clasificarse en dos grupos de moléculas: 1) Enzimas de estructura compleja y elevado peso molecular como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPX), etc. 2) Antioxidantes de menor tamaño y bajo peso molecular, dentro de los cuales se encuentran los de acción directa que permiten la estabilización a través de que el radical libre ceda su electrón desapareado, como lo son: las vitaminas E y C, el glutatión reducido (GSH), el ácido úrico y los carotenos, o los antioxidantes de acción indirecta, los cuales aumentan la cantidad de GSH, como es el caso de la acetilcisteína (Cerdá Micó et al., 2010; Gil, N. et al., 2008; Leza, 2005). Su función homeostática consiste en controlar a las ROS para mantener el equilibrio de óxido-reducción en el organismo y mantenerlas por debajo de sus umbrales citotóxicos (Macedo-Márquez, 2012; Rani et al., 2015).

2.1.1 Estrés oxidativo.

Un aumento exacerbado en la generación y acumulación de ROS, ya sea por un exceso en la producción de éstas o por una anomalía en los mecanismos encargados de su eliminación, genera un desequilibrio en el estado de óxido-reducción conocido como estrés oxidativo. Durante el estrés oxidativo, la tasa de producción de ROS es mayor a la de su eliminación, por lo cual el grado de estrés que puede tener una célula es directamente proporcional a la tasa a la cual se produce principalmente el $O_2^{\bullet-}$ y el H_2O_2 (Dorado-Martínez et al., 2003; Ferrer Viant, Fonseca & Clavel, 2013; Gil, N. et al., 2008; Leza, 2005; Panieri & Santoro, 2016).

Este aumento exacerbado de ROS, puede deberse a una gran variedad de factores entre los cuales podemos encontrar tanto fisiológicos como patológicos (Dorado-Martínez et al., 2003). Dentro de los fisiológicos, se encuentran la edad del organismo, ya que el envejecimiento se caracteriza por la acumulación de macromoléculas dañadas, debido a un desgaste progresivo de los mecanismos de reparación del DNA, la proteólisis y la degradación de estas moléculas, además de la pérdida de la regulación del sistema inmune y la disminución en la eficiencia de los mecanismos antioxidantes (Angoa-Pérez & Selva-Rivas, 2007; Dorado-Martínez et al., 2003).

Por otro lado, bajo condiciones patológicas, puede presentarse un estado de estrés oxidativo agudo o crónico. Las causas de un estrés agudo pueden ser desde una lesión en el sistema nervioso causada por un evento traumático en sí, el daño axonal difuso, la toxicidad del exceso de aminoácidos excitatorios y por la isquemia seguida por la reperfusión (Gil, N. et al., 2008). En el estado de estrés oxidativo crónico, donde el metabolismo celular aumenta la producción de RL y ROS, algunas de las principales causas son el estado nutricional del organismo, procesos inflamatorios prolongados, factores genéticos que codifican sistemas antioxidantes, fallas en los sensores ROS que miden la concentración intracelular de ROS regulando así la activación y expresión de los mecanismos antioxidantes, además de patologías degenerativas de tipo infeccioso e inmune, así como los distintos tipos de cáncer y las enfermedades neurodegenerativas, como la córea de Huntington, la enfermedad de Alzheimer, el mal de Parkinson y esclerosis lateral amiotrófica (Angelova & Abramov, 2018; Angoa-Pérez & Selva-Rivas, 2007; Cabisco, 2014; D'Autréaux & Toledano, 2007; Dorado-Martínez et al., 2003; Panieri & Santoro, 2016). También se sabe qué factores como la radiación ionizante, los rayos ultravioletas, el tabaco, el exceso de ejercicio, agentes tóxicos como drogas anticancerígenas, algunos anestésicos y analgésicos, las condiciones ambientales como la contaminación atmosférica y someterse a ambientes con hiperoxia, influyen de manera directa en el aumento exacerbado en la generación de ROS, superando fácilmente la capacidad antioxidante celular (Cabisco, 2014; Dorado-Martínez et al., 2003; Ferrer Viant et al., 2013).

2.1.2 Desequilibrio del estado óxido-reducción y neurodegeneración.

El aumento en la producción de ROS genera un estado de estrés oxidativo que conlleva a lesiones secundarias dentro de las células. Como la peroxidación lipídica que provoca la alteración de la permeabilidad de las membranas celulares externas e internas, la oxidación de proteínas que provoca alteraciones en su plegamiento y dañando componentes del citoesqueleto. Además de la desnaturalización de carbohidratos y ácidos nucleicos, modificando su estructura y su función, por otro lado la generación incrementada de ROS promueve la muerte celular por necrosis

o apoptosis (Angoa-Pérez & Selva-Rivas, 2007; Cerdá Micó et al., 2010; Leza, 2005). Particularmente en las células cerebrales los estímulos estresores provocan la liberación de aminoácidos excitadores como el aspartato y el glutamato; que activan receptores que aumentan la entrada de Ca^{2+} al citoplasma, contribuyendo a la activación de enzimas dependientes de Ca^{2+} que incrementan la generación de ROS; las cuales participan en el mecanismo que altera la excitabilidad neuronal provocando excitotoxicidad y atrofia neuronal (Leza, 2005).

Las evidencias indican que el estrés oxidativo amplifica y propaga el daño celular, promoviendo la progresión de enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer, el Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica y el Huntington; también aumenta la vulnerabilidad a infecciones, enfermedades autoinmunes y gastrointestinales, así como enfermedades crónicas como la diabetes (Angoa-Pérez & Selva-Rivas, 2007; Cerdá Micó et al., 2010).

2.2 Astrocitos.

Además de las neuronas, las células gliales principalmente los astrocitos son responsivos a los estímulos por estrés oxidativo (Gil, N. et al, 2008).

Investigar el efecto del estrés oxidativo en los astrocitos es de gran relevancia, ya que éstos son los que modulan la homeostasis del tejido neural mediante la eliminación de RL y la recaptura de neurotransmisores previniendo la excitotoxicidad de las neuronas (Pfrieger, 2010).

Los astrocitos se dividen principalmente en tres tipos de acuerdo con su morfología y organización espacial: **A)** Astrocitos protoplasmáticos en la sustancia gris cuya morfología es densa con numerosos procesos cortos y altamente ramificados y **B)** Astrocitos fibrosos en la sustancia blanca, los cuales muestran formas más estrelladas, con procesos lisos y largos que son menos ramificados **C)** Astrocitos radiales que rodean a los ventrículos y tienen procesos largos no ramificados. (Chen & Swanson, 2003; Sofroniew & Vinters, 2010).

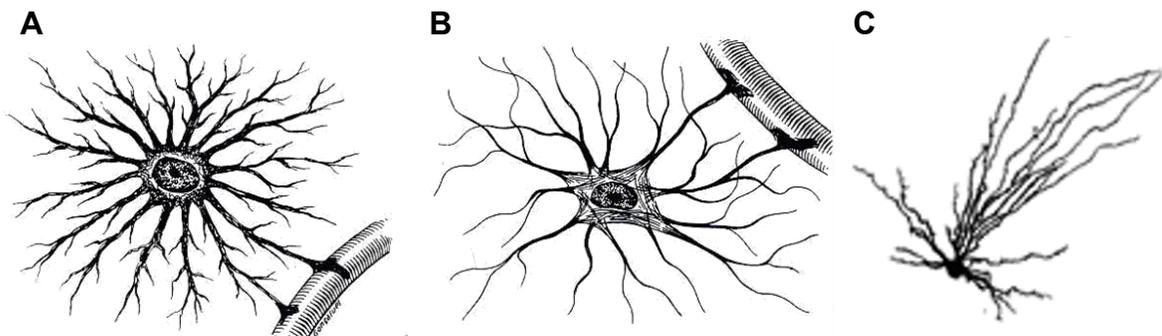


Figura 2. Clasificación de astrocitos por morfología. **A)** Astrocito protoplasmático y **B)** Astrocito fibroso anclados a un vaso sanguíneo **C)** Astrocito radial (modificada de Sofroniew y Vinters, 2009).

Dentro de sus funciones, los astrocitos proveen soporte estructural, trófico y metabólico a las neuronas, participando en el control de la migración axonal, modulando la actividad sináptica y la homeostasis del tejido neural mediante la eliminación de RL, el transporte de agua, la producción de citocinas y óxido nítrico, regulando el pH e interviniendo en la formación y mantenimiento de la BHE (Chen & Swanson, 2003; Verkhratsky & Parpura, 2016).

Los astrocitos cumplen con distintas funciones de acuerdo a la etapa de desarrollo en la que se encuentren. En etapas embrionales funcionan como progenitores neuronales y de soporte para la migración, y secretan moléculas de señalización para la regulación del crecimiento dendrítico y axonal (Molofsky & Deneen, 2015). En la etapa neonatal, los astrocitos participan de forma activa en la formación de sinapsis, conexiones vasculares y su estabilización (Pfrieger, 2010). En cuanto a la etapa adulta llevan a cabo funciones que promueven la supervivencia neuronal,

responden ante un daño tisular, infección o trauma, a través de promover una respuesta neuroinflamatoria (Robel et al., 2011).

2.1 Astrocitos y estrés oxidativo.

Tras un daño en el tejido que prive el paso de O₂ y glucosa al cerebro se generan ROS que causan la despolarización de la membrana mitocondrial de los astrocitos y cambios en la permeabilidad de la membrana mitocondrial. Además, se ha demostrado que las ROS inducen la muerte de los astrocitos activando la vía celular de la poli(ADPribosa) polimerasa-1. Sin embargo, pueden ser rescatados por la inactivación de esta vía a través de la suplementación del medio con sustratos metabólicos que no requieren metabolismo por glucólisis como el piruvato y la glutamina. Dependiendo del nivel de daño al que sean sometidos los astrocitos se pueden activar tanto la muerte celular por apoptosis o por necrosis (Ying, Chen, Alano, & Swanson, 2002).

Se ha reportado que insultos oxidativos subtóxicos como el H₂O₂, activan fuertemente la expresión génica dependiente de Nrf2/ elemento de respuesta antioxidante (ARE) en los astrocitos, y ésto contribuye a un pre-acondicionamiento neuroprotector, donde los astrocitos son capaces de proteger con mayor efectividad a las neuronas (Dowell & Johnson, 2013). Se conocen principalmente cuatro enzimas: catalasa, prostaglandina reductasa-1, peroxiredoxina-6 y hemoxigenasa-1, que son fundamentales para la protección mediada por Nrf2 en los astrocitos. Aunque no se descartan otras enzimas que han sido reportadas con relación a la activación de Nrf2 como la sulfirredoxina-1, la deshidrogenasa (quinona)-1 y la glutatión S-transferasa A4 (GSTA4) (Bell et al., 2011; Dowell & Johnson, 2013; Haskew-Layton, et al., 2010).

La participación de los astrocitos en las enfermedades neurodegenerativas es bastante evidente. Por ejemplo, se ha observado que astrocitos que presentan una mutación en el gen superóxido dismutasa 1 (SOD1) exhiben una disfunción del transportador de glutamato. Esta disfunción del transportador promueve una acumulación excesiva de glutamato extracelular que propicia la muerte de las neuronas motoras por mecanismos que permiten la entrada excesiva de Ca⁺ y que

provoca a su vez una disfunción metabólica mitocondrial, acelerando el desarrollo de la enfermedad de Huntington (Cerdá Micó et al., 2010).

Las neuronas son más susceptibles que los astrocitos al daño que genera el estado de estrés oxidativo. Sin embargo, estos últimos no están exentos de los efectos de oxidación causados por el estrés, ya que también pueden verse alterados en sus funciones, generando su muerte mediante la activación de vías de señalización apoptóticas. Además, se aumenta la peroxidación lipídica, que se encuentra asociada con modificaciones en proteínas de membrana, conduciendo a una homeostasia alterada de los niveles intracelulares de Ca^{2+} y de las cinasas dependientes de Ca^{2+} , lo que lleva a una disfunción mitocondrial, que a su vez también activa vías de señalización apoptóticas (Zhu, 2005).

Debido a la protección que brindan los astrocitos a las neuronas ante algún daño como lo es la exposición al estrés oxidativo, se han buscado alternativas terapéuticas que pudiesen contrarrestar este daño (Cerdá Micó et al., 2010). Ante el estrés oxidativo los astrocitos aumentan su actividad transcripcional que da lugar a la síntesis de enzimas antioxidantes, las cuales poseen efectos neuroprotectores en modelos experimentales. Esta respuesta transcripcional de los astrocitos puede estar mediada por la acción de diversos factores de crecimiento y neurotróficos.

La acción de las hormonas contribuye y es esencial en la modulación de los efectos citotóxicos inducidos por el estrés oxidativo. Se ha descrito que algunas pueden desencadenar mecanismos de supervivencia celular o actuar como antioxidantes. Por ejemplo, la hormona del crecimiento y los estrógenos que tienen efectos directos en la protección celular y por lo que en la búsqueda de posibles alternativas surgieron casos como el uso de la prolactina (PRL) (Cerdá Micó et al., 2010; Gil, N. et al., 2008).

3.- La hormona prolactina.



Figura 3. Estructura terciaria de la PRL (AMYPdb).

La PRL es una hormona de carácter proteico de 23 kDa, formada por una sola cadena de 199 aminoácidos con 3 puentes disulfuro intramoleculares (Ignacak et al., 2012). La cual es sintetizada y secretada principalmente por las células lactotropas de la adenohipófisis, pero también puede producirse localmente en el hipotálamo, en la placenta y en el útero, así como en células epiteliales de la glándula mamaria y en los linfocitos (Eric Kandel, James Schwartz, 2014; Freeman, Kanyicska, Lerant, & Marc, 2000). Fue identificada y caracterizada originalmente por sus acciones en la lactancia y la reproducción pero ahora se sabe posee diversas funciones (Ignacak et al., 2012; Marano & Nira, 2014).

Además de promover la producción de leche en los mamíferos, la PRL presenta diversas funciones como en:

a) La reproducción, donde dependiendo de la especie y la etapa del ciclo reproductivo, la PRL ejerce efectos sobre la producción y función de hormonas como la progesterona, la hormona luteinizante (LH) y la hormona estimulante de los folículos (FSH) (Ignacak et al., 2012). En los machos, la PRL estimula la función testicular aumentando la expresión de receptores de LH y FSH, incrementa la producción de esteroides y andrógenos, además de jugar un papel importante en la maduración de espermatocitos y en el aumento del metabolismo y motilidad de los espermatozoides (Bole-Feysot, Goffin, Edery, Binart, & Kelly, 1998). Por otro lado, también regula la conducta materna, así como en la supresión del eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HPA), reduciendo el estrés, la ansiedad, así como, la depresión y mostrando conductas positivas en cuanto el cuidado de las crías y la socialización (Bridges, Scanlan, Lee, & Byrnes, 2011; Torner, 2016).

b) La osmorregulación, también ha sido descrita como una de las acciones de la PRL, regulando el transporte de solutos y agua a través de la membrana celular. En peces y anfibios, la PRL controla la entrada o pérdida de Na^+ y la permeabilidad en

la entrada de agua, manteniendo el balance electrolítico, (Sakamoto & McCormick, 2006). En mamíferos la PRL tiene un efecto inhibitorio en la bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+$, además incrementa la excreción de iones de Na^+ y Cl^- en el sudor e incrementa la absorción de agua y sales en el intestino (Freeman et al., 2000).

c) La regulación del metabolismo también es parte de las funciones de la PRL, ya que es esencial para la adipogénesis y la diferenciación de adipocitos, además de ser capaz de modular el metabolismo de los lípidos en el tejido adiposo (Bole-Feysot et al., 1998). En páncreas estimula la producción de insulina, del transportador de glucosa 2 y promueve la entrada de la glucosa a las células β (Ignacak et al., 2012). Mientras que en el hígado estimula la actividad de lipasas en los hepatocitos e incrementa la secreción de bilis (Bole-Feysot et al., 1998).

d) La respuesta inmune, donde la PRL es capaz de estimular la mitogénesis de linfocitos T, linfocitos B, células NK, neutrófilos y células dendríticas a través de la activación de Jak/STAT (Bole-Feysot et al., 1998). Participa en la regulación de las respuestas inmunes humoral y celular en estadios tanto fisiológicos como patológicos, regulando la expresión de citocinas inflamatorias como las interleucinas-1, -2 y -4, CD69, CD25 y CD54, aumenta la expresión de la óxido nítrico sintasa (iNOS) y del factor de necrosis tumoral α (TNF α) (Freeman et al., 2000).

Por otra parte, la PRL también participa en el crecimiento y desarrollo de células y tejidos, así como en la regulación del sistema nervioso y en el mantenimiento de la homeostasis del organismo (Bole-Feysot et al., 1998; Freeman et al., 2000).

3.1 Receptor de PRL (R-PRL).

Todas las acciones que ejerce la PRL son mediadas a través de la activación de su receptor, el cual es una proteína transmembranal monocatenaria que posee homologías estructurales a la familia de receptores de citosinas tipo I. El gen que codifica al R-PRL humana se localiza en el cromosoma 5 y posee 10 exones, con una longitud aproximada de 100 kb. La regulación transcripcional del gen R-PRL se lleva a cabo por tres distintas regiones promotoras específicas para diferentes tejidos. El promotor I, es específico para las gónadas, el promotor II lo es para el

hígado y el promotor III es genérico, es decir, que está presente en diversos tejidos incluyendo en gónadas e hígado (Freeman et al., 2000; Pérez, 2010).

Como resultado de la transcripción que comienza en los sitios de iniciación alternativos del gen del R-PRL para diferentes promotores y de algunas modificaciones post-traduccionales, se han identificado tres isoformas del R-PRL, las cuales difieren en la longitud y composición de su dominio citoplasmático, sin embargo su dominio extracelular es idéntico; fueron nombradas como la isoforma larga de 591 aminoácidos (aa), intermedia de 393 aa y corta de 291 aa (Bole-Feysot

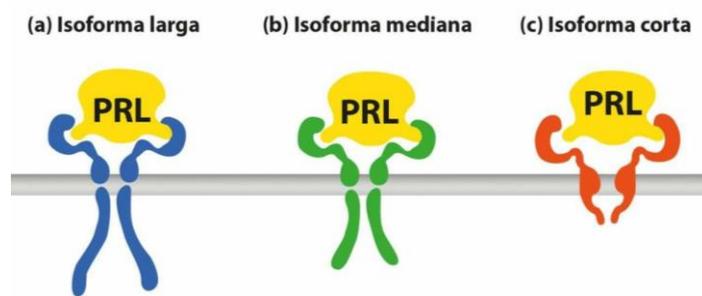


Figura 4. Isoformas del receptor de PRL. a) Isoforma larga de 591 aa. b) Isoforma intermedia de 393 aa. c) Isoforma corta 291 aa. (modificada de N. Binart 2010).

et al., 1998; Freeman et al., 2000). La isoforma larga es considerada la principal isoforma a través de la cual la PRL activa las vías de señalización y cuya masa molecular es de 90 kDa (Marano & Nira, 2014). El R-

PRL posee tres dominios: el extracelular, compuesto por 210 aa siendo este dominio necesario para la interacción con la PRL. El dominio transmembranal, el cual contiene 24 aa que como en todos los receptores de citosinas traspasa la membrana celular. Y el dominio intracelular el cual contiene varios residuos de tirosina susceptibles a ser fosforilados, jugando un papel crucial en la señalización intracelular (Pérez, 2010).

En mamíferos, el R-PRL se encuentra no solo en la glándula mamaria y ovario, también se distribuye en otros muchos órganos como: hipófisis, corazón, pulmón, timo, bazo, hígado, páncreas, riñón, glándula adrenal, útero, músculo esquelético, piel y recientemente se descubrió en el cerebro, siendo el hígado el órgano donde más se expresa (Pérez, 2010; Smith, 2004).

