



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

EFFECTO PROTECTOR DE LA PROLACTINA EN NEURONAS HIPOCAMPALES
EN RESPUESTA A UN ESTRÉS OXIDATIVO

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:
FERNANDO MACÍAS PRADO

TUTORA: DRA. EDITH ARNOLD HERNÁNDEZ
(INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM)
CO-TUTOR: DR. GONZALO MARTÍNEZ DE LA ESCALERA LORENZO
(INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM)

COMITÉ TUTOR:
DR. MAURICIO DÍAZ MUÑOZ
(INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM)
DR. CARLOS GUILLERMO MARTÍNEZ MORENO
(INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM)

JURIQUILLA, QUERÉTARO
AGOSTO, 2019



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 Jurado certificamos que la tesis elaborada por: Fernando Macías Prado, cuyo título es: "Efecto protector de la prolactina en neuronas hipocampales en respuesta a un estrés oxidativo" se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Presidente:

Dra. María Teresa Morales Guzmán

Secretario:

Dra. Edith Arnold Hernández

Vocal:

Dra. María de la Luz Torner Aguilar

Suplente:

Dr. Mauricio Díaz Muñoz

Suplente:

Dra. Rocío Brenda Anguiano Serrano

Aprobado por el comité académico

Dra. Maricela Luna Muñoz
Coordinadora del programa de Maestría en Ciencias
(Neurobiología)

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 51801056-6.

RESUMEN

El estrés oxidativo en el cerebro se encuentra relacionado con la aparición y progresión de enfermedades neurodegenerativas. La prolactina (PRL) en el cerebro puede actuar como un agente neuroprotector; se ha reportado que protege a las células del hipocampo contra un daño por excitotoxicidad. También protege a los astrocitos corticales y a las células del epitelio pigmentario retiniano sometidos a un daño oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno (H_2O_2). En este trabajo investigamos si la PRL protege a las neuronas hipocampales bajo estrés oxidativo inducido por H_2O_2 o por cloruro de cobalto ($CoCl_2$). Cultivos primarios de neuronas del hipocampo obtenidas de embriones de ratón de 16 días de gestación fueron caracterizados por inmunocitoquímica para la expresión del marcador de neuronas: β -III-tubulina. La pureza y madurez del cultivo se analizó mediante la expresión por qRT-PCR de la GFAP (como marcador de astrocitos), sinaptofisina, vGlut1 y PSD95 (como marcadores de sinápsis) y del receptor de la PRL, en los días in vitro (DIV) 4, 10 y 12. La mayor expresión de los marcadores medidos fue observada al DIV10. Al DIV10 los cultivos fueron incubados con H_2O_2 (de 25 a 225 μM) o $CoCl_2$ (de 100 a 600 μM), para determinar la LD_{50} . El tratamiento con H_2O_2 indujo un incremento en la concentración de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la fragmentación del ADN revelada por la oxidación del 2'-7'-Diclorodihidrofluorescein diacetato y la tinción de TUNEL, respectivamente. Los cultivos fueron incubados o no con PRL (1 nM a 100 nM) al DIV9, 24 horas antes del insulto con H_2O_2 o $CoCl_2$. La PRL previno el daño inducido por el H_2O_2 de manera dependiente de la concentración, teniendo su efecto máximo a la concentración de 100 nM; pero no así del daño inducido por el $CoCl_2$, según lo determinado por el ensayo de MTT. De la misma forma, la PRL redujo la producción de ROS inducida por el H_2O_2 pero no por el $CoCl_2$. Para elucidar el posible mecanismo se analizó en neuronas tratadas con 100 nM de PRL la expresión por RT qPCR de los factores apoptóticos: BAX, NOXA, PUMA, BAD, BIM y BCL2, de los factores reguladores de la autofagia: LC3, BECN1, ATG12 y LAMP2 y de las enzimas antioxidantes: SOD2, GPX1, PRDX1 y PRDX6. La PRL previno el aumento en la expresión de los factores pro-apoptóticos BAX, PUMA, BAD y de los moduladores de la autofagia LC3, BECN1 y ATG12 causada por el H_2O_2 . Estos resultados sugieren que la PRL es un factor protector de las neuronas hipocampales contra el estrés oxidativo, mediante la inhibición de la apoptosis y la regulación de la autofagia.

ABSTRACT

Oxidative stress (OS) is related with the occurrence and progression of neurodegenerative diseases. Efforts have been made to find antioxidant-protective factors that could diminish the cytotoxic effect of ROS. Prolactin (PRL) is a pituitary hormone, mainly known for its actions in lactation and reproduction. In the brain PRL acts as a neuroprotective factor. Some studies have reported that PRL protects hippocampal cells against excitotoxicity. PRL protects cortical astrocytes and retinal pigment epithelium cells against oxidative damage induced by hydrogen peroxide (H_2O_2). Therefore, in this work we investigated if PRL protects hippocampal neurons under OS conditions induced by H_2O_2 and hypoxic stress induced by cobalt chloride ($CoCl_2$). Primary cultures of hippocampal neurons were isolated from the brain of E16 mice and incubated for 12 days in vitro (DIV). The cultures were characterized by immunocytochemistry for the expression of the specific neuronal marker β -III-tubulin. Purity and maturity of neuronal cultures were assessed by the expression of GFAP (astrocyte marker); synaptophysin, vGlut1 and PSD95 (synapsis markers); and PRL receptor at DIV 4, 10 and 12 by qRT-PCR. The highest expression levels of the synaptic markers as well as the expression of the PRL receptor were observed at DIV10. At this time the cultures were incubated with increasing concentrations of H_2O_2 (25 to 225 μ M) or $CoCl_2$ (100 to 600 μ M), to determine LD₅₀. H_2O_2 treatment increased reactive oxygen species (ROS) concentration and DNA fragmentation, as seen by 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate oxidation and TUNEL staining, respectively. The cultures were incubated or not with increasing concentrations of PRL (1 nM to 100 nM) at DIV9, 24h before the oxidative damage with H_2O_2 or $CoCl_2$. PRL prevented the reduction in the cell viability induced by H_2O_2 in a dose dependent manner; but not with $CoCl_2$, as determined by the MTT assay. Furthermore, PRL reduced the ROS production caused by H_2O_2 , but not the one induced by $CoCl_2$. To elucidate the possible mechanism, the cultures treated with PRL (100 nM), were assessed by qRT-PCR for the expression of apoptotic genes: BAX, NOXA, PUMA, BAD, BIM and BCL2; autophagy regulators: LC3, BECN1, ATG12 and LAMP2, and antioxidant enzymes: SOD2, GPX1, PRDX1 and PRDX6. PRL prevented H_2O_2 induced expression of pro-apoptotic factors BAX, PUMA, BAD, and autophagy regulators LC3, BECN1 and ATG12. These results demonstrate that PRL is a potential neuroprotective factor against oxidative stress, by inhibiting apoptosis and regulating some autophagy mediators.

A mis papás, Rocío y Fernando.

*The most exciting phrase to hear in science, the one that heralds new discoveries, is not Eureka! but
"That's funny..."*

— Isaac Asimov

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca proporcionada durante mis estudios.

Al Instituto de Neurobiología de la UNAM, por otorgar las facilidades y equipamiento necesarios para la realización de este trabajo.

A mi tutora, la Dra. Edith Arnold Hernández, responsable de la dirección de este proyecto y de las ideas aquí vertidas.

Al Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera Lorenzo co-tutor de este trabajo.

A la Dra. María del Carmen Clapp Jiménez Labora, titular del laboratorio de Endocrinología Molecular, lugar donde se realizó este trabajo.

Al Dr. Mauricio Díaz Muñoz y al Dr. Carlos Guillermo Martínez Moreno, miembros de mi comité tutorial, quienes aportaron valiosos comentarios para la realización de este trabajo.

Al Lic. Fernando López Barrera, técnico académico del Laboratorio de endocrinología molecular, por su soporte técnico.

A la Dra. Xarubet Ruiz Herrera, técnico académico del Laboratorio de Neuroendocrinología de la Reproducción, por su soporte técnico.

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 al MVZ. José Martín García Servín, por su asistencia técnica, el manejo y el cuidado de los animales de experimentación.

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

A la Unidad de Proteogenómica, especialmente a la M. en C. Adriana González Gallardo, por su asistencia técnica.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi familia, que con su apoyo y cariño me han demostrado que siempre hay una razón para ser feliz. Gracias a mis papás **Rocío Prado** y **Fernando Macías** cuya guía me mantiene fuerte y me inspira a seguir adelante. Este trabajo es tan suyo como lo es mío, no hay ningún logro que yo haya conseguido sin ustedes. A mis hermanos **Fernanda**, **Rocío** y **Alejandro**, gracias por su apoyo y compañía.

A los miembros de los laboratorios A14 y A15. A la **Dra. Edith Arnold** quien fue mi guía durante toda la maestría, gracias por su paciencia, entusiasmo y por inspirarme a seguir adelante. A **Miriam Tovar**, gracias por todas esas pláticas y palabras de aliento que me diste, con tu apoyo y amistad la maestría se hizo menos complicada. A **Jose García** mi "nuevo mejor amigo" del laboratorio, gracias por tu sincera amistad, por tu entusiasmo y tu consejo, además ¿por qué no? también por amenizar nuestras muchas sobremesas (guiño, guiño). A **Josué Rivera** por su agradable compañerismo y también por apoyarme en los experimentos en numerosas ocasiones. A **Georgina Ortíz**, **Freinet Nuñez**, **Mosterrat Siqueiros** y **Rodrigo Aroña**, quienes me otorgaron su compañía y apoyo con los que hicieron de la maestría y del laboratorio un lugar mejor.

A mis buenos amigos de la maestría. Gracias a Jalil Rasgado, Jonathan Gallego, Alfonso Fajardo, Omar Báez, Santiago Flores, Cindy Lucero y Luis Temo, por las veladas de seminarios, de música y de diversión. Porque juntos nos llenamos de ánimos, risas y toneladas de buenos momentos. Ustedes hicieron de la maestría una etapa que siempre recordaré con alegría y aprecio. A **Martín Macías**, mi buen amigo, gracias por tu amistad, lealtad y por todos los buenos momentos que hemos pasamos juntos. A **Ana Hidalgo**, mi primera amiga de la maestría, por tantas buenas charlas llenas de risas, agradezco tu sinceridad y tu apoyo durante la maestría.

A **Miriam Ulloa** a quien con un profundo cariño agradezco su compañía y todo el tiempo que hemos compartido. Gracias por el apoyo, las salidas, los viajes, las risas, el afecto y la enorme alegría que me has dado.

A todos los que de alguna forma u otra, me ayudaron a enriquecer este trabajo y a hacer más feliz mi estancia en esta maestría.

ÍNDICE GENERAL

1	INTRODUCCIÓN	1
2	ANTECEDENTES	3
2.1	Las especies reactivas de oxígeno (ROS)	3
2.1.1	Las acciones citotóxicas de las ROS	5
2.1.2	El efecto de las ROS en el cerebro	6
2.1.3	Respuesta antioxidante en el cerebro	7
2.1.4	El estrés oxidativo y la muerte celular	9
2.2	La apoptosis	9
2.2.1	La apoptosis y el estrés oxidativo	12
2.2.2	La apoptosis en el SNC	13
2.3	La autofagia	14
2.3.1	La autofagia y el estrés oxidativo	16
2.3.2	La autofagia en el SNC	17
2.4	La Prolactina	18
2.4.1	El receptor de la PRL	19
2.4.2	La PRL en el SNC	20
2.4.3	Acciones de la PRL en el SNC	20
2.4.4	Efecto neuroprotector de la PRL	21
2.4.5	La PRL y la muerte celular	22
3	JUSTIFICACIÓN	24
4	HIPÓTESIS	25
5	OBJETIVOS	26
5.1	General	26
5.2	Específicos	26
6	MATERIAL Y MÉTODOS	27
6.1	Animales	27
6.2	Cultivos celulares	27
6.3	Tratamientos a los cultivos neuronales	28
6.4	Ensayo de MTT	28
6.5	Medición de ROS totales	29
6.6	Inmunocitoquímica	29

6.7	Detección de la fragmentación del ADN	30
6.8	Extracción de ARN y síntesis de ADN complementario	30
6.9	PCR punto final y tiempo real	30
6.10	Estadística	31
7	RESULTADOS	34
7.1	Caracterización de los cultivos primarios de neuronas hipocampales	34
7.2	Expresión del ARNm de la PRL y el PRLR en los cultivos de neuronas hipocampales	35
7.3	Efecto del H ₂ O ₂ en los cultivos de neuronas hipocampales	37
7.4	Efecto de la PRL en neuronas hipocampales bajo estrés oxidativo	39
7.5	Efecto del CoCl ₂ en los cultivos de neuronas hipocampales	40
7.6	Efecto de la PRL en neuronas hipocampales bajo un daño por hipoxia química	40
7.7	Expresión del RPRL en los cultivos neuronales tratados con PRL y/o H ₂ O ₂	42
7.8	Efecto de la PRL en la expresión de genes apoptóticos en neuronas bajo estrés oxidativo	42
7.9	Efecto de la PRL en la expresión de genes reguladores de la autofagia en neuronas bajo estrés oxidativo	45
7.10	Efecto de la PRL en la expresión de enzimas antioxidantes en neuronas bajo estrés oxidativo	45
8	DISCUSIÓN	48
9	CONCLUSIONES	57
	BIBLIOGRAFÍA	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Estrés oxidativo en las células. (A) Generación de las principales especies reactivas de oxígeno (ROS) a partir de reacciones bioquímicas ocurridas en la mitocondria o por la enzima NADPH oxidasa. SOD: Superóxido dismutasa. (B) Las ROS producidas en la mitocondria pueden generar un daño oxidativo sobre diversas macromoléculas, ocasionando un mal funcionamiento de la cadena respiratoria, daño en el ADN, mal formación de proteínas y la producción de compuestos tóxicos por la peroxidación lipídica. Como consecuencia, en las células se activan procesos de muerte celular que están relacionados a la progresión de enfermedades y el envejecimiento. Cyt c: Citocromo C. PTP: transición de permeabilidad mitocondrial. Modificado de Murphy, 2016.	4
Figura 2	La apoptosis. La muerte celular por apoptosis puede ser activada a través de dos vías diferentes. (1) La vía intrínseca, iniciada por factores ambientales, implica la acción de proteínas de la familia de la Bcl-2. La proteína Bcl-2 se inactiva, lo que induce la formación de poros mitocondriales que permiten la salida de citocromo C (Cyt C). Citocromo C junto con otras proteínas (Apaf1 y dATP) forman el apoptosoma que promueve la activación de la proteína efectora caspasa 3. (2) La vía extrínseca, es activada por receptores como el receptor FAS o el receptor a TNF (TNFR1), su activación promueve la acción de proteínas del grupo de las caspasas lo que al final induce la activación de la caspasa 3. Para la mayoría de los casos la caspasa 3 activada implica el paso final de la apoptosis, en donde se promueve la fragmentación del ADN y la consecuente muerte de la célula. Modificado de McArthur, Chappaz y Kile, 2018.	11

Figura 3	<p>La autofagia. La autofagia es un proceso catabólico en el que son degradados los compuestos celulares para su posterior reciclaje. Comprende una serie de pasos conocidos como nucleación, elongación y maduración. En la autofagia se forma una doble membrana que engulle organelos y macromoléculas formando vesículas que se fusionan con el lisosoma que contiene proteasas para la degradación. Para que ocurra la autofagia es necesaria la acción de diversos complejos proteicos que se encargan de la formación y fusión de las vesículas y del reclutamiento de los compuestos a degradar.</p>	15
Figura 4	<p>Análisis de la pureza del cultivo de neuronas hipocampales. (A) Inmunocitoquímica del cultivo de neuronas en el DIV₁₄, con o sin un tratamiento continuo de AraC 2 μM; En rojo se observan células positivas a β-III-Tubulina y en verde células positivas a GFAP, los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). (B) Conteo de los núcleos correspondientes a neuronas (N) y astrocitos (A), se representa la proporción de núcleos positivos a β-III-Tubulina o GFAP respecto al número total de núcleos (T). Las imágenes mostradas son representativas. Imágenes tomadas en Z-stack 600 μm (25x de aumento) en un microscopio confocal LSM 780 con el programa Aim Imagen Examiner. Barra de escala: 200 μm. Conteo celular realizado con el programa ImageJ. DIV: Día in vitro.</p>	34
Figura 5	<p>Expresión de genes de marcadores neuronales y de sinapsis en el desarrollo del cultivo de neuronas hipocampales. (A) Expresión relativa en el DIV₄, DIV₁₀ y DIV₁₂ del ARNm β-III-Tubulina (TUBB₃) y GFAP en el cultivo de neuronas, datos normalizados respecto a los valores de β-III-Tubulina en el DIV₄ (n=4). (B, C, D) Expresión relativa en el DIV₄, DIV₁₀ y DIV₁₂ de los marcadores sinápticos: sinaptofisina (SYP), vGlut₁ (SLC_{17A7}) y PSD₉₅ (DLG₄), datos normalizados respecto al DIV₄ (n=3). DIV: Día in vitro. ARNm: ARN mensajero. Datos analizados con ANOVA de un factor seguidos de una prueba post-hoc de Tukey * p <0.05 ** p <0.01 *** p <0.001. . . .</p>	36

Figura 6

Expresión del gen del PRLR en el desarrollo del cultivo de neuronas hipocampales. (A) Expresión del ARNm de la PRL y de su receptor (PRLR) en el cultivo de neuronas hipocampales en el DIV₁₀. Amplificación del transcrito por RT PCR punto final. Como control positivo fue utilizado ARNm de hipófisis de ratón hembra. (B) Expresión relativa del PRLR en el DIV₄, DIV₁₀ y DIV₁₂ del cultivo neuronal, datos normalizados respecto al DIV₄, obtenidos por RT qPCR. n=3. DIV: Día in vitro. ARNm: ARN mensajero. Las barras representan la media +/- el EEM. Datos analizados con ANOVA de un factor seguidos de una prueba post-hoc de Tukey * p <0.05. . . .

37

Figura 7

Efecto del H₂O₂ sobre los cultivos de neuronas hipocampales. (A) Viabilidad celular del cultivo de neuronas tratadas con dosis crecientes (25 a 225 µM) de H₂O₂ por 24 horas, medida por el ensayo de MTT. Datos presentados como porcentaje del CTRL. (B) Curso temporal de la generación de ROS totales en neuronas tratadas con H₂O₂(100 µM), medida por la oxidación del reactivo DCFHDA. Datos normalizados respecto al control (0 µM H₂O₂, 15 minutos). n=3. (C) Fragmentación del ADN nuclear en cultivos neuronales tratados con H₂O₂ (100 µM) durante 4 o 24 horas, detectada por el ensayo de TUNEL. CTRL: control. H₂O₂: Peróxido de hidrógeno. Las barras representan la media +/- el EEM. Datos analizados con ANOVA de un factor seguidos de una prueba post-hoc de Tukey * p <0.05 ** p <0.01 *** p <0.001 **** p <0.0001, se indican las diferencias entre tratamientos. Barra de escala: 200 µm.

38

Figura 8

La PRL protege a las neuronas hipocampales contra un daño por estrés oxidativo. (A) Viabilidad celular de neuronas pre-tratadas con dosis crecientes de PRL (1 a 100 nM) por 48 horas y con H₂O₂ (100 µM) por 24 horas, medidas por el ensayo de MTT. Datos normalizados respecto al control (0 nM PRL, 0 µM H₂O₂). (B) Producción de ROS totales en neuronas pre-tratadas con PRL (100 nM) por 24 horas y/o con H₂O₂ (100 µM) durante 60 minutos. n=4. CTRL: control. H₂O₂: Peróxido de hidrógeno. Las barras representan la media +/- el EEM. Datos analizados con ANOVA de uno o dos factores, según fuera el caso, seguidos de una prueba post-hoc de Tukey * p <0.05 ** p <0.01 *** p <0.001 **** p <0.0001.

39

- Figura 9 **Efecto del CoCl_2 sobre los cultivos de neuronas hipocampales.** (A) Viabilidad celular del cultivo de neuronas tratadas con dosis crecientes (100 a 600 μM) de CoCl_2 por 24 horas, medida por el ensayo de MTT. Datos presentados como porcentaje del CTRL. (B) Producción temporal de ROS totales en neuronas tratadas con CoCl_2 (300 μM), obtenida por la oxidación del reactivo DCFDA. Datos normalizados respecto al control (0 μM CoCl_2 , 15 minutos). n=3. CTRL: control. CoCl_2 : Cloruro de cobalto. Las barras representan la media +/- el EEM. Datos analizados con ANOVA de un factor seguidos de una prueba post-hoc de Tukey * p <0.05 ** p <0.01 *** p <0.001 **** p <0.0001, se indican las diferencias entre tratamientos. 41
- Figura 10 **La PRL no protege a las neuronas hipocampales contra un daño por hipoxia química.** (A) Viabilidad celular de neuronas pre-tratadas con dosis crecientes de PRL (1 a 100 nM) por 48 horas y con CoCl_2 (300 μM) por 24 horas, medida por el ensayo de MTT. Datos normalizados respecto al control (0 nM PRL, 0 μM CoCl_2). n=3. (B) Producción de ROS totales en neuronas pre-tratadas con PRL (100 nM) por 24 horas y/o con CoCl_2 (300 μM) durante 60 minutos. n=3. CTRL: control. CoCl_2 : Cloruro de cobalto. Las barras representan la media +/- el EEM. Datos analizados con ANOVA de uno o dos factores, según fuera el caso, seguidos de una prueba post-hoc de Tukey * p <0.05 ** p <0.01 *** p <0.001. 42
- Figura 11 **La PRL induce un incremento en la expresión de su receptor en las neuronas hipocampales.** Expresión relativa del PRLR en cultivos neuronales pre-tratados con PRL ovina por 48 horas (100 nM) y/o con H_2O_2 (100 μM) por 24 horas. Datos normalizados respecto al CTRL, obtenidos por RT qPCR. n=4. CTRL: control. PRLR: receptor de PRLR. H_2O_2 : Peróxido de hidrógeno. Las barras representan la media +/- el EEM. Datos analizados con prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de la U de Mann-Whitney. *p <0.05 ** p <0.01 *** p <0.001. 43

Figura 12

La PRL reduce la expresión de genes pro-apotóticos en neuronas hipocampales bajo estrés oxidativo inducido por H₂O₂. Expresión relativa de genes apoptóticos de cultivos neuronales pre-tratados con PRL (100 nM) por 48 horas y/o con H₂O₂ (100 μM) por 24 horas. Se analizó la expresión de los genes pro-apoptóticos BAX: bcl-2-like protein 4. PMAIP1: Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1 o NOXA. BBC3: Bcl-2-binding component 3 o PUMA. BAD: Bcl-2-associated death promoter. BCL2L11: Bcl-2-like protein 11 o BIM. Y se analizó la expresión del gen anti-apoptótico BCL2: B-cell lymphoma 2 o Bcl-2. Datos normalizados respecto al CTRL, obtenidos por RT qPCR. n=4. CTRL: control. H₂O₂: Peróxido de hidrógeno. Las barras representan la media +/- el EEM. Datos analizados con ANOVA de un factor seguido de una prueba post-hoc de Tukey o por la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de la U de Mann-Whitney, según fuera el caso. *p <0.05 ** p <0.01 *** p <0.001. 44

Figura 13

La PRL reduce la expresión de reguladores de la autofagia en neuronas hipocampales bajo estrés oxidativo inducido por H₂O₂. Expresión relativa de genes autofágicos de cultivos neuronales pre-tratados con PRL (100 nM) por 48 horas y/o con H₂O₂ (100 μM) por 24 horas. Se analizó la expresión de BECN1: Beclina 1. ATG12: Autophagy-related protein 12. MAP1LC3B: Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B o LC3. LAMP2: Lysosome-associated membrane protein 2. Datos normalizados respecto al CTRL, obtenidos por RT qPCR. n=4. CTRL: control. H₂O₂: Peróxido de hidrógeno. Las barras representan la media +/- el EEM. Datos analizados con ANOVA de un factor seguido de una prueba post-hoc de Tukey o por la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de la U de Mann-Whitney, según fuera el caso. *p <0.05 ** p <0.01 *** p <0.001. 46

Figura 14

La PRL reduce la expresión de genes de enzimas antioxidantes en neuronas hipocampales bajo estrés oxidativo por H₂O₂. Expresión relativa de enzimas antioxidantes SOD2: Manganeso superóxido dismutasa 2. GPX1: Glutatión peroxidasa 1. PRDX1: Peroxiredoxina 1. PRDX6: Peroxiredoxina 6. En cultivos neuronales pre-tratados con PRL (100 nM) por 48 horas con o sin H₂O₂ (100 μM) por 24 horas. Datos normalizados respecto al CTRL, obtenidos por RT qPCR. n=4. CTRL: control. H₂O₂: Peróxido de hidrógeno. Las barras representan la media +/- el EEM. Datos analizados con ANOVA de un factor seguido de una prueba post-hoc de Tukey o por la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de la U de Mann-Whitney, según fuera el caso. *p <0.05 ** p <0.01 *** p <0.001. 47

Figura 15

Propuesta del mecanismo protector de la prolactina en neuronas bajo un estado estrés oxidativo inducido por H₂O₂. La PRL protege a las neuronas hipocampales del H₂O₂ al reducir la concentración de especies reactivas de oxígeno (ROS) e inhibir la expresión de marcadores pro-apoptóticos y reguladores de la autofagia. Lo que promueve la correcta actividad de la mitocondria y la posible inhibición de la apoptosis y la autofagia. Las líneas punteadas indican relaciones hipotéticas. 56

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1	Tabla 1A	32
Cuadro 2	Tabla 1B	33

1 INTRODUCCIÓN

El oxígeno molecular (O_2), es un componente crucial para el funcionamiento de las células y de los organismos debido a su papel como el principal aceptor de electrones para la producción de energía (Patel, 2016). En las mitocondrias se utiliza el O_2 durante la síntesis de energía en forma de ATP, a través de un proceso conocido como fosforilación oxidativa en conjunto con la cadena transportadora de electrones (Angelova y Abramov, 2018). Durante este proceso, aunque no de manera exclusiva, se generan productos secundarios conocidos como especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), las cuales pueden ser o generar radicales libres. Estas moléculas actúan en la señalización celular, pero cuando se acumulan o producen en exceso también se les han atribuido efectos tóxicos que conllevan a la degeneración de los tejidos. Las células poseen defensas antioxidantes que previenen y reparan el daño ocasionado por las ROS, cuando estas defensas fallan en contener dicho daño se genera un estado de "estrés oxidativo". En dicho estado el equilibrio entre los agentes pro-oxidantes y los anti-oxidantes se pierde, lo que provoca la oxidación de macromoléculas y el consecuente mal funcionamiento de la célula (Patel, 2016). El efecto del estrés oxidativo ha sido reportado en numerosos estudios que relacionan el incremento de las ROS con la progresión de enfermedades vasculares, la diabetes, el cáncer y la neurodegeneración (Le Bras y col., 2005).

Debido a las características particulares del cerebro, especialmente por su alto consumo de oxígeno y glucosa, este órgano tiene una alta susceptibilidad a los efectos citotóxicos de las ROS (Kim y col., 2015). Un estado continuo de estrés oxidativo se ha relacionado con la aparición y progresión de patologías como la enfermedad de Alzheimer, el mal del Parkinson, la corea de Huntington o la esclerosis lateral amiotrófica, se han visto relacionadas con un continuo estado de estrés oxidativo en distintas regiones del SNC (Mattson, 2000). Una característica común entre estas enfermedades es la excesiva muerte de las neuronas inducida por las ROS a través de diferentes vías de muerte celular. Dependiendo de su concentración, las ROS pueden activar la apoptosis, la autofagia o la necrosis (Higgins y col., 2011; Tan, Wood y Maher, 1998). La apoptosis y la autofagia son tipos de "muerte celular regulada" cuya activación se ha visto involucrada en la degeneración neuronal durante procesos como la hipoxia-isquemia o la excitotoxicidad (Damme y col., 2015), fenómenos en los que se producen elevadas cantidades de ROS. Las neuronas son células del sistema nervioso

cuyo principal papel es la transmisión del impulso nervioso, lo que permite el desempeño de tareas motoras y procesos cognitivos. Debido a que poseen una alta especialización y diferenciación, carecen de suficientes defensas antioxidantes y demás características que las hacen muy sensibles a los efectos del estrés oxidativo. Por ello se han buscado mecanismos y factores que logren reducir los efectos deletéreos de las ROS e inhibir la activación de procesos como la apoptosis o la autofagia. Dentro de los factores con acciones que disminuyen el daño celular o disminuyen el estrés oxidativo, se encuentran varias hormonas. Por ello, proponemos a la prolactina (PRL), una hormona adenohipofisiaria, como un factor neuroprotector en el cerebro.

