



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

***El efecto de la prolactina sobre los sistemas antioxidantes en
cultivos primarios de neuronas hipocampales de rata***

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

María Isabel Coronado Mares

México, DF. AÑO 2016





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Zambrano González Elena

VOCAL: Profesor: Pedraza Chaverri José

SECRETARIO: Profesor: Cerbón Cervantes Marco Antonio

1er. SUPLENTE: Profesor: Camacho Arroyo Ignacio

2° SUPLENTE: Profesor: Martínez Castilla León Patricio

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Unidad de Investigación en reproducción humana, Instituto Nacional de Perinatología.

Facultad de Química, UNAM

Asesor del tema:

Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes

Supervisor técnico:

Biól. Nadia Alejandra Rivero Segura

Sustentante:

María Isabel Coronado Mares

"Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas."

Marie Curie

Agradecimientos Académicos

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por permitirme crecer académicamente y vivir muchas experiencias dentro de esta, mi segunda casa.

Al Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes por darme la oportunidad de desarrollar el proyecto en su laboratorio, por haber sido una de las primeras personas que creyó en mí y me dio la oportunidad de participar en más proyectos. Que el crecimiento que adquirí durante todo este tiempo fue muy satisfactorio. No solo fue un tutor para mí, fue una fuente de inspiración y admiración. Por qué me demostró que con perseverancia y determinación se pueden lograr grandes cosas. Que lo México necesita son grandes investigadores y el primer paso para lograrlo es formar personas con calidad científica.

A la Biol. Nadia Rivero Segura por su asesoría técnica y valiosas contribuciones a la tesis.

Al Dr. José Pedreza Chaverri y la Dra. Elena Zambrano por asesorar, criticar e impulsar este proyecto tan enriquecedor para mí.

Al Dr. Ignacio González por su apoyo y su asesoría en el manejo del cuarto de cultivo.

Al Dr. Edgar Vergara por sus valiosas contribuciones y manejo de técnicas en el laboratorio.

Al Dr. Israel Pérez Torres (Instituto Nacional de Cardiología) por el apoyo brindado en la realización de algunas técnicas.

A la Dra. Perla Casteñeda por su apoyo brindado a lo largo de mi carrera, no solo estuvo para mí en aspectos académicos, sino estuvo en gran medida como un sostén, como una guía a lo largo de muchos proyectos de la sociedad estudiantil para el beneficio de nuestra H. Facultad de Química.

A la QFB Guadalupe Castorena por su apoyo brindado durante mi estancia en la Facultad.

Y a cada uno de los miembros del laboratorio 206 de Química "F" por su apoyo incondicional, estos últimos 3 años de mi vida.

Agradecimientos personales y dedicatorias

Quiero agradecer a mis padres y patrocinadores Marina y Fernando por darme la vida, por cuidar de mí siempre, por creer en mí cuando yo me daba por vencida, por limpiar mis lágrimas, por levantarme cuando pensé que ya no podía dar ni paso más, por las noches de desvelo que les hice pasar, por aguantarme en mis malos días, en mis ausencias. Y por supuesto por todas esas alegrías, todas las risas, las cosquillas y toda la diversión que gracias a Dios han sido infinitas. Por hacer que un pedazo de carbón se convierta poco a poco en un hermoso diamante. Gracias por todo recuerden que los amo mucho

A mi hermano Iván, mi chavo muchas gracias por ser mi hermanito por cuidar de mí y lo más importante por aguantarme con este mal genio que me cargo. Gracias por esas visitas a CU juntos, por las clases que tomamos juntos y lo más importante por toda toda la diversión y las risas a lo largo de nuestra vida. "Gemelos Fantásticos únense"

A mi abue Chabe que ya no tuvo la dicha de acompañarme en este día pero que me cuida desde el cielo y me bendice para que todo me vaya de maravilla.

A mis tíos Pepe, Rosy y Maribel por ser esos segundos padres, por guiarme, por los consejos. Por estar ahí para mí y quererme como a una hija. Los amo mucho.

A mis primas Chac, Chelo, Churrus, Chiquis por darle sazón a mi vida, por todas las risas, los enojos, las lágrimas, son como las hermanas que nunca tuve, las amo con todo mi corazón.

A mis sobrinos hermosos Iker y Emmanuel por todas esas risas, porque a pesar de ser muy pequeños son parte de este momento, que cuando sean mayores esto les sirva como inspiración para ser científicos, abogados, artistas, bomberos o astronautas lo que quieran ser, porque siempre estaré ahí para apoyarlos en sus sueños.