La interacción de la PRL con su receptor conlleva a la dimerización del mismo. Como primer paso, la PRL se une a una molécula de receptor por el primer dominio de unión, cuyo complejo formado aun no es biológicamente activo, sino hasta que la PRL se une por su segundo dominio de interacción a otra molécula de receptor, formando el complejo hormona-receptor activo (Bole-Feysot et al., 1998; Pérez, 2010).

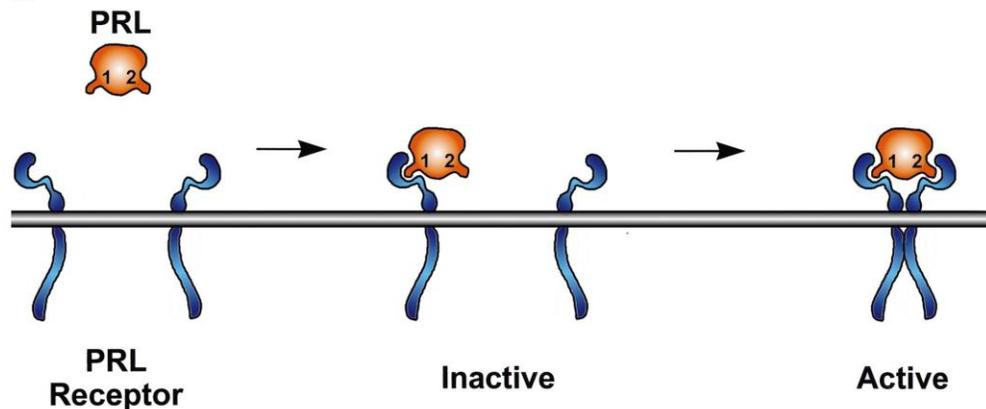


Figura 5. Activación del receptor de PRL. El sitio de unión 1 de la PRL se une a una unidad del receptor permitiendo la unión del sitio 2 a una segunda unidad del receptor, formando la dimerización del receptor. Tal unión provoca un cambio conformacional, activando al receptor que induce la fosforilación de la tirosina cinasa Janus 2 (Jak2) (Freeman *et al.*, 2000).

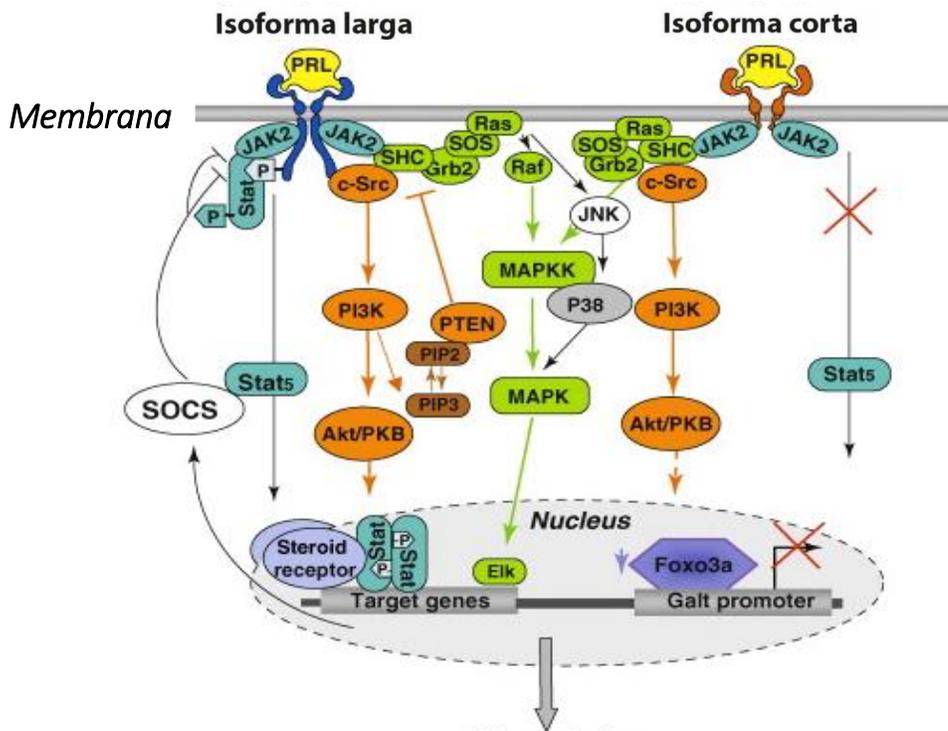
3.2 Vías de señalización canónicas del R-PRL.

Una vez activado el R-PRL se induce la fosforilación de numerosas proteínas intracelulares, incluyendo al mismo receptor (Freeman et al., 2000). La vía de señalización canónica y mayormente caracterizada del R-PRL está dada por la región membrana-proximal del dominio intracelular que está constantemente asociada con la tirosina cinasa Janus 2 (Jak2). Esta enzima se encuentra involucrada en la fosforilación de residuos de tirosina del mismo R-PRL y también se fosforila después de la unión de la PRL a su receptor (Freeman et al., 2000; Marano & Nira, 2014; Watson & Burdon, 1996). La fosforilación de Jak2 permite la unión y fosforilación de la familia de los STAT's, proteínas transductoras de señal y activadoras de la transcripción; siendo STAT1, STAT3 y STAT5 sus principales blancos. Al fosforilarse, estos factores forman dímeros que se translocan al núcleo celular, donde regulan la expresión de numerosos genes relacionados con la diferenciación celular y la proliferación (Freeman et al., 2000; Ignacak et al., 2012).

La vía Jak/STAT utiliza a los supresores de la señalización de citosina (SOCS) para la terminación de la señal, inhibiéndola por competencia con las STATS, induciendo la desfosforilación de Jack2 y la ubiquitinación del complejo proteico reclutado por SOCS (Freeman et al., 2000). Y aunque la fosforilación de Jak2 ocurre con todas las isoformas activas del R-PRL, la fosforilación de tirosina del receptor no ocurre en la isoforma corta, por lo que las STAT's no se fosforilan (Freeman et al., 2000). Existe evidencia de que la PRL induce la internalización de su receptor, especialmente de la isoforma corta, como un mecanismo de regulación de la señal (Marano & Nira, 2014) (Fig. 6).

Existen otras vías de señalización involucradas con la activación del R-PRL, como la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), la cual está relacionada con funciones de proliferación y crecimiento celular. Los residuos de tirosina fosforilados sirven como sitios de anclaje de proteínas las adaptadoras Shc/Grb2/SOS que conectan al receptor con la cascada de las Ras/Raf/MAPK. La activación de esta cascada resulta en la translocación de la MAPK al núcleo derivando en la fosforilación de diversos factores de transcripción (Freeman et al., 2000). La especificidad de esta vía se encuentra limitada en que virtualmente cada receptor integral de membrana celular puede activar esta cascada de señalización (Clevenger & Kline, 2001) (Fig. 6).

Por otra parte, se ha demostrado que la PRL también activa la vía de PI3K/Akt cuya activación promueve la supervivencia celular, así como efectos antiapoptóticos a través de la inhibición de la actividad de la caspasa 3. Además, la subunidad p85 de PI3K se asocia con el R-PRL formando un complejo que ha sido activado por la interacción previa de la PRL con su receptor, lo que contribuye a la motilidad celular, por medio de la modulación de citoesqueleto y la interacción con cinasas de adhesión (Binart, Bachelot, & Bouilly, 2010; Clevenger & Kline, 2001; Marano & Nira, 2014) (Fig. 6).



Proliferación, Diferenciación Supervivencia celular, Anti-apoptosis.

Figura 6. Principales vías de señalización desencadenadas por la activación de las isoformas largas y cortas del R-PRL. La principal vía implica a Jak2, que a su vez activa a algunos miembros de la familia Stat. La vía MAPK es otra cascada activada por el R-PRL. Involucra intermediarios Shc/Grb2/Sos/Ras/Raf río arriba de la MAPK. El reclutamiento de PI3K conduce a la activación de Akt/PKB. La activación de otras vías de señalización han sido reportadas (modificada de N. Binart 2010).

4.- ANTECEDENTES

4.1 La PRL y el sistema nervioso central (SNC).

Se sabe que la PRL modula un amplio número de procesos en el cerebro e incluso se ha sugerido su participación en funciones neuronales como la excitabilidad y la neurotransmisión (Patil, Henry, & Akopian, 2014). En respuesta a un gran número de estresores es liberada al flujo sanguíneo, contribuyendo al control de respuestas al estrés mediante la regulación de la secreción de la hormona adrenocorticotropa (ACTH), que estimula la producción de glucocorticoides (Torner, 2016). Se ha descrito su capacidad de regular la neurogénesis en el hipocampo, en la zona subventricular (SVZ) y en el bulbo olfatorio donde se ha encontrado el receptor de la PRL (Torner, 2016).

Además, la PRL presenta efectos neuroprotectores ante el estrés y el daño tisular, ayudando a la regeneración y la migración de células madre, dando origen a neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (Pathipati et al., 2011; Torner et al., 2009).

Estas acciones de la PRL en el SNC son mediadas por la activación de la proteína ERK5 expresada en los nichos neurogénicos del cerebro. También se ha mostrado que la PRL estimula la expresión de nestina y de MAP2 (proteína asociada a los microtúbulos), estimulando así la síntesis de proteínas que forman parte del citoesqueleto, lo que puede contribuir en la diferenciación neural (Havránek, Bacová, Strbák, Lesanová, & Bakos, 2014; Wang et al., 2013).

Otros grupos de estudio han observado efectos neuroprotectores durante la lactancia, la cual se asocia con un aumento en los niveles de oxitocina, PRL, progesterona y glucocorticoides. Se ha identificado a la PRL como la hormona que contribuye a la preservación de neuronas en el hipocampo durante la lactancia, después de haber sido sometidas a un insulto excitotóxico con ácido kaínico (Morales, Lorenson, Walker, & Ramos, 2014).

En otros estudios se ha reportado que la PRL actúa sobre otros tipos celulares en el SNC, promoviendo el aumento en la capacidad de mielinización de los oligodendrocitos y la regulación de la neuroinflamación, provocando cambios en la expresión de citosinas en la microglía (Mangoura et al., 2000; Mödersheim et al., 2007). También se ha observado que la PRL limita la gliosis y la degeneración de la retina neural cuando existe algún daño causado por estrés oxidativo (Arnold et al., 2014). En astrocitos *in vitro* se demostró que la PRL es capaz de estimular su proliferación y diferenciación mediante la activación de la mitogénesis y la regulación de vías de señalización que involucran la activación de la PKC (DeVito et al., 1993). Además, se demostró la presencia del receptor a la PRL en este mismo tipo de ensayos *in vitro*, reflejando una posible participación de ésta en la respuesta inmune, así como la activación de vías de señalización mitogénicas que incluyen la activación de la fosfolipasa D. También se demostró la activación de la vía de las Jak/STAT, que promueven la diferenciación celular en cultivos de astrocitos de

embrión pertenecientes al día embrionario 15 (E.15) (DeVito et al., 1995; Mangoura et al., 2000).

Por otro lado, en ensayos *in vivo* se encontró que la PRL promueve la astrogliosis cuando existe un daño en el tejido; además, aumenta la expresión de citosinas inflamatorias como la interleucina-1- α y el TNF- α sugiriendo que los astrocitos son células inmunocompetentes, lo cual se relaciona con lo anteriormente mencionado sobre su papel en la regulación del sistema inmunitario. (DeVito et al., 1995; Freeman et al., 2000).

En estudios más recientes, se ha sugerido que la PRL juega un papel importante en la reparación de tejidos que han sufrido algún tipo de daño (Mödersheim et al., 2007). Mientras que en otros estudios *in vivo* en ratas juveniles, se confirmó una alta correlación entre los niveles de la PRL circulante y la proliferación celular de los astrocitos, así como un efecto protector sobre estos mismos, ante un daño causado por hipoxia. Todos estos resultados muestran que la PRL presenta un papel importante en la modulación de la respuesta de los astrocitos al presentarse un daño en el tejido, así como la regulación en su diferenciación y proliferación durante las etapas del neurodesarrollo (Mödersheim et al., 2007).

4.2 Antecedente directo.

En un estudio previo realizado dentro de nuestro grupo de trabajo, se observó que la administración de PRL a cultivos primarios de astrocitos corticales de rata mantuvo la viabilidad celular de dichos astrocitos cuando fueron sometidos a un insulto de estrés oxidativo mediante peróxido de hidrógeno (Fig. 7). Estos resultados sugieren que la PRL ejerce un efecto protector sobre los astrocitos corticales probablemente a través de la activación de la isoforma larga de su receptor (R-PRL), (el cual está presente en astrocitos y cuya expresión fue detectada por RT-PCR) (Karla Ortiz y colaboradores, datos no publicados). Este estudio es la base de la presente propuesta, el cual tiene como objetivo la búsqueda del mecanismo por el cual la PRL ejerce su efecto.

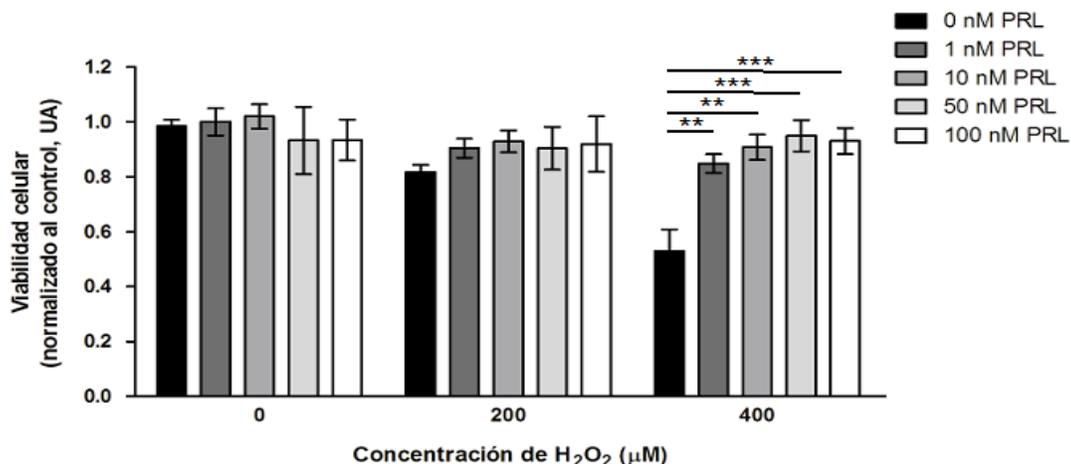


Figura 7. Efecto protector de la PRL sobre los astrocitos sometidos a un daño oxidativo con H₂O₂ y medido mediante el ensayo de MTT. **p<0.01, ***p<0.001 vs. 0 nM PRL

II.- JUSTIFICACIÓN

La progresión de múltiples enfermedades neurodegenerativas se debe en gran parte al estrés oxidativo en el SNC, provocado por un aumento de ROS y RL. Sabemos que la PRL tiene un efecto neuroprotector y se han encontrado ciertas propiedades antioxidantes, sin embargo, se desconoce el mecanismo por el cual ejerce la protección sobre los astrocitos de rata ante el estrés oxidativo. En este estudio se pretende encontrar el posible mecanismo involucrado en este efecto protector.

III.- HIPÓTESIS

La PRL posee un efecto protector sobre los astrocitos sometidos a un estado de estrés oxidativo, mediado por la activación o el aumento en la expresión de enzimas antioxidantes, lo cual podría conducir a la reducción de las ROS.

IV.- OBJETIVO GENERAL

Encontrar el posible mecanismo por el cual la PRL mantiene la viabilidad y promueve la supervivencia de los astrocitos ante un estrés oxidativo con peróxido de hidrogeno.

1.- OBJETIVOS PARTICULARES

1.1 Establecer e implementar cultivos primarios de astrocitos corticales de rata neonata.

1.2 Analizar la expresión de la PRL y de su receptor en astrocitos corticales de rata.

1.3 Evaluar el efecto protector de la PRL sobre los astrocitos ante el estrés oxidativo.

1.4 Analizar la transducción de señales del R-PRL modulando el efecto protector de la PRL en los astrocitos.

1.5 Analizar la sobreexpresión de las enzimas antioxidantes como posible mecanismo que induce la protección ejercida por la PRL en astrocitos bajo estrés oxidativo.

V.- MATERIALES Y MÉTODOS

5.1.- Animales experimentales

Se utilizaron ratas neonatas del día postnatal 0 y 1 (P0-P1) de la cepa Wistar, las cuales fueron proporcionadas por el bioterio del Instituto de Neurobiología.

Todos los procedimientos y manejo de animales fueron realizados de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. El comité de bioética del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) aprobó todos los protocolos experimentales utilizados (protocolo #68).

5.2.- Métodos

5.2.1 Aislamiento de cultivos primarios de astrocitos corticales de rata.

Por cultivo se utilizaron cuatro ratas neonatas Wistar, las cuales fueron anestesiadas por hipotermia cubriendo a las crías en papel y colocándolas en hielo, posteriormente fueron decapitadas. El cultivo se realizó en condiciones estériles, se colocó el material de disección y de cultivo dentro de la campana de flujo laminar bajo luz UV por 30 min. Se realizó la disección comenzando por la parte dorsal retirando la piel y el cráneo, se extrajo el cerebro y se colocó en una solución de disección constituida por Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, 14175-095,

GIBCO) y Penicilina/Estreptomicina al 1% (GIBCO). Posteriormente se retiraron los bulbos olfatorios, las meninges, el cerebelo y el cerebro medio, obteniendo solo las cortezas de cada hemisferio. El tejido se disgregó mecánicamente y se realizó la digestión del mismo con tripsina al 0.25% (GIBCO; 27250-018) en HBSS a 37°C por 20 min y agitando cada 10 min. Después el tejido fue centrifugado a 4,000 rpm durante 5 min, se retiró el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 20 ml de medio DMEM (Dubelco's Modified Eagle Medium; GIBCO; DML10-500ml) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10% y Penicilina/Estreptomicina al 1%. Posteriormente, se colocaron 10 ml en cada botella de cultivo T75, las cuales fueron recubiertas previamente con una solución de 1 µg/mL de poli-D-lisina e incubadas a 37 °C. En este paso algunas neuronas logran adherirse al fondo de la botella, sin embargo, el medio utilizado carece de los requerimientos nutricionales que necesitan y mueren.

El medio de cultivo fue cambiado cada 5 días, hasta alcanzar el 100% de confluencia, lo cual ocurre aproximadamente al día 12-13 *in vitro*. Para eliminar las contaminaciones celulares por microglía, las botellas de cultivo fueron agitadas a 240 rpm durante 6 h a 37°C, y poder retirar a estas células que yacen sobre la monocapa de astrocitos al aspirar el medio. Posteriormente, se agregó medio nuevo con α -Citocina D-Arabinofuranosida a una concentración de 10 µM (AraC; C1768-1G, SIGMA), el cual es un agente antimetabólico que evita la proliferación y promueve la muerte de la microglía que aun haya quedado en el cultivo. El medio se cambió 5 días después de la administración de AraC, y se volvió a agitar para la eliminación del resto de microglía.

Una vez obtenidos los cultivos de astrocitos, estos fueron sembrados a una densidad de 50,000 células/cm² en placas de 6 y 96 pozos, para los experimentos posteriores.

5.2.2 Caracterización del cultivo primario.

Inmuncitofluorescencia: Los astrocitos fueron sembrados en cubreobjetos previamente recubiertos con poli-D-lisina, los cuales son colocados en placas de 12 pozos y fueron incubados a 37°C por 5 días. El día 6 *in vitro* los cubre objetos

se lavaron con solución amortiguadora de fosfato salino (PBS) estéril y fueron fijados con 1 mL de paraformaldehído al 4% (SIGMA, P6148) por 10 min, se realizaron tres lavados con PBS; las células fueron permeabilizadas con tritón X-100 (BioRad, 161-0407) al 0.1% en PBS por 10 min. Los cubreobjetos fueron colocados en una cámara húmeda y se bloquearon con suero normal de cabra (NGS) al 10% por una hora a temperatura ambiente, posteriormente se incubaron con un anticuerpo primario policlonal anti-GFAP (1:1000; EMD Milipore, AB5804) durante toda la noche a 4°C. Al siguiente día, se retiró el anticuerpo y se realizaron tres lavados con PBS de 5 min cada uno. Se incubaron con el anticuerpo secundario policlonal anti IgG de conejo acoplado a fluorescencia Alexa Flour 555 (1:5000, Abcam, ab150078). Por último, los cubreobjetos fueron montados sobre portaobjetos usando 10 µL del medio de montaje Vectashield suplementado con DAPI (Vector Laboratories, 150078555) para el marcaje de los núcleos. Las laminillas fueron analizadas utilizando el microscopio confocal LSM 780 (Zeiss, Alemania).