La PRL es una hormona polipeptídica sintetizada en la adenohipófisis (aunque no de manera exclusiva), entre sus principales acciones está su efecto sobre la reproducción, particularmente sobre la lactogénesis en la glándula mamaria (Freeman y col., 2000). Se ha reportado que posee importantes efectos sobre otros tejidos como el cerebro donde promueve procesos de proliferación, migración y diferenciación (Torner, 2016). Además la PRL promueve la supervivencia de diferentes células del organismo entre las que se incluyen los astrocitos y las neuronas (Reyes-Mendoza y Morales, 2016; Rivero-Segura y col., 2017; Ulloa, 2018). La PRL es capaz de inducir cambios en vías de señalización relacionadas con la apoptosis y la autofagia sobre las cuales podría tener un efecto inhibitorio (Adán y col., 2013; Wen y col., 2014).

Por lo anterior, en este trabajo nos propusimos estudiar el efecto y posible mecanismo protector de la PRL en neuronas hipocampales bajo un estrés oxidativo, vía sus acciones modulatorias sobre la apoptosis y la autofagia.

2 ANTECEDENTES

2.1 LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS)

Un radical libre es un átomo, molécula o compuesto altamente inestable debido a que en su conformación estructural posee un electrón desapareado. Tal inestabilidad provoca que tiendan a aparearse con otras moléculas robando átomos de hidrógeno o uniéndose directamente a ellas, para crear así un compuesto estable (Bhattacharya, 2015). La gran mayoría de los radicales libres generados en el organismo están constituidos por oxígeno, siendo conocidos como ROS, las cuales suelen ser resultado del metabolismo normal de la célula (Birben y col., 2012).

Las ROS son producidas como intermediarios en las reacciones de óxido-reducción del O_2 para la formación de H_2O . Para esta reducción las enzimas mitocondriales pueden convertir el O_2 por una reacción tetravalente sin la generación de algún intermediario, sin embargo, en otras ocasiones tal reducción se da por una vía univalente que forma a las ROS: al aceptar un primer electrón se obtiene el anión superóxido (O_2^-) que se puede dismutar (de manera espontánea o por la acción de las enzimas superóxido dismutasas) generando peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que es reducido a H_2O por la acción de enzimas como la catalasa o la glutatión peroxidasa (Hess y Manson, 1984). Cuando la acumulación de H_2O_2 es excesiva, éste puede reaccionar con metales como el hierro o el cobre a través de la reacción de Fenton, produciendo uno de los radicales libres más inestables y dañinos: el radical hidroxilo (OH) (Hess y Manson, 1984) (Fig. 1A).

Alrededor del 95% del O_2 consumido por las células es reducido para la obtención de dos moléculas de agua, sin embargo entre el 1 y 3% pasa a formar las ROS, principalmente durante la ya mencionada cadena de transporte de electrones en la mitocondria (Angelova y Abramov, 2018). La producción de las ROS se encuentra modulada por factores como la eficiencia y la actividad de moléculas antioxidantes, por el contenido de oxígeno y óxido nítrico, y por la disponibilidad de donadores de electrones y citocinas (Touyz, 2012). Otras fuentes generadoras de ROS dentro de la célula son: las enzimas citocromo P-450 encargadas de la remoción y desintoxicación de compuestos, proceso en el cual utilizan oxígeno; durante la acción de la xantina oxidasa, encargada de la generación de NADH y

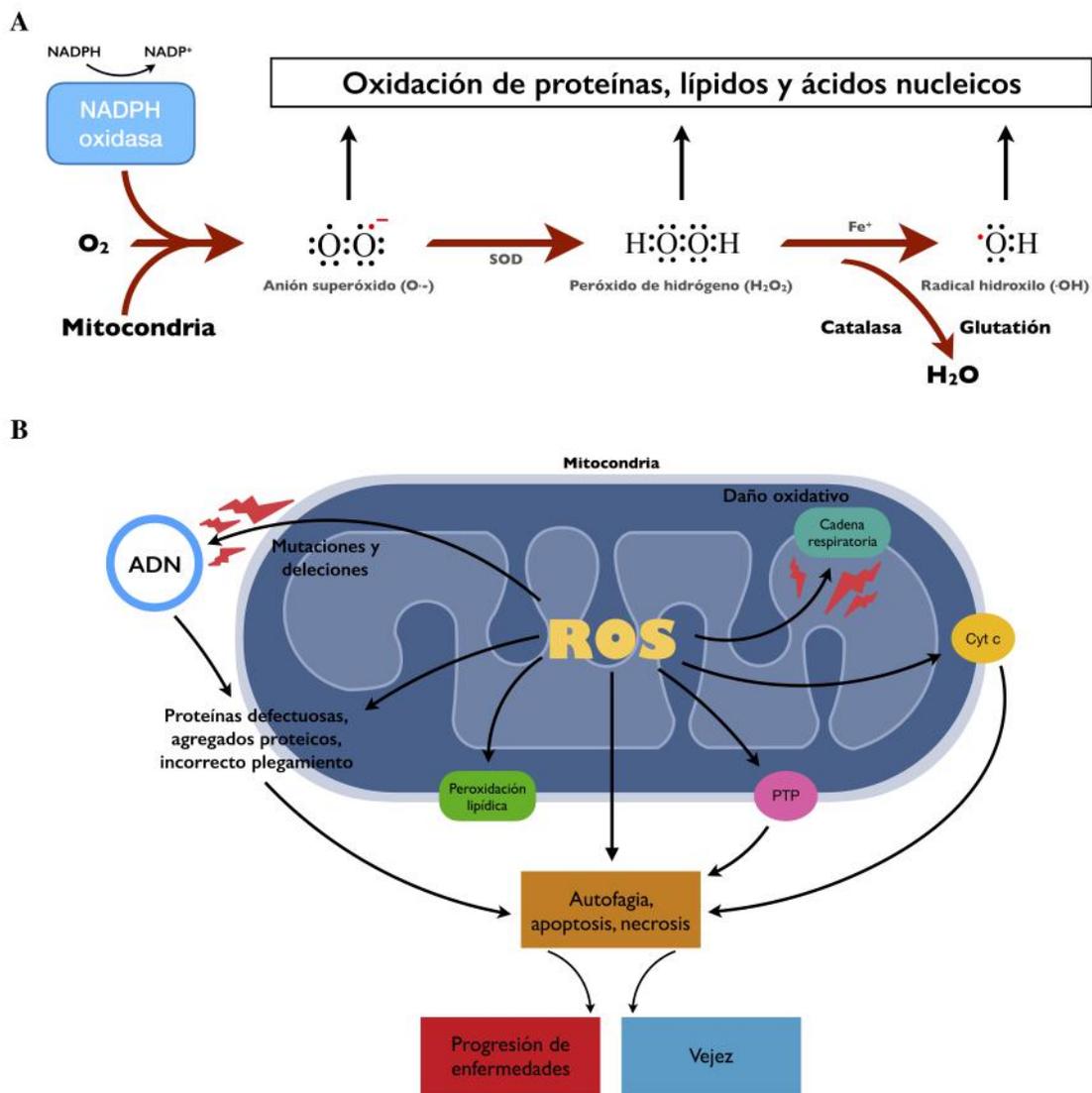


Figura 1: **Estrés oxidativo en las células.** (A) Generación de las principales especies reactivas de oxígeno (ROS) a partir de reacciones bioquímicas ocurridas en la mitocondria o por la enzima NADPH oxidasa. SOD: Superóxido dismutasa. (B) Las ROS producidas en la mitocondria pueden generar un daño oxidativo sobre diversas macromoléculas, ocasionando un mal funcionamiento de la cadena respiratoria, daño en el ADN, mal formación de proteínas y la producción de compuestos tóxicos por la peroxidación lipídica. Como consecuencia, en las células se activan procesos de muerte celular que están relacionados a la progresión de enfermedades y el envejecimiento. Cyt c: Citocromo C. PTP: transición de permeabilidad mitocondrial. Modificado de Murphy, 2016.

que en ciertas circunstancias puede producir ROS; en la activación del complejo enzimático NADPH oxidasa, que produce O_2^- y H_2O_2 para la destrucción de patógenos; y en los procesos enzimáticos que ocurren en los peroxisomas (Bhattacharya, 2015; Dasuri, Zhang y Keller, 2013).

Durante condiciones normales, las ROS ejercen acciones reguladoras sobre procesos metabólicos y vías de señalización. Debido a su capacidad oxidante participan en reacciones de óxido-reducción como parte del metabolismo normal de las células. Las ROS generadas de manera endógena funcionan como segundos mensajeros de receptores de factores de crecimiento y hormonas, y también participan en la activación o inactivación de cinasas de proteínas, fosfatasa y de factores de transcripción, pueden regular vías de señalización dependientes de calcio, actúan en la biosíntesis de moléculas y en acciones de protección contra bacterias (Bhattacharya, 2015; Winterbourn y Hampton, 2008). La función de las ROS ha sido reportada sobre el control de vías de supervivencia, proliferación y diferenciación, en la homeostasis iónica, así como también en la activación de mecanismos antiinflamatorios y antioxidantes (Ray, Huang y Tsuji, 2012), por lo que en las células se puede promover su propia regulación, manteniendo así un equilibrio entre factores pro-oxidantes y antioxidantes.

2.1.1 *Las acciones citotóxicas de las ROS*

Como se mencionó anteriormente, las ROS son capaces de activar mecanismos antioxidantes los cuales responden a variaciones en la concentración de radicales libres. En efecto, las células poseen enzimas y factores que ayudan a la remoción de las ROS y a la reparación de moléculas que pudieran resultar dañadas. Entre las principales moléculas que actúan en tales procesos están la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa, la glutatión peroxidasa (GPX) y las peroxirredoxinas (PRX) (Le Bras y col., 2005). Durante condiciones normales en la célula existe un equilibrio entre la formación y eliminación de las ROS. Cuando tal regulación se pierde se genera un desequilibrio entre los factores oxidantes y antioxidantes, que conduce a perturbaciones en las reacciones redox y a un daño en diferentes macromoléculas, en un estado conocido como estrés oxidativo (Patel, 2016).

Un estado de estrés oxidativo prolongado puede ocasionar daño o incluso muerte celular, ya que al aumentar la presencia de las ROS se generan incrementos en la concentración de calcio lo que induce la activación de endonucleasas y provoca la fragmentación del ADN (Bhattacharya, 2015) (Fig. 1B). Otros componentes celulares pueden resultar oxidados, provocando cambios estructurales en las proteínas, la inactivación de enzimas y el daño a la

membrana celular por la peroxidación lipídica (Bell, 2013).

Conforme han avanzado las investigaciones se han acumulado evidencias del papel central del estrés oxidativo en la progresión de enfermedades degenerativas, sin embargo, el establecimiento de si las ROS son la causa o una consecuencia, continúa siendo materia de debate (Gandhi y Abramov, 2012).

2.1.2 *El efecto de las ROS en el cerebro*

El cerebro comprende el 2% del peso total del cuerpo humano, sin embargo, es el órgano con los mayores requerimientos de oxígeno en el organismo, consumiendo alrededor del 20% del total (Kim y col., 2015). Esto debido a la participación del O₂ en la producción de ATP, que es necesario para el mantenimiento de procesos altamente energéticos como los potenciales de acción, el mantenimiento de la maquinaria sináptica (receptores y procesos de exocitosis), para la neurotransmisión y durante las reacciones enzimáticas (Patel, 2016). Por estas razones, se ha considerado al cerebro como un órgano particularmente sensible a las acciones citotóxicas de las ROS, dado que posee ciertas características, extra e intra celulares, que influyen en su sensibilidad: (1) En el tejido nervioso existe una amplia red de corrientes de calcio (Ca⁺⁺) que en altas dosis de ROS pueden verse modificadas, provocando cambios en proteínas sensibles a Ca⁺⁺ y sobre el citoesqueleto. (2) Aminoácidos excitotóxicos como el glutamato pueden ser liberados en exceso por acción de las ROS, generando daños sobre las células y causando la muerte celular. De la misma forma, el glutamato puede inducir la producción de ROS. Otros neurotransmisores como la dopamina, serotonina y norepinefrina son auto-oxidables, lo que puede generar más ROS. (3) Metales como el hierro o el cobre se encuentran en abundancia en el cerebro, y pueden participar en la formación de radicales como el OH. (4) El óxido nítrico, muy importante para la función cerebral, puede interactuar con las ROS formando especies reactivas de nitrógeno, las cuales participan en la nitrosilación de proteínas. (5) Las membranas de sus células (principalmente de las neuronas) son ricas en ácidos grasos poli-insaturados susceptibles a la peroxidación lipídica causada por las ROS, generando compuestos citotóxicos. (6) La presencia de antioxidantes como la catalasa es relativamente baja en comparación con otros sistemas (Gandhi y Abramov, 2012; Halliwell, 2006; Kim y col., 2015).

Entre todos los tipos de células existentes en el cerebro, las neuronas tienen una mayor susceptibilidad al daño causado por las ROS. Algunas de las características que aumentan dicha sensibilidad al estrés oxidativo son: su alta actividad mitocondrial y demanda de ATP; la síntesis de neurotransmisores; por ser células postmitóticas sin opción a sustituirse

tras un daño (Dasuri, Zhang y Keller, 2013) y su alta dependencia de los astrocitos, los cuales son su principal fuente de mecanismos antioxidantes (Bell, 2013).

Por todo lo anterior, resulta innegable la participación de las ROS en la progresión de múltiples condiciones patológicas neuronales. Entre las principales características del daño por estrés oxidativo en las células se encuentran: el mal funcionamiento de la mitocondria, la presencia de agregados proteicos, la inflamación, los cambios en el metabolismo del hierro y el cobre, la peroxidación lipídica, la nitración de proteínas y el daño en el sistema proteosomal (Halliwell, 2006), todos estos procesos relacionados con la degeneración y la muerte neuronal. En patologías como la enfermedad de Alzheimer se ha encontrado un incremento en los niveles de marcadores de peroxidación lipídica, a la vez que se presenta un mal funcionamiento de la mitocondria relacionado con la presencia de β -amiloide. Todo esto genera una mayor cantidad de ROS que puede ocasionar aún más daño (Angelova y Abramov, 2018). De hecho, se ha reportado que el estrés oxidativo puede inducir y/o agravar la producción de placas amiloideas, por lo que sus acciones constituyen un "círculo vicioso" durante la progresión de la enfermedad (Kim y col., 2015). En la enfermedad del Parkinson, otra enfermedad neurodegenerativa, también se ha visto que el estrés oxidativo es responsable de la muerte neuronal en la sustancia nigra, además de presentar un mal funcionamiento de la mitocondria que provoca la formación de agregados de α -sinucleína (Jomova y col., 2010). En esta enfermedad se presentan efectos típicos de las ROS, como la peroxidación lipídica, la oxidación de proteínas y el daño en el ADN (Angelova y Abramov, 2018). Uno de los principales reguladores de la respuesta antioxidante, el factor de transcripción Nrf2, posee efectos protectores ante la enfermedad (Todorovic, Wood y Mellick, 2016). Lo que sugiere el importante papel del estrés oxidativo en su progresión. De la misma forma que en los casos anteriores, el estrés oxidativo se ha visto implicado en enfermedades como la esclerosis lateral amiotrófica, la corea de Huntington, en síndromes metabólicos como la diabetes, y en procesos de amplia muerte tisular como la isquemia (Lin y Beal, 2006).

2.1.3 Respuesta antioxidante en el cerebro

Tanto en condiciones normales, como en respuesta a un daño por estrés oxidativo, en las neuronas se activan dos principales mecanismos para contrarrestar el efecto de las ROS: (1) una respuesta endógena que consiste en compuestos y enzimas antioxidantes que remueven las ROS a través de conversiones metabólicas, y (2) sistemas que se encargan de remover o reemplazar las moléculas modificadas u oxidadas (Ryter y col., 2007).

Las principales enzimas encargadas de remover el exceso de las ROS son: las superóxido dismutasas (SOD) que catalizan la dismutación del O_2^- en H_2O_2 , dependiendo de su sitio activo pueden estar acopladas a manganeso como la MnSOD presente en la matriz mitocondrial, o a cobre y zinc, como la CuZnSOD presente en el espacio intermembranal de la mitocondria y en el citoplasma (Birben y col., 2012). En conjunto con estas enzimas, la catalasa y la glutatión peroxidasa (GPX) remueven el H_2O_2 reduciéndolo a H_2O (Ray, Huang y Tsuji, 2012). Otra familia de enzimas importantes en la remoción del H_2O_2 son las peroxirredoxinas (PRX), las cuales lo reducen a peróxidos orgánicos (Kim y col., 2015). Además de tales enzimas, las células son capaces de producir compuestos antioxidantes no enzimáticos como el glutatión, el ácido lipóico, la L-arginina y la transferrina (Bhattacharya, 2015). También es posible obtener antioxidantes de la dieta como lo son las vitaminas E y C, los carotenos, los flavonoides y algunos compuestos fenólicos (Dasuri, Zhang y Keller, 2013).

Dada la gran cantidad de compuestos que pueden resultar oxidados por acción de las ROS, los mecanismos de reparación no resultan completamente efectivos en detener el daño. Si las proteínas son oxidadas de manera irreversible, se activan mecanismos para la detección y ubicación de tales moléculas (Jung, Höhn y Grune, 2014). Entre los principales sistemas para la degradación de las moléculas oxidadas está el sistema proteosomal y el sistema lisosomal. El sistema proteosomal generalmente se encarga de la degradación de proteínas de vida corta, es inespecífico y posee una limitada capacidad de degradación dado que se concentra en péptidos pequeños (Höhn, König y Grune, 2013). El sistema lisosomal posee una mayor capacidad de degradación, encargándose de proteínas de vida larga, diferentes organelos y varios tipos de macromoléculas (proteínas, lípidos y ácidos nucleicos) (Chondrogianni y col., 2014). Este sistema, también conocido como macroautofagia, es el principal centro de reciclaje de la célula, además de que actúa en condiciones de estrés siendo esencial para la supervivencia. (Chondrogianni y col., 2014; Dasuri, Zhang y Keller, 2013).

Tanto el sistema proteosomal como la macroautofagia resultan activados en condiciones de estrés oxidativo, dado que son esenciales para la remoción de las moléculas dañadas. Sin embargo, en diversos estudios se ha demostrado que condiciones de estrés oxidativo muy intenso o crónico causan un mal funcionamiento de los principales reguladores de tales sistemas, por lo que este fallo puede contribuir a la degeneración celular (Höhn, König y Grune, 2013).

2.1.4 *El estrés oxidativo y la muerte celular*

El estrés oxidativo causado por concentraciones elevadas de ROS causa la progresiva modificación y la degradación de biomoléculas como el ADN, las proteínas, los lípidos y los carbohidratos. Tales acciones se han visto relacionadas a procesos de envejecimiento, inflamatorios, en el cáncer, la artritis reumatoide y las enfermedades vasculares y neurodegenerativas (Le Bras y col., 2005; Maritim, Sanders y Watkins III, 2003; Nickel, Kohlhaas y Maack, 2014; Patel, 2016).

Debido a sus acciones degenerativas las ROS pueden causar la muerte celular por tres diferentes vías. A través de la activación de procesos no regulados como la "necrosis", que consiste en una lisis celular masiva causada por un daño en la membrana y la consecuente fuga de los componentes celulares al espacio extracelular. Esta fuga puede dañar al tejido circundante y expandir el daño (Nikoletopoulou y col., 2013). Por otro lado, también se pueden activar mecanismos de muerte celular regulada como la apoptosis (muerte celular tipo I) o la autofagia (muerte celular tipo II) (Ryter y col., 2007). A diferencia de la necrosis, estos procesos se encuentran altamente regulados y requieren de la acción de diversas proteínas (Nikoletopoulou y col., 2013).

A pesar de que los tres tipos de muerte celular pueden ocurrir en respuesta al estrés oxidativo, se ha asociado que la necrosis es causada por un daño considerablemente mayor que el que puede activar a la apoptosis y la autofagia (Tan, Wood y Maher, 1998). Debido a los objetivos y alcance de este trabajo, únicamente nos enfocaremos en estos dos últimos tipos de muerte celular.

2.2 LA APOPTOSIS

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada que ocurre de manera fisiológica para el desarrollo y la homeostasis de los organismos. Este proceso consiste en una serie de eventos bien definidos donde una célula individual activa un programa genético que culmina con la fragmentación del ADN y la formación de vesículas membranales conocidas como cuerpos apoptóticos (Kannan y Jain, 2000). La activación de alguna de las dos siguientes vías se considera el inicio de la apoptosis: la vía intrínseca (que inicialmente depende de la mitocondria), o la vía extrínseca (que inicialmente depende de receptores membranales). Ambas vías de señalización son promovidas por múltiples factores tanto internos como externos (Fig. 2) (Ryter y col., 2007). La vía intrínseca es iniciada comúnmen-

te por la acción de factores ambientales (como la radiación, el daño en el ADN, el estrés oxidativo, etc.) y su control depende de una familia de proteínas conocidas como Bcl-2. El paso crítico de la apoptosis intrínseca es la permeabilización de la membrana externa mitocondrial, proceso que es controlado por factores pro- y anti- apoptóticos de la familia Bcl-2 (Kannan y Jain, 2000). Para la promoción de la apoptosis es necesaria la activación de las proteínas Bax (BCL2 associated X) y Bak (BCL2 antagonist/killer 1), que forman homodímeros o heterodímeros para la creación de canales en la membrana mitocondrial que alteran su permeabilidad y que permiten la salida de factores pro-apoptóticos como el citocromo-C, Smac/Diablo (second mitochondria-derived activator of caspase/direct inhibitor of apoptosis protein (IAP)-binding protein with low pI) o el factor inductor de la apoptosis (AIF) (Portt y col., 2011). La liberación de tales factores es regulada por la acción de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 (B-cell lymphoma 2), Bcl-XL (BCL2 like 1), MCL1 (BCL2 family apoptosis regulator) o BCL-W (BCL2 like 2) que inhiben a Bax o Bak al unirse directamente a ellos impidiendo su oligomerización, o a través de la inhibición de algunos "activadores" de la apoptosis. Por otro lado, otros factores pro-apoptóticos como PUMA (p53- upregulated modulator of apoptosis), NOXA (phorbol-12-myristate-13-acetate- induced protein 1), BIM (BCL2-interacting mediator of cell death), BID (BH3 interacting domain death agonist) o BAD (BCL2 associated agonist of cell death), promueven la permeabilización de la membrana mitocondrial al unirse a los factores anti-apoptóticos, limitando así su disponibilidad para secuestrar a Bax y Bak (Galluzzi y col., 2018). Una vez afuera de la mitocondria, el citocromo-C se une a Apaf-1 (Apoptotic protease-activating factor 1) y a dATP en el citoplasma, formando un complejo conocido como el "apoptosoma", que a través de continuas interacciones activa a un grupo de enzimas llamadas caspasas. Por su parte, la proteína Smac/Diablo actúa como un activador de las caspasas de manera indirecta, esto debido a que se une a las proteínas IAPs (cytoplasmic inhibitor of apoptosis proteins) quienes inhiben la actividad de las caspasas (Green y Llambi, 2015).

La vía extrínseca de la apoptosis se encuentra regulada por dos clases de receptores, los receptores de muerte, que al activarse inician las vías apoptóticas, y los receptores dependientes, que promueven la apoptosis al haber una falta de su ligando (Galluzzi y col., 2018). Los principales receptores de muerte conocidos son FAS (Fas cell surface death receptor) y TNFR (TNF receptor). La activación de estos receptores por sus respectivos ligandos (FasL o TNF α) causa cambios conformacionales y el reclutamiento de proteínas para la formación del complejo DISC (death-inducing signaling complex) que a su vez activará a las caspasas para la promoción de la apoptosis (Galluzzi y col., 2018; Julien y Wells, 2017; Ryter y col., 2007). Las caspasas son un grupo de enzimas de la familia de las cisteín-proteasas,

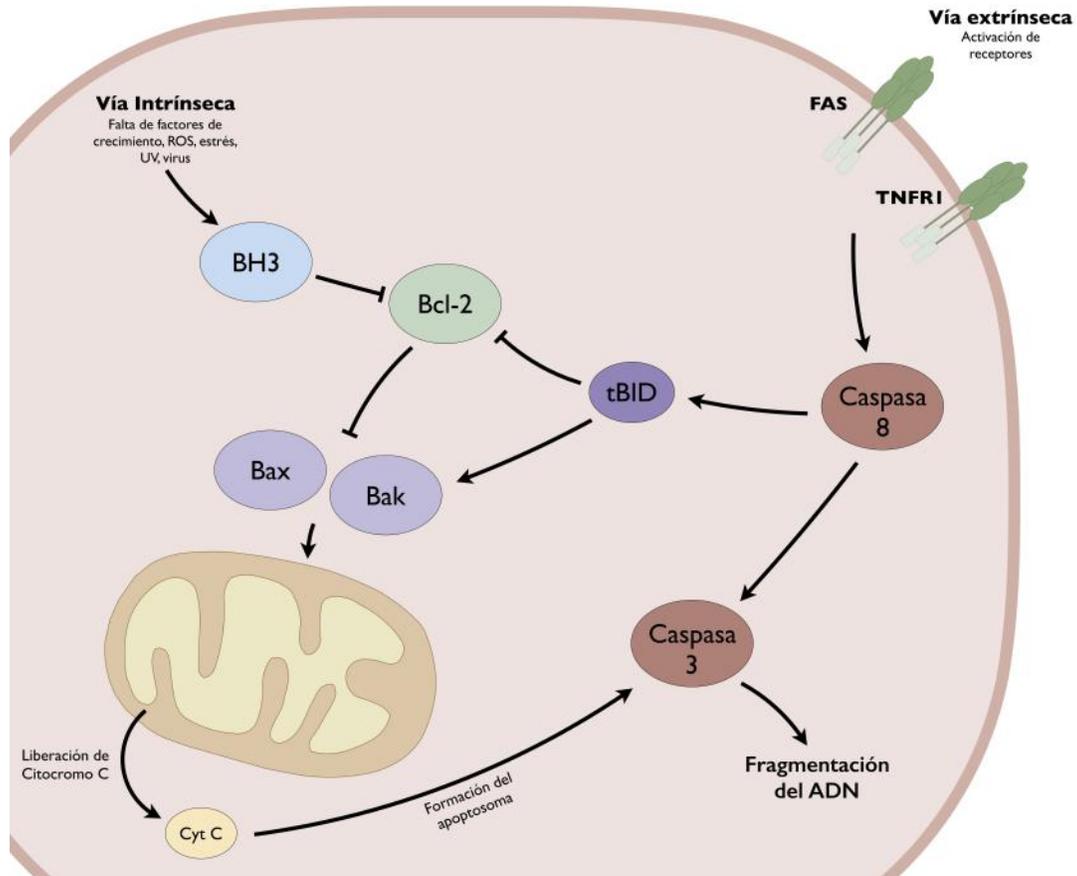


Figura 2: **La apoptosis.** La muerte celular por apoptosis puede ser activada a través de dos vías diferentes. (1) La vía intrínseca, iniciada por factores ambientales, implica la acción de proteínas de la familia de la Bcl-2. La proteína Bcl-2 se inactiva, lo que induce la formación de poros mitocondriales que permiten la salida de citocromo C (Cyt C). Citocromo C junto con otras proteínas (Apaf1 y dATP) forman el apoptosoma que promueve la activación de la proteína efectora caspasa 3. (2) La vía extrínseca, es activada por receptores como el receptor FAS o el receptor a TNF (TNFR1), su activación promueve la acción de proteínas del grupo de las caspasas lo que al final induce la activación de la caspasa 3. Para la mayoría de los casos la caspasa 3 activada implica el paso final de la apoptosis, en donde se promueve la fragmentación del ADN y la consecuente muerte de la célula. Modificado de McArthur, Chappaz y Kile, 2018.

caracterizadas por generar un corte en un residuo de aspartato de sus proteínas blanco. Las caspasas involucradas en la apoptosis pueden ser divididas en dos clases, las iniciadoras y las efectoras (Ryter y col., 2007). Las caspasas iniciadoras, tanto las activadas por los receptores de muerte (caspasas 8 o 10) o por el apoptosoma (caspasa 9), se ensamblan a través de dominios particulares en su estructura para la consecuente activación de las caspasas efectoras (caspasas 3, 6 y 7), que a través de un procesamiento proteolítico pasan de una forma inactiva a una activada debido a un cambio conformacional que permite la unión de sus sitios activos (McIlwain, Berger y Mak, 2013). Las caspasas efectoras pueden interactuar con una gran cantidad de proteínas (alrededor de 1000). A través de sus efectos proteolíticos ocasionan una pérdida o ganancia de funciones en las proteínas blanco, desencadenando mecanismos apoptóticos. Las principales caspasas efectoras, la caspasa 3 y 7, ocasionan la ruptura del potencial transmembranal de la mitocondria, un mal funcionamiento de la cadena transportadora de electrones, fallos en la producción de ATP, activan enzimas DNAsas que degradan el ADN, y también pueden interactuar con moduladores del citoesqueleto, por lo que causan una organización aberrante de los microfilamentos de actina y alteraciones en la membrana (Green y Llambi, 2015).