A Javier por estar ahí en esta última etapa de mi vida académica, por todo este amor y dedicación a nuestra relación. Por enseñarme a ver el mundo con tus ojos e ir escalando poco a poco esa gran montaña juntos. Por permitirme compartir esos grandes momentos de crecimiento personal porque sin duda somos y seremos una pareja Misión. Gracias al destino por habernos generado uno al otro. Te amo.

A mis amig@s Sughey, Tania, Pawi (Claudia), Selene, Nadia, Paez, Richard, Edgar, Karlita, Irene, Erika, Aline y Oscar que fueron parte fundamental de mi permanencia en la facultad, gracias por los desvelos, las series interminables, los reportes mal hechos, las siestas entre clases, por compartir esas medias comidas en cafetería, por esas juntas en la SEQFB, por tardes de dolor y alegría en el campo de juego. Por todas esas aventuras juntos muchas gracias.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	3
1. El papel de la prolactina en la neuroprotección	3
1.1 La prolactina (PRL)	3
1.2 La prolactina en la neuroprotección	5
2. Efectos producidos por excitotoxicidad	8
2.1 Funciones del glutamato	8
2.2 La recaptura del glutamato	10
2.3 Excitotoxicidad	11
3. Estructura y funcionamiento mitocondrial	11
3.1 Generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) en la mitocondria	13
3.2 Cadena transportadora de electrones	14
3.3 Disfunción mitocondrial	15
4. Estrés oxidante	16
4.1 Formación de Especies Reactivas de Oxígeno	16
4.2 Formación de Radicales Libres	17
4.3 Estrés oxidante	17
5. Sistema antioxidante celular	19
5.1 Sistemas antioxidantes enzimáticos	20
5.2 Sistemas antioxidantes no enzimáticos	23
6. La neurodegeneración y el estrés oxidante	26
II. JUSTIFICACIÓN	28
III. HIPOTESIS	29
IV. OBJETIVO	29
V. METODOLOGIA	30
5.1 Cultivo celular	30
5.2 Ensayo de viabilidad celular	32
5.3 Extracción y cuantificación de proteínas	33

5.4 Analisis de expresion proteinica	34
5.5 Determinacion de la actividad enzimatica	35
5.6 Ensayos de lipoperoxidacion	36
VI. RESULTADOS	38
6.1 La PRL induce sobrevivencia celular	38
6.2 La PRL actua sobre los sistemas antioxidantes	40
6.3 Determinacion de la actividad de SOD	44
6.4 Cuantificacion de lipoperoxidacion	46
VII. DISCUSIÓN	48
VIII. CONCLUSIONES	53
IX. PERSPECTIVAS	54
X. BIBLIOGRAFIA	55
XI. ABREVIATURAS	71

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

La prolactina (PRL) es una hormona peptídica sintetizada principalmente por los lactotrofos en la pituitaria anterior, sin embargo la PRL también se expresa y se secreta por otras células y tejidos. En informes recientes PRL se describe como una hormona pleiotrópica capaz de realizar múltiples funciones en todo el cuerpo.

Se ha descrito que la PRL ejerce un efecto de neuroprotección a nivel neuronal cuando las neuronas están sometidas a daño por excitotoxicidad causada por ácido kainico o glutamato (Glu), generando un estado de estrés celular y por consiguiente muerte celular, daño al tejido, envejecimiento entre otras patologías del sistema nervioso.

Existen varios mecanismos de defensa para minimizar el efecto del estrés oxidante; enzimas como la catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y la superóxido dismutasa (SOD) que son capaces de reducir la cantidad de $O_2^{\cdot-}$ en el medio y por tanto contrarrestar el estrés oxidante.

OBJETIVO

El presente proyecto se enfoca en describir el efecto de la PRL sobre los sistemas antioxidantes en un modelo in vitro de neuronas hipocampales de rata expuesto ante daño excitotóxico.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizaron cultivos primarios de neuronas hipocampales de ratas Wistar los cuales fueron tratados con PRL y se evaluó la viabilidad celular de los cultivos primarios, la expresión proteínica mediante Western blot así como la actividad enzimática de las isoformas de la enzima SOD y también se cuantificó la concentración de lípidos peroxidados.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Observamos que los tratamientos con PRL no influyen en la viabilidad celular ya que este grupo se comportó de acuerdo al control, mientras que el tratamiento con Glu si afecto gravemente a las células ya que viabilidad disminuyo en un 20 % con respecto a las células control.