5.2.3 Análisis de la expresión del R-PRL y PRL.

PCR: Los astrocitos fueron resembrados en placas de 6 pozos, dos veces cada 48 h se les cambió el medio y fueron tratados con 10 µM de AraC. Pasados 7 días de haber sido resembrados, se cosecharon las células, en 350 µL de solución de lisis celular para extracción de ARN (Buffer RLT, Kit RNeasy Mini, 74106, Qiagen).

Extracción de ARN: Se extrajo y cuantificó el ARN total utilizando el kit comercial RNeasy Mini (74106, Qiagen). Para la síntesis de cDNA mediante una retrotranscripción, se utilizó 1 µg de ARN y la enzima transcriptasa reversa Superscript III RT (200 U/µL). La reacción se lleva a cabo en el termociclador Eppendorf #22331 (Hamburg, Alemania) utilizando la siguiente secuencia en el programa: 1 ciclo a 25°C por 10 min, 1 ciclo a 37°C durante 2 h, 1 ciclo a 85°C por 5 min.

Para la PCR punto final: se adicionó a cada muestra la mezcla de reacción que contiene los iniciadores (#115723, GIBCO, USA), la enzima Taq (#MO486S, Biolabs, New England), el amortiguador de reacción y los dNTP's. Se realiza la

reacción utilizando el siguiente protocolo: 1 ciclo a 95°C durante 1 min, 1 ciclo a 95°C durante 15 s, 1 ciclo a Tm°C durante 15 s, 1 ciclo a 72°C durante 10 s, 1 ciclo a 72°C durante 5 s, esto se repite por 40 ciclos y ciclo a 4°C al ∞. El producto de reacción se corrió en un gel de agarosa (#50070, SEAKEM, USA) al 1% con bromuro de etidio en 100 mL de buffer TAE 1X (Tris, ácido acético, EDTA).

PCR-tiempo real (qPCR): se utilizaron 5 µL de una dilución 1:5 del cDNA y 5 µL de una mezcla 1:10 de SYBR-Green qPCR MasterMix (Thermo Scientific, K0223) con los iniciadores. La reacción se lleva a cabo en el termociclador PCR CFX96 (BioRad). Utilizando el protocolo: 15 s a 95°C, 30 s a Tm de los iniciadores y 30 s a 72°C, por 40 ciclos.

Tabla 1:

Iniciadores de PRL y R-PRL

Gen		Secuencia 5'-----3'	Tm °C	% de Eficiencia
R-PRL	S	CCA GGA GAG TTC CGT TGA AAT G	63.2	119.4
	AS	GGT GGA AAG ATG CAG GTC AT		
PRL	S	CAA TGA CGT CCC CAC TTC TTC C	62	102
	AS	AGC CGC TTG TTT TGT TCC TCA		
H-PRT	S	GAC CGG TTC TGT CAT GTC G	60.2	121.5
	AS	ACC TGG TTC ATC ATC ACT AAT CAC		

5.2.4 Establecimiento del modelo de estrés oxidativo con H₂O₂.

Para el establecimiento de un modelo de estrés oxidativo, cultivos de astrocitos corticales fueron tratados con dosis crecientes de 200, 400, 600 y 800 µM de H₂O₂ por 3 h, al cabo de las cuales se evaluó la viabilidad celular mediante un ensayo de MTT y se seleccionó la dosis letal media para posteriormente investigar los efectos protectores de la PRL.

Ensayo de MTT: Este ensayo permite evaluar la viabilidad metabólica de los astrocitos, ya que está basado en la reducción metabólica mediada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa del compuesto bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) a cristales de formazan y los cuales poseen una coloración azul-morado. Siendo así la cantidad de células metabólicamente activas proporcional a la cantidad de formazan producido (Denizot

& Lang, 1986; Mosmann, 1983). A cada pozo se le adicionaron 10 μ L de la solución de MTT a una concentración de 5 mg/mL (M5655, Sigma, EUA) en PBS y se incubaron las placas por 3 h, posteriormente se aspiró el medio y a cada pozo se añadieron 100 μ L del disolvente (solución de SDS al 10% y 0.01N de HCl), las placas fueron colocadas en agitación lenta durante toda la noche. Finalmente, al día siguiente se midió la densidad óptica con un espectrofotómetro Varioskan Flash spectral scanning multimode reader (Thermo Scientific) a una longitud de onda de 570 nm.

5.2.5 Evaluación del efecto protector de la PRL sobre los astrocitos.

Tratamiento con PRL ovina (oPRL) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2): Los astrocitos fueron resembrados en placas de 96 pozos y se incubaron a 37°C. A las 48 h se cambió el medio (DMEM-suplementado) y se realizó un tratamiento con AraC 10 μ M y esto se repitió 48 h después para tratar de eliminar remanentes de microglia. Posteriormente el séptimo día después de resembrar, se cambió el medio por DMEM no suplementado y las células fueron tratadas con o sin dosis crecientes de 0.1, 0.25, 0.5, 1, 10, 50 y 100 nM de oPRL (L-6520, Sigma-Aldrich, EUA). Fueron incubadas a 37°C por 24 h, al cabo de las cuales se les indujo el daño con la concentración de 400 μ M de H_2O_2 por 3 h a 37°C y se evaluó la viabilidad celular mediante un ensayo de MTT.

Posteriormente, se seleccionaron las dosis de 1 y 10 nM de oPRL y fueron probadas utilizando el mismo diseño experimental previamente descrito, para observar su capacidad protectora sobre la viabilidad celular de los astrocitos contra las dosis crecientes de 200, 400, 600 y 800 μ M de H_2O_2 , medida por el ensayo de MTT.

5.2.6 Análisis morfológicos de los astrocitos.

Los astrocitos fueron resembrados en cubreobjetos de vidrio de acuerdo al procedimiento descrito en secciones anteriores. Posteriormente, fueron tratados con una dosis única de 10 nM de oPRL por 24 h, y al término de las cuales se les trató con 400 μ M de H_2O_2 durante 3 h. Los cambios morfológicos en respuesta a los tratamientos se evaluaron a través de análisis de microfotografías en campo claro

a 4X; así como mediante la tinción del citoesqueleto con faloidina acoplada a rodamina observado a 4 y 20X (R415, Molecular probes, EUA).

Tinción faloidina-rodamina: La faloidina es un péptido bicíclico perteneciente a la familia de toxinas aisladas del mortal hongo (*Amanita phalloides*) conocido como “capón de la muerte”, y utilizado comúnmente para marcar selectivamente las fibras de F-actina. La faloidina marcada fluorescentemente con Rodamina proporciona una fluorescencia rojo-naranja (Invitrogen™ R415). Después de los tratamientos con oPRL y H₂O₂, las células fueron fijadas en los cubreobjetos con paraformaldehído y permeabilizadas con Tritón X-100 de acuerdo al procedimiento anteriormente descrito para las inmunocitofluorescencias. Posteriormente, se pasaron los cubreobjetos a una cámara húmeda y se bloquearon con BSA al 5% en PBS por 30 min a temperatura ambiente. Se retiró el BSA y se incubaron con 5 µL de faloidina diluidos en 200 µL de PBS (200 nM) por cada cubreobjetos durante 20 min a temperatura ambiente. Por último, se lavaron tres veces por 5 min con PBS y se retiró el PBS para ser montados sobre portaobjetos usando 10 µL de Vectashield con DAPI (Vector Laboratories, 150078555). Las laminillas fueron observadas y fotografiadas con el microscopio confocal LSM 780 (Zeiss, Alemania).

5.2.7 Análisis de la expresión de las enzimas antioxidantes y factores responsivos a estrés oxidativo.

A partir del RNA obtenido de cultivos de astrocitos tratados con 10 nM de oPRL durante 24 h, y posteriormente con 400 µM de H₂O₂, se analizaron mediante qPCR los cambios en la expresión de las enzimas antioxidantes manganeso superóxido dismutasa (MnSOD), Cu/Zn superóxido dismutasa (Cu/ZnSOD), peroxirredoxina 6 (Prdx-6), peroxirredoxina 1 (Prdx-1), glutatión peroxidasa 1 (GPX-1), catalasa (Cat), hemo-oxigenasa-1 (HO-1), glutatión S-transferasa mu 1 (Gstm1) y glutatión S-transferasa mu 3 (Gstm3) para dilucidar los posibles efectores de la protección ejercida por la PRL. Estas enzimas antioxidantes son reguladas por factores de transcripción activados por diferentes vías de señalización, como Stat3 que promueve la expresión de MnSOD a través de la fosforilación de Jak2. Otro factor importante en la regulación de enzimas como la HO-1, la Cat, la GPX, entre otras,

es Nrf2; el cual puede ser activado por la vía PI3K/Akt/ERK. Asimismo, c-Jun se ha descrito como un factor de transcripción importante en la regulación de enzimas antioxidantes, siendo activado a través de la vía de las MAPK (Jung, Kim, Narasimhan, Song, & Chan, 2009; Kanzaki et al., 2017; Na et al., 2008; Sadí, 2010). Dado que en trabajos previos se ha descrito que todas estas vías de señalización son activadas por la interacción de la PRL con su receptor, estos podrían ser posibles mecanismos de acción de esta hormona. La MnSOD reduce los radicales superóxido en la matriz mitocondrial mientras que la SOD1 lo hace en el citosol, la Prdx-6 está altamente asociada con efectos antioxidantes en los astrocitos, la Prdx-1 como una molécula de señalización celular estimulada por H₂O₂, la GPX-1 se ha descrito que desempeña un papel importante en la protección de las células del SNC contra el estrés oxidativo, la Cat cuya función es proteger a las células del efecto tóxico del H₂O₂, las Gstm 1 y 3 como parte del mecanismo de desintoxicación celular, mientras que la HO-1 cataliza el paso limitante de degradación del grupo hemo; siendo sus productos monóxido de carbono (CO), hierro y biliverdina, que pueden proveer de protección antioxidante en una gran variedad de células y tejidos. Además, se evaluaron cambios en la expresión de GFAP y del factor nuclear-2 (Nrf2), ya que se ha reportado un incremento en la transcripción de GFAP ante un estímulo nocivo como el H₂O₂, mientras que Nrf2 se ha reportado como un factor de transcripción mediador de la respuesta de los astrocitos ante estrés oxidativo (Dowell & Johnson, 2013).

Tabla 2:

Iniciadores de enzimas antioxidantes

Gen		Secuencia 5'-----3'	Tm °C	% de Eficiencia
MnSOD	S AS	TCA GGA CCC ACT GCA AGG A GCG TGC TCC CAC ACA TCA	59.2	123.2
Cu/Zn SOD	S AS	GGT GTC AGG ACA GAT TAC AGG ACC GCC ATG TTT CTT AGA GTG	55.7	94.5
Prxs-6	S AS	TTG ATG ATA AGG GCA GGG AC CTA CCA TCA CGC TCT CTC CC	54.3	71.8
Prx-1	S AS	CTT TGA ATG AAT TGT CCA TCC GGC GTT TGT GAT GTG AGA CCT GTA GCT CG	58.6	91.3
GPX-1	S AS	CTC GGT TTC CCG TGC AAT CAT ACT TGA GGG AAT TCA GAA TCT CTT	57	98.6
Cat	S AS	ACC CAC AAA CTC ACC TGA AG TGT GAG CCA TAG CCA TTC ATG	60	99.2
HO-1	S AS	CCT GCT AGC CTG GTT CAA G CAT AAA TTC CCA CTG CCA CG	53	97.6
Gstm1	S AS	TGA CAT TCT TGA CCA GTA CCA C AAA TAT AGGT GTT GAG AGG TAG CG	58.4	88.6
Gstm3	S AS	AGT ACC GTA TGT TTG AGC CC AAC ACA GGT CTT GGG AGA AAG	58	82.2
Nrf2	S AS	CCA CAT TCC CAA ACA AGA TGC GTG AAG ACT GAG CTC TCA ACG	59	97.8
GFAP	S AS	CCG TTC TCT GGA AGA CAC TGA AAC TTG GAA GGA TGG TTG TGG ATT C	55	98.4

*Nota: Se utilizó el gen constitutivo H-PRT, como control de carga y de cantidad de ADN para el cálculo de la expresión relativa del gen de estudio mediante la fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Huggett, Dheda, Bustin, & Zumla, 2005).

5.2.8 Determinación de la respuesta de astrogliosis.

Se ha reportado en otros trabajos que los astrocitos son altamente responsivos a estímulos nocivos, volviéndose astrocitos reactivos, lo cual se refleja por el aumento en la expresión de GFAP. Para observar estos cambios en la expresión en esta proteína, se realizó una inmunocitofluorescencia para GFAP, en los astrocitos tratados con oPRL y/o H₂O₂ bajo el diseño experimental y el protocolo para la inmunocitofluorescencia descritos anteriormente. Las laminillas fueron observadas y fotografiadas en formato Tile-Scan con el microscopio confocal LSM 780 (Zeiss, Alemania).

5.2.9 Análisis de la capacidad antioxidante total.

En cultivos de astrocitos tratados con 10 nM de oPRL durante 24 h, y al término de las cuales se les trató con 400 μM de H_2O_2 , se analizaron los cambios en la capacidad antioxidante total, mediante el uso de un ensayo químico (Antioxidant assay, Cayman, № 709001). Este ensayo mide la capacidad de los antioxidantes en la muestra para inhibir la oxidación de ABTS® (2,2'-azino-di-[3-etilbenzotiazolina sulfonato]) a ABTS®⁺, por metmioglobina. La cantidad de ABTS®⁺, producido se detectó midiendo la absorbancia a 750 nm. La capacidad de los antioxidantes en la muestra para prevenir la oxidación de ABTS se comparó con la de Trolox, un análogo del tocoferol soluble en agua, y se cuantificó como equivalentes molares de Trolox.

Las muestras de lisados celulares se cosecharon en PBS, se centrifugaron a 2000 rpm por 10 min a 4°C, se retiró el PBS y se les añadió 1 mL buffer no enzimático frío (5 mM fosfato de potasio, pH 7.4, con 0.9% de cloruro de sodio y 0.1% de glucosa). Las muestras fueron homogenizadas con sonicador a una amplitud del 50% por 5 s y se centrifugaron a 13,200 rpm por 20 min a 4°C, obteniendo el sobrenadante para el ensayo enzimático.

Se preparó una curva estándar de Trolox y todos los reactivos que se utilizaron, según las indicaciones del estuche comercial. Por otro lado, para cada muestra se realizó un Bradford para cuantificar la cantidad de proteína. Para la realización del ensayo se tomaron 6 μg de proteína y se ajustó el volumen con el buffer del ensayo a 20 μL , se añadieron 10 μL de metmioglobina y 150 μL del cromógeno y por último a cada muestra se le añadieron 40 μL de la dilución indicada en el kit de H_2O_2 . Se cubrió la placa con aluminio y se incubó a temperatura ambiente por 5 min en agitación baja. Finalmente se midió la densidad óptica con un espectrofotómetro Varioskan Flash spectral scanning multimode reader (Thermo Scientific) a una longitud de onda de 750 nm.

5.2.10 Análisis de la transducción de señales del R-PRL involucradas en el efecto protector de la PRL en los astrocitos.

Los cultivos de astrocitos fueron incubados con 10 nM de oPRL y cosechados a los 5, 10, 20, 40 y 60 min, y a las 4 y 24 h, mediante un raspado con PBS frío, posteriormente se centrifugaron y se obtuvo el pellet celular, al cual se le agregó 100 µL de buffer de lisis (Tris HCl 1M (4103-02, J.T. Baker) pH 7.5, EGTA 0.2M (E-4378, Sigma) pH 7.5, EDTA 0.2M (3002E, Research Organics) pH 7.5, 1% Nonidet PAO 1% (Igepal, CA-630), ortovanadato de sodio 0.1M (Na₃VO₄, S6508, Sigma), fluoruro de sodio 0.05M (NaF, S7920, Sigma), pirofosfato de sodio 5mM (221362, Sigma), sacarosa 0.26M (4072-05, J.T. Baker)) y se agitaron por 30 min, posteriormente fueron disgregadas con sonicador por 5 s y se centrifugaron a 13,200 rpm por 20 min a 4°C. Para todos los casos, se recuperó el sobrenadante y se determinó la concentración de proteínas total utilizando el ensayo de Bradford (Protein Assay; 500-0006, Bio-Rad). Se utilizaron 30 µg de cada muestra, las cuales fueron reducidas agregando buffer de Laemmli (1:1; SDS 10% (Sodio Dodecil Sulfato; 161-0302, Bio-Rad), glicerol 20% (G-6279, Sigma), azul de bromofenol 0.5% (161-0404, Bio-Rad), Tris HCl 0.5M (4103-02, J.T. Baker) pH 6.8) más β-mercapto-etanol (1:20; 1610710, Bio-Rad), y se calentaron por 5 min a 97°C.

Las muestras preparadas con Laemmli se resolvieron en geles de SDS-poliacrilamida al 10% bajo condiciones reductoras y desnaturalizantes, después se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (9004-70-0, Bio-Rad), por transferencia húmeda. Posteriormente las membranas fueron bloqueadas por 1 hora a temperatura ambiente con leche al 5% en TBS-T, se enjuagaron y se incubaron durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos policlonales anti-pSTAT5 de rata (Cell Signaling Tyr694, dilución 1:500), anti-pSTAT3 de rata (Cell Signaling Tyr705, dilución 1:2000), anti-STAT5 de rata (Santa Cruz Biotechnology sc-835, 1:350), anti-STAT3 de rata (Santa Cruz Biotechnology sc-483, 1:350) y anti-β-tubulina (abcam, 1:500) según fuera el caso. Los complejos antígeno-anticuerpo fueron detectados mediante anticuerpos secundarios acoplado a peroxidasa de rábano (HRP por sus siglas en inglés), con el kit de revelado SuperSignal™ West Dura Extended Duration

Substrate (Thermo Scientific, # 34076), analizados con el visualizador FluorChem E system (Protein simple, EUA) y analizados con el software AlphaView for FluorChem™ Systems (Protein simple, EUA) y el ImageJ (National Institutes of Health, EUA).

5.2.11 Análisis estadístico.

Los datos se presentan como medias \pm error estándar de la media. La significancia estadística se determinó por el análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba post-hoc de Bonferroni. El análisis estadístico se llevó a cabo usando el programa SigmaPlot 11.0. Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

VI.- RESULTADOS

6.1 Establecimiento de cultivos de astrocitos corticales de rata.

Se realizó el aislamiento de astrocitos corticales de rata neonata (P0) Wistar, obteniendo cultivos como el que se observa en la siguiente imagen (Fig. 8) tomada al *día in vitro* diez (DIV).