Todos los factores que se han mencionado hasta ahora son regulados tanto de manera transcripcional como por modificaciones post-traduccionales. Su activación e inhibición depende de la participación de factores de transcripción, enzimas y transportadores. La función de estos puede ser promovida durante procesos fisiológicos para el desarrollo y protección de los organismos, pero en condiciones de estrés o daño pueden activar la apoptosis causando un extenso daño en los tejidos.

2.2.1 *La apoptosis y el estrés oxidativo*

El estrés oxidativo ha estado asociado con la promoción de la apoptosis especialmente por sus acciones sobre la mitocondria. Este organelo funciona como la principal fuente de ROS así como también el principal blanco de sus efectos. Un incremento en las concentraciones de las ROS genera un daño en el ADN mitocondrial y un mal funcionamiento de la cadena transportadora de electrones, que a su vez produce una mayor cantidad de ROS. Estos eventos pueden causar la permeabilización de la membrana mitocondrial provocando la salida de los factores pro-apoptóticos citocromo C o Smac/Diablo (Circu y Aw, 2010). El H_2O_2 y el O_2^- pueden interactuar con proteínas de la mitocondria como la ciclofilina D, la ANT (adenine nucleotide translocator) y el VDAC (voltage dependent-anion-channel) cuya oxidación provoca la apertura de poros transmembranales de la mitocondria (Redza-

Dutordoir y Averill-Bates, 2016). De manera particular, el O_2^- es capaz de inactivar un grupo de proteínas conocidas como acotinasas, lo que provoca la liberación de Fe^{2+} y H_2O_2 , favoreciendo a la reacción de Fenton y la consecuente producción del radical hidroxilo (Ott y col., 2007).

El H_2O_2 es uno de los compuestos más utilizados como modelo de estrés oxidativo, y se ha descrito como promotor de la apoptosis. El H_2O_2 puede provocar la sobre-expresión y la activación de p53, que regula la expresión de las proteínas pro-apoptóticas Bax y PUMA (Ott y col., 2007), y se encuentra involucrado en el control de las caspasas (Circu y Aw, 2010). Se ha reportado que las ROS son capaces de regular la señalización de TNFR1, que inhibe la activación de NF- κ B, un factor de supervivencia y anti-apoptótico (Redza-Dutordoir y Averill-Bates, 2016), promueven la actividad de la proteína ASK-1 (apoptosis signal-regulating kinase-1) y de JNK (c-Jun N-terminal kinase) que inhibe la actividad de Bcl-2 y Bcl-XL, promueven la expresión de TNF α , p53, Bak y FasL, e inducen la liberación de citocromo C (Circu y Aw, 2010; Redza-Dutordoir y Averill-Bates, 2016; Ryter y col., 2007).

Por otro lado, la peroxidación lipídica causada por el estrés oxidativo también posee un papel en la promoción de la apoptosis, ya que provoca alteraciones en la membrana celular y mitocondrial además de que tiene efectos sobre la homeostasis del calcio (Circu y Aw, 2010). Las ROS son capaces de modificar la función de la cardiolipina, un fosfolípido que se encarga de acoplarse al citocromo C manteniéndolo en la membrana interna mitocondrial, sin embargo, al oxidarse la cardiolipina se desacopla de tal proteína permitiendo su salida al citoplasma (Circu y Aw, 2010; Ott y col., 2007).

Además de la mitocondria, otros organelos importantes en la promoción de la apoptosis son el retículo endoplasmático (RE) y el núcleo. En el RE el continuo estado de estrés oxidativo provoca un incorrecto plegamiento de las proteínas y la liberación anormal de Ca^{++} , estas condiciones favorecen la activación de vías apoptóticas dependientes de ASK, p38 MAPK y JNK (Redza-Dutordoir y Averill-Bates, 2016). Por su parte, en el núcleo el daño oxidativo causa modificaciones en las bases nitrogenadas y en los enlaces del ADN, un extenso daño en esta molécula puede inducir la estabilización del factor p53 y el inicio de la apoptosis (Ott y col., 2007).

2.2.2 *La apoptosis en el SNC*

Durante el desarrollo del SNC son promovidos procesos de "muerte celular programada" que participan en la morfogénesis, la diferenciación celular y el remodelado del tejido

(Naruse y Keino, 1995). La apoptosis resulta esencial durante la formación y cierre de la placa y el tubo neural, además funciona en el control del número de células en el tejido y en la eliminación de células mal posicionadas o defectuosas (Yamaguchi y Miura, 2015).

Después del desarrollo, el tejido nervioso y particularmente las neuronas, no son capaces de proliferar por lo que deben sobrevivir todo el ciclo de vida del organismo. La mayoría de las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por presentar anomalías en la morfología y la fisiología de las neuronas, tal es el caso de la presencia de agregados proteicos, daño en la mitocondria, mal funcionamiento de los canales de Ca^{++} y una excesiva producción de ROS. Estas características se encuentran relacionadas con la promoción de la apoptosis. Por ejemplo, los agregados de la proteína β -amiloide y las marañas miofibrilares de la proteína Tau, característicos de la enfermedad de Alzheimer, se han visto relacionados con la activación de la caspasa 3 y de la vía extrínseca a través de Fas (Chi, Chang y Sang, 2018). Además, en dicha enfermedad se presenta un incremento en el daño del ADN y alteraciones en la expresión de proteínas de la familia BCL-2, esto acompañado de daño por estrés oxidativo como la peroxidación lipídica, un excesivo flujo de corrientes de calcio, y la disfunción y la permeabilización de la membrana mitocondrial, todo esto llevando a la activación de la apoptosis (Mattson, 2000). En otras patologías como el mal de Parkinson o la corea de Huntington también se han observado procesos de apoptosis en las neuronas, esto a través de la activación de las caspasas 8 y 6, por la expresión del factor pro-apoptótico Par-4 y por fenómenos de excitotoxicidad por glutamato que conllevan a un daño en la membrana de la mitocondria (Ghavami y col., 2014; Mattson, 2000). Por otro lado, en un daño del tejido neural como en los procesos de isquemia, se ha encontrado que se activa la apoptosis por una reducción en las proteínas anti-apoptóticas IAPs y por la acción de la caspasa 3 (Robertson y col., 2000; Yakovlev y Faden, 2001).

En conjunto con la apoptosis, se ha reportado en múltiples estudios que otros tipos de muerte celular se encuentran relacionados con la progresión de las patologías ya mencionadas. De hecho, fenómenos como la necrosis, la necroptosis (un proceso de necrosis regulado) y la autofagia están relacionados con la apoptosis y sus mecanismos de regulación (Redza-Dutordoir y Averill-Bates, 2016).

2.3 LA AUTOFAGIA

La autofagia es un proceso que se presenta de manera constitutiva en todas las células, el cual se encarga de la degradación y el reciclaje de diferentes moléculas y organelos (Parzych y Klionsky, 2014). La ruta general de la autofagia consiste en la aparición de

un saco membranal (conocido como fagóforo), que se extiende y engloba una porción del citoplasma que contiene proteínas y/u organelos celulares, conocido como autofagosoma. Así, este autofagosoma se fusiona con el lisosoma para la degradación de su contenido por la acción de las hidrolasas (Fig. 3). Después de haber terminado tal proceso, los residuos de la degradación (como los aminoácidos) son regresados al citoplasma para su re-utilización (Ohsumi, 2014).

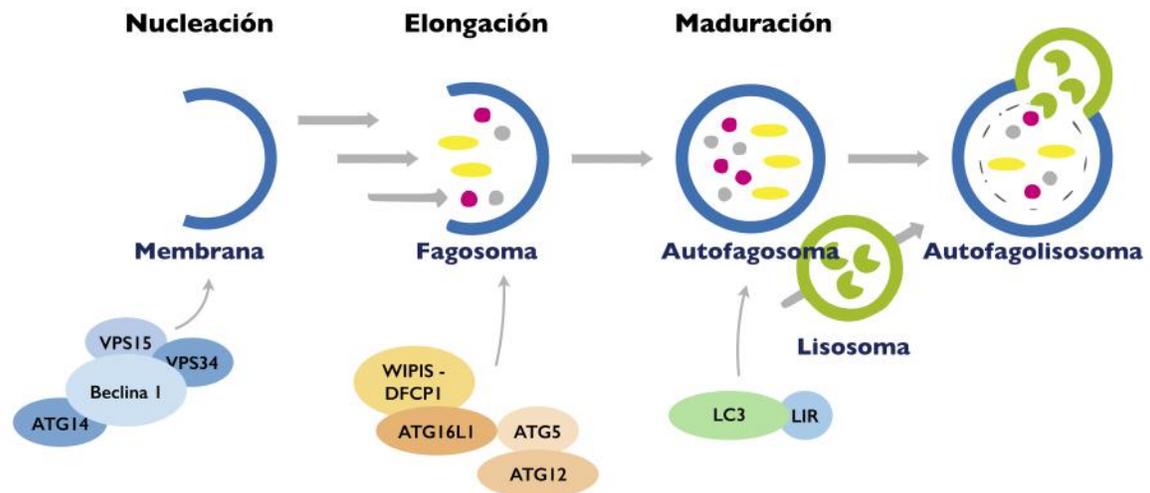


Figura 3: **La autofagia.** La autofagia es un proceso catabólico en el que son degradados los compuestos celulares para su posterior reciclaje. Comprende una serie de pasos conocidos como nucleación, elongación y maduración. En la autofagia se forma una doble membrana que engulle organelos y macromoléculas formando vesículas que se fusionan con el lisosoma que contiene proteasas para la degradación. Para que ocurra la autofagia es necesaria la acción de diversos complejos proteicos que se encargan de la formación y fusión de las vesículas y del reclutamiento de los compuestos a degradar.

La autofagia se encuentra regulada por toda una serie de complejos proteicos que median la expansión de la membrana, el secuestro de componentes citoplasmáticos (también llamado carga") y la fusión del autofagosoma con el lisosoma. Dentro de los principales mediadores se encuentran el complejo de la Unc51-like cinasa (ULK1/2), la proteína relacionada a la autofagia 13 (Atg13) y el complejo RB1CC1, que participan en la iniciación de la autofagia. Otro regulador es el complejo fosfatidilinositol 3 fosfato clase III (PtdIns3P clase III) que regula la formación del fagóforo (Parzych y Klionsky, 2014). Para la elongación y englobamiento es necesaria la participación de sistemas conjugados tipo ubiquitinas, como las proteínas relacionadas a la autofagia 12, 5 y 16L1 (Atg12, Atg5 y Atg16L1) (Damme y col., 2015). Otro sistema tipo ubiquitina es el de la proteína de cadena ligera I (LC3I) que sufre una conjugación con una fosfatidiletanolamina (PE), resultando en LC3II. Dicha lipidación

resulta esencial para el progreso del autofagosoma y se ha utilizado como un marcador de autofagia en numerosos estudios (Parzych y Klionsky, 2014).

Debido a que la principal función de la autofagia es la del reciclar componentes celulares, este proceso suele estar modulado por la cantidad de nutrientes y factores de crecimiento disponibles. Para esto existen dos principales sensores en la célula, uno de carbono por la acción de la proteína cinasa A (PKA) y otro de nitrógeno por la acción de mTORC1 (por sus siglas en inglés, mammalian Target of Rapamycin complex 1) (Parzych y Klionsky, 2014). El principal mediador de la autofagia resulta ser mTORC1, el cual responde de manera positiva a la concentración de aminoácidos en la célula. mTOR funciona como un sensor principalmente de leucina, que al fosforilarse participa en la inactivación de ULK1 para así inhibir la autofagia (Fader y Colombo, 2008). La concentración intracelular de aminoácidos no es el único mecanismo por el que se regula la autofagia, los factores de crecimiento que activan la vía de la PI3K-Akt regulan positivamente a mTOR. Por otro lado, la disponibilidad de glucosa puede regular de manera negativa a mTOR a través de la actividad de la proteína AMP cinasa (AMPK), que es un sensor de AMP/ATP (Jung et al., 2009). La autofagia también juega un papel importante en la función celular en respuesta a un gran número de estresores. El incremento excesivo en las corrientes de Ca⁺⁺, la acumulación de agregados proteicos o un estado continuo de estrés oxidativo pueden promover la activación de la autofagia (Parzych y Klionsky, 2014).

Debido a lo anterior muchos estudios han propuesto a la autofagia como un proceso protector en el desarrollo de ciertas patologías, dado que su promoción se encuentra correlacionada inversamente con los efectos adversos de tales condiciones (Mizushima y Komatsu, 2011). Sin embargo, un exceso en la autofagia también está relacionado con algunas enfermedades. La acumulación descontrolada de autofagosomas tiene efectos deletéreos en la célula conocidos como muerte celular tipo II o muerte celular por autofagia (Liu y Levine, 2015).

2.3.1 *La autofagia y el estrés oxidativo*

En diversos tipos celulares se ha probado que el estrés oxidativo causa una acumulación de autofagosomas, por lo que existe una relación entre un exceso en las ROS y la autofagia. De hecho, tales componentes se encuentran involucrados en el progreso de enfermedades cardiovasculares, el cáncer, la diabetes, la isquemia y las patologías neurodegenerativas (Navarro-Yepes y col., 2014). A pesar de lo anterior, aún no se conoce con detalle cuáles son los mecanismos moleculares por los cuales el estrés oxidativo activa a la autofagia y sólo

se han propuesto algunas posibles vías indirectas de regulación.

A la mitocondria, conocida como el principal organelo productor de ROS y también el primero en resultar dañado, se le considera la fuente inicial para la inducción de la autofagia. Sin embargo, su degradación se llevaría a cabo sólo en situaciones extremas donde fuera muy necesario eliminar la fuente de ROS. En efecto, a este tipo de degradación se le conoce como mitofagia, y es un proceso altamente regulado en la célula (Lee, Giordano y Zhang, 2012). Cuando existe un daño en la mitocondria por estrés oxidativo los niveles disponibles de ATP bajan, lo que da lugar a la activación de la AMPK que a su vez puede inhibir mTOR o activar directamente a la autofagia. La AMPK también puede interactuar con el H₂O₂, resultando en su activación y promoción de la autofagia (Sureshbabu, Ryter y Choi, 2015). Uno de los pocos mecanismos que han ligado directamente a la autofagia con las ROS es el de la proteína ATG4, la cual se activa por una reacción de oxido-reducción, participando así en la conversión de la LC3I a LC3II, cumpliendo un papel esencial en la maduración del autofagosoma (Navarro-Yepes y col., 2014). Un aumento en las ROS también tiene efectos sobre factores de transcripción, siendo uno de los más reconocidos el factor nuclear tipo eritroide 2 (Nrf2) que promueve la expresión de proteínas antioxidantes. El Nrf2 también se ha visto relacionado con la activación de la proteína p62 que es esencial en reconocimiento y transporte de la carga a degradar (Lee, Giordano y Zhang, 2012). Además, la peroxidación lipídica que es otro efecto de las ROS promueve la acumulación de LC3II (Filomeni, De Zio y Cecconi, 2015).

Dada la estrecha relación de la autofagia con el estrés oxidativo, se le ha descrito como un fenómeno que puede promover tanto la supervivencia como la muerte de la célula, esto dependiendo de la severidad del estrés oxidativo y de la condición específica.

2.3.2 *La autofagia en el SNC*

De manera particular, la autofagia en las neuronas tiene gran relevancia para su supervivencia. Estas células son post-mitóticas y tienen un tiempo de vida muy largo, por lo que es necesaria la existencia de mecanismos de degradación para las moléculas dañadas con el paso del tiempo. De hecho, la autofagia es vital en la degradación de agregados proteicos en las neuronas, estando relacionada su desregulación con enfermedades como el Alzheimer o el Parkinson (Li y Le, 2017). También tiene un importante papel en la regulación del crecimiento axónico, el tamaño de la sinapsis y en la liberación de neurotransmisores (Damme y col., 2015; Shen y col., 2015).

La importancia de la autofagia en la función neuronal se ha probado ampliamente a tra-

vés de su inhibición tanto farmacológica como en deleciones genéticas de sus principales proteínas reguladoras (ATG5, ATG7 o FIP200/RB1CC1), las cuales generan cuadros patológicos de neurodegeneración, deficiencias cognitivas y daño motor (Tan y col., 2014). En efecto, el mal funcionamiento de la autofagia y de su regulación promueve el progreso de enfermedades como las ya mencionadas Alzheimer y Parkinson, pero también de otras como el Huntington, la esclerosis lateral amiotrófica, el infarto cerebral y los fenómenos de hipoxia-isquemia (Son y col., 2012).

Es por ello que en múltiples estudios se ha considerado a la autofagia como un factor protector contra el daño oxidativo y la progresión de neuropatologías, sin embargo, su papel aún no es preciso debido a que dependiendo del tipo y del grado de avance de la enfermedad, la autofagia evita o promueve la muerte celular (Wolf y col., 2019). En relación a esto, estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que en condiciones de excitotoxicidad, hipoxia e isquemia, la inducción prolongada de autofagia excede la respuesta adaptativa celular activando vías de apoptosis y necrosis (Wang y col., 2018). En cultivos de neuronas corticales de ratas neonatas sometidos a condiciones de hipoxia y excitotoxicidad por ácido kaínico (KA), se encontró que dicho estrés causaba un aumento en la cantidad de autofagosomas y una consecuente muerte celular, hecho que fue revertido al inhibir de manera farmacológica la autofagia (Ginet y col., 2014). También en astrocitos se ha reportado que la inhibición de tal mecanismo reduce la muerte celular de astrocitos en un modelo de isquemia (Zhou y col., 2017). Recientemente Sun y col., 2018 encontraron que la muerte celular causada por la autofagia durante un proceso isquémico se veía contrarrestada al administrar una dosis del Factor de Crecimiento de Fibroblastos b (bFGF). De hecho, en otros estudios ya se ha visto una regulación de la autofagia por parte de otras hormonas y factores como la insulina, el IGF-1, la grelina y la melatonina (Lim, Cho y Kim, 2016).

Entre los diversos factores y hormonas capaces de regular algunos mecanismos de supervivencia y muerte celular en el cerebro, encontramos a la PRL. La cual es un potencial agente neuroprotector ante situaciones de daño celular.

2.4 LA PROLACTINA

La PRL es una hormona polipeptídica de 23 kDa formada por una sola cadena de 199 aminoácidos con tres puentes disulfuro intramoleculares (Ignakak y col., 2012). Es sintetizada y secretada principalmente por los lactotrofos de la adenohipófisis, sin embargo, también puede producirse en tejidos y células extra-hipofisarios como son el hipotálamo, la placenta, la decidua, el útero, las células epiteliales de la glándula mamaria, los linfocitos, entre

otros (Freeman y col., 2000). Fue identificada originalmente debido a que interviene en el desarrollo de las glándulas mamarias y promueve la lactogénesis (revisado en Pereira-Suarez y col., 2015), siendo el mayor factor estimulante para la lactancia (Ignakak y col., 2012). Además de sus acciones clásicas, la PRL afecta a un amplio espectro de funciones responsables de la homeostasis del organismo, conociéndose hasta ahora alrededor de 300 acciones diferentes (Freeman y col., 2000). Dicha hormona es capaz de modular la función de una gran variedad de tipos celulares, ejerciendo acciones sobre la reproducción, la osmoregulación, el metabolismo y la regulación tanto del sistema inmune como del sistema nervioso (Torner, 2016).

2.4.1 *El receptor de la PRL*

La PRL es actúa de manera autócrina, parácrina y endócrina, siendo responsable de una amplia variedad de acciones en los vertebrados, donde se incluyen peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos (Brooks, 2012). Dichas acciones son mediadas de manera específica por la activación de su receptor. El receptor de la PRL (RPRL) es una proteína transmembranal perteneciente a la superfamilia de receptores de citocina clase I, contiene tres dominios principales; el dominio extracelular, el trasmembranal y el intracelular (Freeman y col., 2000). Como resultado de modificaciones post-traduccionales, se han identificado diferentes isoformas del RPRL que difieren principalmente en la longitud y composición de su dominio intracelular, siendo denominados como RPRL largo, medio y corto (Bole-Feysot y col., 1998).

La activación del RPRL involucra la formación de un complejo triple. Cada molécula de PRL contiene dos sitios de unión a su receptor (sitio 1 y 2). La unión de la PRL al sitio 1 es indispensable para la unión al sitio 2 en un segundo receptor, formando así el complejo trimérico (2 receptores, 1 hormona). Tal unión provoca una dimerización del receptor. El dominio extracelular transmite cambios estructurales al dominio intracelular promoviendo la fosforilación de la tirosina cinasa Janus 2 (Jak2). Las cinasas Jak2 se transfosforilan entre ellas y también se encuentran involucradas en la fosforilación de residuos de tirosina del RPRL (Bole-Feysot y col., 1998; Freeman y col., 2000; Brooks, 2012). La fosforilación del RPRL permite la unión de la proteína transductora de señal y activadora de la transcripción (STAT). Las proteínas STAT (STAT₁, STAT₂ y STAT₅) son las principales reguladoras en la transducción de las señales de los receptores de citosina, que al fosforilarse forman dímeros que pueden ser translocados al núcleo celular donde regulan la expresión de numerosos genes (Ignakak y col., 2012). Otra vía de señalización involucrada con la activación del

RPRL es la vía de las cinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAPK). Los residuos de tirosina fosforilados del RPRL sirven como sitios de anclaje de proteínas adaptadoras (Shc/Grb2/SOS) que conectan al receptor con la cascada de las Ras/Raf/MAPK (Freeman y col., 2000).

2.4.2 *La PRL en el SNC*

La PRL posee un potente efecto modulador en diversas regiones del cerebro sobre las que actúa como neuropéptido y hormona neuroendócrina (Grattan y Kokay, 2008). Algunas áreas del SNC como el hipotálamo, la amígdala, el núcleo septal lateral y los plexos coroideos presentan una alta inmunoreactividad a la PRL y a su receptor (Brown y col., 2010), lo que sugiere la interacción y presencia de esta hormona en la regulación de la función neuronal. En el SNC, la síntesis de la PRL ha sido confirmada en el hipotálamo mediante el análisis con PCR en tiempo real e hibridación in situ (Torner y col., 2004). Sin embargo, la producción de novo de PRL en otras partes del cerebro ha sido ampliamente debatida, ya que muchos autores consideran que la PRL llega al cerebro, y en particular al líquido cefalorraquídeo, a través de los plexos coroideos, atravesando la barrera hemato-líquido cefalorraquídeo y esparciéndose por el encéfalo (Carlo y col., 1992). Sin embargo, recientemente se reportó que la PRL no solo ingresa al cerebro a través de dicha vía, por lo que su entrada también ocurriría a través de la barrera hemato-encefálica por una molécula transportadora aún desconocida (Brown y col., 2016). A pesar de estos hallazgos, la expresión de su ARN mensajero ha sido reportada en el bulbo olfatorio, la amígdala, el núcleo paraventricular, el septum lateral, el cerebelo y el hipocampo (Chaiseha y col., 2011; Jakob y col., 2014; Roselli y col., 2008).

2.4.3 *Acciones de la PRL en el SNC*

La PRL participa en la regulación del comportamiento parental y las respuestas a estresores. Su expresión es regulada por estímulos que generan estrés (Torner y Neumann, 2000), contribuyendo al control de estos procesos a través de la inhibición del eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal. La hiperprolactinemia inducida experimentalmente causa efectos anti-depresivos en animales sometidos a nado forzado (Torner y Neumann, 2000) e incluso dicho estrés puede causar la expresión de la isoforma larga del receptor de PRL en las células de los plexos coroideos. La PRL también es capaz de inducir la neurogénesis en es-

estructuras como la zona subventricular (SVZ) del giro dentado del hipocampo y en el bulbo olfatorio, donde ha sido encontrado el RPRL (Torner, 2016). Sus acciones se han relacionado con un incremento en la neurogénesis, estando involucrada en procesos de memoria y aprendizaje así como en comportamiento materno (Larsen y Grattan, 2012; Walker y col., 2012). Ha sido identificada como un regulador de la proliferación de las células neurales (Torner y col., 2009) ayudando a la regeneración y migración de células madre que dan origen a neuronas, oligodendrocitos y astrocitos (Pathipati y col., 2011). La PRL también estimula la síntesis de proteínas del citoesqueleto como la nestina y la proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP2), por lo que podría contribuir a la diferenciación celular (Havránek y col., 2014).

Todas estas acciones ubican a la PRL como un importante factor regulador en la fisiología del cerebro, por lo que es importante investigar su papel en las diversas células que componen este tejido.

2.4.4 *Efecto neuroprotector de la PRL*

Se ha encontrado que la PRL es capaz de proteger a las células de daños citotóxicos. En un modelo in vivo de ratones sometidos a estrés crónico, la inyección subcutánea de PRL aumentó la supervivencia neuronal en el hipocampo, teniendo tal efecto a través de su receptor (Torner y col., 2009). En ratas lactantes (etapa en la cual la producción de la PRL es mayor), se encontró una reducción del daño por excitotoxicidad causado por la administración del agonista glutamatérgico ácido kaínico (KA), presentándose también una reducción en la cicatriz glial (Cabrera y col., 2013; Vanoye-Carlo y col., 2008). De manera particular, la administración intravenosa de PRL en ratas ovariectomizadas previno el daño provocado por KA en el hipocampo (Tejadilla, Cerbón y Morales, 2010), observándose que incluso cuando la administración de la PRL ocurrió después del insulto, el tejido dañado mostró una recuperación (Reyes-Mendoza y Morales, 2016). Utilizando un modelo in vitro con cultivos de neuronas hipocampales de rata, Vergara-Castañeda y col., 2016 encontraron que la PRL impedía el daño celular causado por un exceso de glutamato. También se observó la expresión del RPRL, por lo que las acciones encontradas podrían estar mediadas a través de dicho receptor. En este mismo modelo, recientemente se encontró que la PRL ejerce su mecanismo neuroprotector contra la excitotoxicidad por glutamato a través de la reducción en las concentraciones de calcio, inhibiendo la activación de la caspasa 3 y también promoviendo la expresión de la vía anti-apoptótica mediada por Bcl-2 y Bax, esto probablemente por la translocación al núcleo del factor de transcripción NF- κ B (Rivero-Segura y col., 2017).

El efecto neuroprotector de la PRL también ha sido estudiado ante un daño por estrés oxidativo. En la retina la PRL contribuye al mantenimiento de la homeostasis, regulando la gliosis y la degeneración retiniana (Arnold y col., 2014). En líneas celulares del epitelio pigmentario retiniano fue capaz de contrarrestar los efectos pro-apoptóticos de un tratamiento con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Meléndez García y col., 2016). Con relación a esto, Thébault, 2017 propuso que el posible mecanismo por el cual la PRL ejerce sus efectos antioxidantes, es por la activación del glutatión causando su reducción por la coenzima NADPH y también contribuyendo a la activación de enzimas para la síntesis de novo. Esto probablemente a través de vías como la Jak2/STAT3 y PI3K/Akt. Además de estos efectos en la retina, estudios no publicados de nuestro laboratorio indican que la PRL tiene un efecto protector ante un daño por estrés oxidativo en astrocitos corticales de rata, en los que se observa un incremento en la expresión de enzimas antioxidantes en respuesta a dicha hormona (Ulloa, 2018).

2.4.5 *La PRL y la muerte celular*

Diversos trabajos han reportado el papel protector de la PRL sobre la apoptosis. Buckley y col., 1996 reportaron que la incubación con PRL ovina en células de linfoma Nb2 induce la sobre expresión de Bcl-2 tanto del ARNm como de la proteína, e inhibe la expresión de Bax. En este mismo modelo, se observó que la PRL inhibe la promoción de la apoptosis inducida por un insulto con glucocorticoides, esto relacionado con una sobre-expresión de los factores anti-apoptóticos Pim-1 y Bcl-2 (Krumenacker y col., 1998). Siguiendo esta línea de investigación, Weimann y col., 1999 encontraron que la PRL evita la apoptosis en las células Nb2 al bloquear el daño en el potencial de membrana de la mitocondria y la consecuente degradación del ADN. Por su parte Buckley y col., 2003 encontraron en ratones tratados con glucocorticoides, que niveles elevados de PRL bloquean la actividad de la caspasa 3 y la fragmentación del ADN en timocitos, esto relacionado con una sobre expresión de XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis), un supresor de la apoptosis.

En otros tipos celulares como los espermatozoides humanos, la incubación por 48 h con PRL indujo su supervivencia a través de la vía de PI3K/Akt, al reducir la actividad de la caspasa 3 y la degradación del ADN (Curry, Pujianto y Aitken, 2010). De la misma forma, la PRL inhibe la apoptosis en un modelo de artritis in vivo y en condrocitos tratados con citocinas pro-inflamatorias, al reducir la expresión de p53 y previniendo la activación de la caspasa 3, así como reduciendo la expresión de Bax y aumentando la de Bcl-2. Estas acciones son probablemente reguladas por la vía de Jak/STAT3, dado que al inhibirla se pierden los

efectos de protección (Adán y col., 2013). En concordancia con estos hallazgos, en cultivos primarios de células de la decidua, la PRL también ejerce un efecto anti-apoptótico al inhibir tanto la expresión como la actividad de la caspasa 3 a través de la activación de la vía PI3K/Akt (Prigent-Tessier y col., 2001). Por otro lado, en otros estudios se encontró que la PRL incrementa la expresión relativa de Bcl-xL e inhibe la expresión de Bad en células WEHI-231, una línea celular de células B de la médula ósea (Flores-Fernández y col., 2016). Estos autores argumentan que estos efectos son probablemente mediados a través de la vía de STAT5b.

Además de su papel en la supresión de la apoptosis, la PRL también ha sido relacionada con la autofagia; en células cancerosas de ovario fue encontrada una correlación inversa entre los niveles tumorales de PRL/PRLR y de factores autofágicos. Más aún, la administración de un antagonista de la PRL (G129R) promovió la expresión de proteínas y factores relacionados con la formación de autofagosomas, causando en este modelo la muerte celular por autofagia (Wen y col., 2014). De la misma forma, un estudio realizado por Geng y col., 2017 demostró que la administración de bromocriptina (un agonista del receptor de dopamina D2 el cual inhibe la secreción de PRL) induce la muerte celular por autofagia en adenomas hipofisarios. Estos estudios colocan a la PRL como un factor regulador de la autofagia, sin embargo aún se desconocen las vías de señalización a través de las cuales esta hormona estaría actuando.

3 JUSTIFICACIÓN

La alta presencia de las ROS generan un estrés oxidativo en múltiples enfermedades neurodegenerativas, las cuales tienen efectos deletéreos sobre las células del cerebro y principalmente sobre las neuronas. Dadas las acciones neuroprotectoras de la PRL reportadas, es importante investigar mecanismos de agentes terapéuticos como la PRL que puedan resultar de utilidad para contrarrestar dicho daño.

4 HIPÓTESIS

La PRL protege a las neuronas hipocampales del daño inducido por el estrés oxidativo, a través de la modulación de la apoptosis y la autofagia.

5 OBJETIVOS

5.1 GENERAL

Investigar el efecto protector de la PRL debido a la modulación de la apoptosis y la autofagia en neuronas hipocampales sometidas a un daño por estrés oxidativo.

5.2 ESPECÍFICOS

- Estandarizar el cultivo primario de neuronas hipocampales de embriones de 16 días de ratón CD-1, caracterizando la pureza y el grado de madurez del cultivo mediante la determinación de la expresión de proteínas neuronales específicas y de proteínas sinápticas.
- Elucidar el efecto neuroprotector de la PRL en cultivos primarios de neuronas hipocampales ante un daño por estrés oxidativo.
- Analizar la posible correlación entre el efecto neuroprotector de la PRL y la modulación de los patrones de expresión de las proteínas reguladoras de la autofagia, de marcadores pro y anti apoptóticos y de enzimas antioxidantes.

6 MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 ANIMALES

Ratonas albinas CD-1 de 16 días de gestación (E16), fueron obtenidas del bioterio del Instituto de Neurobiología de la UNAM campus Juriquilla, Querétaro. Fueron sacrificadas por asfixia con CO₂ y mediante cesárea se obtuvieron los fetos. Todos los protocolos experimentales con animales fueron aprobados por el Comité de Ética en Investigación del Instituto de Neurobiología (Protocolo No. 68, NOM-062-ZOO-1999).

6.2 CULTIVOS CELULARES

Para la obtención de los cultivos primarios de neuronas, se emplearon hipocampos de ratones CD-1 de 16 días de gestación (entre 8 a 15 crías por cultivo). Los hipocampos fueron disecados y posteriormente incubados por 20 minutos a 37°C con tripsina 0.25% (Gibco; 27250-018) en una solución de disección (Hank's Balanced Salt Solution (HBSS; 14175-095, GIBCO), piruvato de sodio 100mM, glucosa 0.1%, HEPES 1M). Después se procedió a la incubación a temperatura ambiente con DNasa 0.02%. Los hipocampos fueron lavados y disociados mecánicamente con una pipeta Pasteur en medio de sembrado (Basal Medium E (BME, GIBCO), Suero Fetal Bovino 10% (FBS; GIBCO), glucosa 0.45%, piruvato de sodio 100 mM, glutamina 200 mM y penicilina/estreptomicina 1%). Se realizó un conteo total de células y estas fueron sembradas en placas previamente recubiertas con Poli-L-Lisina. Cuatro horas después del sembrado se realizó un cambio total del medio a medio de mantenimiento (Neurobasal, B-27 1x, glutamina 200mM y penicilina/estreptomicina 1%), y la mitad del medio fue remplazado cada cuatro días. Con el objetivo de eliminar del cultivo otros tipos celulares como la glía, se administró el antimitótico β -Citocina D-Arabinofuranosido (AraC; C1768-1G, SIGMA) 2 μ M al día in vitro (DIV) 1 y en cada cambio de medio.

6.3 TRATAMIENTOS A LOS CULTIVOS NEURONALES

Para establecer el modelo de estrés oxidativo las neuronas hipocampales fueron sembradas en placas de 96 pozos a una densidad de 125,000 células/cm². Se administraron dosis crecientes de H₂O₂ (Sigma, 00802MH) 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200 y 225 μM o CoCl₂ (Sigma, C-2644) 100, 200, 300, 400, 500 y 600 μM con el fin de establecer la concentración letal media (IC₅₀), es decir, la dosis con la que la mitad de la población neuronal muere. Para esto, se evaluó la viabilidad celular por el ensayo de la reducción metabólica a cristales de formazán del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT, Sigma). Una vez obtenida la DL₅₀ del H₂O₂ o CoCl₂, con el objetivo de observar el efecto protector de la PRL, se realizaron tratamientos con PRL ovina (oPRL, Sigma) a concentraciones crecientes (1, 10, 50 y 100 nM) 24 h antes del insulto con los estresores y se mantuvo hasta el final del experimento. 24 h después del daño se evaluó la viabilidad celular por el ensayo de la reducción metabólica del MTT. Para el análisis de los cambios en la expresión de genes en las neuronas, estas fueron sembradas en placas de cultivo de 6 pozos a una densidad de 125,000 células/cm². Al DIV9 se realizó un tratamiento con oPRL 100 nM, 24 h después fue adicionado el H₂O₂ 100 μM. Las células fueron cosechadas 24 h después del insulto, en solución RLT (Qiagen) más β-Mercapto-Etanol (10 μL/mL).

6.4 ENSAYO DE MTT

Con el objetivo de evaluar la viabilidad celular de los cultivos de neuronas, fue realizado el ensayo de MTT. Este ensayo indica la viabilidad metabólica de las células, debido a la reducción metabólica mediada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa del MTT a cristales de formazán, los cuales poseen una coloración azul-morado por lo que la cantidad de células metabólicamente activas es proporcional a la cantidad de formazan producido (Denizot y Lang, 1986; Mosmann, 1983). Al término de los tratamientos en los cultivos, se les adicionó 10 μL de la solución de MTT a una concentración de 5 mg/mL (M5655, Sigma, EUA) en PBS, dejando incubar por 3 h. Posteriormente se aspiró el medio y se añadieron 100 μL de disolvente (SDS 10% y HCl 0.01N). Las placas de cultivo fueron colocadas en agitación lenta durante toda la noche. 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.

6.5 MEDICIÓN DE ROS TOTALES

Para determinar que el insulto con H_2O_2 y $CoCl_2$ generan un incremento en la concentración de las ROS y de esta manera generar un estrés oxidativo en los cultivos neuronales, se midió la concentración de las ROS con el reactivo 2'-7'-Diclorodihidrofluorescein diacetato (DCFDA, Sigma, D6883). El DCFDA es un compuesto que es capaz de atravesar la membrana celular y en el interior de la célula sufre una desacetilación y puede reaccionar con agentes oxidantes dando origen a un compuesto fluorescente (Eruslanov y Kusmartsev, 2010), cuya concentración es directamente proporcional a la cantidad de ROS generadas en la célula. Los cultivos fueron incubados con DCFDA ($41.04 \mu M$) durante 20 minutos antes del tratamiento con H_2O_2 ($100 \mu M$) o $CoCl_2$ ($300 \mu M$). Se midió la fluorescencia durante 90 minutos en intervalos de 15 minutos (excitación: 504 nm; emisión: 529 nm).

6.6 INMUNOCITOQUÍMICA

Para eliminar la mayor cantidad de células contaminantes en el cultivo, se realizó un tratamiento continuo con el anti-mitótico AraC. Los cultivos fueron realizados en cubre-objetos de vidrio bajo las condiciones previamente establecidas para analizar la presencia de neuronas y astrocitos. Fueron realizados controles sin tratamiento, mientras que otros pozos fueron tratados con AraC $2 \mu M$. En el DIV₁₄ el cultivo fue detenido, se realizó una fijación con paraformaldehído al 4% (SIGMA, P6148) y la consecuente permeabilización se realizó con tritón X-100 (Bio-Rad, 161-0407) al 0.1% en PBS. Se realizó un bloqueo utilizando suero normal de cabra (NGS) 10% seguido de la incubación toda la noche a 4° C con el anticuerpo primario policlonal anti-GFAP (1:1000; EMD Milipore, AB5804) y el anticuerpo primario monoclonal anti- β -III-Tubulina (1:1000; Covance, cat. no. MMS-435, USA). Fueron utilizados el anticuerpo secundario policlonal anti-conejo fluorescente Alexa Fluor 555 (1:5000; cat. no. ab150078) y el anticuerpo secundario monoclonal anti-ratón Red Texas (1:5000 cat. no. A11001). Los cubre-objetos se montaron sobre porta-objetos en 10 μL de vectashield con 4, 6-diamino-2-fenilindol (DAPI; Vector Laboratories, 150078555) para el marcaje de los núcleos. Las imágenes fueron obtenidas utilizando el microscopio confocal LSM 780 (Zeiss) y analizadas con el programa ZEN (Carl Zeiss microimaging). Para el conteo celular se utilizó el programa Image J, identificando el número de núcleos positivos a GFAP o β -III-Tubulina.

6.7 DETECCIÓN DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN

Las neuronas hipocampales fueron sembradas en cubre-objetos de vidrio a una densidad de 125,000 células/cm². En el DIV₁₀ fueron tratadas o no, con H₂O₂ (100 μM) durante 4 o 24 horas. Al término de este periodo los cultivos fueron fijados con paraformaldehído 4% más glucosa 1%. La permeabilización se realizó con tritón X-100 (JT Baker, X198-07) al 1% con citrato de sodio (JT Baker, 3646-01) al 1% en PBS. La fragmentación del ADN como indicador de la muerte apoptótica fue detectada mediante la tinción de TUNEL utilizando el kit In Situ Cell Death Detection Kit (Roche Diagnostics) y siguiendo las indicaciones del fabricante. La señal de apoptosis fue visualizada utilizando el microscopio confocal LSM 780 (Zeiss) y digitalizada con el programa ZEN (Carl Zeiss microimaging).

6.8 EXTRACCIÓN DE ARN Y SÍNTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO

Los extractos de las neuronas hipocampales fueron almacenados en el buffer de lisis RLT (Qiagen) a -70° C hasta su uso. Se extrajo y cuantificó el ARN total utilizando el kit comercial RNeasy Mini (74106, Qiagen). 1 μg de ARN fue utilizado para la transcripción reversa utilizando la enzima transcriptasa reversa Superscript III RT (200 U/μL) incubando 10 minutos a 25° C, 2 horas a 37° C y 5 minutos a 85° C, 5 μL fueron usados para la amplificación del ADN complementario en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

6.9 PCR PUNTO FINAL Y TIEMPO REAL

Para la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa punto final se utilizó el kit Phire; 40 segundos a 98° C, 15 segundos a la temperatura de alineamiento de los iniciadores (Tabla 1), 140 segundos a 72° C. La detección de los productos de amplificación se realizó por electroforesis en gel de agarosa 1%. La PCR en tiempo real (qPCR); 15 segundos a 95° C, 30 segundos a la temperatura de alineamiento específica de los iniciadores y 30 segundos a 72° C, por 40 ciclos. Los productos de la qPCR fueron detectados y cuantificados utilizando el kit SYBR Green qPCR MasterMix (Thermo Scientific, Ko223) en un volumen final de 10 μL conteniendo 0.5 μM de cada iniciador (Tablas 1 y 2). La amplificación fue llevada a cabo en un termociclador PCR CFX96 (BioRad). Como control de carga se midió la expresión

del gen constitutivo hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (HPRT). Los datos fueron analizados con el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

6.10 ESTADÍSTICA

Todos los datos fueron analizados utilizando el paquete estadístico IBM SPSS Statistics 23.0.0.2. Se evaluó que los grupos cumplieran con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas, para realizar un análisis de varianza (ANOVA) de un factor y pruebas post-hoc de Tuckey HDS, en el caso contrario se utilizaron las pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis y la prueba de la U de Mann-Whitney. Las diferencias entre grupos se consideraron con una p menor o igual a 0.05.

Cuadro 1: Lista de iniciadores utilizados para la RT PCR de los cultivos de neuronas hipocampales. PB: Pares de bases del amplicón. F: secuencia sentido. R: secuencia anti-sentido. T: Temperatura de alineamiento.

TIPO	GEN	PROTEÍNA	SECUENCIA 5'-3'	T (°C)	PB
Prolactina	PRL	Prolactina	F:GTTTGACCGTGTGGTCATAC R:GGCTTGTTCTTGCTTC	59.8	143
Prolactina	PRLR	Receptor de prolactina	F:GGAAACATTCACCTGCTGGT R:TATGGAAGTGACTGCTTGCT	54.8	142
Fenotipo neuronal	TUBB3	β-III-Tubulina	F:GCTGGAGAGGATCAATGTCTAC R:AGTTGTCTGGCCGAAAGATC	55.4	118
Fenotipo neuronal	GFAP	Proteína gliofibrilar ácida	F:AGGCAGAAGCTCCAAGATGA R:GTTCTCGAACTTCCTCCTCA	55.4	158
Fenotipo neuronal	SYP	Sinaptofisina	F:CCTGTCCGATGTGAAGATGG R:AGGTTTCAGGAAGCCAAACAC	59.8	127
Fenotipo neuronal	SLC17A7	Transportador vesicular de glutamato 1 (vGlut1)	F:CAATGACCAAGCACAAGACG R:CGAAGCAAAGACCCCATAGAAG	59.8	79
Fenotipo neuronal	DLG4	Proteína de densidad postsináptica 95 (PSD95)	F:CAATGCCTACCTGAGTGACAG R:ATCTCATTGTCCAGGTGCTG	54.8	64
Apoptosis	BAX	Bax	F:AAGAAGCTGAGCGAGTGTCT R:AAGTAGAAGAGGGCAACCAC	57.5	159
Apoptosis	PMAIP1	NOXA	F:CAGGAAGATCGGAGACAAAGTG R:AGCACACTCGTCCTTCAAG	56.5	129
Apoptosis	BBC3	PUMA	F:TCTGTGAAGAGCATATGAGCC R:CAGATGAAGGTGAGGCAGG	57.5	129
Apoptosis	BAD	Bad	F:ACATTCATCAGCAGGGACG R:CTCGAAAAGGGCTAAGCTCC	54	122
Apoptosis	BCL2L11	Bim	F:GAGATACGGATTGCACAGGAG R:CGGAAGATAAAGCGTAACAGTTG	55	122
Apoptosis	BCL2	Bcl-2	F:CTGTGGATGACTGAGTACCT R:AGGTATGCACCCAGAGTGAT	58	165

Cuadro 2: Lista de iniciadores utilizados para la RT PCR de los cultivos de neuronas hipocampales. PB: Pares de bases del amplicón. F: secuencia sentido. R: secuencia anti-sentido. T: Temperatura de alineamiento.

TIPO	GEN	PROTEÍNA	SECUENCIA 5'-3'	T (°C)	PB
Autofagia	MAP1LC3Bc3		F:ATGAGCGAGTTGGTCAAGATC R:CGTCTTCATCCTTCTCCTGTTC	57.5	120
Autofagia	BECN1	Beclina 1	F:AACTGGACACGAGCTTCAAG R:CCTGGCGAGTTTCAATAAATGG	59	125
Autofagia	LAMP2	LAMP2	F:GGTATTCACCTGCAAGCTTTTG R:GGGTGTTGAAGTTGGAGTGAG	54	128
Autofagia	ATG12	ATG12	F:ACCATCCAAGGACTCATTGAC R:CCATCACTGCCAAAACACTC	61.3	122
Enzimas anti-oxidantes	SOD2	Superóxido dismutasa 2 (SOD2)	F:TGCTCTAATCAGGACCCATTG R:CATTCTCCCAGTTGATTACATTCC	57	124
Enzimas anti-oxidantes	GPX1	Glutación peroxidasa 1 (GPX1)	F:GTTTCCCGTGCAATCAGTTC R:AGCCTTCTCACCATTCACTTC	57.7	122
Enzimas anti-oxidantes	PRDX1	Peroxiredoxina 1 (PRDX1)	F:GGACCCATGAACATTCCCTT R:GATCGTTTATTGTTATCTGTCTGAAGG	57.7	122
Enzimas anti-oxidantes	PRDX6	Peroxiredoxina 6 (PRDX6)	F:CATCCTTTTGGGCATGTTGG R:TCAAAGTTCCTGCCCCGTG	59	121
Control de carga	HPRT	Hipoxantina-guanina fosforibosil-transferasa (HPRT)	F:TTGCTGACCTGCTGGATTAC R:GTTGAGAGATCATCTCCACC	60.2	128

7 RESULTADOS

7.1 CARACTERIZACIÓN DE LOS CULTIVOS PRIMARIOS DE NEURONAS HIPOCAMPALES

Con el objetivo de analizar la composición celular de los cultivos, se realizó una inmunocitoquímica durante el DIV₁₄ después de un tratamiento continuo con AraC (2 μ M), para la eliminación de las células proliferantes. Las células fueron marcadas contra β -III-Tubulina en rojo, como un marcador de neuronas; o contra la proteína gliofibrilar ácida (GFAP) en verde, como marcador de astrocitos. Se observó un claro efecto del AraC en el cultivo, al haber una menor presencia de células positivas a GFAP (Fig. 4A). De acuerdo con el conteo celular el tratamiento con AraC redujo la población de astrocitos de un 18.52% del número total de células en el cultivo, a sólo un 0.25% en el tratado con el anti-mitótico (Fig. 4B).

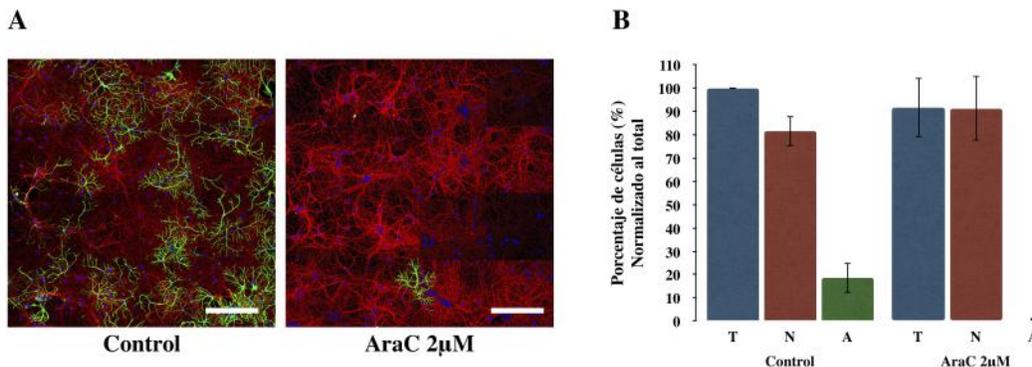


Figura 4: **Análisis de la pureza del cultivo de neuronas hipocampales.** (A) Inmunocitoquímica del cultivo de neuronas en el DIV₁₄, con o sin un tratamiento continuo de AraC 2 μ M; En rojo se observan células positivas a β -III-Tubulina y en verde células positivas a GFAP, los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). (B) Conteo de los núcleos correspondientes a neuronas (N) y astrocitos (A), se representa la proporción de núcleos positivos a β -III-Tubulina o GFAP respecto al número total de núcleos (T). Las imágenes mostradas son representativas. Imágenes tomadas en Z-stack 600 μ m (25x de aumento) en un microscopio confocal LSM 780 con el programa Aim Imagen Examiner. Barra de escala: 200 μ m. Conteo celular realizado con el programa ImageJ. DIV: Día in vitro.

Lo anterior confirma que se obtuvieron cultivos de neuronas hipocampales altamente enriquecidos. Fue realizado un análisis por RT qPCR de la expresión de la β -III-Tubulina durante el desarrollo del cultivo. Dicha expresión se mantuvo constante entre el DIV₄ y el DIV₁₀, presentando un aumento al DIV₁₂. Por otro lado, se corroboró lo ya observado en la inmunocitoquímica, dado que la expresión de la GFAP disminuyó significativamente a partir del DIV₁₀ (Fig. 5A).

Diversos estudios han referido el concepto de que un cultivo neuronal es maduro cuando las conexiones sinápticas se encuentran establecidas. Como un acercamiento para evaluar la madurez del cultivo de neuronas, si bien como una medida indirecta del establecimiento de estas conexiones, determinamos la expresión de marcadores neuronales y de sinapsis que indican la formación de redes dendríticas y axónicas, a lo largo de tres diferentes días de cultivo: en el DIV₄, el DIV₁₀ y el DIV₁₂. Para esto fueron realizadas RT qPCRs para analizar la expresión de sinaptofisina, vGlut₁ y PSD95 (Fig. 5).

La expresión de la sinaptofisina (SYP) aumentó significativamente del DIV₄ al DIV₁₀ (Fig. 5B). De la misma forma, el transportador vesicular de glutamato 1 (vGlut₁; SLC17A7) duplicó su expresión del DIV₄ al DIV₁₀ y casi tres veces más al DIV₁₂ (Fig. 5C). Esto sugiere que en este periodo (DIV₁₀-DIV₁₂) se alcanza el establecimiento de conexiones neuronales o sinapsis. Por el contrario, la proteína de densidad post-sináptica (PSD95) se mantuvo constante a lo largo de todos los días de cultivo evaluados (Fig. 5D).

7.2 EXPRESIÓN DEL ARNM DE LA PRL Y EL PRLR EN LOS CULTIVOS DE NEURONAS HIPOCAMPALES

Con el propósito de determinar la expresión del ARNm de la PRL y del PRLR, realizamos una RT PCR punto final de las neuronas hipocampales durante el DIV₁₀. No encontramos expresión del mensajero de la PRL, pero sí se observó la expresión de su receptor (Fig. 6A), por lo que estas células no estarían sintetizando PRL pero sí podrían ser sensibles a sus acciones vía su receptor. Por otro lado, evaluamos por RT qPCR la expresión del PRLR en tres diferentes días del cultivo (DIV₄, 10 y 12), observando una mayor expresión durante el DIV₁₀, seguida por una disminución dos días después (Fig. 6B) De acuerdo a estos resultados, se decidió utilizar los cultivos neuronales durante el DIV₁₀ para los subsecuentes experimentos.

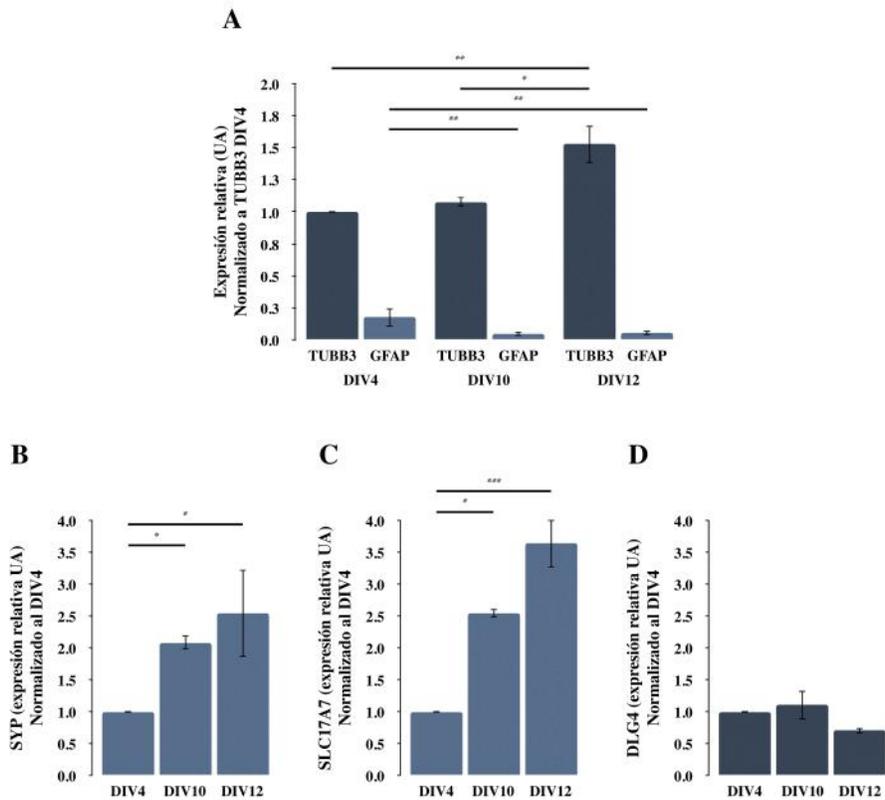


Figura 5: **Expresión de genes de marcadores neuronales y de sinapsis en el desarrollo del cultivo de neuronas hipocampales.** (A) Expresión relativa en el DIV₄, DIV₁₀ y DIV₁₂ del ARNm β -III-Tubulina (TUBB₃) y GFAP en el cultivo de neuronas, datos normalizados respecto a los valores de β -III-Tubulina en el DIV₄ (n=4). (B, C, D) Expresión relativa en el DIV₄, DIV₁₀ y DIV₁₂ de los marcadores sinápticos: sinaptofisina (SYP), vGlut₁ (SLC_{17A7}) y PSD₉₅ (DLG₄), datos normalizados respecto al DIV₄ (n=3). DIV: Día in vitro. ARNm: ARN mensajero. Datos analizados con ANOVA de un factor seguidos de una prueba post-hoc de Tukey * p < 0.05 ** p < 0.01 *** p < 0.001.