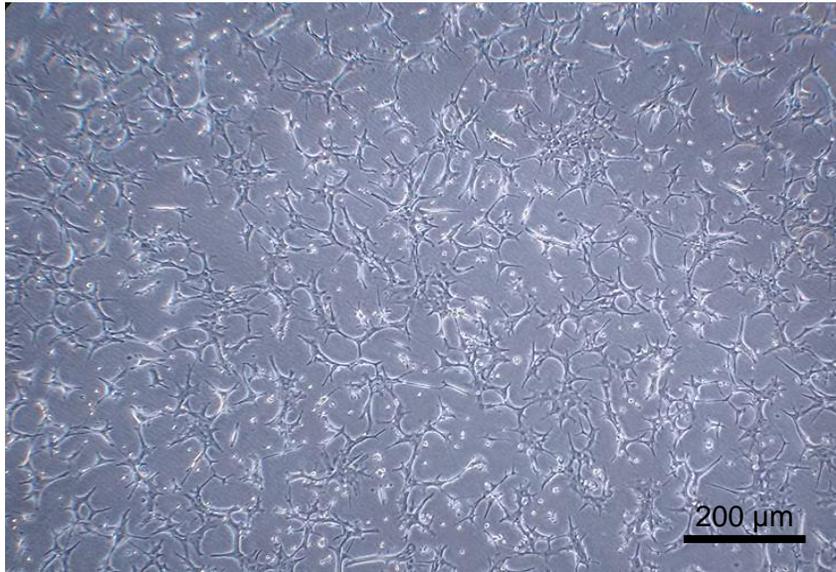


Figura 8. Cultivo primario de astrocitos corticales de rata neonata. Microfotografía representativa de contraste de fases en campo claro de un cultivo al DIV 10 tomada con un objetivo 4X.

Los cultivos fueron llevados a confluencia, es decir, los astrocitos están en contacto unos con otros, formando una monocapa de células que inhibe su crecimiento por contacto. Para determinar el tiempo que tardan los cultivos en llegar a confluencia se realizó un monitoreo diario de su crecimiento, determinando que el DIV 12 la mayoría de los cultivos llegaban a la confluencia celular (Fig. 9).

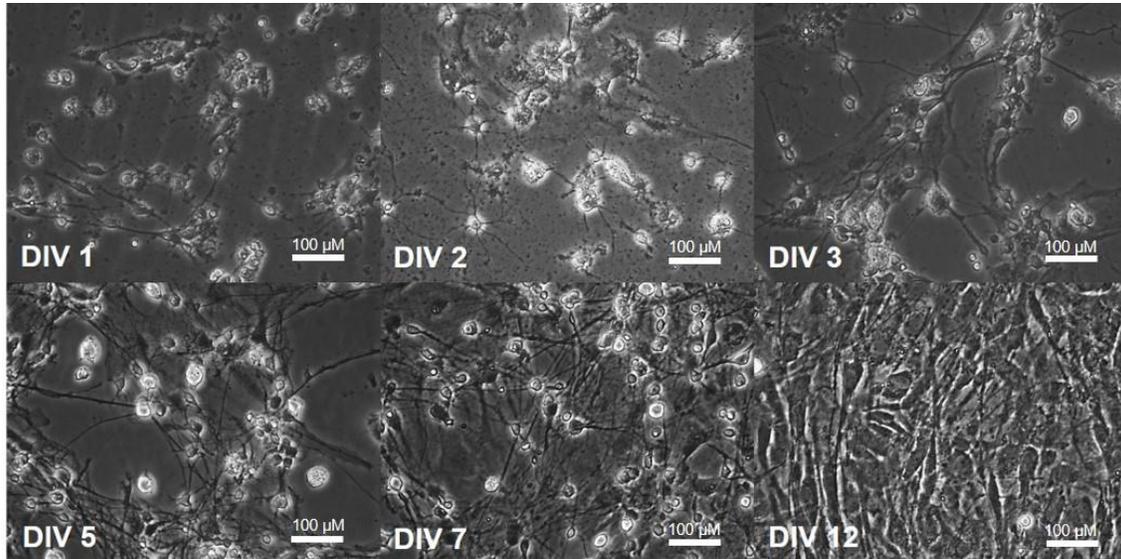


Figura 9. Establecimiento de cultivos primarios de astrocitos corticales de rata neonata. Microfotografías representativas de contraste de fases en campo claro del crecimiento de un cultivo en los días 1, 2, 3, 5, 7 y 12 *in vitro* (DIV). Tomadas con un objetivo 20X.

6.2 Caracterización del cultivo de astrocitos corticales de rata.

La presencia de los astrocitos fue corroborada mediante una inmunocitoquímica para la proteína gliofibrilar ácida conocida por sus siglas en inglés como GFAP (marcador de astrocitos). Mostrando que los cultivos son altamente enriquecidos en

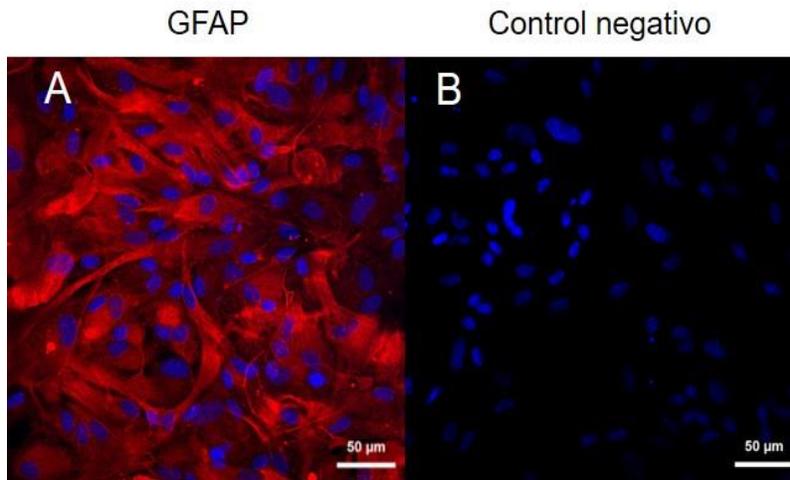


Figura 10. Caracterización de cultivos primarios de astrocitos. **(A)** Fotografía representativa de inmunocitoquímica para GFAP de astrocitos corticales aislados de ratas Wistar neonatales. **(B)** Control negativo (sin anticuerpo primario). Núcleo celular marcado con DAPI (azul). La ausencia de cuerpos celulares teñidos con DAPI, pero no con GFAP indica una alta pureza de los cultivos de astrocitos corticales.

astrocitos dado que se puede observar que prácticamente todas las células reveladas por la tinción de sus núcleos con DAPI muestran la inmunotinción positiva para GFAP marcada en su citoplasma en rojo (Fig. 10).

6.3 Determinación de la expresión de la PRL y del R-PRL en astrocitos corticales de rata.

Dado el efecto protector de la PRL sobre los astrocitos es probable que estas acciones estén mediadas a través de su receptor, por lo que se determinó si el R-PRL es expresado por estas células. Aunado a esto se investigó la expresión del gen de la PRL para dilucidar si esta pudiera estar actuando de manera autocrina al ser producida por los propios astrocitos.

Los productos de la RT-PCR punto final se corrieron en un gel de agarosa, donde se observa una banda de amplificación del gen del R-PRL en los astrocitos corticales de igual tamaño a la observada en el control positivo de hipófisis de rata, y que no se observa en el control negativo (sin muestra) (Fig. 11A). Por otra parte, no se observó la expresión del gen de PRL en los astrocitos corticales (Fig. 11B).

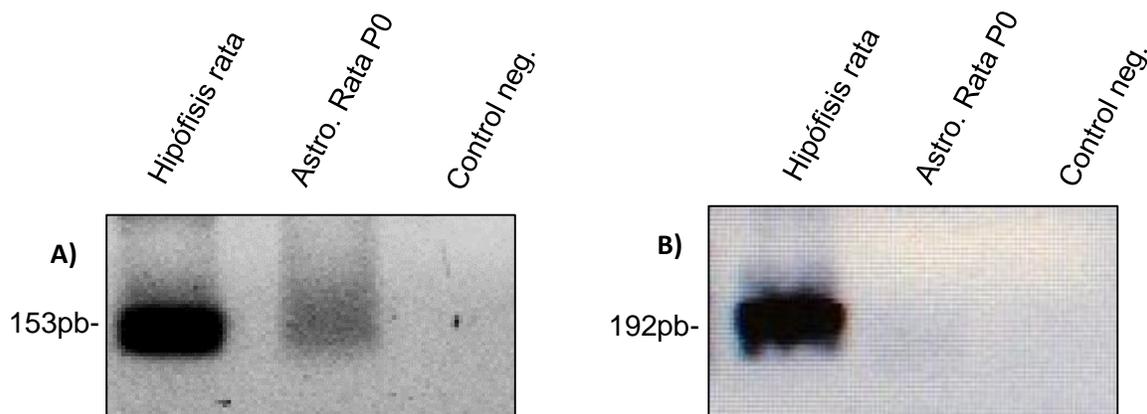


Figura 11. Expresión del gen del receptor de PRL y de la PRL en cultivos de astrocitos corticales de rata. Productos de amplificación de PCR punto final analizados en gel de agarosa al 1% **A)** del gen del R-PRL y **B)** el gen de la PRL, en los cultivos de astrocitos de rata.

Estos resultados se corroboraron por PCR cuantitativa. En la figura 12, se muestran las curvas de amplificación tanto del R-PRL (Fig. 12A), como de la PRL (Fig. 12B), y observamos una curva de amplificación para el gen del R-PRL (Ct=26.49, línea verde, Fig.12C) pero no así para el gen de la PRL (Fig. 12B). Además, se utilizaron muestras de ADN de hipófisis de rata como control positivo de la expresión de ambos genes (curvas en rojo), teniendo valores de Ct de 19.64 para el R-PRL (Fig.12C) y Ct de 3 para el gen de PRL. Estos resultados muestran la expresión del R-PRL en los astrocitos, lo que sugiere que los astrocitos pueden ser blanco de las acciones de la PRL a través de su receptor.

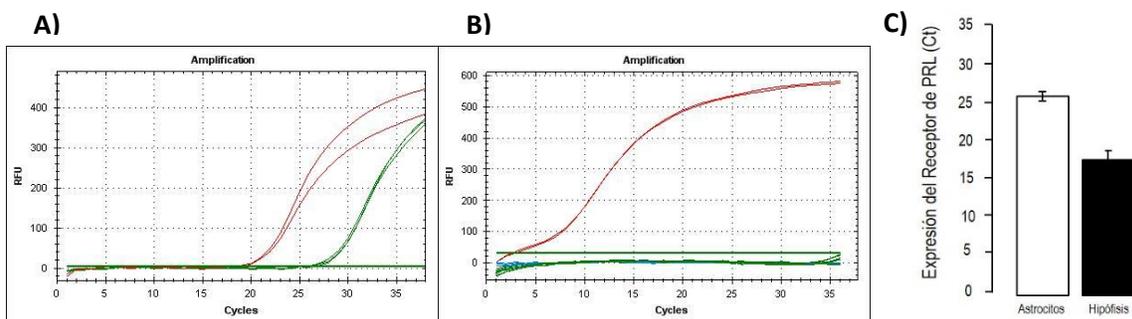


Figura 12. Expresión del R-PRL y PRL mediante qPCR. **A)** Curvas de amplificación correspondiente al gen del R-PRL en el cultivo de astrocitos de rata (verde) e hipófisis de rata (rojo). **B)** Curvas de amplificación para el gen de PRL en el cultivo de astrocitos de rata (verde) e hipófisis (rojo). **C)** Gráfica con los valores de Ct de la amplificación para el gen del R-PRL mediante qRT-PCR.

6.4 Establecimiento de un modelo de estrés oxidativo *in vitro*.

Para establecer un modelo de estrés oxidativo, los cultivos de astrocitos fueron tratados con concentraciones crecientes de H₂O₂, utilizando las concentraciones de 200 μM, 400 μM, 600 μM y 800 μM. Posteriormente se evaluó la viabilidad celular mediante un ensayo de MTT y se encontró que el H₂O₂ reduce de manera dosis dependiente la viabilidad celular de los astrocitos. Siendo la dosis letal media 400 μM de H₂O₂ (Figura 13).

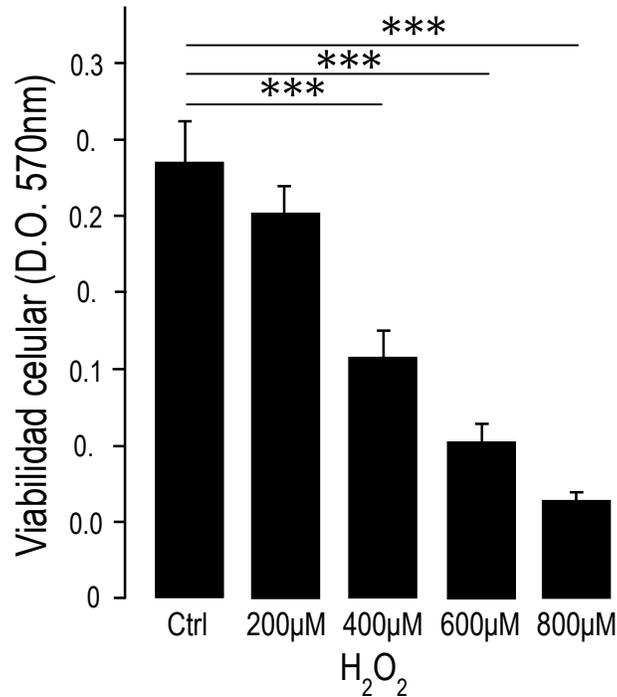


Figura 13. El estrés oxidativo inducido por H₂O₂ reduce la viabilidad de los astrocitos de manera dosis dependiente. Los cultivos de astrocitos se trataron con dosis crecientes de H₂O₂ desde 200 μM hasta 800 μM durante 3 h y luego se evaluó la viabilidad celular mediante ensayo de MTT. Para investigar más a fondo el efecto protector de la PRL, elegimos la dosis de 400 μM de H₂O₂. Los datos son representativos de tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de una vía y la prueba post hoc Bonferroni; *** P < 0.001 frente al ctrl

6.5 Evaluación del efecto protector de la PRL sobre la supervivencia de los astrocitos ante el estrés oxidativo.

Como anteriormente se comentó, en un estudio previo de nuestro laboratorio, se demostró que la PRL previno la disminución en la viabilidad celular de los cultivos de astrocitos que fueron sometidos a un insulto con H₂O₂. Esto fue realizado bajo condiciones experimentales distintas a las utilizadas en éste estudio, ya que las temporalidades de los cultivos de los astrocitos fueron diferentes y no se trataron con AraC para eliminar la microglía, que en este trabajo si se llevó a cabo.

Se tomaron fotografías representativas tras la incubación con el MTT, de los astrocitos tratados o no, con la concentración de 10 nM de PRL y las concentraciones crecientes de H₂O₂. La cantidad de cristales de formazan observados disminuyó significativamente y de manera progresiva en los astrocitos que no fueron tratados con PRL a partir de la concentración de 400 μM de H₂O₂ en comparación al control sin H₂O₂ (Fig. 14). En cambio, en los cultivos de astrocitos tratados con 10 nM de PRL no se observa una disminución en la cantidad de cristales de formazan luego de ser tratados con 400 μM de H₂O₂; mientras que en las concentraciones de 600 y 800 μM ya se observa una notable disminución comparado a su control sin PRL (Fig. 14).

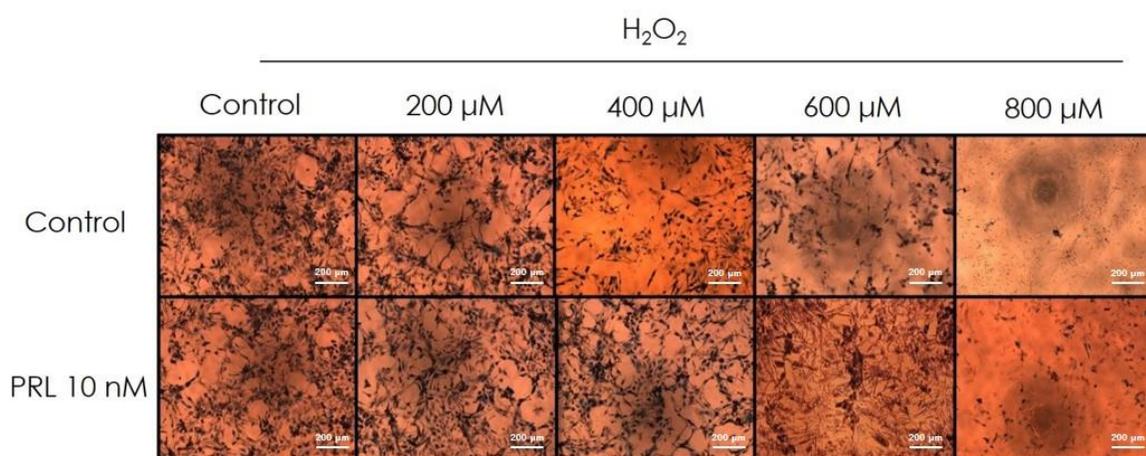


Figura 14. La prolactina protege a los astrocitos del daño inducido por H₂O₂. Se observan fotografías representativas de cultivos de astrocitos corticales que fueron tratados con PRL (10 nM) en ausencia o presencia de concentraciones crecientes de H₂O₂ desde 200 μM hasta 800 μM por 3 h, evaluando la viabilidad celular mediante un ensayo de MTT. Observamos los cristales de formazan formados dentro de las mitocondrias metabólicamente activas de los astrocitos en un color púrpura. Tomadas con un objetivo 20X.

Enseguida, los astrocitos corticales fueron tratados con dosis crecientes de PRL de 0.1 a 100 nM durante 24 h al cabo de las cuales se les indujo el daño oxidante con 400 μM de H₂O₂ durante 3 h y se evaluó la viabilidad celular, mediante un ensayo de MTT. Al disolver los cristales de formazan y completar el ensayo de MTT. Se encontró que a partir de la dosis de 1 nM, en todas las dosis probadas de PRL se prevenía la disminución en la viabilidad celular inducida por el H₂O₂ (Fig. 15A). Posterior a esto se seleccionaron las dosis de 1 nM y 10 nM de PRL y se determinó si estas dosis eran capaces de proteger la viabilidad celular de los astrocitos

sometidos a dosis crecientes de H₂O₂. Observamos que tanto la concentración de 1 nM como la de 10 nM de PRL previnieron la disminución de la viabilidad celular de los astrocitos cuando se trataron con la dosis letal media de H₂O₂ (Fig. 15B). Sin embargo, se observó que solo la dosis de 10 nM de PRL logró proteger la viabilidad celular de los astrocitos con la dosis de 600 μM de H₂O₂ (Fig. 15B). Estos resultados muestran que la PRL es un factor protector para los astrocitos ante un estrés oxidativo.