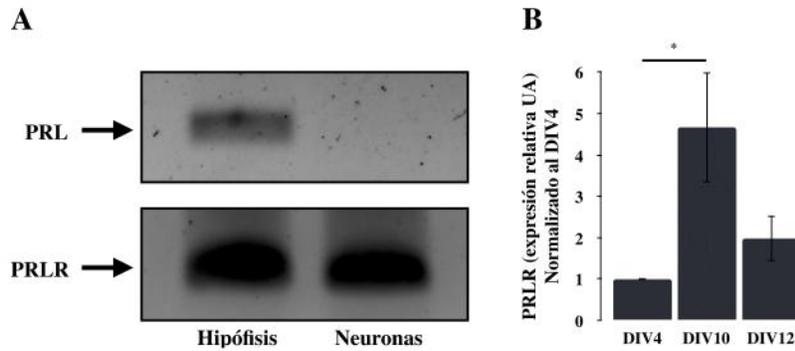


Figura 6: **Expresión del gen del PRLR en el desarrollo del cultivo de neuronas hipocampales.** (A) Expresión del ARNm de la PRL y de su receptor (PRLR) en el cultivo de neuronas hipocampales en el DIV₁₀. Amplificación del transcrito por RT PCR punto final. Como control positivo fue utilizado ARNm de hipófisis de ratón hembra. (B) Expresión relativa del PRLR en el DIV₄, DIV₁₀ y DIV₁₂ del cultivo neuronal, datos normalizados respecto al DIV₄, obtenidos por RT qPCR. n=3. DIV: Día in vitro. ARNm: ARN mensajero. Las barras representan la media +/- el EEM. Datos analizados con ANOVA de un factor seguidos de una prueba post-hoc de Tukey * p <0.05.

7.3 EFECTO DEL H₂O₂ EN LOS CULTIVOS DE NEURONAS HIPOCAMPALES

Con el objetivo de inducir un estado de estrés oxidativo en los cultivos de neuronas, las células fueron tratadas con H₂O₂ en el DIV₁₀. Para establecer la concentración letal media (IC₅₀) las neuronas fueron tratadas con dosis crecientes de H₂O₂ (de 25 a 225 μM) y 24 horas después se analizó la viabilidad celular con el ensayo de MTT. El H₂O₂ a una concentración de 100 μM resultó ser efectivo para matar aproximadamente a la mitad de la población del cultivo (Fig. 7A), por lo que esta dosis fue utilizada en los subsecuentes experimentos. Adicionalmente, esta concentración de H₂O₂ indujo un aumento significativo en la producción de ROS a lo largo del tiempo (Fig. 7B), medida por la oxidación del reactivo DCFDA. Estos resultados confirman que el tratamiento con H₂O₂ ocasiona un estado de estrés oxidativo en los cultivos neuronales.

Dado que estudios previos han mostrado que un insulto pro-oxidante con H₂O₂ promueve la muerte por apoptosis en las neuronas, precedimos a determinar el efecto del H₂O₂ en la fragmentación del ADN como indicador de la muerte apoptótica. El tratamiento con H₂O₂ (100 μM) durante 4 y 24 horas provocó un aumento en la fragmentación del ADN revelado por un número mayor de nucleosomas positivos para la tinción de TUNEL (Fig. 7C). Con estos resultados confirmamos que bajo nuestras condiciones experimentales el H₂O₂ (100 μM) induce la apoptosis de los cultivos neuronales.

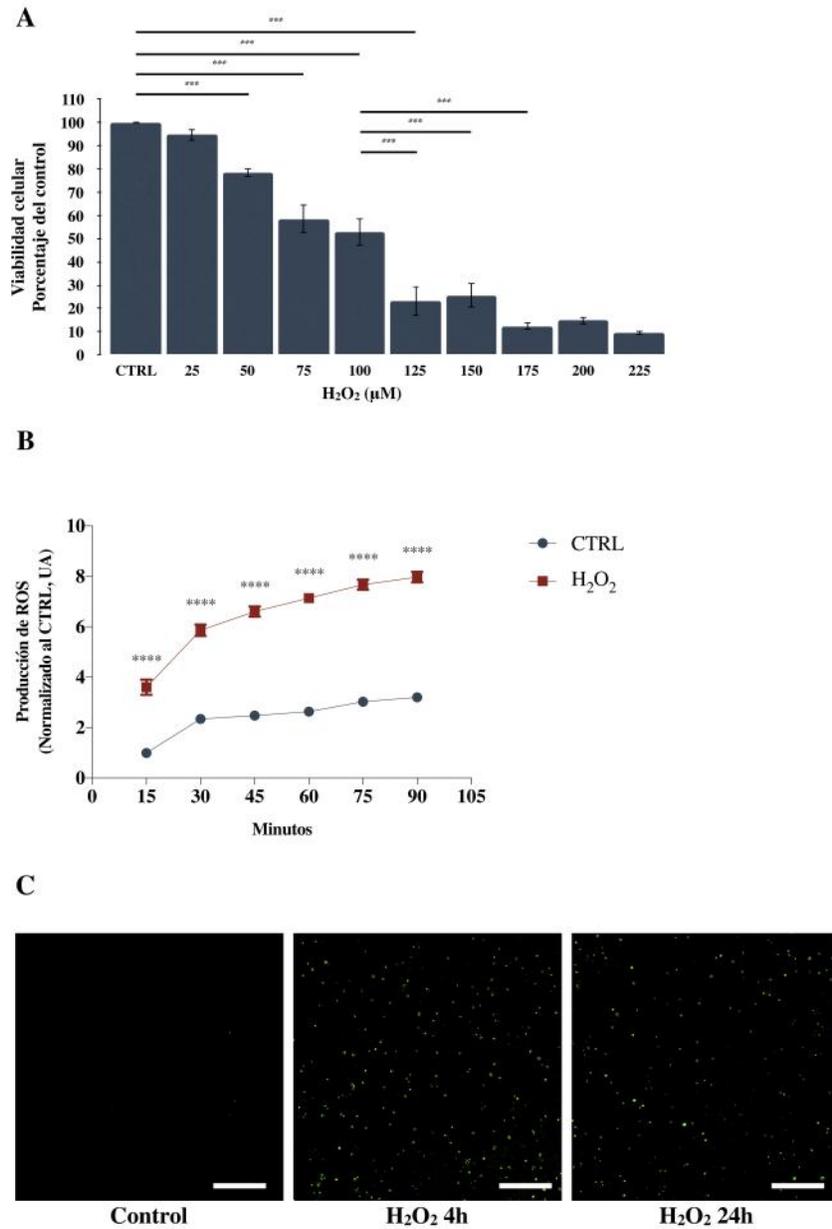


Figura 7: **Efecto del H₂O₂ sobre los cultivos de neuronas hipocámpales.** (A) Viabilidad celular del cultivo de neuronas tratadas con dosis crecientes (25 a 225 μM) de H₂O₂ por 24 horas, medida por el ensayo de MTT. Datos presentados como porcentaje del CTRL. (B) Curso temporal de la generación de ROS totales en neuronas tratadas con H₂O₂(100 μM), medida por la oxidación del reactivo DCFHDA. Datos normalizados respecto al control (0 μM H₂O₂, 15 minutos). n=3. (C) Fragmentación del ADN nuclear en cultivos neuronales tratados con H₂O₂ (100 μM) durante 4 o 24 horas, detectada por el ensayo de TUNEL. CTRL: control. H₂O₂: Peróxido de hidrógeno. Las barras representan la media +/- el EEM. Datos analizados con ANOVA de un factor seguidos de una prueba post-hoc de Tukey * p <0.05 ** p <0.01 *** p <0.001 **** p <0.0001, se indican las diferencias entre tratamientos. Barra de escala: 200 μm.

7.4 EFECTO DE LA PRL EN NEURONAS HIPOCAMPALES BAJO ESTRÉS OXIDATIVO

Para probar el efecto protector de la PRL los cultivos fueron tratados con dosis crecientes de esta hormona (1 a 100 nM) 24 horas antes del insulto con el H₂O₂ (100 μM) hasta el final del experimento. La viabilidad celular fue analizada por el ensayo de MTT. La disminución en la actividad metabólica inducida por el H₂O₂ fue revertida parcial o totalmente con la PRL: desde el tratamiento con 10 nM de PRL hay una protección, aunque no total, contra el daño inducido por el H₂O₂. La dosis de 100 nM de PRL resultó ser la que protege completamente la viabilidad de las neuronas ante el daño oxidante (Fig. 8A) y ejerce un efecto antioxidante (Fig. 8B). La producción de ROS se midió por la oxidación del DCFDA en cultivos tratados con PRL (100 nM) y/o H₂O₂(100 μM). La PRL disminuyó significativamente la generación de las ROS inducida por el tratamiento con H₂O₂ durante 60 minutos. Por otra parte, la PRL por si misma, indujo una disminución en la producción de ROS (Fig. 8B). Estos resultados indican que la protección de la viabilidad celular de las neuronas puede deberse en parte al efecto antioxidante de la PRL.

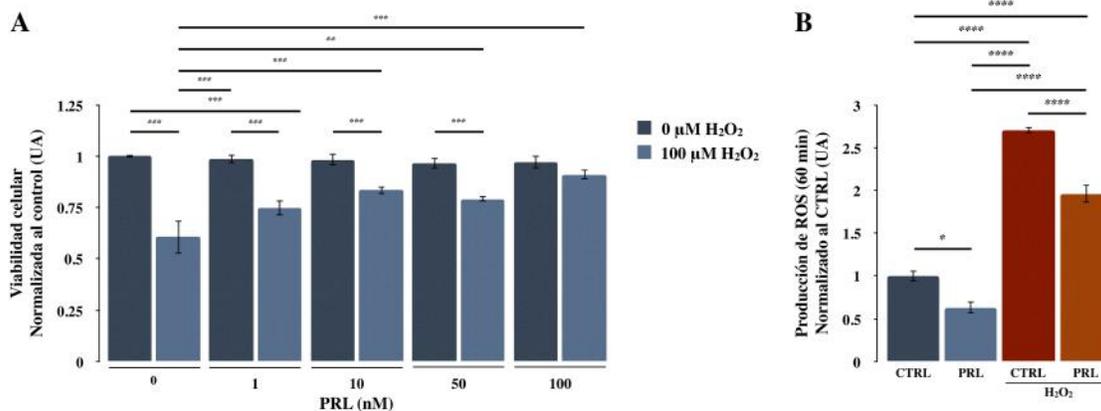


Figura 8: **La PRL protege a las neuronas hipocampales contra un daño por estrés oxidativo.** (A) Viabilidad celular de neuronas pre-tratadas con dosis crecientes de PRL (1 a 100 nM) por 24 horas y con H₂O₂ (100 μM) por 24 horas, medidas por el ensayo de MTT. Datos normalizados respecto al control (0 nM PRL, 0 μM H₂O₂). (B) Producción de ROS totales en neuronas pre-tratadas con PRL (100 nM) por 24 horas y/o con H₂O₂ (100 μM) durante 60 minutos. n=4. CTRL: control. H₂O₂: Peróxido de hidrógeno. Las barras representan la media +/- el EEM. Datos analizados con ANOVA de uno o dos factores, según fuera el caso, seguidos de una prueba post-hoc de Tukey * p <0.05 ** p <0.01 *** p <0.001 **** p <0.0001.

7.5 EFECTO DEL CoCl_2 EN LOS CULTIVOS DE NEURONAS HIPOCAMPALES

Se decidió utilizar al cloruro de cobalto (CoCl_2) como otro agente inductor de daño en las neuronas. El CoCl_2 es un compuesto inorgánico que genera en las células una "hipoxia química", debido a que inactiva las principales enzimas que censan la concentración de O_2 . En consecuencia, activa al factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1) que es el principal elemento de respuesta a la hipoxia (Caltana y col., 2009). El CoCl_2 es capaz de inducir un daño en la mitocondria y exacerba la producción de ROS, lo que genera un estado de estrés oxidativo en las células (Zou y col., 2001). Siguiendo el mismo protocolo utilizado con el H_2O_2 , fue obtenida la IC_{50} ; resultando en una dosis de 300 μM la cual reduce la viabilidad alrededor de un 50% (Fig. 9A). Al analizar la producción de ROS confirmamos que el CoCl_2 también induce un aumento significativo en tales moléculas (Fig. 9B). Por lo que este compuesto induce un estado de estrés oxidativo en las neuronas. El CoCl_2 indujo hasta 10 veces más ROS en comparación al H_2O_2 , por lo que el daño que es capaz de producir en las neuronas es potencialmente mayor al que induce el H_2O_2 .

7.6 EFECTO DE LA PRL EN NEURONAS HIPOCAMPALES BAJO UN DAÑO POR HIPOXIA QUÍMICA

Con el objetivo de analizar si la PRL también protege a las neuronas del efecto del CoCl_2 , se realizaron tratamientos a dosis crecientes (de 1 a 100 nM) de PRL 24 horas antes del insulto y se analizó la viabilidad celular por el ensayo de MTT. Contrario a lo observado con el H_2O_2 , la PRL resultó incapaz de prevenir el daño inducido por el CoCl_2 en las neuronas (Fig. 10A). De la misma forma, la PRL tampoco redujo la producción de ROS en los cultivos tratados con CoCl_2 durante 60 minutos (Fig. 10B). El hecho de que la PRL no sea un factor protector ante un estado de hipoxia química, sugiere que no puede prevenir la muerte celular ante ambientes altamente oxidantes. Además de que pudieran existir diferencias importantes entre los mecanismos de muerte celular inducidos por el H_2O_2 y el CoCl_2 y la capacidad de la PRL de interferir en estos.

La PRL solo resultó ser un agente protector ante un daño con H_2O_2 . Por ello se decidió investigar los cambios en la expresión de genes que esta hormona pudiera inducir sobre las neuronas, al retarlas únicamente con el mencionado compuesto.

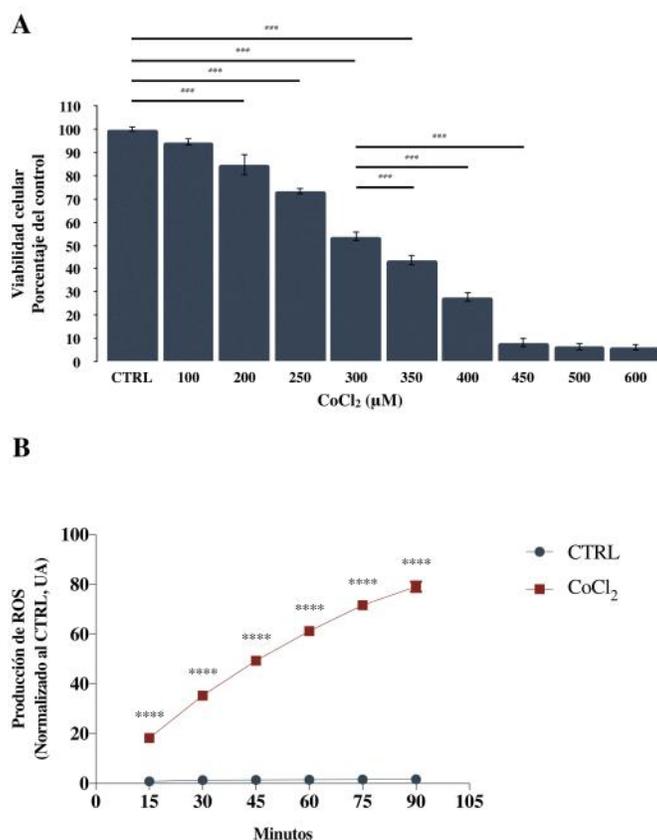


Figura 9: **Efecto del CoCl₂ sobre los cultivos de neuronas hipocámpales.** (A) Viabilidad celular del cultivo de neuronas tratadas con dosis crecientes (100 a 600 μM) de CoCl₂ por 24 horas, medida por el ensayo de MTT. Datos presentados como porcentaje del CTRL. (B) Producción temporal de ROS totales en neuronas tratadas con CoCl₂ (300 μM), obtenida por la oxidación del reactivo DCFDA. Datos normalizados respecto al control (0 μM CoCl₂, 15 minutos). n=3. CTRL: control. CoCl₂: Cloruro de cobalto. Las barras representan la media +/- el EEM. Datos analizados con ANOVA de un factor seguidos de una prueba post-hoc de Tukey * p < 0.05 ** p < 0.01 *** p < 0.001 **** p < 0.0001, se indican las diferencias entre tratamientos.

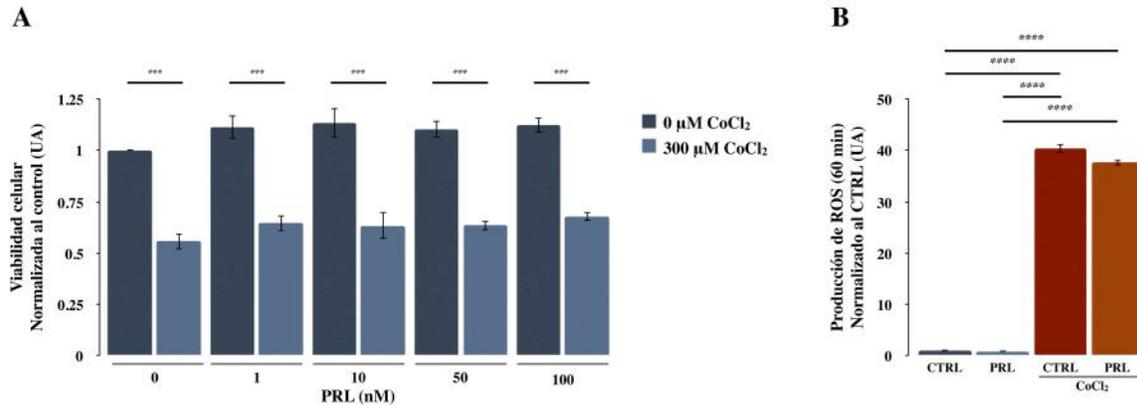


Figura 10: **La PRL no protege a las neuronas hipocámpales contra un daño por hipoxia química.**

(A) Viabilidad celular de neuronas pre-tratadas con dosis crecientes de PRL (1 a 100 nM) por 48 horas y con CoCl₂ (300 μM) por 24 horas, medida por el ensayo de MTT. Datos normalizados respecto al control (0 nM PRL, 0 μM CoCl₂). n=3. (B) Producción de ROS totales en neuronas pre-tratadas con PRL (100 nM) por 24 horas y/o con CoCl₂ (300 μM) durante 60 minutos. n=3. CTRL: control. CoCl₂: Cloruro de cobalto. Las barras representan la media +/- el EEM. Datos analizados con ANOVA de uno o dos factores, según fuera el caso, seguidos de una prueba post-hoc de Tukey * p <0.05 ** p <0.01 *** p <0.001.

7.7 EXPRESIÓN DEL RPRL EN LOS CULTIVOS NEURONALES TRATADOS CON PRL Y/O H₂O₂

Con el objetivo de probar si el H₂O₂ y/o la PRL pudieran inducir la expresión de su receptor en las neuronas, los cultivos fueron tratados con PRL (100 nM) 24 horas antes del insulto con H₂O₂ (100 μM) e incubadas durante 24 horas. La expresión del PRLR fue analizada por RT qPCR 24 horas después. El tratamiento con H₂O₂ no modificó la expresión del PRLR en las neuronas (Fig. 11). Sin embargo, el tratamiento con PRL aumentó significativamente (de 0.5 - 1 veces) dicha expresión respecto a los cultivos sin tratamiento (Fig. 11).

7.8 EFECTO DE LA PRL EN LA EXPRESIÓN DE GENES APOPTÓTICOS EN NEURONAS BAJO ESTRÉS OXIDATIVO

Debido al efecto protector de la PRL observado en las neuronas tratadas con H₂O₂ y dado que este compuesto induce la apoptosis en estas células, se decidió investigar si esta hormona pudiera estar regulando algunos mecanismos de muerte celular. Para ello, se analizaron

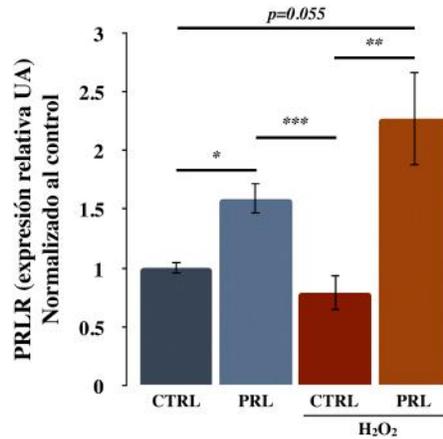


Figura 11: **La PRL induce un incremento en la expresión de su receptor en las neuronas hipocámpicas.** Expresión relativa del PRLR en cultivos neuronales pre-tratados con PRL ovina por 48 horas (100 nM) y/o con H₂O₂ (100 μM) por 24 horas. Datos normalizados respecto al CTRL, obtenidos por RT qPCR. n=4. CTRL: control. PRLR: receptor de PRLR. H₂O₂: Peróxido de hidrógeno. Las barras representan la media +/- el EEM. Datos analizados con prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de la U de Mann-Whitney. *p < 0.05 ** p < 0.01 *** p < 0.001.

cambios en la expresión de genes apoptóticos mediante RT qPCR. El tratamiento por 24 horas con H₂O₂ (100 μM) en los cultivos neuronales, indujo un aumento en la expresión de BAX (3 veces), PMAIP1 (NOXA) (1 vez), BBC3 (PUMA) (0.5 veces) y BAD (1.5 veces) respecto al control (Fig. 12). Este aumento en todos estos genes pro-apoptóticos es consistente con la inducción de la apoptosis por el H₂O₂. Por el contrario, en los cultivos pre-tratados con PRL (100 nM) por 48 horas y con H₂O₂ (100 μM) por 24 horas, la expresión de BAX, PUMA y BAD se redujo a niveles similares al control, indicando que la PRL fue capaz de inhibir la expresión de tres de los cuatro genes pro-apoptóticos sobre-expresados por el H₂O₂, con la excepción de NOXA. Esto sugiere un posible mecanismo protector de la PRL al inhibir la expresión de genes pro-apoptóticos en neuronas bajo estrés oxidativo. En el caso de BCL2L11 (BIM), otro gen pro-apoptótico, la expresión de su mensajero no aumentó por el H₂O₂ ni reducida por la PRL, si no paradójicamente su expresión en los cultivos con el daño oxidante fue menor respecto a los tratados con PRL. Por otro lado, la expresión de BCL2 no cambió con ninguno de los tratamientos hechos en los cultivos (Fig. 12), por lo que ni la PRL y/o el H₂O₂ se encuentran relacionados con la expresión de esta proteína anti-apoptótica en los cultivos neuronales.

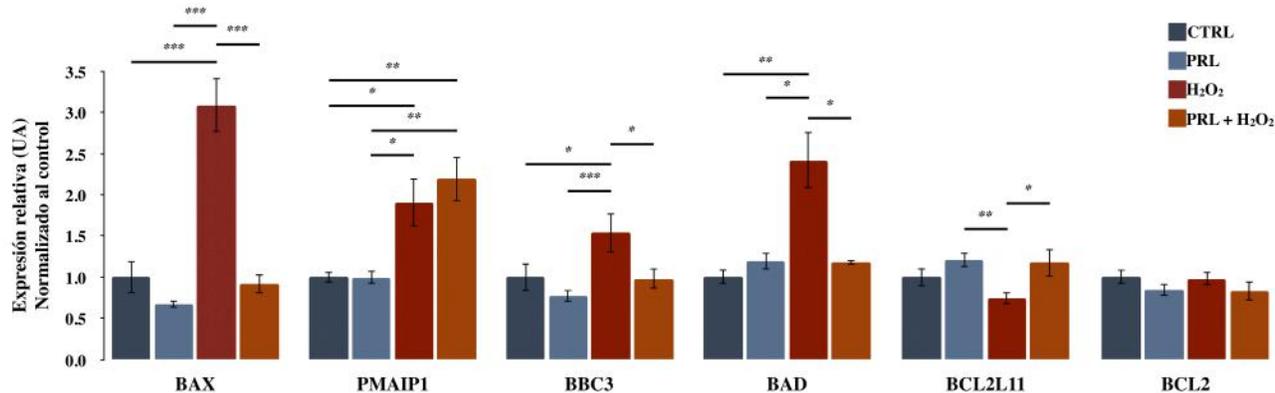


Figura 12: La PRL reduce la expresión de genes pro-apoptóticos en neuronas hipocampales bajo estrés oxidativo inducido por H₂O₂. Expresión relativa de genes apoptóticos de cultivos neuronales pre-tratados con PRL (100 nM) por 48 horas y/o con H₂O₂ (100 μM) por 24 horas. Se analizó la expresión de los genes pro-apoptóticos BAX: bcl-2-like protein 4. PMAIP₁: Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1 o NOXA. BBC₃: Bcl-2-binding component 3 o PUMA. BAD: Bcl-2-associated death promoter. BCL₂L₁₁: Bcl-2-like protein 11 o BIM. Y se analizó la expresión del gen anti-apoptótico BCL₂: B-cell lymphoma 2 o Bcl-2. Datos normalizados respecto al CTRL, obtenidos por RT qPCR. n=4. CTRL: control. H₂O₂: Peróxido de hidrógeno. Las barras representan la media +/- el EEM. Datos analizados con ANOVA de un factor seguido de una prueba post-hoc de Tukey o por la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de la U de Mann-Whitney, según fuera el caso. *p <0.05 ** p <0.01 *** p <0.001.

7.9 EFECTO DE LA PRL EN LA EXPRESIÓN DE GENES REGULADORES DE LA AUTOFA-GIA EN NEURONAS BAJO ESTRÉS OXIDATIVO

Dado que también la autofagia se ha relacionado con la promoción de la muerte celular durante un estado de estrés oxidativo, se investigó si el efecto protector de la PRL observado en los cultivos neuronales pudiera estar relacionado con la regulación transcripcional de la autofagia. El análisis por RT qPCR mostró un aumento significativo en la expresión de BECN1 (Beclina 1), ATG12 y LAMP2 por efecto del tratamiento con H₂O₂ (Fig. 13), habiendo también una clara tendencia de un aumento en la expresión en MAP1LC3B (LC3) aunque no significativa. El pre-tratamiento con PRL por 24 horas previno en su totalidad el efecto del H₂O₂ sobre la expresión de Beclina 1 y LC3 (Fig. 13), observándose niveles de expresión iguales al control sin tratamiento con H₂O₂, también la PRL previno significativamente la expresión de ATG12, pero de manera parcial. El tratamiento solo con PRL no indujo cambios en la expresión de LC3, Beclina 1 y LAMP2, sin embargo, aumentó significativamente la expresión de ATG12 respecto al control (Fig. 13). Estos resultados sugieren que hay un incremento en la respuesta autofágica en las neuronas hipocampales ante un daño oxidativo y que la PRL puede tener un efecto regulador en esta respuesta. De esta manera pudiera estar relacionada con su efecto protector en las neuronas hipocampales bajo condiciones de estrés oxidativo.

7.10 EFECTO DE LA PRL EN LA EXPRESIÓN DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES EN NEURO-NAS BAJO ESTRÉS OXIDATIVO

Debido a que la PRL redujo significativamente la producción de ROS causada por el H₂O₂, se decidió investigar si esta hormona es capaz de cambiar la expresión de algunas enzimas antioxidantes que pudieran ayudar a detener el daño causado por el H₂O₂. Siguiendo el mismo esquema que en los experimentos anteriores, se analizó por RT qPCR cambios en la expresión de cuatro enzimas antioxidantes en los cultivos de neuronas hipocampales. En las neuronas tratadas por 24 horas con H₂O₂ (100 µM), únicamente la expresión del ARNm de la enzima GPX1 se incrementó, exhibiendo un aumento de 0.8 veces más que el control (Fig. 14). Por el contrario, el tratamiento con PRL (100 nM) inhibió el aumento en la enzima glutatión peroxidasa (GPX1) (0.8 veces) inducido por el H₂O₂. En el caso de las enzimas superóxido dismutasa 2 (SOD2), peroxirredoxina 1 (PRDX1) y peroxirredoxina 6 (PRDX6) no se encontró algún efecto del tratamiento con H₂O₂ (Fig. 14). Por otro lado,

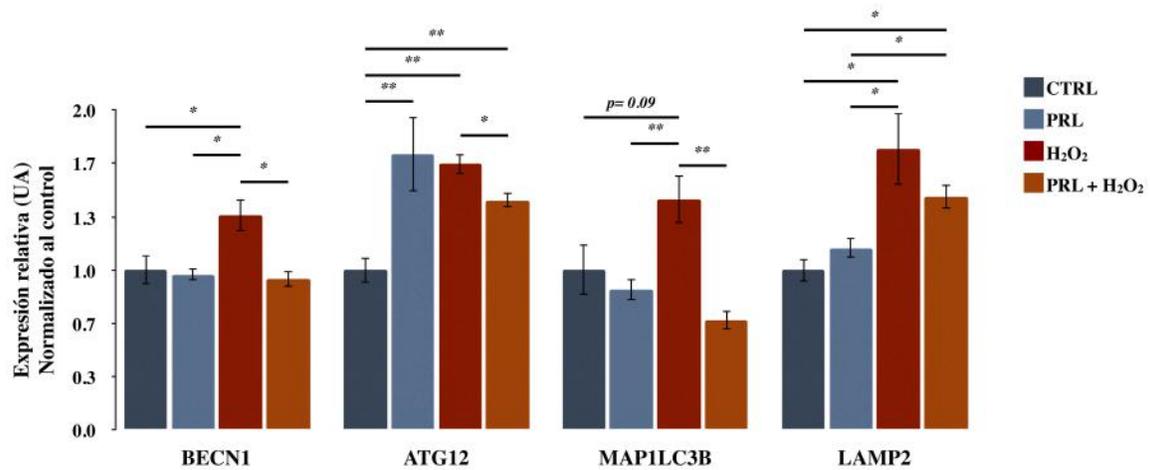


Figura 13: **La PRL reduce la expresión de reguladores de la autofagia en neuronas hipocampales bajo estrés oxidativo inducido por H₂O₂.** Expresión relativa de genes autofágicos de cultivos neuronales pre-tratados con PRL (100 nM) por 48 horas y/o con H₂O₂ (100 μM) por 24 horas. Se analizó la expresión de BECN1: Beclina 1. ATG12: Autophagy-related protein 12. MAP1LC3B: Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B o LC3. LAMP2: Lysosome-associated membrane protein 2. Datos normalizados respecto al CTRL, obtenidos por RT qPCR. n=4. CTRL: control. H₂O₂: Peróxido de hidrógeno. Las barras representan la media +/- el EEM. Datos analizados con ANOVA de un factor seguido de una prueba post-hoc de Tukey o por la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de la U de Mann-Whitney, según fuera el caso. *p <0.05 ** p <0.01 *** p <0.001.

el tratamiento únicamente con PRL (100 nM) por 48 horas redujo 0.5 veces la expresión de la SOD2, hecho que se vio exacerbado en los cultivos tratados con PRL y H₂O₂. De la misma forma la expresión de la PRDX1 se redujo 0.7 veces respecto al control por dicho tratamiento. En el caso de la PRDX6, esta enzima también presentó una reducción de 0.5 veces en su expresión en el grupo tratado con PRL y H₂O₂ respecto al tratado solo con PRL o H₂O₂ (Fig. 14).

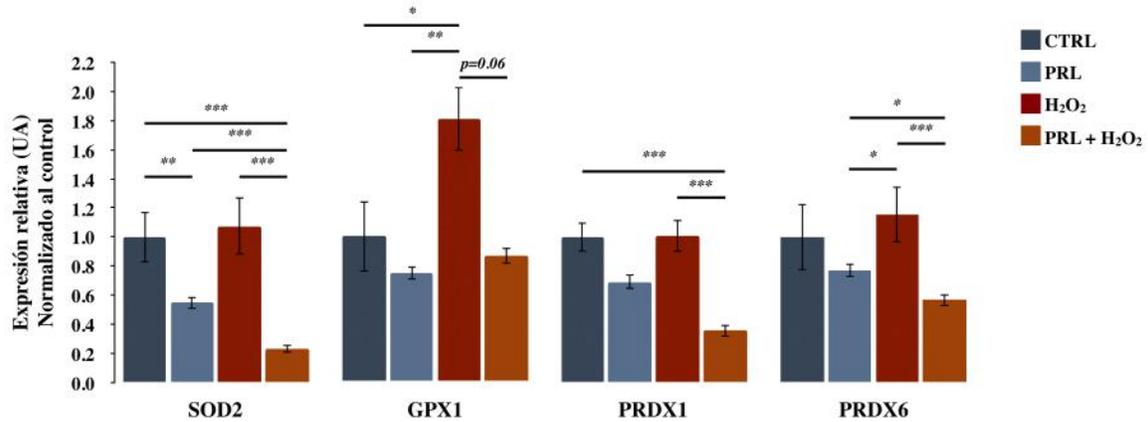


Figura 14: **La PRL reduce la expresión de genes de enzimas antioxidantes en neuronas hipocámpicas bajo estrés oxidativo por H₂O₂.** Expresión relativa de enzimas antioxidantes SOD2: Manganeso superóxido dismutasa 2. GPX1: Glutación peroxidasa 1. PRDX1: Peroxiredoxina 1. PRDX6: Peroxiredoxina 6. En cultivos neuronales pre-tratados con PRL (100 nM) por 48 horas con o sin H₂O₂ (100 μM) por 24 horas. Datos normalizados respecto al CTRL, obtenidos por RT qPCR. n=4. CTRL: control. H₂O₂: Peróxido de hidrógeno. Las barras representan la media +/- el EEM. Datos analizados con ANOVA de un factor seguido de una prueba post-hoc de Tukey o por la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de la U de Mann-Whitney, según fuera el caso. *p <0.05 ** p <0.01 *** p <0.001.

8 DISCUSIÓN

Las neuronas son la base para el funcionamiento del SNC, de ellas depende el procesamiento de la información que permite realizar tanto tareas motoras como procesos cognitivos. Debido a esta especialización ganada u ocurrida a lo largo de la evolución, son células muy vulnerables a todo tipo de insultos (como el estrés oxidativo) que causan anomalías en su función y conllevan a la degeneración del tejido. En este trabajo encontramos que la hormona adenohipofisaria PRL, ejerce un efecto protector sobre cultivos neuronales sometidos a estrés oxidativo por H_2O_2 , reduciendo la producción de ROS e induciendo cambios en la expresión de genes apoptóticos y autofágicos.

La PRL previno el daño inducido por el H_2O_2 en las neuronas hipocampales, lo que confirma su papel protector ante un daño por estrés oxidativo. Además de que indujo una reducción en la producción de ROS, que también le confiere un papel antioxidante sobre estas células. Dicha función de la PRL ya se había reportado por nuestro laboratorio en otros tipos celulares; en células del epitelio pigmentario retiniano se encontró que la PRL es capaz de prevenir el daño inducido por un tratamiento con H_2O_2 (Meléndez García y col., 2016) y al administrarla en astrocitos corticales de rata bajo un estrés oxidativo previene el daño e induce la expresión de enzimas antioxidantes (Ulloa, 2018).

La capacidad de respuesta a la PRL por parte de las neuronas ha sido debatido en otros trabajos (Mödersheim y col., 2007). De hecho, las dosis de PRL con las que en nuestro modelo se observó su protección son entre 1,000 y 10 veces mayores a la usada en los trabajos anteriormente mencionados. Esto sugiere que la respuesta de las neuronas a la PRL es menor que en los otros tipos celulares. Se ha propuesto que las acciones de la PRL en el cerebro son mediados principalmente por las células de la glía (Anagnostou, Reyes-Mendoza y Morales, 2018), siendo necesaria una mayor concentración de PRL para que esta ejerza sus acciones protectoras sobre las neuronas.

Para elucidar el mecanismo de protección de la PRL en los cultivos de neuronas tratados con H_2O_2 , se examinó la expresión de genes apoptóticos y reguladores de la autofagia. Se confirmó lo ya reportado en trabajos anteriores sobre el efecto del H_2O_2 como promotor de la muerte celular por apoptosis y autofagia (Gao y col., 2018; Higgins y col., 2011; Ryter y col., 2007; Tan, Wood y Maher, 1998), dado que en las neuronas indujo una señal positiva para fragmentación de ADN y promovió la expresión del ARNm de las proteínas

pro-apoptóticas BAX, NOXA, PUMA y BAD. De la misma forma, aumentó la expresión de los genes reguladores de la autofagia LC3, Beclina 1, LAMP2 y ATG12. Por el contrario, la PRL presentó el efecto inverso; previno el incremento en la expresión de los genes pro-apoptóticos: BAX, PUMA y BAD. En otros tipos celulares ya se había reportado una disminución de BAX (Adán y col., 2013) y BAD (Flores-Fernández y col., 2016) por la administración in vitro de PRL, siendo este el primer reporte en donde se relaciona a dicha hormona con una disminución en la expresión del ARNm de PUMA. En cultivos de neuronas hipocampales de rata, Rivero-Segura y col., 2017 encontraron que la PRL induce una disminución en la proporción de Bax/Bcl-2, lo que coincide parcialmente con nuestros resultados en los que se observó una disminución de BAX pero no se presentaron cambios en BCL2. En el mismo trabajo Rivero-Segura y col., 2017 se analizó la expresión de la proteína y no de su mensajero, un análisis de este tipo sería necesario en nuestro modelo para confirmar la participación de la PRL en la regulación de estos componentes. Bcl-2 es una proteína anti-apoptótica la cual se encarga de unirse a Bax y Bak para evitar la formación de poros mitocondriales (Green y Llambi, 2015). En trabajos anteriores se ha visto que la PRL regula de manera transcripcional y post-transcripcional la expresión de Bcl-2 (Adán y col., 2013; Krumenacker y col., 1998), el hecho de que este cambio sea responsable del efecto protector de la PRL ha sido debatido por Weimann y col., 1999 quienes encontraron que la PRL induce una sobre-expresión de Bcl-2 en células Nb2 en condiciones normales, pero no bajo un daño con glucocorticoides. Es probable que el efecto de supervivencia de la PRL en las neuronas sometidas a estrés oxidativo no sea mediado por Bcl-2 o que su regulación por esta hormona sea a nivel post-transcripcional. En los estudios con condrocitos tratados con citocinas pro-inflamatorias, Adán y col., 2013 encontraron que la PRL inhibe la apoptosis al inducir una reducción en la expresión del factor pro-apoptótico Bax y del gen supresor de tumores p53. p53 es un conocido promotor de la apoptosis que ejerce sus efectos principalmente a través de la activación transcripcional de BAX, PUMA y NOXA (Aubrey y col., 2018). El hecho de que dos de estos genes fueran inhibidos por la PRL durante condiciones de estrés oxidativo en las neuronas, podría indicar que esta hormona ejerce sus efectos antiapoptóticos al inhibir p53. Una de las vías por las que la PRL actúa, es a través de la fosforilación del factor de transcripción STAT3 (Ignakak y col., 2012). En el mismo estudio Adán y col., 2013 encontraron que la inhibición de esta vía bloquea la protección de la PRL y su efecto sobre la expresión de p53 y Bax. Jak2/STAT3 ha sido una vía comúnmente asociada con la supervivencia celular, su activación promueve la disminución en la expresión de p53 en diferentes células cancerosas (Niu y col., 2005), además de que puede inhibir la expresión de los factores pro-apoptóticos Bax, caspasa 3, PUMA y BAD (Liu y col., 2017; Sulaiman y col., 2016; Yang y col., 2013; Yu y col., 2018). El factor NF-κB (nuclear factor

kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) participa como regulador en diferentes situaciones de estrés en la célula, estando relacionado con la supervivencia, la proliferación, la inflamación y la apoptosis. Se ha propuesto que la PRL ejerce sus acciones de protección en las neuronas al inducir la translocación al núcleo de NF- κ B (Rivero-Segura y col., 2017), lo que promueve la expresión de factores anti-apoptóticos. Otros estudios han demostrado que al activarse, STAT3 y NF- κ B pueden interactuar e inhibir la apoptosis en células cancerosas (Duan y col., 2016), por lo que ambos mecanismos podrían ser candidatos a través de los cuales la PRL induce cambios en la expresión de genes pro-apoptóticos en las neuronas bajo estrés oxidativo.

Con relación a la autofagia, la PRL redujo el incremento en la expresión de LC3, beclina 1 y ATG12 en las neuronas bajo estrés oxidativo. Confirmando lo ya reportado en estudios previos (Geng y col., 2017; Wen y col., 2014) donde la inhibición de la PRL y su receptor se relacionaba con un aumento en la expresión de factores autofágicos. La regulación transcripcional de la autofagia se encuentra mediada principalmente por el factor TEFB (Transcription Factor EB) y las proteínas FOXO1 (Forkhead box O1) y FOXO3 (Forkhead box O3) (Sakamaki y col., 2018; Zhao y col., 2007). La PRL podría actuar sobre los factores autofágicos a través de dos posibles vías. Por una parte, se sabe que la expresión de FOXO3 puede ser reprimida por la acción de la PRL, a través de la isoforma corta de su receptor (Halperin y col., 2008), por lo que existe la posibilidad de que por esta vía inhiba la expresión de genes autofágicos. Otro importante regulador de la autofagia es el sensor de nutrientes mTOR, que al estar activado inhibe las acciones de TEFB, impidiendo la promoción de la autofagia (Parzych y Klionsky, 2014). mTOR puede ser activado río arriba por la vía de PI3K/Akt, a través de una de-fosforilación. PI3K/Akt es una vía de supervivencia celular, la cual puede ser activada por la PRL (Prigent-Tessier y col., 2001), lo que activaría a mTOR y reprimiría a la autofagia.

Como se mencionó previamente, la PRL puede activar a STAT3, y este factor de transcripción también participa en la modulación del proceso de autofagia. En células de cáncer de pulmón, STAT3 inhibe la expresión de Beclina 1 (Miao y col., 2014), que resulta esencial para la iniciación de la autofagia. De la misma forma, STAT3 reduce la actividad de EIF2A (eukaryotic initiation factor 2A), un factor que promueve la expresión de MAP1LC3B, por lo que STAT3 podría inhibir la expresión de LC3, que participa en la maduración de los autofagosomas (You y col., 2015). Dado que LC3 y Beclina 1 fueron los principales genes inhibidos por acción de la PRL en las neuronas hipocampales sometidas a estrés oxidativo, es posible que esta hormona ejerza sus efectos a través de la activación de STAT3 en las neuronas hipocampales. Otro de los factores autofágicos analizados fue LAMP2. Este gen codifica para la proteína Lamp2 (lysosome-associated membrane protein type 2) que

participa en la translocación de diferentes substratos al lisosoma, en un tipo de autofagia conocido como "autofagia mediada por chaperonas" (Cuervo y Wong, 2013). El estado de estrés oxidativo en las neuronas causó un incremento en la expresión de LAMP2, hecho ya reportado en otros estudios (Bhansali y col., 2017; Tsuchihashi y col., 2015). Sin embargo, el tratamiento con PRL no consiguió reducir dicho aumento. Es probable que la PRL no tenga acciones directas sobre la autofagia mediada por chaperonas. Estudios mas amplios sobre este proceso serían necesarios para confirmar dicha hipótesis.

Contrario a los resultados anteriores, el análisis de la expresión del ARNm de ATG12, indicó que tanto la PRL como el H₂O₂ promueven la expresión de dicho gen. Un hecho aún más sorprendente fue que el pre-tratamiento con PRL redujo parcialmente la expresión de ATG12 en las neuronas tratadas con H₂O₂. Estos resultados contradicen lo observado sobre el efecto de la PRL en los otros reguladores de la autofagia analizados: MAP1LC3B y BECN1, dado que la reducción en la expresión de estos genes sugería una inhibición de la autofagia por la PRL. ATG12 posee un papel controversial en la célula, de acuerdo con Boya y col., 2005 la inhibición de este factor suprime la autofagia y promueve la activación de la caspasa 3 en células HeLa, de la misma forma Jiang y col., 2018 encontraron en células HUVECs bajo condiciones de hipoxia/isquemia un efecto protector al inducir la expresión de ATG12 que a su vez causa un incremento en los niveles de Bcl-2, por lo que pudiera tener efectos anti-apoptóticos. Por el contrario, en otros estudios se ha demostrado que ATG12 promueve la apoptosis al inducir la activación de Bax y la liberación de citocromo C (Rubinstein y col., 2011). Además, ATG12 puede ejercer funciones independientes de su regulación sobre la autofagia. Radoshevich y col., 2010 encontraron que ATG12 puede formar un complejo en conjunto con ATG3 para el mantenimiento de la homeostasis mitocondrial. Todos estos resultados indican que existe una compleja regulación de ATG12 en las células la cual pudiera ser diferencial dependiendo de los factores involucrados, por lo que las acciones de la PRL en su expresión dependerían del papel que tiene ATG12 en la célula. La autofagia es un proceso altamente regulado en las células, su promoción o inhibición depende de un gran número de factores que pueden cambiar la función de ciertas proteínas a través de modificaciones post-traduccionales, de hecho, gran parte de la regulación de la autofagia está dado por tales modificaciones (Botti-Millet y col., 2016). Por ello, a pesar de los efectos que observamos de la PRL sobre los genes reguladores de la autofagia, será necesario analizar los cambios que esta hormona pudiera ejercer a un nivel post-traduccional, para así confirmar su papel en la inhibición de la autofagia en neuronas bajo condiciones de estrés oxidativo.

El papel de la autofagia en la muerte celular ha sido ampliamente debatido debido a que bajo ciertas condiciones posee un efecto protector, mientras que en otras promueve la de-

generación celular. Por esta razón se ha propuesto que la promoción de la autofagia y sus efectos sobre las células dependen de su capacidad adaptativa (Wang y col., 2018). La inhibición observada tanto de los genes pro-apoptóticos como de los reguladores de la autofagia en los cultivos de neuronas hipocampales podría deberse a dos mecanismos de protección diferentes. Sin embargo, también se ha relacionado a la autofagia como una vía común para la activación de la muerte celular por apoptosis. En procesos de hipoxia/isquemia se han reportado un incremento en la autofagia, que se relaciona con un daño excesivo en la mitocondria, promoviendo finalmente la apoptosis a través de la activación de la caspasa 3 (Rami y Kögel, 2008). De la misma forma, Koike y col., 2008 encontraron que en un estado de hipoxia/isquemia en neuronas del hipocampo, la inhibición de la autofagia causaba una reducción en la apoptosis. Y en astrocitos bajo daño isquémico, la inhibición farmacológica y genética de la autofagia bloqueó la activación de proteasas lisosomales y la consecuente activación de la proteína tBid, que participa en la formación de poros mitocondriales que causan la activación de las caspasas (Zhou y col., 2017). Tales evidencias refuerzan la idea de una participación conjunta entre la autofagia y la apoptosis para la promoción de la muerte celular, dónde la PRL pudiera ser capaz de mediar dicho proceso dadas las acciones encontradas en los cultivos de neuronas bajo estrés oxidativo.

La PRL previno la sobreproducción de ROS causada por el H₂O₂. Por lo que se decidió investigar si este efecto podría deberse a cambios en la expresión de enzimas antioxidantes, como parte del efecto protector de la PRL en las neuronas. El H₂O₂ únicamente indujo un aumento en la expresión de la enzima Gpx1, lo que confirma la baja respuesta antioxidante que poseen las neuronas (Dasuri, Zhang y Keller, 2013). En general, se considera que las defensas antioxidantes de las neuronas están mediadas principalmente por el glutatión, siendo la respuesta de la enzima Gpx1 esencial para la detoxificación de peróxidos en estas células (Dringen, 2000), por lo que no es sorprendente que la expresión de esta enzima sea la única que cambió en las neuronas bajo condiciones de estrés oxidativo. Un hecho interesante en nuestros resultados, fue el efecto del tratamiento con PRL en la expresión de las enzimas antioxidantes, dado que induce la disminución en su expresión. Estos resultados indican que el efecto de la PRL pudiera diferir de acuerdo al tipo celular, dado que evidencias previas de nuestro laboratorio demostraron que el tratamiento con PRL induce un incremento en la expresión de las enzimas antioxidantes: SOD₁, SOD₂, PRDX₁, PRDX₆, GPX₁ y GST, en astrocitos tratados con H₂O₂ (Ulloa, 2018). En estos experimentos Ulloa, 2018 administró la PRL 24 horas antes del análisis de la expresión de genes, mientras que en este trabajo el tratamiento fue 48 horas previas al referido análisis, lo que también indicaría que el efecto antioxidante de la PRL pudiera depender del tiempo de administración. Lo anterior se ve reforzado con los resultados obtenidos sobre la producción de ROS, que

se vio disminuida en los cultivos tratados con PRL y H₂O₂, y cuya medición fue realizada 24 horas después de la adición de PRL. La reducción de las ROS causada por la PRL pudiera llevarse a cabo debido a una activación temprana en la maquinaria antioxidante de la célula, que después de 48 horas ya no estaría sobre-expresada. Para confirmar esta hipótesis sería necesario llevar a cabo un análisis temporal del efecto de la PRL sobre la expresión y actividad de las enzimas antioxidantes.

El hecho de que el efecto antioxidante de la PRL prevenga la activación de la apoptosis en las neuronas o que su efecto sobre la apoptosis cause una menor producción de ROS, aún permanece desconocido. Se requiere de un estudio más a fondo sobre estos procesos para entender cómo la PRL ejerce sus efectos protectores tanto antioxidantes como anti-apoptóticos.

Actualmente existe un amplio debate sobre el origen de la PRL en el SNC, existiendo hipótesis que afirman su procedencia desde la circulación vs una posible producción de novo en el cerebro (Bridges y Grattan, 2019). En nuestro modelo de estudio, no se encontró expresión de la PRL de acuerdo al análisis por PCR punto final, por lo que la PRL tendría que ser sintetizada por otro tipo celular o llegar a través de la circulación desde la adenohipófisis. La expresión del mensajero de la PRL se ha reportado en el bulbo olfatorio, la amígdala, el cerebelo, el hipocampo y el hipotálamo, siendo en esta última la única estructura donde se ha confirmado su síntesis (Chaiseha y col., 2011; Jakob y col., 2014; Roselli y col., 2008; Torner y col., 2004). En cultivos de neuronas hipocampales de rata, Vergara-Castañeda y col., 2016 encontraron por RT qPCR la expresión del ARNm de la PRL, sin embargo, no se encontró la proteína al analizar su presencia por Western Blot. Estos autores sugieren que pudiera haber un control postranscripcional para su síntesis o que su producción en las neuronas es muy poca, encontrándose por debajo de los límites de detección de la técnica utilizada.

La mayoría de las acciones de la PRL en el cerebro se han asociado con la activación de la isoforma larga de su receptor (Torner, 2016). En el bulbo olfatorio, la corteza cerebral, los plexos coroideos, la amígdala, el cuerpo caloso, e incluso en el hipocampo ya se ha reportado la expresión del PRLR (Brown y col., 2010; Cabrera-Reyes y col., 2017; Torner y col., 2009). Nosotros confirmamos la expresión del PRLR en los cultivos de neuronas hipocampales, sugiriendo que las acciones de esta hormona son a través de su receptor. Se observó un aumento en la expresión al DIV₁₀, durante el mismo periodo en el que los marcadores de sinapsis aumentaron su expresión en el cultivo. Dado que la PRL influye en la expresión de neurotrofinas como el BDNF, GDNF o el bFGF (Arnold y col., 2014) y que estos participan en la formación y mantenimiento de las sinapsis (Bourque y Trudeau, 2000; Forget, Stewart y Trudeau, 2006; Kowiański y col., 2018), es posible que a través de esta vía

y con un aumento en la expresión de su receptor, la PRL participe en el establecimiento de dichas estructuras. A pesar de esta relación, actualmente no existen investigaciones que involucren a la PRL con el desarrollo de conexiones sinápticas.

La PRL por sí misma incrementó la expresión de su receptor independientemente del tratamiento con el H_2O_2 . Esto corrobora lo observado por Vergara-Castañeda y col., 2016, quienes reportaron que la PRL causaba un incremento en la expresión de su receptor en cultivos de neuronas hipocampales de ratas sometidos a un daño por excitotoxicidad. En otros tipos celulares también se ha reportado un incremento en la expresión del PRLR por acción de su ligando: en astrocitos corticales de rata tratados con H_2O_2 (Ulloa, 2018), en células secretoras de insulina (Galsgaard, Nielsen y Møldrup, 1999), en adipocitos (Ling y col., 2000) y en los plexos coroideos (Soya y col., 1995). La PRL al estimular la expresión de su receptor estaría amplificando su propia señalización, promoviendo un efecto mayor en la célula blanco. Se ha especulado que estas acciones son un mecanismo de adaptación para asegurar la función de la PRL tanto en condiciones normales y durante episodios de estrés (Galsgaard, Nielsen y Møldrup, 1999; Ogata y col., 2004).

Encontramos que la PRL es capaz de proteger a las neuronas de un daño por estrés oxidativo inducido por H_2O_2 , pero no protege del daño por hipoxia química provocado por $CoCl_2$. Además, redujo la producción de ROS causada por el H_2O_2 , acción que no logró realizar con el $CoCl_2$. El hecho de que el $CoCl_2$ haya inducido hasta diez veces más ROS que el H_2O_2 , indicaría que la PRL no es capaz de reducir el daño inducido en un ambiente altamente oxidante. Por lo que sus acciones moduladoras sobre los estadios pro-oxidantes estarían limitadas a las características particulares del sistema. Además, los mecanismos de muerte por los que los dos compuestos utilizados pueden actuar sobre las neuronas podrían ser diferentes. El H_2O_2 se ha asociado en la promoción de la apoptosis, la autofagia y la necrosis, sin embargo, es considerado que bajo dosis moderadas (como la LD50) el H_2O_2 induce la muerte a través de la apoptosis, esto principalmente por la activación de p53 y JNK (Ott y col., 2007). Por su parte, el $CoCl_2$ puede inducir la muerte celular a través de p53, FasL y la activación de las caspasas (Zou y col., 2002; Halterman, Miller y Federoff, 1999). Otras vías independientes también han sido descritas; a través de las proteínas pro-apotóticas BNip3 y NIX (Vengellur y LaPres, 2004), por la activación del factor AIF-1 (Stenger y col., 2011) y también por el factor de transcripción AP-1 (Activator protein 1) (Zou y col., 2001). Debido a las diferentes vías por las que el $CoCl_2$ puede inducir la muerte de las células, es probable que el mecanismo de acción de la PRL no sea capaz de inhibirlas para el ejercicio de su protección.

En resumen, la PRL previene la muerte celular inducida por estrés oxidativo en cultivos primarios de neuronas hipocampales. Este efecto protector se encontró relacionado con

una disminución en la producción de ROS y en cambios en la expresión de genes pro-apoptóticos y autofágicos. Lo que indicaría que la PRL pudiera ejercer su protección a través de la inhibición de vías de muerte celular (Fig. 15). ¿Cómo la PRL causa estos cambios sobre las neuronas? Se requerirá de investigaciones sobre la señalización "de arriba" que induce esta hormona, con un énfasis en la posible activación de factores de transcripción y demás vías de señalización.

La relevancia del papel que tiene la PRL sobre la supervivencia celular se ha propuesto en estados fisiológicos como la lactancia en el cual existe un aumento en la secreción de glucocorticoides que exacerba el daño excitotóxico en el cerebro (Morales, 2011). La hiperprolactinemia que ocurre durante este periodo previene dicho daño, permitiendo la supervivencia de las neuronas y la glía (Anagnostou, Reyes-Mendoza y Morales, 2018; Bole-Feysot y col., 1998; Reyes-Mendoza y Morales, 2016). El conocimiento de las vías de protección de la PRL permitirá conocer su papel como regulador de la homeostasis del tejido neural, así como su rol como un potencial agente contra diversos estresores, entre los que se encuentra el estrés oxidativo.