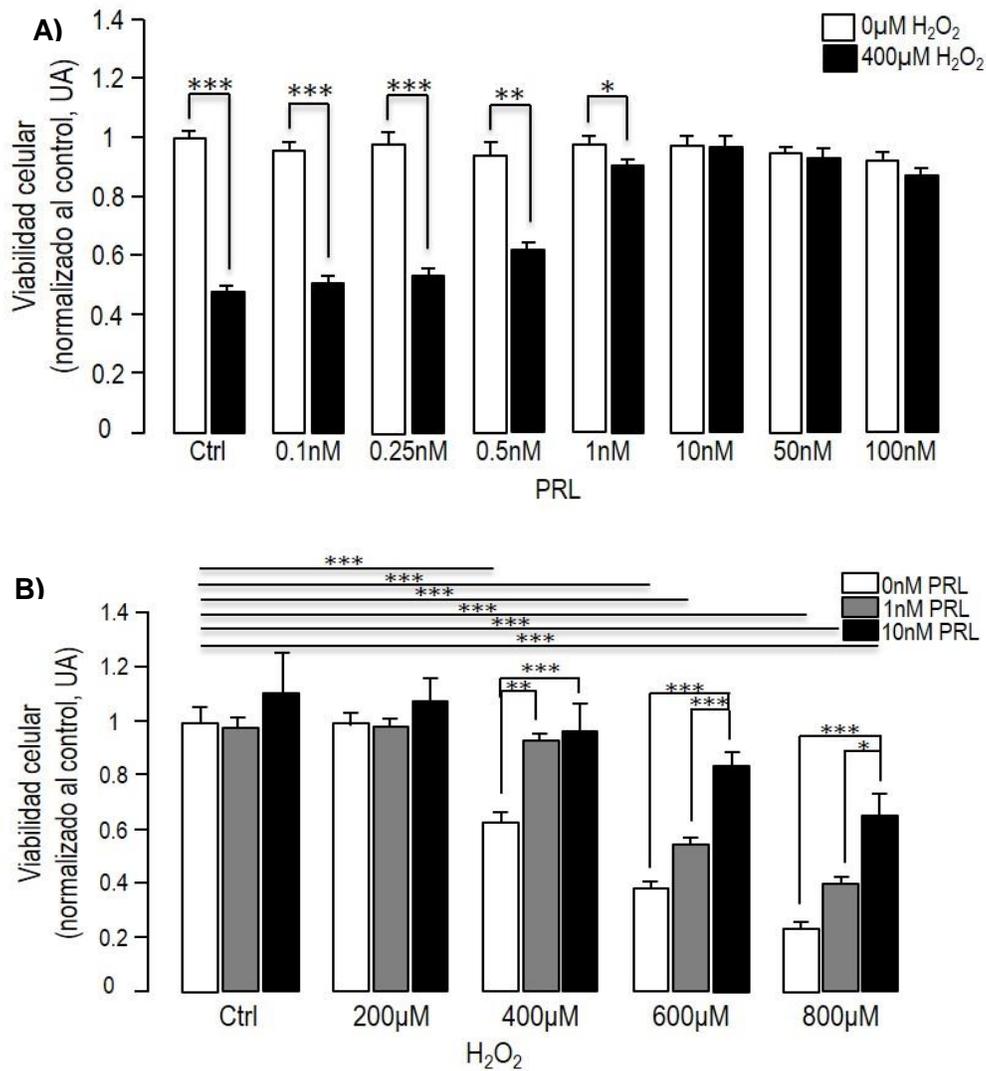


Figura 15. La prolactina protege a los astrocitos del daño inducido por H_2O_2 . **A)** Los astrocitos corticales fueron tratados con concentraciones crecientes de PRL de 0.1 a 100 nM durante 24 h y luego se expusieron al estrés oxidativo inducido con 400 μM de H_2O_2 durante 3 h. **B)** Los cultivos de astrocitos se trataron con dos concentraciones de PRL (1 nM y 10 nM) durante 24 h, después de lo cual se trataron con concentraciones crecientes de H_2O_2 desde 200 μM hasta 800 μM por 3 h. En ambos experimentos, la viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo MTT. Los datos son representativos de tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía y la prueba post hoc Bonferroni; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

6.6 Cambios morfológicos en los astrocitos inducidos por el estrés oxidativo.

Las microfotografías de contraste de fases en campo claro de los cultivos de astrocitos tratados con la concentración de 400 μM de H_2O_2 mostraron aparentes cambios morfológicos tales como proyecciones más largas y delgadas comparadas al control. Además, estos cambios no se observan en los astrocitos tratados solo con PRL, ni en los astrocitos tratados tanto con PRL como con H_2O_2 , (Figura 16).

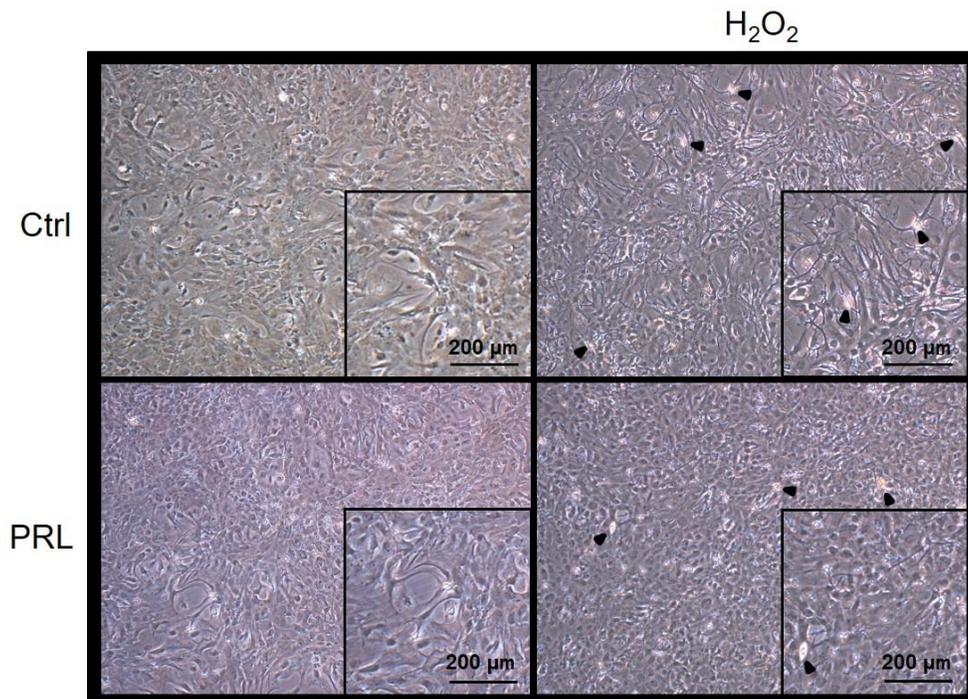


Figura 16. Cambios en la morfología celular de los astrocitos en respuesta al H_2O_2 . Los astrocitos tratados con H_2O_2 , presentan proyecciones más largas y delgadas comparadas al control, además se observan células desprendidas del fondo, refractando la luz, señaladas por flechas negras. La PRL no produce cambios aparentes en la morfología de los astrocitos y evita los cambios morfológicos inducidos con H_2O_2 . Tomadas con un objetivo 4X.

Para poder observar de manera directa el rearrreglo o cambios en la morfología del citoesqueleto de los astrocitos, se realizó un marcaje con faloidina acoplada a rodamina, la cual se une a las fibras de actina. Esta tinción permitió ver las fibras de actina y su acomodo con cada uno de los tratamientos a los que fueron sometidos los astrocitos. En los cultivos de astrocitos que no recibieron tratamiento alguno, se aprecia un acomodo estructurado de las fibras de actina, formando el citoesqueleto definido alrededor de cada núcleo (Fig. 17A y B). Por otro lado, se observa que en los cultivos tratados con la concentración de 10 nM de PRL, hay un aumento exacerbado en la cantidad de fibras de actina, las cuales mantienen una estructura definida parecida al control, aunque mostrando fibras más intensas y engrosadas (Fig. 17C y D). Mientras que en los cultivos de astrocitos tratados únicamente con 400 μ M de H₂O₂, se observa la pérdida de estas fibras de actina, las cuales se ven discontinuas y sin una estructura definida comparadas al control (Fig. 17E y F). Por último, en los cultivos tratados tanto con PRL como con H₂O₂, se aprecia una mayor cantidad de fibras de actina, las cuales se mantienen definidas; sin embargo, no presentan el acomodo alrededor de los núcleos como se observa en el control y los tratados solo con PRL (Fig. 17H y I).

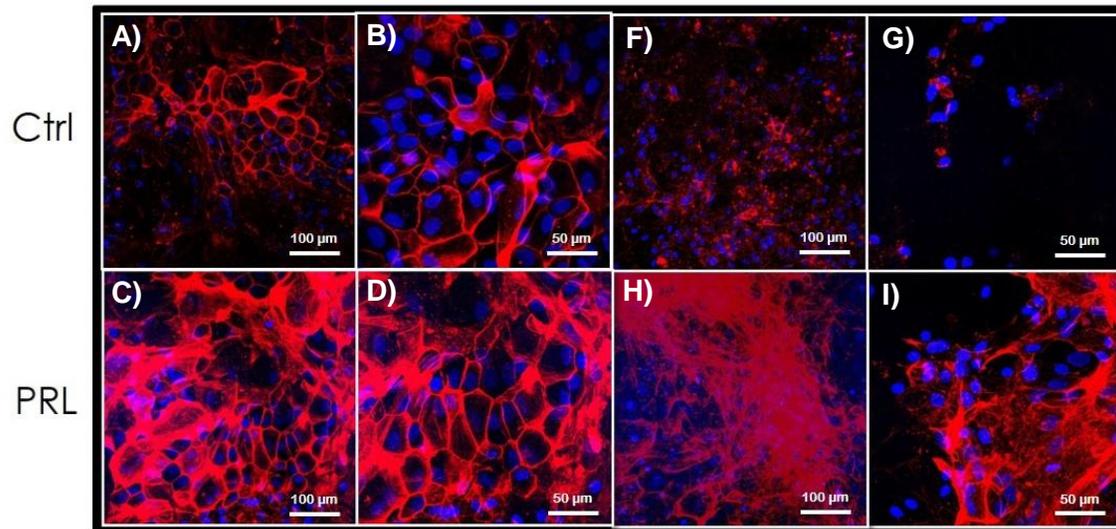


Figura 17. La PRL disminuye el rearreglo en las fibras de actina de los astrocitos inducido por el H₂O₂. Fotografías representativas de los astrocitos teñidos con faloidina/rodamina (rojo). **A y B)** Control, donde se observan fibras de actina definidas y formando la estructura del citoesqueleto de las células, **C y D)** Tratados con PRL, se observa un aumento en la cantidad de fibras de actina, **F y G)** Tratados con H₂O₂, se observan fibras punteadas y estructuras no definidas, **H y I)** Tratados con PRL y H₂O₂ presentan fibras desorganizadas y sin una formación estructural definida. Núcleos teñidos con DAPI (azul). Tomadas con los objetivos de 4X y 20X.

Ambas figuras 16 y 17, muestran cambios en la estructura y organización del citoesqueleto de los astrocitos inducido por el H₂O₂, reconocido por la pérdida de las proyecciones y de la configuración estructural que se observa en el control.

6.7 Cambios de expresión del R-PRL en astrocitos corticales de rata ante el estrés oxidativo.

Se buscaron cambios en la expresión del R-PRL ya, que en diferentes tejidos se ha encontrado que la PRL *per se* es capaz de inducir la expresión de su receptor. Los astrocitos fueron tratados con o sin PRL (10 nM) y luego sometidos o no al insulto con H₂O₂ (400 μM). Se cosecharon las células y se evaluaron los cambios en la expresión de la isoforma larga del R-PRL por qRT-PCR. Bajo condiciones basales, se observó un aumento significativo en la expresión del R-PRL en respuesta al tratamiento con PRL. Además, la PRL en presencia simultánea de un estímulo oxidante aumenta 1.28±0.22 la expresión relativa del R-PRL con respecto al control

no tratado con PRL ni con H₂O₂ y aumento 1.10±0.13 con respecto al grupo tratado con H₂O₂. Mientras que el tratamiento con H₂O₂ no modifica la expresión del R-PRL (Fig. 18). De acuerdo a estos resultados se observa que la PRL es capaz de inducir un aumento en la expresión de su receptor y este efecto se exagera bajo un ambiente pro-oxidante.

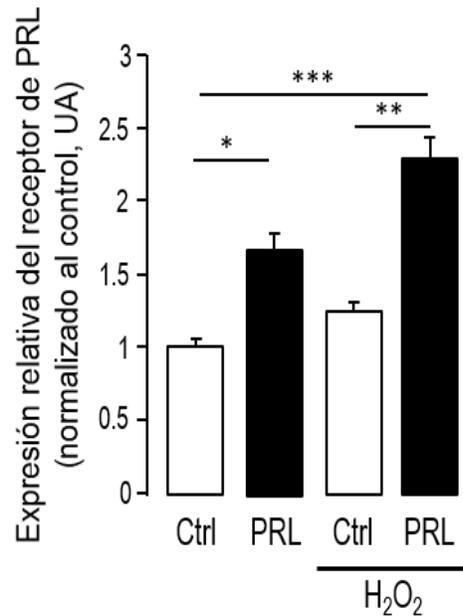


Figura 18. Expresión del R-PRL ante un daño oxidativo. Los cultivos de astrocitos se trataron con PRL (10 nM) por 24 h al término de las cuales se trataron con H₂O₂ (400 μM) durante 3 h y se obtuvo el ARN para evaluar los cambios en la expresión del receptor de PRL por qRT-PCR. Los datos son representativos de tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía y la prueba post hoc Bonferroni; ** P <0.01, *** P <0.001. Promedio de las veces de cambio.

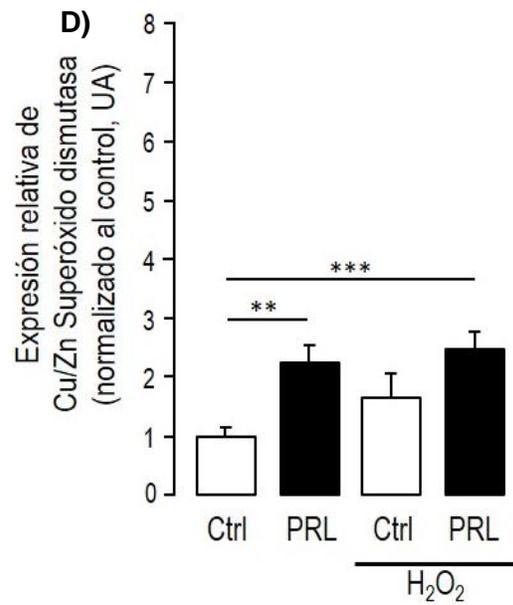
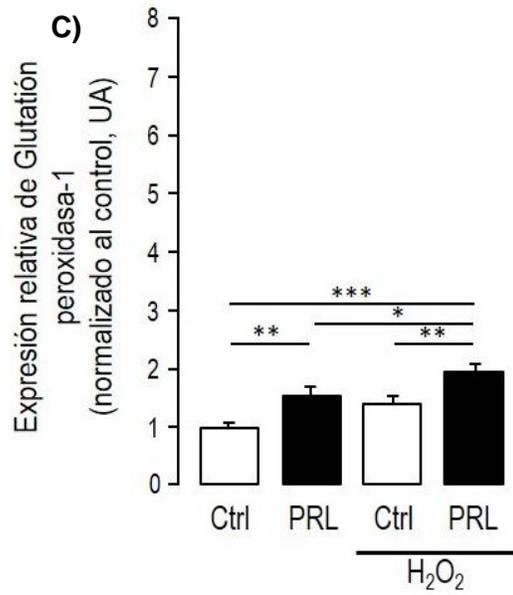
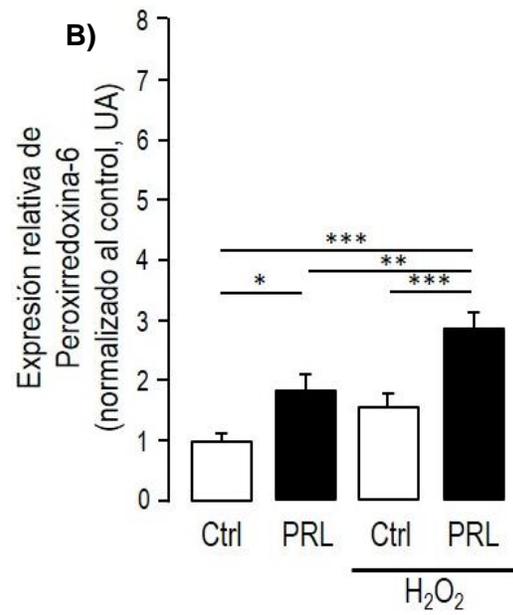
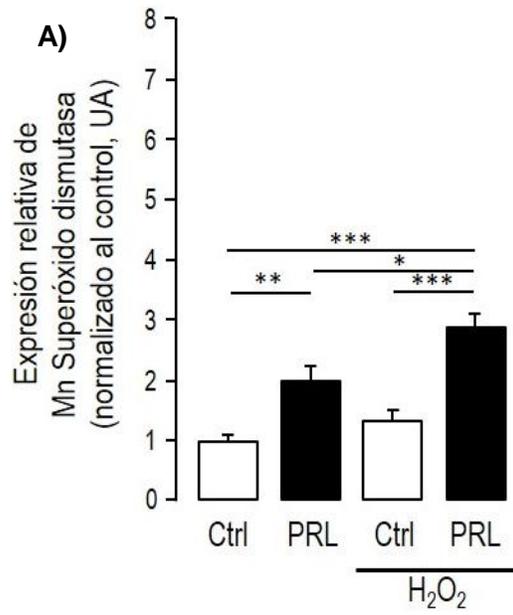
6.8 Cambios en la expresión de enzimas antioxidantes.

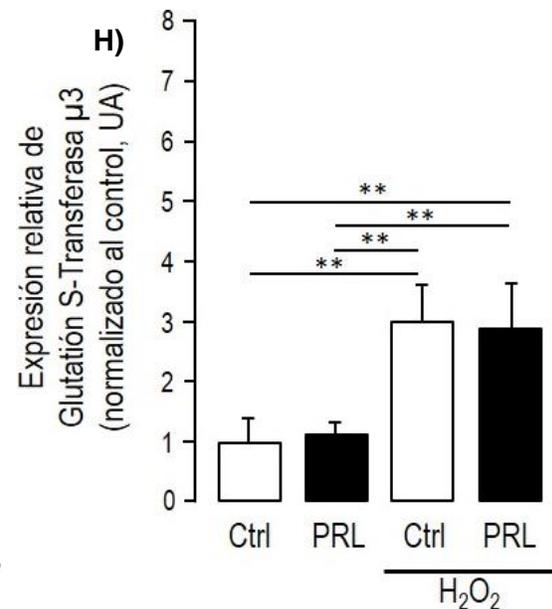
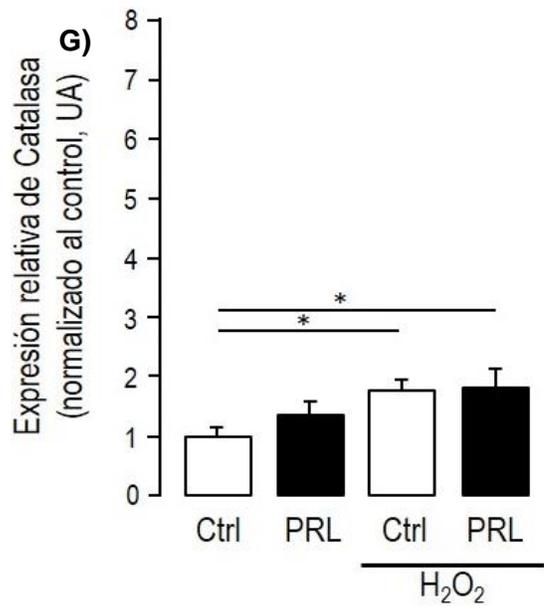
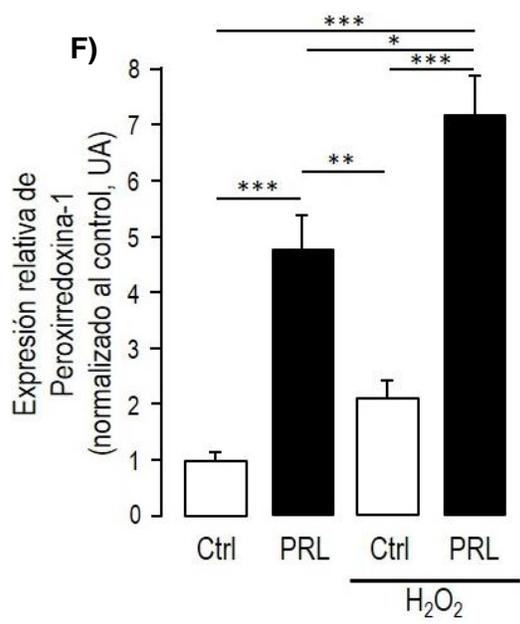
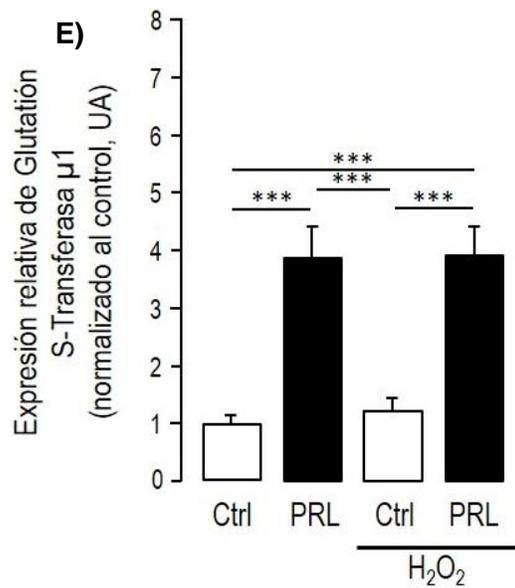
Se evaluaron los cambios de expresión de las enzimas antioxidantes mitocondriales MnSOD, Prdx-6, GPX-1 y citosólicas Cu/ZnSOD, Prdx-1, Cat, Gstm1, Gstm3 y HO-1. Estas enzimas juegan un papel importante en la respuesta y la protección de las células del SNC ante un daño inducido por el estrés oxidativo. Se observó que la PRL aumentó la expresión de las enzimas en 1.01±0.16 de MnSOD, 0.85±0.15 de Prx-6, 1.26±0.15 de Cu/ZnSOD (Fig. 19A, B y D), 0.54±0.08 la enzima GPX-1 (Fig. 19C), en 2.98±0.39 la expresión de Gstm1 (Fig. 19E) y 3.78±0.44 de la enzima Prdx-1 (Fig. 19F), todos los cambios con respecto al control. Además, se observó que los cultivos tratados solo con H₂O₂ aumentan la expresión de las enzimas Cat, Gstm3 y Hmox-1 en 0.8±0.01, 2.01±0.21 y 14.99±1.52 respectivamente en comparación al

control (Fig. 19G, H y I). El no encontrar cambios significativos en todas las enzimas evaluadas entre los grupos control y los tratados con H₂O₂, podría indicar que el H₂O₂ no está induciendo la expresión, pero quizá si la activación de estas enzimas antioxidantes.

Por otro lado, en el grupo tratado con PRL y con H₂O₂, se observan cambios de expresión más notorios en la mayoría de las enzimas, siendo un aumento de 1.51 ± 0.13 y 0.98 ± 0.4 respectivamente en las enzimas Cu/ZnSOD y GPX-1 (Fig. 19C y D), 1.87 ± 0.16 en MnSOD, 1.88 ± 0.14 en Prdx-6 y 1.89 ± 0.34 en Gstm3 (Fig. 19A, B y H), en 2.93 ± 0.34 más en la enzima Gstm1 (Fig. 19E), 0.85 ± 0.13 en Cat (Fig. 19G), 6.18 ± 0.54 más en la enzima Prdx-1 (Fig. 19F) y un aumento de 12.94 ± 1.51 en la Hmox-1 (Fig. 19I), todas con respecto al control.

Además, bajo condiciones oxidativas, se observa que la PRL aumento significativamente la expresión de algunas enzimas, como la MnSOD y la Prdx-6, ambas con un incremento de 0.85 ± 0.01 y de 1.03 ± 0.01 respectivamente, la GPX-1 cuyo aumento fue de 0.43 ± 0.03 y la Prdx-1 que aumento 2.40 ± 0.10 con respecto a las células tratadas con PRL (Fig. 19A, B, C y F). Finalmente, se observa que las enzimas Cu/ZnSOD y Gstm1 (Fig. 19D y E) presentan cambios en su expresión únicamente por el efecto de la PRL en los astrocitos. Sin embargo, hay que destacar el efecto aparentemente sumatorio del aumento en la expresión que se presenta en otras enzimas como, MnSOD, Prdx-6, Gpx-1 y Prdx-1 (Fig. 19A, B, C y F), es decir, el efecto inducido tanto por la PRL como por el H₂O₂.





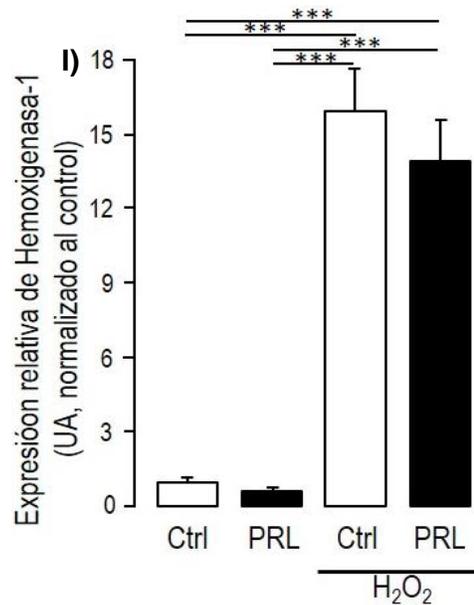


Figura 19. La PRL induce un aumento en la expresión de enzimas antioxidantes en condiciones basales y se exagera bajo estrés oxidativo. Los cultivos de astrocitos tratados con PRL (10 nM) indujeron un aumento en la expresión de las enzimas antioxidantes: **A)** Mn superóxido dismutasa, **B)** peroxirredoxina 6, **C)** glutatión peroxidasa 1, **D)** Cu/Zn superóxido dismutasa, **E)** Glutatión S-transferasa μ 1 y **F)** Peroxirredoxina 1 en condiciones basales, y este efecto fue exacerbado por el estrés oxidativo inducido por H₂O₂ con 400 μ M durante 3 h. Por otro lado, la expresión de **G)** Catalasa, **H)** Glutatión S-transferasa μ 3 y **I)** hemoxigenasa-1 solo muestra un aumento en su expresión cuando los cultivos fueron sometidos al insulto con H₂O₂. Evaluación por qRT-PCR. Los datos son representativos de tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía, prueba t de Bonferroni; * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001.

6.9 Análisis de la capacidad antioxidante total de los astrocitos.

Se analizó la capacidad antioxidante de los cultivos de astrocitos tratados o no con PRL y con o sin el insulto con H₂O₂. Los mecanismos antioxidantes de las células incluyen enzimas tales como superóxido dismutasa, peroxirredoxinas, catalasa y glutatión peroxidasa; macromoléculas como albúmina, ceruloplasmina y ferritina; y una serie de moléculas pequeñas, que incluyen ácido ascórbico, β -caroteno, glutatión reducido, ácido úrico y bilirrubina (Cayman Chemicals, 2001). La capacidad antioxidante general considera el efecto acumulativo de todos los antioxidantes presentes en lisados celulares y proporciona una mayor protección contra el ataque por ROS o RNS. Por ello, se analizó la capacidad antioxidante de los cultivos de astrocitos. Se observó que en cultivos de astrocitos tratados con PRL

aumentan significativamente su capacidad antioxidante total y este aumento se exagera cuando se les indujo el daño con H₂O₂ (Fig. 20).

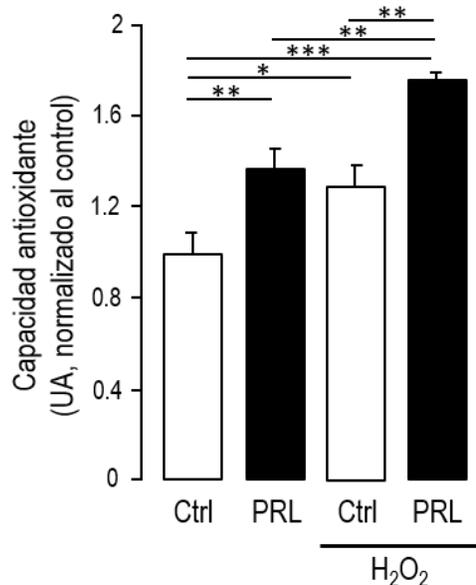


Figura 20. Capacidad antioxidante de los astrocitos tratados con PRL y bajo un daño oxidativo. Los cultivos de astrocitos se trataron con PRL (10 nM) por 24 h al término de las cuales se trataron con H₂O₂ (400 μ M) durante 3 h y se obtuvo el lisado celular para evaluar los cambios en la capacidad antioxidante general de las enzimas. Evaluado mediante un ensayo colorimétrico. Los datos son representativos de tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía y la prueba post hoc Bonferroni; ** P <0.01, *** P <0.001.

6.10 La PRL y el H₂O₂ aumentan la expresión de GFAP.

Se analizaron los cambios en la expresión del gen de GFAP, encontrando que la PRL es capaz de inducir un aumento de 1.18 ± 0.5 en la expresión de GFAP, mientras que el H₂O₂ incrementa la expresión 2.62 ± 0.11 y los astrocitos tratados con PRL y H₂O₂, incrementan hasta 4.30 ± 0.68 más la expresión de GFAP, todos comparados al control (Fig. 21).

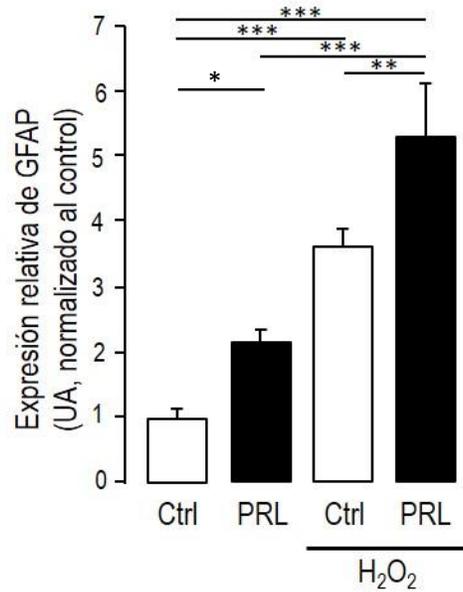


Figura 21. La PRL y el H₂O₂ aumenta la expresión de GFAP. Los cultivos de astrocitos se trataron con PRL (10 nM) por 24 h al término de las cuales se trataron con H₂O₂ (400 μM) durante 3 h y se obtuvo el ARN para evaluar los cambios en la expresión de GFAP aumenta tanto con la PRL como cuando se induce el daño con el H₂O₂. Evaluado por qRT-PCR. Los datos son representativos de tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía y la prueba post hoc Bonferroni; *P<0.05, ** P <0.01, *** P <0.001.

La astrogliosis es un proceso en el que los astrocitos son reactivos y caracterizados por un cambio en su morfología, dependiendo del grado de daño pueden presentar poca o mucha pérdida de sus dominios, por ejemplo: cuando el daño es alto, los astrocitos se caracterizan por una hipertrofia.

Para corroborar el resultado anterior, se realizó una inmunocitofluorescencia para observar la proteína en los cultivos. Encontrando que efectivamente los astrocitos tratados con PRL presentan un aumento en la proteína GFAP, mantienen su forma estrellada y con proyecciones bien definidas. En los astrocitos tratados con H₂O₂ se observa un aumento mayor en la expresión de GFAP comparado a los tratados con PRL, presentan morfología ovoide y sin proyecciones bien definidas. Mientras que

los astrocitos tratados con PRL y H₂O₂, aumentan aún más la expresión de GFAP, sin embargo la mayoría mantienen una estructura y proyecciones definidas (Fig.22).

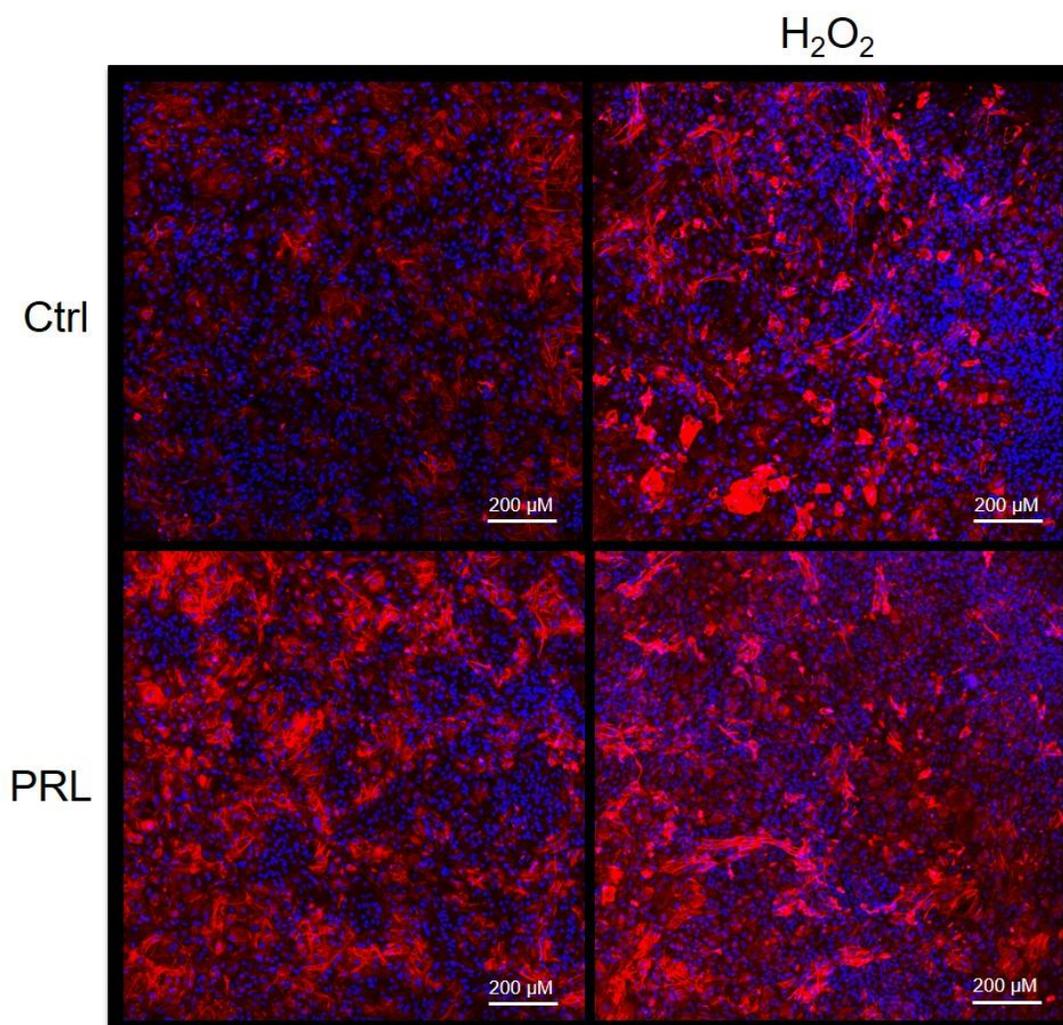


Figura 22. Astrogliosis en respuesta al H₂O₂ y la PRL. Los astrocitos tratados con PRL mantienen su morfología y aumentan la expresión de GFAP. Los astrocitos tratados con H₂O₂ aumentan la expresión de GFAP, presentando hipertrofia. Tratados con la PRL (10 nM) por 24 h incrementan su expresión de GFAP y disminuye su hipertrofia cuando son tratados con H₂O₂ (400 µM) por 3 h, todos comparados al control. Microfotografías de inmunocitofluorescencias tomadas con los objetivos de 4X y 20X.

Tabla 3:

Cuantificación de la intensidad de rojo para GFAP.

Tratamiento	Área en µm ²
Ctrl	3023100.75
H ₂ O ₂	4590430
PRL	4445344
PRL H ₂ O ₂	5017240

6.11 Cambios en la expresión de otros factores relacionados al daño inducido por H₂O₂.

Se analizaron los cambios en la expresión del gen de Nrf2, ya que se ha reportado que Nrf2 es un factor responsivo al daño inducido por estrés oxidativo. Se ha reportado que la activación y la sobre expresión de Nrf2 específica de los astrocitos confiere protección contra las ROS a las neuronas; representando un beneficio adicional, además de ser un factor responsivo a la señalización del H₂O₂. Al evaluar cambios en su expresión, se encontró que el H₂O₂ induce un incremento de 0.51 ± 0.17 en la expresión de Nrf2, pero no así la PRL comparado al control (Fig. 23).

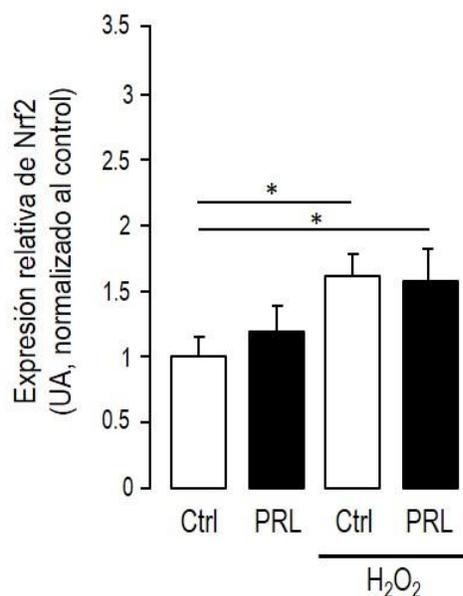


Figura 23. Incremento en la expresión de Nrf2 bajo un ambiente pro-oxidante. Los cultivos de astrocitos se trataron con PRL (10 nM) por 24 h al término de las cuales se trataron con H₂O₂ (400 μ M) durante 3 h. Evaluado por qRT-PCR la expresión de Nrf2 aumenta cuando se induce el daño con el H₂O₂. Los datos son representativos de tres experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía y la prueba post hoc Bonferroni; ** P <0.01, *** P <0.001. (Veces de cambio).

6.12 Análisis de la transducción de señales del R-PRL en respuesta a la PRL en los astrocitos corticales.

Los factores de transcripción, STAT5 y STAT3, forman parte de la vía de señalización canónica activada por la interacción de la PRL con su receptor. Principalmente STAT3 se ha descrito como un factor de transcripción involucrado

en la regulación de algunas enzimas antioxidantes como la MnSOD y las Gstm (Jung et al., 2009). Por tanto, se buscó como uno de los posibles factores involucrados en el efecto protector de la PRL en los astrocitos, además de que es un factor que se comunica con otras posibles vías de señalización involucradas con la supervivencia celular como PI3K/AKT (R. Wang, Cherukuri, & Luo, 2005).

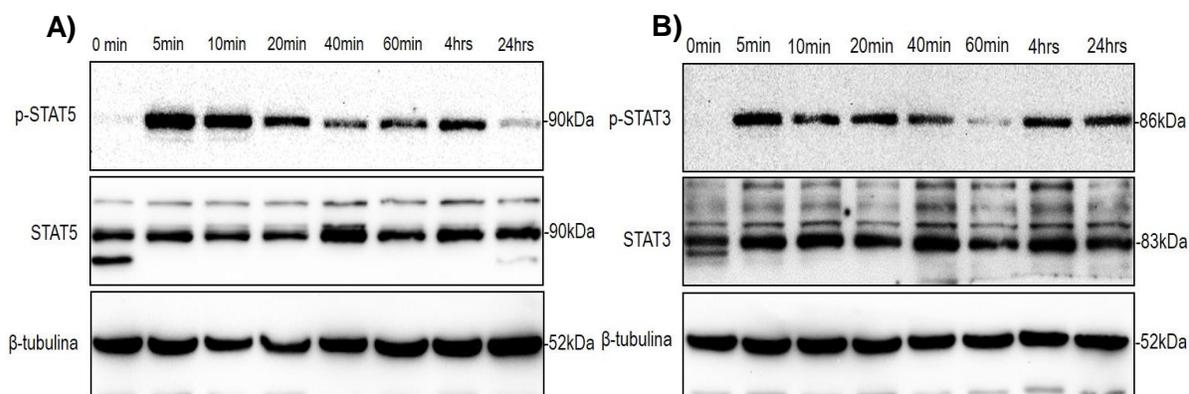


Figura 24. La PRL activa la fosforilación de STAT5 y STAT3. Cultivos de astrocitos fueron tratados con la concentración de 10 nM de PRL y las muestras se obtuvieron a los 5, 10, 20, 40 y 60 min, a las 4 y 24 h y las muestras fueron procesadas y analizadas para la detección de **A)** STAT5 fosforilado, STAT5 total y β -tubulina y **B)** STAT3 fosforilado, STAT3 total y β -tubulina. Encontrando la fosforilación tanto de STAT5 como de STAT3.