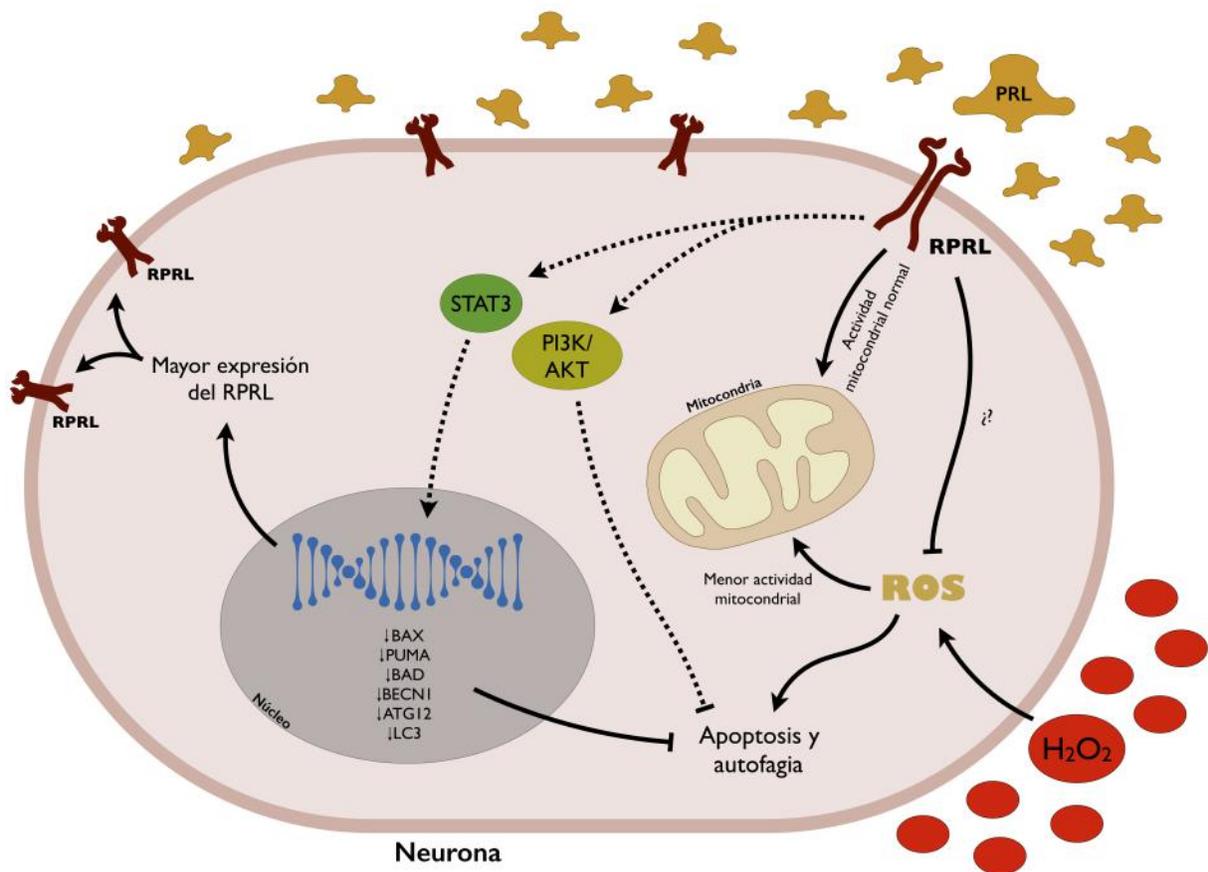


Figura 15: **Propuesta del mecanismo protector de la prolactina en neuronas bajo un estado estrés oxidativo inducido por H_2O_2 .** La PRL protege a las neuronas hipocámpales del H_2O_2 al reducir la concentración de especies reactivas de oxígeno (ROS) e inhibir la expresión de marcadores pro-apoptóticos y reguladores de la autofagia. Lo que promueve la correcta actividad de la mitocondria y la posible inhibición de la apoptosis y la autofagia. Las líneas punteadas indican relaciones hipotéticas.

9 CONCLUSIONES

- Los cultivos primarios de neuronas hipocampales de ratón son blanco de las acciones de la PRL al expresar el PRLR.
- El pre-tratamiento con PRL previene en las neuronas el daño por estrés oxidativo inducido por H_2O_2 , pero no así el daño por hipoxia química inducido por $CoCl_2$.
- La PRL induce la expresión de su receptor en las neuronas, pudiendo amplificar su señal y sus acciones.
- La PRL parece inhibir la muerte celular por apoptosis en neuronas tratadas con H_2O_2 , dado que inhibe la expresión de los genes pro-apoptóticos BAX, PUMA y BAD, sin inducir algún cambio en el gen anti-apoptótico BCL2.
- La PRL parece inhibir la muerte celular por autofagia en neuronas tratadas con H_2O_2 , dado que inhibe la expresión de los genes reguladores de la autofagia MAP1LC3B, BECN1 y ATG12, sin ejercer efectos sobre LAMP2.
- La expresión de diversas enzimas antioxidantes no cambia por efecto del H_2O_2 , con excepción de GPX1, mientras que la PRL reduce la expresión de estas enzimas, por lo que su papel protector no ocurre a través de esta vía.

BIBLIOGRAFÍA

- Adán, Norma y col. (2013). «Prolactin promotes cartilage survival and attenuates inflammation in inflammatory arthritis.» eng. En: *The Journal of clinical investigation* 123.9, págs. 3902-3913. ISSN: 1558-8238 (Electronic). DOI: [10.1172/JCI69485](https://doi.org/10.1172/JCI69485).
- Anagnostou, Ilektra, Julio Reyes-Mendoza y Teresa Morales (2018). «Glial cells as mediators of protective actions of prolactin (PRL) in the CNS». En: *General and Comparative Endocrinology* 265, págs. 106-110. ISSN: 0016-6480. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.01.024>. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016648017306950>.
- Angelova, Plamena R y Andrey Y Abramov (2018). «Role of mitochondrial ROS in the brain: from physiology to neurodegeneration». En: *FEBS Letters* 592.5, págs. 692-702. DOI: [10.1002/1873-3468.12964](https://doi.org/10.1002/1873-3468.12964). URL: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/1873-3468.12964>.
- Arnold, Edith y col. (2014). «The Hormone Prolactin Is a Novel, Endogenous Trophic Factor Able to Regulate Reactive Glia and to Limit Retinal Degeneration». En: *The Journal of Neuroscience* 34.5, 1868 LP -1878. URL: <http://www.jneurosci.org/content/34/5/1868.abstract>.
- Aubrey, Brandon J, Gemma L Kelly, Ana Janic, Marco J Herold y Andreas Strasser (2018). «How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression?» eng. En: *Cell death and differentiation* 25.1, págs. 104-113. ISSN: 1476-5403 (Electronic). DOI: [10.1038/cdd.2017.169](https://doi.org/10.1038/cdd.2017.169).
- Bell, Karen F.S. (2013). «Insight into a neuron's preferential susceptibility to oxidative stress». En: *Biochemical Society Transactions* 41.6, págs. 1541-1545. ISSN: 0300-5127. DOI: [10.1042/BST20130245](https://doi.org/10.1042/BST20130245). eprint: <http://www.biochemsoctrans.org/content/41/6/1541.full.pdf>. URL: <http://www.biochemsoctrans.org/content/41/6/1541>.
- Bhansali, Shipra, Anil Bhansali, Rama Walia, Uma Nahar Saikia y Veena Dhawan (2017). «Alterations in Mitochondrial Oxidative Stress and Mitophagy in Subjects with Prediabetes and Type 2 Diabetes Mellitus.» eng. En: *Frontiers in endocrinology* 8, pág. 347. ISSN: 1664-2392 (Print). DOI: [10.3389/fendo.2017.00347](https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00347).
- Bhattacharya, Susinjan (2015). «Reactive Oxygen Species and Cellular Defense System». En: *Free Radicals in Human Health and Disease*. Ed. por Vibha Rani y Umesh Chand Singh

- Yadav. New Delhi: Springer India, págs. 17-29. ISBN: 978-81-322-2035-0. DOI: [10.1007/978-81-322-2035-0_2](https://doi.org/10.1007/978-81-322-2035-0_2). URL: https://doi.org/10.1007/978-81-322-2035-0_{_}2.
- Birben, Esra, Umit Murat Sahiner, Cansin Sackesen, Serpil Erzurum y Omer Kalayci (2012). «Oxidative Stress and Antioxidant Defense». En: *World Allergy Organization Journal* 5.1, págs. 9-19. ISSN: 1939-4551. DOI: [10.1097/WOX.0b013e3182439613](https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613). URL: <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>.
- Bole-Feysot, C, V Goffin, M Edery, N Binart y P A Kelly (1998). «Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice». En: *Endocrinology Reviews* 19, págs. 225-268.
- Botti-Millet, Joëlle, Anna Chiara Nascimbeni, Nicolas Dupont, Etienne Morel y Patrice Codogno (2016). «Fine-tuning autophagy: from transcriptional to posttranslational regulation». En: *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 311.3, págs. C351-C362. DOI: [10.1152/ajpcell.00129.2016](https://doi.org/10.1152/ajpcell.00129.2016). URL: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00129.2016>.
- Bourque, Marie-Josée y Louis-Eric Trudeau (2000). «GDNF enhances the synaptic efficacy of dopaminergic neurons in culture». En: *European Journal of Neuroscience* 12.9, págs. 3172-3180. DOI: [10.1046/j.1460-9568.2000.00219.x](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1460-9568.2000.00219.x). URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1460-9568.2000.00219.x>.
- Boya, Patricia y col. (2005). «Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis.» eng. En: *Molecular and cellular biology* 25.3, págs. 1025-1040. ISSN: 0270-7306 (Print). DOI: [10.1128/MCB.25.3.1025-1040.2005](https://doi.org/10.1128/MCB.25.3.1025-1040.2005).
- Bridges, Robert S y David R Grattan (2019). «30 years after: CNS actions of prolactin: Sources, mechanisms and physiological significance». En: *Journal of Neuroendocrinology* 31.3, e12669. DOI: [10.1111/jne.12669](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jne.12669). URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jne.12669>.
- Brooks, C L (2012). «Molecular Mechanisms of Prolactin and Its Receptor». En: *The Endocrine Society* 33.4, págs. 504-525.
- Brown, R S E, I C Kokay, A E Herbison y D R Grattan (2010). «Distribution of prolactin responsive neurons in the mouse forebrain». En: *The Journal of Comparative Neurology* 518, págs. 92-102.
- Brown, Rosemary S E, Amanda K Wyatt, Ryan E Herbison, Penelope J Knowles, Sharon R Ladyman, Nadine Binart, William A Banks y David R Grattan (2016). «Prolactin transport into mouse brain is independent of prolactin receptor.» En: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 30.2, págs. 1002-10. ISSN: 1530-6860. DOI: [10.1096/fj.15-276519](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26567005). URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26567005>.

- Buckley, A R, D J Buckley, J C Reed, J S Krumenacker, M A Leff y T Miyashita (1996). «Rapid modulation of the apoptosis regulatory genes, bcl-2 and bax by prolactin in rat Nb2 lymphoma cells». En: *Endocrinology* 137.12, págs. 5456-5462. ISSN: 0013-7227. DOI: [10.1210/endo.137.12.8940371](https://doi.org/10.1210/endo.137.12.8940371). URL: <https://dx.doi.org/10.1210/endo.137.12.8940371>.
- Buckley, Donna J, Nithya Krishnan, Olivier Thellin, Nelson D Horseman y Arthur R Buckley (2003). «Prolactin Suppresses Glucocorticoid-Induced Thymocyte Apoptosis in Vivo». En: *Endocrinology* 144.5, págs. 2102-2110. ISSN: 0013-7227. DOI: [10.1210/en.2003-0053](https://doi.org/10.1210/en.2003-0053). URL: <https://dx.doi.org/10.1210/en.2003-0053>.
- Cabrera-Reyes, Erika Alejandra, Ofelia Limón-Morales, Nadia Alejandra Rivero-Segura, Ignacio Camacho-Arroyo y Marco Cerbón (2017). «Prolactin function and putative expression in the brain». En: *Endocrine* 57.2, págs. 199-213. ISSN: 1559-0100. DOI: [10.1007/s12020-017-1346-x](https://doi.org/10.1007/s12020-017-1346-x). URL: <https://doi.org/10.1007/s12020-017-1346-x>.
- Cabrera, V., E. Ramos, A. González-Arenas, M. Cerbón, I. Camacho-Arroyo y T. Morales (2013). «Lactation Reduces Glial Activation Induced by Excitotoxicity in the Rat Hippocampus». En: *Journal of Neuroendocrinology* 25.6, págs. 519-527. ISSN: 09538194. DOI: [10.1111/jne.12028](http://doi.wiley.com/10.1111/jne.12028). URL: <http://doi.wiley.com/10.1111/jne.12028>.
- Caltana, Laura, Amalia Merelli, Alberto Lazarowski y Alicia Brusco (2009). «Neuronal and Glial Alterations Due to Focal Cortical Hypoxia Induced by Direct Cobalt Chloride (CoCl₂) Brain Injection». En: *Neurotoxicity Research* 15.4, págs. 348-358. ISSN: 1476-3524. DOI: [10.1007/s12640-009-9038-9](https://doi.org/10.1007/s12640-009-9038-9). URL: <https://doi.org/10.1007/s12640-009-9038-9>.
- Carlo, Raffaele Di, Giampiero Muccioli, Mauro Papotti y Gianni Bussolati (1992). «Characterization of prolactin receptor in human brain and choroid plexus». En: *Brain Research* 570.1, págs. 341-346. ISSN: 0006-8993. DOI: [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(92\)90599-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)90599-5). URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006899392905995>.
- Chaiseha, Y, P Ngernsoungnern, N Sartsoongnoen, N E M Prakobsaeng y E Halawani (2011). «Presence of prolactin mRNA in extra pituitary brain areas in the domestic turkey». En: *Acta Histochemica* 114, págs. 116-121.
- Chi, Hao, Hui-Yun Chang y Tzu-Kang Sang (2018). «Neuronal Cell Death Mechanisms in Major Neurodegenerative Diseases.» eng. En: *International journal of molecular sciences* 19.10. ISSN: 1422-0067 (Electronic). DOI: [10.3390/ijms19103082](https://doi.org/10.3390/ijms19103082).
- Chondrogianni, Niki, Isabelle Petropoulos, Stefanie Grimm, Konstantina Georgila, Betul Catalgol, Bertrand Friguet, Tilman Grune y Efstathios S Gonos (2014). «Protein damage, repair and proteolysis». En: *Molecular Aspects of Medicine* 35, págs. 1-71. ISSN: 0098-2997. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.09.001>. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0098299712001276>.

- Circu, Magdalena L y Tak Yee Aw (2010). «Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis». En: *Free Radical Biology and Medicine* 48.6, págs. 749-762. ISSN: 0891-5849. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.12.022>. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S089158490900793X>.
- Cuervo, Ana Maria y Esther Wong (2013). «Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging». En: *Cell Research* 24, pág. 92. URL: <https://doi.org/10.1038/cr.2013.153><http://10.0.4.14/cr.2013.153>.
- Curry, Benjamin J, Dwi Ari Pujianto y R John Aitken (2010). «Prolactin Exerts a Prosurvival Effect on Human Spermatozoa via Mechanisms that Involve the Stimulation of Akt Phosphorylation and Suppression of Caspase Activation and Capacitation». En: *Endocrinology* 151.3, págs. 1269-1279. ISSN: 0013-7227. DOI: [10.1210/en.2009-0964](https://doi.org/10.1210/en.2009-0964). URL: <https://dx.doi.org/10.1210/en.2009-0964>.
- Damme, Markus, Taina Suntio, Paul Saftig y Eeva-Liisa Eskelinen (2015). «Autophagy in neuronal cells: general principles and physiological and pathological functions». En: *Acta Neuropathologica* 129.3, págs. 337-362. ISSN: 1432-0533. DOI: [10.1007/s00401-014-1361-4](https://doi.org/10.1007/s00401-014-1361-4). URL: <https://doi.org/10.1007/s00401-014-1361-4>.
- Dasuri, Kalavathi, Le Zhang y Jeffrey N. Keller (2013). «Oxidative stress, neurodegeneration, and the balance of protein degradation and protein synthesis». En: *Free Radical Biology and Medicine* 62. Neurodegeneration, págs. 170 -185. ISSN: 0891-5849. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.09.016>. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584912011410>.
- Denizot, François y Rita Lang (1986). «Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability». En: *Journal of Immunological Methods* 89.2, págs. 271-277. ISSN: 0022-1759. DOI: [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(86\)90368-6](https://doi.org/10.1016/0022-1759(86)90368-6). URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022175986903686>.
- Dringen, Ralf (2000). «Metabolism and functions of glutathione in brain». En: *Progress in Neurobiology* 62.6, págs. 649-671. ISSN: 0301-0082. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(99\)00060-X](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(99)00060-X). URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030100829900060X>.
- Duan, JingJing, Wen Yue, JianYu E, Jyoti Malhotra, Shou-En Lu, Jun Gu, Feng Xu y Xiang-Lin Tan (2016). «In vitro comparative studies of resveratrol and triacetylresveratrol on cell proliferation, apoptosis, and STAT3 and NFκB signaling in pancreatic cancer cells.» eng. En: *Scientific reports* 6, pág. 31672. ISSN: 2045-2322 (Electronic). DOI: [10.1038/srep31672](https://doi.org/10.1038/srep31672).

- Fader, C M y M I Colombo (2008). «Autophagy and multivesicular bodies: two closely related partners». En: *Cell Death And Differentiation* 16, pág. 70. URL: <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.168><http://10.0.4.14/cdd.2008.168>.
- Filomeni, G, D De Zio y F Cecconi (2015). «Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs.» eng. En: *Cell death and differentiation* 22.3, págs. 377-388. ISSN: 1476-5403 (Electronic). DOI: [10.1038/cdd.2014.150](https://doi.org/10.1038/cdd.2014.150).
- Flores-Fernández, Rocio, Francisco Blanco-Favela, Ezequiel M Fuentes-Pananá, Luis Chávez-Sánchez, Patricia Gorocica-Rosete, Alberto Pizaña-Venegas y Adriana Karina Chávez-Rueda (2016). «Prolactin Rescues Immature B-Cells from Apoptosis Induced by B-Cell Receptor Cross-Linking.» eng. En: *Journal of immunology research* 2016, pág. 3219017. ISSN: 2314-7156 (Electronic). DOI: [10.1155/2016/3219017](https://doi.org/10.1155/2016/3219017).
- Forget, Caroline, Jane Stewart y Louis-Éric Trudeau (2006). «Impact of basic FGF expression in astrocytes on dopamine neuron synaptic function and development». En: *European Journal of Neuroscience* 23.3, págs. 608-616. DOI: [10.1111/j.1460-9568.2006.04570.x](https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04570.x). URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1460-9568.2006.04570.x>.
- Freeman, M E, B Kaniscka, A Lerant y G Nagy (2000). «Prolactin: Structure, Function and Regulation of Secretion». En: *Physiological Reviews* 80.4, págs. 1523-1631.
- Galluzzi, Lorenzo y col. (2018). «Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018». En: *Cell death and differentiation* 25.3, págs. 486-541. ISSN: 1476-5403. DOI: [10.1038/s41418-017-0012-4](https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4). URL: <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>.
- Galsgaard, Elisabeth D, Jens H Nielsen y Annette Møldrup (1999). «Regulation of Prolactin Receptor (PRLR) Gene Expression in Insulin-producing Cells: PROLACTIN AND GROWTH HORMONE ACTIVATE ONE OF THE RAT PRLR GENE PROMOTERS VIA STAT5a AND STAT5b ». En: *Journal of Biological Chemistry* 274.26, págs. 18686-18692. DOI: [10.1074/jbc.274.26.18686](https://doi.org/10.1074/jbc.274.26.18686). URL: <http://www.jbc.org/content/274/26/18686.abstract>.
- Gandhi, S y AY Abramov (2012). «Mechanism of Oxidative Stress in Neurodegeneration». En: *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2012, pág. 11. URL: <http://dx.doi.org/10.1155/2012/428010>].
- Gao, Zhijie, Helei Wang, Bo Zhang, Xuemei Wu, Yanfeng Zhang, Pengfei Ge, Guangfan Chi y Jianmin Liang (2018). «Trehalose inhibits H₂O₂-induced autophagic death in dopaminergic SH-SY5Y cells via mitigation of ROS-dependent endoplasmic reticulum stress and AMPK activation.» eng. En: *International journal of medical sciences* 15.10, págs. 1014-1024. ISSN: 1449-1907 (Electronic). DOI: [10.7150/ijms.25656](https://doi.org/10.7150/ijms.25656).

- Geng, Xin, Lixin Ma, Zefu Li, Zhenzhu Li, Jianmin Li, Meng Li, Qingbo Wang, Zheng Chen y Qikai Sun (2017). «Bromocriptine Induces Autophagy-Dependent Cell Death in Pituitary Adenomas». En: *World Neurosurgery* 100, págs. 407-416. ISSN: 18788769. DOI: [10.1016/j.wneu.2017.01.052](https://doi.org/10.1016/j.wneu.2017.01.052). URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S187887501730075X?via=ihub>.
- Ghavami, Saeid y col. (2014). «Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders». En: *Progress in Neurobiology* 112, págs. 24-49. ISSN: 0301-0082. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.10.004>. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301008213001044>.
- Ginet, Vanessa, Amélie Spiehlmann, Coralie Rummel, Nikita Rudinskiy, Yulia Grishchuk, Ruth Luthi-Carter, Peter G H Clarke, Anita C Truttmann y Julien Puyal (2014). «Involvement of autophagy in hypoxic-excitotoxic neuronal death.» eng. En: *Autophagy* 10.5, págs. 846-860. ISSN: 1554-8635 (Electronic). DOI: [10.4161/auto.28264](https://doi.org/10.4161/auto.28264).
- Grattan, D R e I C Kokay (2008). «Prolactin: A Pleiotropic Neuroendocrine Hormone». En: *Journal of Neuroendocrinology* 20, págs. 752-763.
- Green, Douglas R y Fabien Llambi (2015). «Cell Death Signaling.» eng. En: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 7.12. ISSN: 1943-0264 (Electronic). DOI: [10.1101/cshperspect.a006080](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006080).
- Halliwell, Barry (2006). «Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?» En: *Journal of Neurochemistry* 97.6, págs. 1634-1658. DOI: [10.1111/j.1471-4159.2006.03907.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03907.x). URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1471-4159.2006.03907.x>.
- Halperin, Julia y col. (2008). «Prolactin signaling through the short form of its receptor represses forkhead transcription factor FOXO3 and its target gene galt causing a severe ovarian defect.» eng. En: *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 22.2, págs. 513-522. ISSN: 0888-8809 (Print). DOI: [10.1210/me.2007-0399](https://doi.org/10.1210/me.2007-0399).
- Halterman, Marc W, Craig C Miller y Howard J Federoff (1999). «Hypoxia-Inducible Factor-1 α Mediates Hypoxia-Induced Delayed Neuronal Death That Involves p53». En: *The Journal of Neuroscience* 19.16, 6818 LP -6824. DOI: [10.1523/JNEUROSCI.19-16-06818.1999](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-16-06818.1999). URL: <http://www.jneurosci.org/content/19/16/6818.abstract>.
- Havránek, T, Z Bačová, V Štrbák, Z Leštanová y J Bakoš (2014). «Prolactin Increases Expression of Cytoskeletal Proteins in SK-N-SH Cells». En: *Folia Biologica* 60, págs. 281-285.
- Hess, Michael L y Nancy H Manson (1984). «Molecular oxygen: Friend and foe: The role of the oxygen free radical system in the calcium paradox, the oxygen paradox and ischemia/reperfusion injury». En: *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 16.11, págs. 969-985. ISSN: 0022-2828. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0022-2828\(84\)80011-5](https://doi.org/10.1016/S0022-2828(84)80011-5). URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022282884800115>.

- Higgins, Gavin C, Rodney J Devenish, Philip M Beart y Phillip Nagley (2011). «Autophagic activity in cortical neurons under acute oxidative stress directly contributes to cell death». En: *Cellular and Molecular Life Sciences* 68.22, págs. 3725-3740. ISSN: 1420-9071. DOI: [10.1007/s00018-011-0667-9](https://doi.org/10.1007/s00018-011-0667-9). URL: <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0667-9>.
- Höhn, Annika, Jeannette König y Tilman Grune (2013). «Protein oxidation in aging and the removal of oxidized proteins». En: *Journal of Proteomics* 92, págs. 132-159. ISSN: 1874-3919. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.01.004>. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874391913000213>.
- Ignakak, A, M Kasztelnik, T Sliwa, R A Korbut, K Rajda y T J Guzik (2012). «Prolactin Not Only Lactotrophin a “New” View of the “Old” Hormone». En: *Journal of Physiology and Pharmacology* 63.5, págs. 435-443.
- Jakob, S, K Schraut, G Schmitt, C Scholz, G Ortega, H W Steinbusch, K Lesch y D van den Hove (2014). «Differential Effects of Prenatal Stress in Female 5 Htt Deficient Mice: Towards Molecular Mechanisms of Resilience». En: *Developmental Neuroscience* 36, págs. 454-464.
- Jiang, Yuan y col. (2018). «Exosomes secreted by HUVECs attenuate hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis in neural cells by suppressing miR-21-3p.» eng. En: *American journal of translational research* 10.11, págs. 3529-3541. ISSN: 1943-8141 (Print).
- Jomova, Klaudia, Dagmar Vondrakova, Michael Lawson y Marian Valko (2010). «Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders». En: *Molecular and Cellular Biochemistry* 345.1, págs. 91-104. ISSN: 1573-4919. DOI: [10.1007/s11010-010-0563-x](https://doi.org/10.1007/s11010-010-0563-x). URL: <https://doi.org/10.1007/s11010-010-0563-x>.
- Julien, Olivier y James A Wells (2017). «Caspases and their substrates». En: *Cell Death And Differentiation* 24, pág. 1380. URL: <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.44><http://10.0.4.14/cdd.2017.44>.
- Jung, Tobias, Annika Höhn y Tilman Grune (2014). «The proteasome and the degradation of oxidized proteins: Part II – protein oxidation and proteasomal degradation». En: *Redox Biology* 2, págs. 99-104. ISSN: 2213-2317. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.12.008>. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213231713000967>.
- Kannan, Krishnaswamy y Sushil K Jain (2000). «Oxidative stress and apoptosis». En: *Pathophysiology* 7.3, págs. 153-163. ISSN: 0928-4680. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0928-4680\(00\)00053-5](https://doi.org/10.1016/S0928-4680(00)00053-5). URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928468000000535>.