Se utilizó la técnica de Western blot para detectar cambios en la activación de factores de transcripción STAT5 y STAT3, encontrando que a partir de los 5 min se observa un incremento significativo en la fosforilación de STAT5 comparando con el control. Se mantiene elevado hasta los 20 min, y cuyo pico máximo de fosforilación es a los 10 min. Después a los 40 y 60 min la proporción de STAT5 fosforilado disminuye, pero vuelve a tener un pico a las 4 h respecto al control, el cual es mucho menor a los observados entre los 5 a los 20 min; a las 24 h la fosforilación se pierde hasta casi al nivel basal (Fig. 25A).

Por otro lado, en la fosforilación de STAT3 se encontró un comportamiento muy similar. Se observa un incremento gradual en la proporción de STAT3 fosforilada respecto a la forma total a partir de los 5 min, que se mantiene hasta los 20 min, alcanza el pico máximo entre los 10 y 20 min, mientras que a los 40 y 60 min se ve disminuida la señal, teniendo un incremento nuevamente a las 4 h con respecto al control y que se pierde a las 24 h (Fig. 25B). Estos resultados sugieren que la

activación del receptor ocurre en los primeros 5 a 10 min, posteriormente la fosforilación de STAT5 y STAT3 permanece activo.

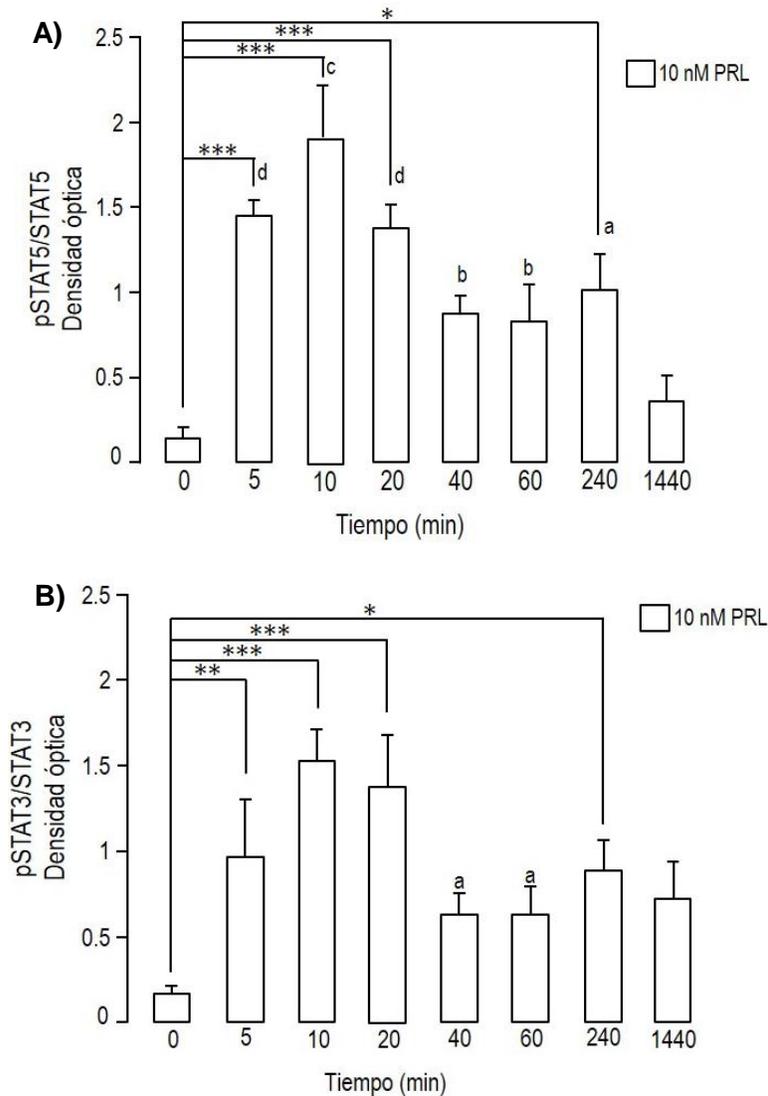


Figura 25. La PRL activa a los factores de transcripción STAT5 y STAT3. Cuantificación densitométrica de la proporción de la forma fosforilada en comparación a la forma total de cada proteína. A) pSTAT5/STAT5 y B) pSTAT3/STAT3. Se analizaron los cocientes de la forma total entre la β -tubulina manteniendo la relación de 1, como control de carga, datos no mostrados. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs 0 min, a= $P \leq 0.05$ vs a 10 min, b= $P \leq 0.01$ vs a 10 min, c= $P \leq 0.001$ vs a 24 h, d= $P \leq 0.01$ vs a 24 h. (Expresado como veces de cambio).

VII.- DISCUSIÓN

En el cerebro la PRL se encuentra involucrada en la regulación del comportamiento materno, la modulación de neurotransmisión, la atenuación de las respuestas emocionales, la mielinización, la neurogénesis y de manera importante en la

neuroprotección (Anagnostou, Reyes-Mendoza, & Morales, 2018; Torner, 2016). En los trabajos de Morales y colaboradores (2011, 2014) se ha demostrado que el tratamiento con PRL confiere neuroprotección a las neuronas hipocampales del cerebro de roedores hembra contra la excitotoxicidad inducida con ácido kaínico (Reyes-Mendoza & Morales, 2016). En otros trabajos realizados en astrocitos se han reportado efectos protectores de la PRL contra la excitotoxicidad causada por etanol, así como por un daño hipóxico (DeVito & Stone, 1999; Mödersheim et al., 2007). Notablemente, en este trabajo determinamos que la PRL además puede ejercer un efecto neuroprotector ante el daño por estrés oxidativo inducido con H_2O_2 mediante el aumento en la capacidad antioxidante de los astrocitos corticales en cultivo.

El estrés oxidativo se ha asociado con muchas enfermedades neurodegenerativas, porque el cerebro es particularmente susceptible al daño oxidativo debido a su alto consumo de oxígeno y alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados (Lu, Hu, Hu, & Bian, 2008). Aunque las neuronas son más susceptibles al daño oxidativo que los astrocitos, está claro que el estrés oxidativo también altera las funciones de estas células gliales (Zhu, 2005). Si éstas últimas se ven dañadas, en consecuencia se presentará neurodegeneración, ya que los astrocitos brindan soporte estructural, trófico y antioxidante a las neuronas (Sheng, Hu, Feng, & Rock, 2014). De aquí surge la importancia de elucidar las moléculas y mecanismos que protejan la viabilidad de los astrocitos ante un daño por estrés oxidativo. Sin embargo, aun faltaría determinar la magnitud del evento pro-oxidante promovido por el H_2O_2 en estos cultivos.

El H_2O_2 es una importante especie oxidativa endógena que participa como segundo mensajero, en la transducción de señales, en la activación y regulación de células inmunes y en la remodelación de las membranas celulares (Rani et al., 2015). Esta es eliminada normalmente por las enzimas antioxidantes catalasa y glutatión peroxidasa, pero su producción puede verse aumentada por diversas razones, dando lugar a un estado de estrés oxidativo (Lu et al., 2008; Morales, 2011). Derivado de su relativa mayor estabilidad en comparación con otras ROS, el H_2O_2

ha sido utilizado como un modelo experimental adecuado para la evaluación de los cambios que presentan los astrocitos ante un daño oxidativo (Sheng et al., 2014; Zhu, 2005). Es difícil determinar la concentración fisiológica de H₂O₂ y en general de las ROS que se tienen tanto dentro como fuera de las células, ya que las ROS en general son transitorias, debido a su corta vida media y a que pueden aumentar su producción debido a la disfunción mitocondrial que ocurre con la edad. Sin embargo, algunos estudios han determinado que las concentraciones basales/fisiológicas de H₂O₂ se encuentran dentro del rango de 25-60 μM, y que concentraciones mayores a 100 μM pueden considerarse como un estado de estrés oxidativo (Haskew-Layton, Ma, & Ratan, 2010; Sies, 2017).

En las últimas décadas la utilización de modelos *in vitro* ha ayudado a obtener gran parte del conocimiento extendido sobre el rol que desempeñan los astrocitos en el SNC. Los cultivos primarios son el modelo más utilizado debido a que permiten la manipulación en tiempo real de los astrocitos para lograr discernir el efecto y los mecanismos asociados a la respuesta propia de los astrocitos, y que actualmente son incapaces de lograr con las técnicas *in vivo* (Du et al., 2010; Norenberg, 2016). Por lo tanto, en este estudio utilizamos cultivos primarios de astrocitos tratados con H₂O₂ para determinar el efecto y el posible mecanismo de acción de la PRL en los astrocitos ante un daño oxidativo.

Se ha reportado en algunos trabajos que los astrocitos son altamente responsivos a estímulos nocivos y tóxicos, lo que se ve reflejado en cambios en la expresión de algunos genes entre los cuales se encuentran S100B, iNOS y principalmente GFAP (Blackburn et al., 2009). De manera semejante a lo descrito en trabajos previos, se encontró que el H₂O₂ da lugar a la astrogliosis reactiva, caracterizada por un incremento en la expresión de GFAP y una morfología alterada con cierta hipertrofia en los astrocitos, donde sus procesos se ven reducidos y adelgazados (Lu et al., 2008; Zhu, 2005). Fue interesante encontrar que la PRL también aumenta la expresión de GFAP, sin embargo, previene la hipertrofia de los astrocitos y mantiene su forma poligonal con sus proyecciones y dominios bien definidos. Esto sugiere que la activación de los astrocitos por la PRL es protectora, ya que en otros estudios

se ha propuesto que la sobre expresión de GFAP puede ser benéfica para los astrocitos cuando existe algún tipo de daño hacia la célula, mientras se mantenga su estructura funcional que permita su funcionamiento adecuado, ya que una de sus funciones es proteger la organización estructural de los astrocitos, a este aumento se le conoce comúnmente como astrocitos reactivos (Lu et al., 2008; Sofroniew & Vinters, 2010).

Los astrocitos poseen mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo, como es el aumento en la expresión y la actividad de enzimas antioxidantes tales como las peroxirredoxinas, las superóxido dismutasas, la catalasa, las glutatión reductasas y la Hmox-1 (Bell et al., 2011; Dowell & Johnson, 2013; Haskew-Layton, et al., 2010; Mitznahuatl, García Arenas, & Nahúm, 2016; Quincozes-Santos et al., 2013). En nuestros resultados se observó que la PRL *per se* induce un aumento en la expresión de algunas enzimas antioxidantes relacionadas con la desintoxicación de ROS en los astrocitos, como en la MnSOD, la Cu/ZnSOD, la Prdx-6, la Prdx-1, la GPX-1 y la Gstm-1, sugiriendo que la PRL protege a los astrocitos aumentando su capacidad antioxidante. Más aún, en el caso de las enzimas MnSOD, Prdx-1, Prdx-6 y GPX-1 el aumento en la expresión inducido por el pretratamiento con PRL es exacerbado una vez que los astrocitos se someten al daño oxidativo.

La enzima mitocondrial MnSOD se encarga de dismutar el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) para dar origen al H_2O_2 , el cual es rápidamente reducido a H_2O y O_2 por las enzimas GPX-1 y Prdx-6; mientras que la enzima citosólica Cu/ZnSOD que también genera H_2O_2 a partir del $O_2^{\bullet-}$, el cual es reducido a H_2O y O_2 por las enzimas Prdx-1 y Gstm-1. Por lo tanto, nuestros resultados nos sugieren que la PRL confiere protección tanto mitocondrial como citosólica a los astrocitos contra el daño inducido por estrés oxidativo. Ahora bien, ¿Cuál de todas estas enzimas es la más eficaz para contrarrestar el daño por estrés oxidativo en respuesta a la PRL? esta pregunta queda por ser contestada midiendo la capacidad antioxidante y actividad enzimática de cada una de ellas.

Existen precedentes, donde se ha observado que la PRL posee propiedades antioxidantes. En macrófagos y monocitos humanos la PRL incrementa hasta 4.5

veces la expresión de Hmox-1 comparada al control. Aunque en nuestros resultados no se observan cambios en la expresión de esta enzima con el tratamiento de PRL, esto podría deberse al tiempo en que evaluamos su expresión, ya que en este mismo trabajo reportaron este cambio a las 8 y 16 h, mientras que a las 24 h la expresión descendía a un valor por debajo del basal (L. Malaguarnera et al., 2005; Lucia Malaguarnera et al., 2004). En células del epitelio pigmentario retiniano, se descubrió que la PRL aumenta el nivel de glutatión reducido (GSH), que es el principal antioxidante tiol presente en la célula (Thébault, 2017). Mientras que en nuestro trabajo encontramos que la PRL incrementó la expresión tanto de GPX-1 y Gstm-1.

En nuestros resultados, el efecto protector de la PRL contra el daño inducido por el H₂O₂ se debe a un incremento en la capacidad antioxidante total de los astrocitos, que puede estar directamente vinculado con el incremento en la expresión de las enzimas antioxidantes, de manera particular en el caso de MnSOD, Cu/ZnSOD, GPX-1 y Gstm-1. Estos hallazgos refuerzan que la PRL posee un efecto citoprotector en los astrocitos, aparentemente inducido por el incremento en la expresión de algunas enzimas antioxidantes.

Se ha reportado que el factor de transcripción Nrf2 está íntimamente ligado con el incremento en la expresión de enzimas antioxidantes como mecanismo de defensa contra el estrés oxidativo en los astrocitos. En ausencia de estrés oxidativo, Nrf2 queda secuestrado en el citosol, donde se une a Keap1, formando el complejo Nrf2-Keap1 que reprime su translocación al núcleo. En presencia de agentes que producen estrés oxidativo Keap1 se oxida fácilmente debido a su alto contenido de cisteínas reactivas, liberando a Nrf2, el cual se al núcleo de las células afectadas, lo que provoca la transactivación de genes citoprotectores que posean al menos un elemento de respuesta antioxidante (ARE) (Bell et al., 2011; Fainstein, 2003; Mitznahuatl et al., 2016). Sin embargo, la PRL no modificó la expresión de Nrf2, lo que podría indicar que su efecto protector antioxidante no está siendo modulado por un aumento en la transcripción de Nrf2, no obstante, quedaría por determinar si la PRL modula la activación de este factor, favoreciendo que Nrf2 se disocie de Keap1

y se desplace al núcleo. Y por último no podemos descartar algún otro posible factor de transcripción que pueda responder a este tipo de estímulo, como lo es el factor inducido por hipoxia-1 (HIF-1).

Encontramos que el efecto protector de la PRL sobre los astrocitos podría ser mediado directamente a través de la expresión de la isoforma larga de su receptor, lo que previamente se ha reportado en trabajos anteriores (DeVito, 1992; Mödersheim et al., 2007). Nuestros resultados indican que el R-PRL es activado en los astrocitos, ya que en respuesta al tratamiento con PRL se observa un incremento en la fosforilación/activación de la proteína transductora de señal STAT5, perteneciente a la vía de señalización canónica de la PRL Jak2/STAT5. Además, también se encontró un incremento en la fosforilación/activación del factor STAT3. Aunado a estos hallazgos, encontramos que la PRL por si misma induce un aumento en la expresión de su propio receptor que es exacerbado en condiciones de estrés oxidativo. Un fenómeno semejante ha sido reportado en la glándula mamaria, donde se observó que durante el periodo de lactancia la señalización de la PRL se amplifica (Bridges et al., 2011). Mientras que en otros reportes la PRL induce el mantenimiento de la señalización en cáncer de mama (Swaminathan, Varghese, & Fuchs, 2008). Por otro lado en el hígado y en la próstata se ha reportado que la inducción en la expresión de RPRL mantiene activa su señalización (Kloehn et al., 2001; Pascual-Mathey et al., 2016; Yu et al., 2013).

Aunque los mecanismos celulares por los cuales la PRL protege a los distintos tipos celulares no se comprenden completamente, se sabe que sus mecanismos de acción están dados a través de la activación de distintas vías de señalización y no solo por la Jak2/STAT5. En el caso de los astrocitos, la PRL regula la activación de la proteína quinasa C (PKC) promoviendo la proliferación celular (DeVito et al., 1993). Además, la PRL participa en la supervivencia celular en cáncer mamario y en cáncer de ovario a través de la activación de la vía de señalización de PI3K/Akt (Swaminathan et al., 2008); vía que se ha propuesto como un posible mecanismo regulador de las acciones antioxidantes de la PRL en la retina (Thébault, 2017). Aunque nuestros resultados muestran la activación de la vía de señalización de

STAT5 y STAT3, no podemos descartar que algunas otras vías de señalización puedan estar involucradas en la supervivencia celular y en el efecto antioxidante de la PRL o incluso que la inducción de otros factores como citocinas que inducen la fosforilación de STAT3, como lo proponen los estudios referidos.

Por otra parte, se ha relacionado la fosforilación del factor STAT3 con un aumento en la expresión de GFAP en los astrocitos. La activación de receptores pertenecientes a la superfamilia de citocinas por ligandos como la Interleucina 6, el factor neurotrófico ciliar (CNTF) y factores tróficos y de crecimiento, desencadena la activación de la ruta de la JAK-STAT, que conduce a la translocación de STAT3 al núcleo, el cual se une directamente al promotor de GFAP promoviendo su expresión, lo que conlleva a cambios morfológicos de los astrocitos (Robel et al., 2011). En concordancia, nuestros resultados muestran un incremento en la expresión de GFAP inducido por la PRL quien a su vez activa la fosforilación de STAT3 pudiendo ser esta una de las vías involucradas en el efecto protector de la viabilidad celular de los astrocitos por parte de la PRL.

Finalmente, los resultados obtenidos podrían contribuir a entender porque durante el periodo de gestación y de lactancia, en el que ocurre un aumento en la producción y liberación de PRL en el SNC, a pesar de que se presenta un aumento en el metabolismo celular y en la excitabilidad neuronal lo que genera un estado de estrés oxidativo y de excitotoxicidad en el cerebro de las hembras, estas no presentan neurodegeneración (Anagnostou et al., 2018; Bole-Feysot et al., 1998; Reyes-Mendoza & Morales, 2016). En otras palabras, un estado de hiperprolactinemia fisiológica, cuando las hembras son sometidas a un aumento en el estrés oxidativo provocado por un incremento en el metabolismo, pueden estar protegidas del daño gracias a la inducción en la liberación y síntesis de la PRL que actúa sobre los astrocitos para aumentar la concentración de factores antioxidantes y su capacidad antioxidante.

VIII.- CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos, se concluye que la PRL es un factor de supervivencia para los astrocitos, ya que preserva la viabilidad celular de estos cuando son sometidos al daño inducido por estrés oxidativo (H_2O_2).

La PRL aumenta la expresión de GFAP, pero protege la morfología de los astrocitos, disminuyendo la astrogliosis causada por daño inducido con H_2O_2 , el cual también induce un aumento de GFAP, de Nrf2 y de algunas enzimas antioxidantes, como respuesta de defensa por parte de los astrocitos ante el daño por estrés oxidativo. Sin embargo, la PRL no modificó la expresión de Nrf2, por lo que su efecto protector no podría estar siendo regulado de manera transcripcional a través de este factor. Sin embargo, no se descarta que la PRL active Nrf2 promoviendo su disociación de Keap1 su translocación al núcleo.

Los efectos ejercidos por la PRL son mediados a través de su receptor, el cual es expresado por los astrocitos, por lo tanto, estos pueden ser blanco de las acciones protectoras de la PRL. La activación del R-PRL en los astrocitos fue evidenciada por la fosforilación de los factores de transcripción STAT5 y STAT3, los cuales han sido ampliamente descritos y relacionados con las acciones de la PRL mediadas por su receptor.

La activación de vías de señalización puede modificar la transcripción de genes. La PRL induce tanto el aumento en la expresión de su receptor como en la expresión de distintas enzimas antioxidantes. Encontramos que aumenta la expresión de MnSOD, GPX-1, Prdx-6, Cu/ZnSOD, Gstm1 y en la Prdx-1, las cuales están involucradas en la dismutación y reducción de los radicales superóxido, peróxido de hidrógeno mitocondrial y citosomal. Esto en condiciones basales y exacerbadas ante un daño oxidativo. Más aun estos incrementos en la expresión de las enzimas antioxidantes sugieren a una mayor capacidad antioxidante total de los astrocitos. Por lo que sugerimos que las acciones protectoras de la PRL en los astrocitos pueden estar mediadas por el aumento en la expresión de las enzimas antioxidantes y el incremento en la capacidad antioxidante total.

REFERENCIAS

- Anagnostou, I., Reyes-Mendoza, J., & Morales, T. (2018). Glial cells as mediators of protective actions of prolactin (PRL) in the CNS. *General and Comparative Endocrinology*, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.01.024>
- Angelova, P. R., & Abramov, A. Y. (2018). Role of mitochondrial ROS in the brain: from physiology to neurodegeneration. *FEBS Letters*, 1–11. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12964>
- Angoa-Pérez, M., & Selva-Rivas, A. (2007). Estrés oxidativo y neurodegeneración: ¿causa o consecuencia? *Archivos de Neurociencia*, 12(1), 45–54.
- Arnold, E., Thebault, S., Baeza-Cruz, G., Zamarripa, D. A., Adán, N., Quintanar-Stéphano, A., ... Clapp, C. (2014). The Hormone Prolactin Is a Novel, Endogenous Trophic Factor Able to Regulate Reactive Glia and to Limit Retinal Degeneration. *The Journal of Neuroscience*, 34(5), 1868–1878. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2452-13.2014>
- Bell, K. F., Al-Mubarak, B., Fowler, J. H., Baxter, P. S., Gupta, K., Tsujita, T., ... Hardingham, G. E. (2011). Mild oxidative stress activates Nrf2 in astrocytes, which contributes to neuroprotective ischemic preconditioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(1), E1–E2. <https://doi.org/10.1073/pnas.1015229108>
- Binart, N., Bachelot, A., & Bouilly, J. (2010). Impact of prolactin receptor isoforms on reproduction. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 21(6), 362–368. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2010.01.008>
- Blackburn, D., Sargsyan, S., Monk, P. N., & Shaw, P. J. (2009). Astrocyte function and role in motor neuron disease: A future therapeutic target? *Glia*, 57(12), 1251–1264. <https://doi.org/10.1002/glia.20848>
- Bole-Feysot, C., Goffin, V., Edery, M., Binart, N., & Kelly, P. A. (1998). Prolactin (PRL) and its receptor: Actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocrine Reviews*, 19(3), 225–268. <https://doi.org/10.1210/edrv.19.3.0334>
- Boveris, A., Oshino, N., & Chance, B. (1972). The cellular production of hydrogen peroxide. *The Biochemical Journal*, 128(3), 617–630.

<https://doi.org/10.1042/BJ1280617>

- Bridges, R. S., Scanlan, V. F., Lee, J.-O., & Byrnes, E. M. (2011). Reproductive Experience Alters Prolactin Receptor Expression in Mammary and Hepatic Tissues in Female Rats. *Biology of Reproduction*, *85*(2), 340–346.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.091918>
- Butterfield, D. A. (2011). Oxidative stress in Alzheimer disease: Synergy between the butterfield and Markesbery laboratories. *NeuroMolecular Medicine*, *13*(1), 19–22. <https://doi.org/10.1007/s12017-010-8123-9>
- Cabiscol, E. (2014). Oxidación celular y envejecimiento. Radicales libres: doctor Jekyll y mister Hyde. *SEBBM Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular*, *2*.
- Cayman Chemicals. (2001). Antioxidant Assay Kit, (709001), 20–23.
<https://doi.org/10.1111/j.1475-6765.2005.00219.x>
- Cerdá Micó, C., Borrego Oliva, S., & Sáez Tormo, G. (2010). neurodegenerativas. *Monografías de La Real Academia Nacional de Farmacia*, 283–302.
- Chen, Y., & Swanson, R. A. (2003). Astrocytes and brain injury. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *23*(2), 137–149.
<https://doi.org/10.1097/01.WCB.0000044631.80210.3C>
- Clevenger, C. V., & Kline, J. B. (2001). Prolactin receptor signal transduction. *Lupus*, *10*(10), 706–718. <https://doi.org/10.1191/096120301717164949>
- D'Autréaux, B., & Toledano, M. B. (2007). ROS as signalling molecules: Mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *8*(10), 813–824. <https://doi.org/10.1038/nrm2256>
- Denizot, F., & Lang, R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. *Journal of Immunological Methods*, *89*(2), 271–277.
[https://doi.org/10.1016/0022-1759\(86\)90368-6](https://doi.org/10.1016/0022-1759(86)90368-6)
- DeVito, W. J., Avakian, C., Stone, S., & Okulicz, W. C. (1993). Prolactin-Stimulated Mitogenesis of Cultured Astrocytes Is Mediated by a Protein Kinase C-Dependent Mechanism. *Journal of Neurochemistry*, *60*(3), 835–842.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1993.tb03227.x>
- DeVito, W. J., & Stone, S. (1999). Ethanol inhibits prolactin-induced activation of

- the JAK/STAT pathway in cultured astrocytes. *Journal of Cellular Biochemistry*, 74(2), 278–291. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4644\(19990801\)74:2<278::AID-JCB12>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4644(19990801)74:2<278::AID-JCB12>3.0.CO;2-P)
- DeVito, W. J., Stone, S., & Shamgochian, M. (1995). Prolactin induced expression of glial fibrillary acidic protein and tumor necrosis factor-alpha at a wound site in the rat brain. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 108(1–2), 125–130.
- Dorado-Martínez, C., Rugerio-Vargas, C., & Rivas-Arancibia, S. (2003). Estrés oxidativo y neurodegeneración. *Rev Fac Med UNAM*, 46(6), 229–235.
- Dowell, J. A., & Johnson, J. A. (2013). Mechanisms of Nrf2 Protection in Astrocytes as Identified by Quantitative Proteomics and siRNA Screening. *PLoS ONE*, 8(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070163>
- Du, F., Qian, Z. M., Zhu, L., Wu, X. M., Qian, C., Chan, R., & Ke, Y. (2010). Purity, cell viability, expression of GFAP and bystin in astrocytes cultured by different procedures. *Journal of Cellular Biochemistry*, 109(1), 30–37. <https://doi.org/10.1002/jcb.22375>
- Eric Kandel, James Schwartz, T. J. (2014). Principles Of Neural Science. *McGraw-Hill Medical*, (1), 1–5. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Fainstein, M. K. (2003). Nrf2: LA HISTORIA DE UN NUEVO FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN QUE RESPONDE A ESTRÉS OXIDATIVO. *Redox Biology*, 26(1), 30–46.
- Ferrer Viant, D., Jorge Fonseca, C., & Cutiño Clavel, I. (2013). RADICALES LIBRES Y SU PAPEL EN LA HOMEOSTASIA NEURONAL. *MEDISAN*, LIII(1), 1–11.
- Freeman, M. E., Kanyicska, L. A., Lerant, A., & Marc, E. (2000). Prolactin : Structure, Function, and Regulation of Secretion *MOLECULAR BIOLOGY. PHYSIOLOGICAL REVIEWS*, 80(4), 1523–1631.
- Gil, N., Gomez, J., Gomez, A. (2008). Radicales libres y lesión cerebral. *Univ Med. Bogotá (Colombia)*, 49(2), 231–242. <https://doi.org/ISSN 1405-6666>
- Haskew-Layton, R. E., Ma, T. C., & Ratan, R. R. (2010). Reply to Bell et al.: Nrf2dependent and independent mechanisms of astrocytic neuroprotection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(1), E3–E4.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1016621108>

- Haskew-Layton, R. E., Payappilly, J. B., Smirnova, N. A., Ma, T. C., Chan, K. K., Murphy, T. H., ... Ratan, R. R. (2010). Controlled enzymatic production of astrocytic hydrogen peroxide protects neurons from oxidative stress via an Nrf2-independent pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(40), 17385–17390. <https://doi.org/10.1073/pnas.1003996107>
- Havránek, T., Bačová, Z., Štrbák, V., Lešánová, Z., & Bakoš, J. (2014). Prolactin increases expression of cytoskeletal proteins in SK-N-SH cells. *Folia Biologica (Czech Republic)*, *60*(6), 281–285.
- Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S., & Zumla, A. (2005). Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes and Immunity*, *6*(4), 279–284. <https://doi.org/10.1038/sj.gene.6364190>
- Ignacak, A., Kasztelnik, M., Sliwa, T., Korbut, R. A., Rajda, K., & Guzik, T. J. (2012). Prolactin - Not only lactotrophin a “new” view of the “old” hormone. *Journal of Physiology and Pharmacology*, *63*(5), 435–443.
- Jung, J. E., Kim, G. S., Narasimhan, P., Song, Y. S., & Chan, P. H. (2009). Regulation of Mn-Superoxide Dismutase Activity and Neuroprotection by STAT3 in Mice after Cerebral Ischemia. *Journal of Neuroscience*, *29*(21), 7003–7014. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1110-09.2009>
- Kanzaki, H., Wada, S., Narimiya, T., Yamaguchi, Y., Katsumata, Y., Itohiya, K., ... Nakamura, Y. (2017). Pathways that regulate ROS scavenging enzymes, and their role in defense against tissue destruction in periodontitis. *Frontiers in Physiology*, *8*(MAY), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00351>
- Kimelberg, H. K., & Nedergaard, M. (2010). Functions of Astrocytes and their Potential As Therapeutic Targets. *Neurotherapeutics*, *7*(4), 338–353. <https://doi.org/10.1016/j.nurt.2010.07.006>
- Kloehn, S., Otte, C., Korsanke, M., Arendt, T., Clemens, A., Glasow, A., ... Monig, H. (2001). Expression and distribution of the prolactin receptor in normal rat liver and in experimental liver cirrhosis. *Horm Metab Res*, *33*(7), 394–401. <https://doi.org/10.1055/s-2001-16229>
- Leza, J. C. (2005). Mecanismos de dano cerebral inducido por estres. *Universidad*

Complutense de Madrid, 11, 123–140.

- Lu, M., Hu, L. F., Hu, G., & Bian, J. S. (2008). Hydrogen sulfide protects astrocytes against H₂O₂-induced neural injury via enhancing glutamate uptake. *Free Radical Biology and Medicine*, 45(12), 1705–1713. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.09.014>
- Macedo-Márquez, A. (2012). La producción de especies reactivas de oxígeno (EROS) en las mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 15(2), 97–103.
- Malaguarnera, L., Imbesi, R., Di Rosa, M., Scuto, A., Castrogiovanni, P., Messina, A., & Sanfilippo, S. (2005). Action of prolactin, IFN- γ , TNF- α and LPS on heme oxygenase-1 expression and VEGF release in human monocytes/macrophages. *International Immunopharmacology*, 5(9), 1458–1469. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2005.04.002>
- Malaguarnera, L., Imbesi, R. M., Scuto, A., D'Amico, F., Licata, F., Messina, A., & Sanfilippo, S. (2004). Prolactin increases HO-1 expression and induces VEGF production in human macrophages. *Journal of Cellular Biochemistry*, 93(1), 197–206. <https://doi.org/10.1002/jcb.20167>
- Mangoura, D., Pelletiere, C., Leung, S., Sakellaridis, N., & Wang, D. X. (2000). Prolactin concurrently activates Src-PLD and JAK/Stat signaling pathways to induce proliferation while promoting differentiation in embryonic astrocytes. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 18(7), 693–704. [https://doi.org/10.1016/S0736-5748\(00\)00031-9](https://doi.org/10.1016/S0736-5748(00)00031-9)
- Marano, R. J., & Nira, B. J. (2014). Minireview: Extrapituitary Prolactin: An Update on the Distribution, Regulation, and Functions. *Molecular Endocrinology*, 28(5), 622–633. <https://doi.org/10.1210/me.2013-1349>
- Mitznahuatl, C., García Arenas, G., & Nahúm, O. (2016). El papel emergente del factor nuclear eritroide2 Nrf2 en la neuroprotección mediada por astrocitos. *Revista Mexicana de Neurociencia*, 17(5), 49–59.
- Mödersheim, T. A. E., Gorba, T., Pathipati, P., Kokay, I. C., Grattan, D. R., Williams, C. E., & Scheepens, A. (2007). Prolactin is involved in glial responses following a focal injury to the juvenile rat brain. *Neuroscience*,

- 145(3), 963–973. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.12.053>
- Molofsky, A. V., & Deneen, B. (2015). Astrocyte development: A Guide for the Perplexed. *Glia*, 63(8), 1320–1329. <https://doi.org/10.1002/glia.22836>
- Molofsky, A. V., Krennick, R., Ullian, E., Tsai, H. H., Deneen, B., Richardson, W. D., ... Rowitch, D. H. (2012). Astrocytes and disease: A neurodevelopmental perspective. *Genes and Development*, 26(9), 891–907. <https://doi.org/10.1101/gad.188326.112>
- Morales, T. (2011). Recent Findings on Neuroprotection Against Excitotoxicity in the Hippocampus of Female Rats. *Journal of Neuroendocrinology*, 23(11), 994–1001. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2011.02141.x>
- Morales, T., Lorenson, M., Walker, A. M., & 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. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.11.015>
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Na, H. K., Kim, E. H., Jung, J. H., Lee, H. H., Hyun, J. W., & Surh, Y. J. (2008). (-)-Epigallocatechin gallate induces Nrf2-mediated antioxidant enzyme expression via activation of PI3K and ERK in human mammary epithelial cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 476(2), 171–177. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.04.003>
- Norenberg, D. (2016). Primary cultures of astrocytes: Their value in understanding astrocytes in health and disease. *Neurochemical Research*, 37(11), 2569–2588. <https://doi.org/10.1007/s11064-012-0868-0.Primary>
- Panieri, E., & Santoro, M. M. (2016). ROS homeostasis and metabolism: a dangerous liason in cancer cells. *Cell Death & Disease*, 7(6), e2253. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.105>
- Pascual-Mathey, L. I., Rojas-Duran, F., Aranda-Abreu, G. E., Manzo, J., Herrera-Covarrubias, D., Muñoz-Zavaleta, D. A., ... Hernandez, M. E. (2016). Effect of hyperprolactinemia on PRL-receptor expression and activation of Stat and

- Mapk cell signaling in the prostate of long-term sexually-active rats. *Physiology and Behavior*, 157(73), 170–177.
<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.02.011>
- Pathipati, P., Gorba, T., Scheepens, A., Goffin, V., Sun, Y., & Fraser, M. (2011). Growth hormone and prolactin regulate human neural stem cell regenerative activity. *Neuroscience*, 190, 409–427.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.05.029>
- Patil, M. J., Henry, M. A., & Akopian, A. N. (2014). Prolactin receptor in regulation of neuronal excitability and channels. *Channels (Austin, Tex.)*, 8(3), 193–202.
<https://doi.org/10.4161/CHAN.28946>
- Pérez, J. (2010). Fisiología De La Prolactina. *Instituto de Investigaciones Biomédicas A. Sols, CSIC/UAM*, 2–14.
- Pfriege, F. W. (2010). Role of glial cells in the formation and maintenance of synapses. *Brain Research Reviews*, 63(1–2), 39–46.
<https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2009.11.002>
- Quincozes-Santos, A., Bobermin, L. D., Latini, A., Wajner, M., Souza, D. O., Gonçalves, C. A., & Gottfried, C. (2013). Resveratrol Protects C6 Astrocyte Cell Line against Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress through Heme Oxygenase 1. *PLoS ONE*, 8(5), 1–10.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064372>
- Rani, V., Mishra, S., Yadav, T., Yadav, U. C. S., & Kohli, S. (2015). Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Free Radicals in Human Health and Disease*, 105–116. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2035-0_8
- 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.
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.04.030>
- Robel, S., Berninger, B., & Götz, M. (2011). The stem cell potential of glia: Lessons from reactive gliosis. *Nature Reviews Neuroscience*, 12(2), 88–104.
<https://doi.org/10.1038/nrn2978>
- Sadl, G. (2010). Antioxidants and Regulation of Antioxidant Enzymes by Cellular

- Redox Status, 3(2), 95–107.
- Saijo, K., Winner, B., Carson, C. T., Collier, J. G., Rosenfeld, M. G., Gage, F. H., & Glass, C. K. (2009). A Nurr1/CoREST transexpression pathway attenuates neurotoxic inflammation in activated microglia and astrocytes. *Cell*, 137(1), 47–59. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.038.A>
- Sakamoto, T., & McCormick, S. D. (2006). Prolactin and growth hormone in fish osmoregulation. *General and Comparative Endocrinology*, 147(1), 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2005.10.008>
- Sheng, W. S., Hu, S., Feng, A., & Rock, R. B. (2014). Reactive Oxygen Species from Human Astrocytes Induced Functional Impairment and Oxidative Damage. *Neurochemical Research*, 38(10), 612–626. <https://doi.org/10.1007/s11064-013-1123-z.Reactive>
- Sies, H. (2017). Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biology*, 11(December 2016), 613–619. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.035>
- Smith, M. S. (2004). Anterior pituitary hormones: development of a bioassay leading to the discovery of prolactin. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 287(5), E813-4. <https://doi.org/10.1152/classicessays.00022.2004>
- Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, 119(1), 7–35. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8>
- Swaminathan, G., Varghese, B., & Fuchs, S. Y. (2008). Regulation of prolactin receptor levels and activity in breast cancer. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 13(1), 81–91. <https://doi.org/10.1007/s10911-008-9068-6>
- Thébault, S. (2017). Potential mechanisms behind the antioxidant actions of prolactin in the retina. *Experimental Eye Research*, 160, 56–61. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2017.03.014>
- Torner, L. (2016). Actions of prolactin in the brain: From physiological adaptations to stress and neurogenesis to psychopathology. *Frontiers in Endocrinology*, 7(MAR), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00025>

- Torner, L., Karg, S., Blume, A., Kandasamy, M., Kuhn, H., Aigner, L., & Neumann, I. D. (2009). Prolactin Prevents Chronic Stress-Induced Decrease of Adult Hippocampal Neurogenesis and Promotes Neuronal Fate, *29*(6), 1826–1833. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3178-08.2009>
- Verkhatsky, A., & Parpura, V. (2016). Astroglipathology in neurological, neurodevelopmental and psychiatric disorders. *Neurobiology of Disease*, *85*, 254–261. <https://doi.org/10.1016/J.NBD.2015.03.025>
- Wang, R., Cherukuri, P., & Luo, J. (2005). Activation of Stat3 sequence-specific DNA binding and transcription by p300/CREB-binding protein-mediated acetylation. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(12), 11528–11534. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413930200>
- Wang, W., Pan, Y. W., Wietecha, T., Zou, J., Abel, G. M., Kuo, C. T., & Xia, Z. (2013). Extracellular signal-regulated kinase 5 (ERK5) mediates prolactin-stimulated adult neurogenesis in the subventricular zone and olfactory bulb. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(4), 2623–2631. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.401091>
- Watson, C. J., & Burdon, T. G. (1996). Prolactin signal transduction mechanisms in the mammary gland: the role of the Jak/Stat pathway. *Reviews of Reproduction*, *1*(1), 1–5. <https://doi.org/10.1530/ror.0.0010001>
- Ying, W., Chen, Y., Alano, C. C., & Swanson, R. A. (2002). Tricarboxylic acid cycle substrates prevent PARP-mediated death of neurons and astrocytes. *J Cereb. Blood Flow Metab*, *22*(7), 774–779. <https://doi.org/10.1097/00004647-200207000-00002>
- Yu, J., Xiao, F., Zhang, Q., Liu, B., Guo, Y., Lv, Z., ... Guo, F. (2013). PRLR regulates hepatic insulin sensitivity in mice via STAT5. *Diabetes*, *62*(9), 3103–3113. <https://doi.org/10.2337/db13-0182>
- Zhu, D. (2005). Hydrogen peroxide alters membrane and cytoskeleton properties and increases intercellular connections in astrocytes. *Journal of Cell Science*, *118*(16), 3695–3703. <https://doi.org/10.1242/jcs.02507>