- Kim, Geon Ha, Jieun E. Kim, Sandy Jeong Rhie y Sujung Yoon (dic. de 2015). «The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases». En: *Exp Neurobiol* 24.4, págs. 325-340. URL: <http://synapse.koreamed.org/D0Ix.php?id=10.5607%2Fen.2015.24.4.325>.
- Koike, Masato y col. (2008). «Inhibition of Autophagy Prevents Hippocampal Pyramidal Neuron Death after Hypoxic-Ischemic Injury». En: *The American Journal of Pathology* 172.2, págs. 454-469. ISSN: 0002-9440. DOI: <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.070876>. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0002944010618111>.
- Kowiański, Przemysław, Grażyna Lietzau, Ewelina Czuba, Monika Waśkow, Aleksandra Steliga y Janusz Moryś (2018). «BDNF: A Key Factor with Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity.» eng. En: *Cellular and molecular neurobiology* 38.3, págs. 579-593. ISSN: 1573-6830 (Electronic). DOI: [10.1007/s10571-017-0510-4](https://doi.org/10.1007/s10571-017-0510-4).
- Krumenacker, Joshua S, Donna J Buckley, Matthew A Leff, John T McCormack, Gary de Jong, Peter W Gout, John C Reed, Toshiyuki Miyashita, Nancy S Magnuson y Arthur R Buckley (1998). «Prolactin-regulated apoptosis of Nb2 lymphoma cells». En: *Endocrine* 9.2, págs. 163-170. ISSN: 1559-0100. DOI: [10.1385/ENDO:9:2:163](https://doi.org/10.1385/ENDO:9:2:163). URL: <https://doi.org/10.1385/ENDO:9:2:163>.
- Larsen, C M y D R Grattan (2012). «Prolactin, neurogenesis, and maternal behaviors». En: *Brain, Behavior and Immunity* 26, págs. 109-201.
- Le Bras, M, MV Clement, S Pervaiz y C. Brenner (2005). «Reactive oxygen species and the mitochondrial signaling pathway of cell death». En: *Histol Histopathol* 20.1, págs. 205-219.
- Lee, Jisun, Samantha Giordano y Jianhua Zhang (2012). «Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling.» eng. En: *The Biochemical journal* 441.2, págs. 523-540. ISSN: 1470-8728 (Electronic). DOI: [10.1042/BJ20111451](https://doi.org/10.1042/BJ20111451).
- Li, Song y Weidong Le (2017). «An insight review of autophagy biology and neurodegenerative diseases: machinery, mechanisms and regulation». En: *Science China Life Sciences* 60.12, págs. 1457-1459. ISSN: 1869-1889. DOI: [10.1007/s11427-017-9214-7](https://doi.org/10.1007/s11427-017-9214-7). URL: <https://doi.org/10.1007/s11427-017-9214-7>.
- Lim, Yun, Hanchae Cho y Eun-Kyoung Kim (2016). «Brain metabolism as a modulator of autophagy in neurodegeneration». En: *Brain Research* 1649, págs. 158-165. ISSN: 0006-8993. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.02.049>. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006899316301202>.
- Lin, Michael T y M Flint Beal (2006). «Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases». En: *Nature* 443, pág. 787. URL: <https://doi.org/10.1038/nature05292><http://10.0.4.14/nature05292>.
- Ling, Charlotte, Håkan Wennbo, Karin Dillner, Maria Gebre-Medhin, Björn Carlsson, Gunnel Hellgren y Håkan Billig (2000). «Prolactin (PRL) Receptor Gene Expression in Mouse

- Adipose Tissue: Increases during Lactation and in PRL-Transgenic Mice*». En: *Endocrinology* 141.10, págs. 3564-3572. ISSN: 0013-7227. DOI: [10.1210/endo.141.10.7691](https://doi.org/10.1210/endo.141.10.7691). URL: <https://dx.doi.org/10.1210/endo.141.10.7691>.
- Liu, Y y B Levine (2015). «Autosis and autophagic cell death: the dark side of autophagy.» eng. En: *Cell death and differentiation* 22.3, págs. 367-376. ISSN: 1476-5403 (Electronic). DOI: [10.1038/cdd.2014.143](https://doi.org/10.1038/cdd.2014.143).
- Liu, Yang, Lei Wang, Yang Du, Zhiyuan Chen, Jia Guo, Xiaodong Weng, Xiao Wang, Min Wang, Danyang Chen y Xiuheng Liu (2017). «Effects of apigenin pretreatment against renal ischemia/reperfusion injury via activation of the JAK2/STAT3 pathway». En: *Bio-medicine & Pharmacotherapy* 95, págs. 1799-1808. ISSN: 0753-3322. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.09.091>. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0753332217328986>.
- Maritim, A C, R A Sanders y J B Watkins III (2003). «Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A review». En: *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 17.1, págs. 24-38. DOI: [10.1002/jbt.10058](https://doi.org/10.1002/jbt.10058). URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jbt.10058>.
- Mattson, Mark P (2000). «Apoptosis in neurodegenerative disorders». En: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 1, pág. 120. URL: <https://doi.org/10.1038/35040009><http://10.0.4.14/35040009>.
- McArthur, Kate, Stephane Chappaz y Benjamin T Kile (2018). «Apoptosis in megakaryocytes and platelets: the life and death of a lineage». En: *Blood* 131.6, 605 LP -610. DOI: [10.1182/blood-2017-11-742684](https://doi.org/10.1182/blood-2017-11-742684). URL: <http://www.bloodjournal.org/content/131/6/605.abstract>.
- McIlwain, David R, Thorsten Berger y Tak W Mak (2013). «Caspase functions in cell death and disease.» eng. En: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5.4, a008656. ISSN: 1943-0264 (Electronic). DOI: [10.1101/cshperspect.a008656](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008656).
- Meléndez García, Rodrigo y col. (2016). «Prolactin protects retinal pigment epithelium by inhibiting sirtuin 2-dependent cell death». En: *EBioMedicine* 7, págs. 35-49. ISSN: 23523964. DOI: [10.1016/j.ebiom.2016.03.048](https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.03.048). URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352396416301359?via=ihub>.
- Miao, Li Jun, Feng Xiang Huang, Zhen Tao Sun, Rui Xia Zhang, Shi Fu Huang y Jing Wang (2014). «Stat3 inhibits Beclin 1 expression through recruitment of HDAC3 in nonsmall cell lung cancer cells». En: *Tumor Biology* 35.7, págs. 7097-7103. ISSN: 14230380. DOI: [10.1007/s13277-014-1961-6](https://doi.org/10.1007/s13277-014-1961-6). URL: <https://doi.org/10.1007/s13277-014-1961-6>.

- Mizushima, Noboru y Masaaki Komatsu (2011). *Autophagy: Renovation of cells and tissues*. DOI: [10.1016/j.cell.2011.10.026](https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.026). URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867411012761?via=ihub>.
- Mödersheim, T A E, T Gorba, P Pathipati, I C Kokay, D R Grattan, C E Williams y A Sheepens (2007). «Prolactin is involved in glial responses following a focal injury to the juvenile rat brain». En: *Neuroscience* 145, págs. 963-973.
- Morales, T (2011). «Recent Findings on Neuroprotection Against Excitotoxicity in the Hippocampus of Female Rats». En: *Journal of Neuroendocrinology* 23, págs. 994-1001.
- Mosmann, Tim (1983). «Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays». En: *Journal of Immunological Methods* 65.1, págs. 55-63. ISSN: 0022-1759. DOI: [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4). URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022175983903034>.
- Murphy, Michael P (2016). «Understanding and preventing mitochondrial oxidative damage.» eng. En: *Biochem Soc Trans* 44.5, págs. 1219-1226. ISSN: 1470-8752 (Electronic); 0300-5127 (Print); 0300-5127 (Linking). DOI: [10.1042/BST20160108](https://doi.org/10.1042/BST20160108).
- Naruse, Ichiro e Hiromi Keino (1995). «Apoptosis in the developing CNS». En: *Progress in Neurobiology* 47.2, págs. 135-155. ISSN: 0301-0082. DOI: [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(95\)00024-P](https://doi.org/10.1016/0301-0082(95)00024-P). URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/030100829500024P>.
- Navarro-Yepes, Juliana y col. (2014). «Antioxidant gene therapy against neuronal cell death.» eng. En: *Pharmacology & therapeutics* 142.2, págs. 206-230. ISSN: 1879-016X (Electronic). DOI: [10.1016/j.pharmthera.2013.12.007](https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.12.007).
- Nickel, Alexander, Michael Kohlhaas y Christoph Maack (2014). «Mitochondrial reactive oxygen species production and elimination». En: *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 73, págs. 26-33. ISSN: 0022-2828. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.03.011>. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022282814000881>.
- Nikoletopoulou, Vassiliki, Maria Markaki, Konstantinos Palikaras y Nektarios Tavernarakis (2013). «Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy». En: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1833.12, págs. 3448-3459. ISSN: 0167-4889. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.06.001>. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167488913002243>.
- Niu, Guilian y col. (2005). «Role of Stat3 in regulating p53 expression and function.» eng. En: *Molecular and cellular biology* 25.17, págs. 7432-7440. ISSN: 0270-7306 (Print). DOI: [10.1128/MCB.25.17.7432-7440.2005](https://doi.org/10.1128/MCB.25.17.7432-7440.2005).
- Ogata, Masato, Naoya Nakai, Takahiko Fujikawa, Hideaki Soya, Kellie L K Tamashiro, Randall R Sakai, Bruce S McEwen, Ikukatsu Suzuki y Kunio Nakashima (2004). «Prolactin

- Prevents Acute Stress-Induced Hypocalcemia and Ulcerogenesis by Acting in the Brain of Rat». En: *Endocrinology* 145.4, págs. 2006-2013. ISSN: 0013-7227. DOI: [10.1210/en.2003-1446](https://doi.org/10.1210/en.2003-1446). URL: <https://dx.doi.org/10.1210/en.2003-1446>.
- Ohsumi, Yoshinori (2014). «Historical landmarks of autophagy research.» eng. En: *Cell Res* 24.1, págs. 9-23. ISSN: 1748-7838 (Electronic); 1001-0602 (Print); 1001-0602 (Linking). DOI: [10.1038/cr.2013.169](https://doi.org/10.1038/cr.2013.169).
- Ott, Martin, Vladimir Gogvadze, Sten Orrenius y Boris Zhivotovsky (2007). «Mitochondria, oxidative stress and cell death». En: *Apoptosis* 12.5, págs. 913-922. ISSN: 1573-675X. DOI: [10.1007/s10495-007-0756-2](https://doi.org/10.1007/s10495-007-0756-2). URL: <https://doi.org/10.1007/s10495-007-0756-2>.
- Parzych, Katherine R y Daniel J Klionsky (2014). «An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation.» eng. En: *Antioxid Redox Signal* 20.3, págs. 460-473. ISSN: 1557-7716 (Electronic); 1523-0864 (Print); 1523-0864 (Linking). DOI: [10.1089/ars.2013.5371](https://doi.org/10.1089/ars.2013.5371).
- Patel, Manisha (2016). «Targeting Oxidative Stress in Central Nervous System Disorders». En: *Trends in Pharmacological Sciences* 37.9, págs. 768-778. ISSN: 0165-6147. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.06.007>. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165614716300748>.
- Pathipati, P, T Gorba, A Scheepens, V Goffin, Y Sun y M Fraser (2011). «Growth Hormone and Prolactin Regulate Human Neural Stem Cell Regenerate Activity». En: *Neuroscience* 190, págs. 409-427.
- Pereira-Suarez, A L, G López-Rincón, P A Martínez-Neri y C Estrada-Chavez (2015). «Prolactin in Inflammatory Response». En: *Advances in Experimental Medicine and Biology* 846, págs. 243-264.
- Portt, Liam, Grant Norman, Caitlin Clapp, Matthew Greenwood y Michael T Greenwood (2011). «Anti-apoptosis and cell survival: A review». En: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1813.1, págs. 238-259. ISSN: 0167-4889. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.10.010>. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167488910002764>.
- Prigent-Tessier, Anne, Christian Tessier, Susan Ferguson-Gottschall, Yan Gu y Geula Gibori (2001). «PRL Antiapoptotic Effect in the Rat Decidua Involves the PI3K/Protein Kinase B-Mediated Inhibition of Caspase-3 Activity». En: *Endocrinology* 142.9, págs. 4086-4094. ISSN: 0013-7227. DOI: [10.1210/endo.142.9.8381](https://doi.org/10.1210/endo.142.9.8381). URL: <https://dx.doi.org/10.1210/endo.142.9.8381>.
- Radoshevich, Lilliana, Lyndsay Murrow, Nan Chen, Estefania Fernandez, Srirupa Roy, Christopher Fung y Jayanta Debnath (2010). «ATG12 conjugation to ATG3 regulates mitochondrial homeostasis and cell death.» eng. En: *Cell* 142.4, págs. 590-600. ISSN: 1097-4172 (Electronic). DOI: [10.1016/j.cell.2010.07.018](https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.07.018).

- Rami, Abdelhaq y Donat Kögel (2008). «Apoptosis meets autophagy-like cell death in the ischemic penumbra: Two sides of the same coin?» En: *Autophagy* 4.4. PMID: 18319639, págs. 422-426. DOI: [10.4161/auto.5778](https://doi.org/10.4161/auto.5778). eprint: <https://doi.org/10.4161/auto.5778>. URL: <https://doi.org/10.4161/auto.5778>.
- Ray, Paul D., Bo Wen Huang y Yoshiaki Tsuji (2012). *Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling*. DOI: [10.1016/j.cellsig.2012.01.008](https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.01.008). arXiv: [NIHMS150003](https://arxiv.org/abs/1500003). URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0898656812000137?via=ihub>.
- Redza-Dutordoir, Maureen y Diana A Averill-Bates (2016). «Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species». En: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1863.12, págs. 2977-2992. ISSN: 0167-4889. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.09.012>. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167488916302324>.
- Reyes-Mendoza, Julio y Teresa Morales (2016). «Post-treatment with prolactin protects hippocampal CA1 neurons of the ovariectomized female rat against kainic acid-induced neurodegeneration». En: *Neuroscience* 328, págs. 58-68. ISSN: 18737544. DOI: [10.1016/j.neuroscience.2016.04.030](https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.04.030). URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306452216301038?via=ihub>.
- Rivero-Segura, Nadia A., Edgar Flores-Soto, Selene García De La Cadena, Isabel Coronado-Mares, Juan C. Gomez-Verjan, Diana G. Ferreira, Erika Alejandra Cabrera-Reyes, Luísa V. Lopes, Lourdes Massieu y Marco Cerbón (2017). «Prolactin-induced neuroprotection against glutamate excitotoxicity is mediated by the reduction of [Ca²⁺]_i overload and NF- κ B activation». En: *PLoS ONE* 12.5. ISSN: 19326203. DOI: [10.1371/journal.pone.0176910](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176910).
- Robertson, George S, Stephen J Crocker, Donald W Nicholson y Jörg B Schulz (2000). «Neuroprotection by the Inhibition of Apoptosis». En: *Brain Pathology* 10.2, págs. 283-292. DOI: [10.1111/j.1750-3639.2000.tb00262.x](https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2000.tb00262.x). URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1750-3639.2000.tb00262.x>.
- Roselli, C E, S Bocklandt, H L Stadelman, T Wadsworth, E Vilain y F Stormshak (2008). «Prolactin Expression in the Sheep Brain». En: *Neuroendocrinology* 87, págs. 206-215.
- Rubinstein, Assaf D., Miriam Eisenstein, Yaara Ber, Shani Bialik y Adi Kimchi (2011). «The Autophagy Protein Atg12 Associates with Antiapoptotic Bcl-2 Family Members to Promote Mitochondrial Apoptosis». En: *Molecular Cell* 44.5, págs. 698-709. DOI: [10.1016/j.molcel.2011.10.014](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.10.014). URL: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.10.014>.
- Ryter, Stefan W, Hong Pyo Kim, Alexander Hoetzel, Jeong W Park, Kiichi Nakahira, Xue Wang y Augustine M K Choi (2007). «Mechanisms of Cell Death in Oxidative Stress».

- En: *Antioxidants & Redox Signaling* 9.1, págs. 49-89. DOI: [10.1089/ars.2007.9.49](https://doi.org/10.1089/ars.2007.9.49). URL: <https://doi.org/10.1089/ars.2007.9.49>.
- Sakamaki, Jun-Ichi, Jaclyn S Long, Maria New, Tim Van Acker, Sharon A Tooze y Kevin M Ryan (2018). «Emerging roles of transcriptional programs in autophagy regulation.» eng. En: *Transcription* 9.2, págs. 131-136. ISSN: 2154-1272 (Electronic). DOI: [10.1080/21541264.2017.1372045](https://doi.org/10.1080/21541264.2017.1372045).
- Shen, Dan Na, Li Hui Zhang, Er Qing Wei y Yi Yang (2015). «Autophagy in synaptic development, function, and pathology» . En: *Neuroscience Bulletin* 31.4, págs. 416-426. ISSN: 19958218. DOI: [10.1007/s12264-015-1536-6](https://doi.org/10.1007/s12264-015-1536-6). URL: <https://doi.org/10.1007/s12264-015-1536-6>.
- Son, Jin H, Jung Hee Shim, Kyung Hee Kim, Ji Young Ha y Ji Young Han (2012). «Neuronal autophagy and neurodegenerative diseases.» eng. En: *Experimental & molecular medicine* 44.2, págs. 89-98. ISSN: 2092-6413 (Electronic). DOI: [10.3858/emm.2012.44.2.031](https://doi.org/10.3858/emm.2012.44.2.031).
- Soya, H, H Yoshizato, K Doh-Ura, K Nakashima, K Sakaguchi, M Tanaka y T Fujikawa (1995). «Restraint stress enhances the gene expression of prolactin receptor long form at the choroid plexus» . En: *Endocrinology* 136.12, págs. 5608-5613. ISSN: 0013-7227. DOI: [10.1210/endo.136.12.7588315](https://doi.org/10.1210/endo.136.12.7588315). URL: <https://dx.doi.org/10.1210/endo.136.12.7588315>.
- Stenger, C., T. Naves, M. Verdier y M Ratinaud (2011). «The cell death response to the ROS inducer, cobalt chloride, in neuroblastoma cell lines according to p53 status» . En: *International Journal of Oncology* 39, págs. 601-609.
- Sulaiman, N.B., C.D. Mohan, S. Basappa, V. Pandey, S. Rangappa, H. Bharathkumar y K.S. Rangappa (2016). «An azaspirane derivative suppresses growth and induces apoptosis of ER-positive and ER-negative breast cancer cells through the modulation of JAK2/STAT3 signaling pathway.» En: *International Journal of Oncology* 49, págs. 1221-1229.
- Sun, Dawei, Wenying Wang, Xintao Wang, Yan Wang, Xiaotao Xu, Feng Ping, Yu Du, Wei Jiang y Derong Cui (2018). «bFGF plays a neuroprotective role by suppressing excessive autophagy and apoptosis after transient global cerebral ischemia in rats» . En: *Cell Death & Disease* 9.2, pág. 172. ISSN: 2041-4889. DOI: [10.1038/s41419-017-0229-7](https://doi.org/10.1038/s41419-017-0229-7). URL: <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0229-7>.
- Sureshbabu, Angara, Stefan W Ryter y Mary E Choi (2015). «Oxidative stress and autophagy: crucial modulators of kidney injury.» eng. En: *Redox biology* 4, págs. 208-214. ISSN: 2213-2317 (Electronic). DOI: [10.1016/j.redox.2015.01.001](https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.001).
- Tan, Chen-Chen, Jin-Tai Yu, Meng-Shan Tan, Teng Jiang, Xi-Chen Zhu y Lan Tan (2014). «Autophagy in aging and neurodegenerative diseases: implications for pathogenesis and therapy» . En: *Neurobiology of Aging* 35.5, págs. 941-957. ISSN: 0197-4580. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.05.001>.

- [org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.11.019](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0197458013005873). URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0197458013005873>.
- Tan, Shirlee, Malcolm Wood y Pamela Maher (1998). «Oxidative Stress Induces a Form of Programmed Cell Death with Characteristics of Both Apoptosis and Necrosis in Neuronal Cells». En: *Journal of Neurochemistry* 71.1, págs. 95-105. DOI: [10.1046/j.1471-4159.1998.71010095.x](https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1998.71010095.x). URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1471-4159.1998.71010095.x>.
- Tejadilla, D, M Cerbón y T Morales (2010). «Prolactin Reduces the Damaging Effects of Exitotoxicity in the Dorsal Hippocampus of the Female Rat Independently of ovarian hormones». En: *Neuroscience* 169, págs. 1178-1185.
- Thébault, Stéphanie (2017). *Potential mechanisms behind the antioxidant actions of prolactin in the retina*. DOI: [10.1016/j.exer.2017.03.014](https://doi.org/10.1016/j.exer.2017.03.014). URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014483516303487?via=ihub>.
- Todorovic, Michael, Stephen A Wood y George D Mellick (2016). «Nrf2: a modulator of Parkinson's disease?» En: *Journal of Neural Transmission* 123.6, págs. 611-619. ISSN: 1435-1463. DOI: [10.1007/s00702-016-1563-0](https://doi.org/10.1007/s00702-016-1563-0). URL: <https://doi.org/10.1007/s00702-016-1563-0>.
- Torner, L (2016). «Actions of Prolactin in the Brain: From Physiological Adaptations to Stress and Neurogenesis to Psychopathology». En: *Frontiers in Endocrinology* 7.25, págs. 1-6.
- Torner, L e I D Neumann (2000). «The Brain Prolactin System: Involvement in Stress Response Adaptations in Lactation». En: *Stress* 5.4, págs. 249-257.
- Torner, L, M Rodriguez, G Nava, J Aranda, C Clapp e I D Neumann (2004). «In vivo release and gene upregulation of brain prolactin in response to physiological stimuli». En: *European Journal of Neuroscience* 19, págs. 1601-1608.
- Torner, L, S Karg, A Blume, M Kandasamy, H G Kuhn, J Winkler, L Aigner e I A Neumann (2009). «Prolactin Prevents Chronic Stress Induced Decrease of Adult Hippocampal Neurogenesis and Promotes Neural Fate». En: *The Journal of Neuroscience* 29.6, págs. 1826-1833.
- Touyz, Rhian M (2012). «Chapter 69 - Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress». En: *Primer on the Autonomic Nervous System (Third Edition)*. Ed. por David Robertson, Italo Biaggioni, Geoffrey Burnstock, Phillip A Low y Julian F R Paton. Third Edit. San Diego: Academic Press, págs. 335-338. ISBN: 978-0-12-386525-0. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386525-0.00069-X>. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012386525000069X>.
- Tsuchihashi, Nana Akagi, Ken Hayashi, Katsuaki Dan, Fumiyuki Goto, Yasuyuki Nomura, Masato Fujioka, Sho Kanzaki, Shizuo Komune y Kaoru Ogawa (2015). «Autophagy through 4EBP1 and AMPK regulates oxidative stress-induced premature senescence in

- auditory cells.» eng. En: *Oncotarget* 6.6, págs. 3644-3655. ISSN: 1949-2553 (Electronic). DOI: [10.18632/oncotarget.2874](https://doi.org/10.18632/oncotarget.2874).
- Ulloa, M (2018). «El papel protector de la prolactina sobre el daño inducido por un estrés oxidativo en astrocitos de rata». Tesis de maestría. Instituto de Neurobiología, Universidad Autónoma de México.
- Vanoye-Carlo, América, Teresa Morales, Eugenia Ramos, Adriana Mendoza-Rodríguez y Marco Cerbón (2008). «Neuroprotective effects of lactation against kainic acid treatment in the dorsal hippocampus of the rat». En: *Hormones and Behavior* 53.1, págs. 112-123. ISSN: 0018506X. DOI: [10.1016/j.yhbeh.2007.09.004](https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2007.09.004). URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0018506X07002115?via=ihub>.
- Vengellur, A y J J LaPres (2004). «The Role of Hypoxia Inducible Factor 1 α in Cobalt Chloride Induced Cell Death in Mouse Embryonic Fibroblasts». En: *Toxicological Sciences* 82.2, págs. 638-646. ISSN: 1096-6080. DOI: [10.1093/toxsci/kfh278](https://doi.org/10.1093/toxsci/kfh278). URL: <https://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfh278>.
- Vergara-Castañeda, E., D. R. Grattan, H. Pasantes-Morales, M. Pérez-Domínguez, E. A. Cabrera-Reyes, T. Morales y M. Cerbón (2016). «Prolactin mediates neuroprotection against excitotoxicity in primary cell cultures of hippocampal neurons via its receptor». En: *Brain Research* 1636, págs. 192-199. ISSN: 18726240. DOI: [10.1016/j.brainres.2016.02.011](https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.02.011). URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006899316300452?via=ihub>.
- Walker, T L, J Vukovik, M M Koudijs, D G Blackmore, E W Mackay, A M Sykes, R W Overall, A S Hamlin y P F Bartlett (2012). «Prolactin Estimulates Precursor Cells in the Adult Mouse Hippocampus». En: *PLoS ONE* 7.9, e44371.
- Wang, Pei, Bo-Zong Shao, Zhiqiang Deng, Shi Chen, Zhenyu Yue y Chao-Yu Miao (2018). «Autophagy in ischemic stroke». En: *Progress in Neurobiology* 163-164, págs. 98-117. ISSN: 0301-0082. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2018.01.001>. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301008217301442>.
- Weimann, Edda, Elena Baixeras, Naoufal Zamzami y Paul Kelly (1999). «Prolactin blocks glucocorticoid induced cell death by inhibiting the disruption of the mitochondrial membrane». En: *Leukemia Research* 23.8, págs. 751-762. ISSN: 0145-2126. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0145-2126\(99\)00050-8](https://doi.org/10.1016/S0145-2126(99)00050-8). URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0145212699000508>.
- Wen, Yunfei y col. (2014). «Antagonism of Tumoral Prolactin Receptor Promotes Autophagy-Related Cell Death». En: *Cell Reports* 7.2, págs. 488-500. ISSN: 22111247. DOI: [10.1016/j.celrep.2014.03.009](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.03.009). arXiv: [NIHMS150003](https://arxiv.org/abs/NIHMS150003).

- Winterbourn, Christine C y Mark B Hampton (2008). «Thiol chemistry and specificity in redox signaling». En: *Free Radical Biology and Medicine* 45.5, págs. 549-561. ISSN: 0891-5849. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.05.004>. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891584908002803>.
- Wolf, Michael S, Hülya BayÄ±r, Patrick M Kochanek y Robert S B Clark (2019). «The role of autophagy in acute brain injury: A state of flux?» En: *Neurobiology of Disease* 122, págs. 9-15. ISSN: 0969-9961. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.04.018>. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0969996118301335>.
- Yakovlev, Alexander G y Alan I Faden (2001). «Caspase-dependent apoptotic pathways in CNS injury». En: *Molecular Neurobiology* 24.1, págs. 131-144. ISSN: 1559-1182. DOI: [10.1385/MN:24:1-3:131](https://doi.org/10.1385/MN:24:1-3:131). URL: <https://doi.org/10.1385/MN:24:1-3:131>.
- Yamaguchi, Yoshifumi y Masayuki Miura (2015). «Programmed Cell Death in Neurodevelopment». En: *Developmental Cell* 32.4, págs. 478-490. ISSN: 1534-5807. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.01.019>. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1534580715000623>.
- Yang, Yang y col. (2013). «JAK2/STAT3 activation by melatonin attenuates the mitochondrial oxidative damage induced by myocardial ischemia/reperfusion injury». En: *Journal of Pineal Research* 55.3, págs. 275-286. DOI: [10.1111/jpi.12070](https://doi.org/10.1111/jpi.12070). URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jpi.12070>.
- You, Liangkun, Zhanggui Wang, Hongsen Li, Jiawei Shou, Zhao Jing, Jiansheng Xie, Xinning Sui, Hongming Pan y Weidong Han (2015). «The role of STAT3 in autophagy.» eng. En: *Autophagy* 11.5, págs. 729-739. ISSN: 1554-8635 (Electronic). DOI: [10.1080/15548627.2015.1017192](https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1017192).
- Yu, Yan, Wanting Li, Liqin Ren, Chunyan Yang, Dongze Li, Xin Han, Yeying Sun, Changjun Lv y Fang Han (2018). «Inhibition of autophagy enhanced cobalt chloride-induced apoptosis in rat alveolar type II epithelial cells.» eng. En: *Molecular medicine reports* 18.2, págs. 2124-2132. ISSN: 1791-3004 (Electronic). DOI: [10.3892/mmr.2018.9209](https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9209).
- Zhao, Jinghui, Jeffrey J Brault, Andreas Schild, Peirang Cao, Marco Sandri, Stefano Schiaffino, Stewart H Lecker y Alfred L Goldberg (2007). «FoxO3 Coordinately Activates Protein Degradation by the Autophagic/Lysosomal and Proteasomal Pathways in Atrophying Muscle Cells». En: *Cell Metabolism* 6.6, págs. 472-483. ISSN: 1550-4131. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.11.004>. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1550413107003397>.
- Zhou, Xian-Yong y col. (2017). «Inhibition of autophagy blocks cathepsins-tBid-mitochondrial apoptotic signaling pathway via stabilization of lysosomal membrane in ischemic astrocy-

tes.» eng. En: *Cell death & disease* 8.2, e2618. ISSN: 2041-4889 (Electronic). DOI: [10.1038/cddis.2017.34](https://doi.org/10.1038/cddis.2017.34).

Zou, Weiguo, Mingda Yan, Weijing Xu, Hairong Huo, Lanying Sun, Zhongcheng Zheng y Xinyuan Liu (2001). «Cobalt chloride induces PC12 cells apoptosis through reactive oxygen species and accompanied by AP-1 activation». En: *Journal of Neuroscience Research* 64.6, págs. 646-653. DOI: [10.1002/jnr.1118](https://doi.org/10.1002/jnr.1118). URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jnr.1118>.

Zou, Weiguo, Jiping Zeng, Ming Zhuo, Weijing Xu, Lanying Sun, Jinxing Wang y Xinyuan Liu (2002). «Involvement of caspase-3 and p38 mitogen-activated protein kinase in cobalt chloride-induced apoptosis in PC12 cells». En: *Journal of Neuroscience Research* 67.6, págs. 837-843. DOI: [10.1002/jnr.10168](https://doi.org/10.1002/jnr.10168). URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jnr.10168>.