Detectamos la expresión basal de SOD y observamos que PRL indujo un incremento tanto en su actividad como en su expresión. Ya que hubo una sobreproducción de SOD en los tratamientos con la PRL podemos sugerir que está favoreciendo la cascada para la activación de SOD lo cual genera una protección al sistema, si lo comparamos con lo que sucede con el Glu en donde esta enzima tuvo su menor expresión así como una baja actividad.

Cuando evaluamos la lipoperoxidación pudimos observar que el daño inducido por el Glu fue muy evidente, mientras que en lo tratamientos donde se administró PRL se observa que se está contrarresto el daño a la membrana, mostrando niveles bajos de lipoperoxidación.

I. INTRODUCCIÓN

1. EL PAPEL DE LA PROLACTINA EN LA NEUROPROTECCIÓN

1.1 La prolactina (PRL)

La PRL se identificó a finales de 1920 por Friesen como una hormona polipeptídica de 197-199 amino ácidos con un peso molecular de 23kDa (Freeman et al., 2010). Se ha descrito en la literatura que su síntesis se realiza en la pituitaria anterior o adenohipófisis también se ha reportado en tejidos extrahipofisarios tales como neuronas hipocampales así como en una gran variedad de células y tejidos, tales como linfocitos, células β -pancreáticas, en las gónadas femeninas y masculinas (Grattan y Kokay, 2008; Featherstone et al., 2012).

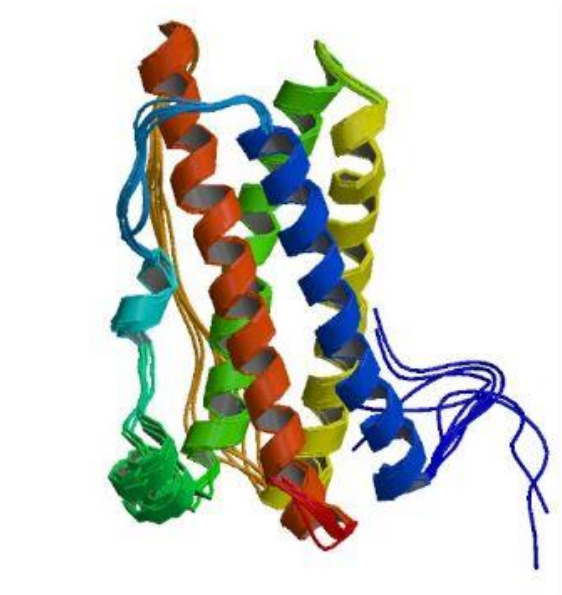


Figura 1. Estructura en 3D de la prolactina humana (1RW5.pdb) determinada por espectroscopia de NMR. Protein Data Bank utilizando el software de VP (WebGL)

En estudios recientes se ha demostrado que la PRL no sólo actúa de una manera endocrina, sino que también actúa de manera autocrina y paracrina por lo que puede llegar a tener más de 300 funciones biológicas conocidas, que van desde la regulación del sistema inmune (Kelley et al., 2007), la proliferación celular en los islotes de Langerhans y la producción de insulina (Huang et al., 2009) , la supresión de la ansiedad y la respuesta al estrés (Carter y Lightman et al., 1987; Donner et al., 2007; Torner et al., 2001), regulación de la activación de las neuronas de oxitocina (Kokay et al., 2006; Townsend et al., 2005), la neurogénesis estimulante (Shingo et al., 2003), a través de la promoción de conductas maternas complejas, sin embargo, muchas de las acciones de PRL son esenciales para la adaptación, la supervivencia de la madre y del feto durante el embarazo y la lactancia (Grattan et al., 2008).

En estudios realizados por nuestro laboratorio se ha descrito que PRL tiene un efecto de neuroprotección, tanto en hembras lactantes, así como en animales castrados tratados con prolactina, sin embargo los mecanismos moleculares por los que la PRL ejerce su efecto no se han descrito por completo (Vanoye-Carlo et al., 2008; Tejadilla et al., 2010; Vergara et al., 2016). Siendo de nuestro interés la muerte neuronal por excitotoxicidad. (Cabrera, 2009). La tabla 1 describe algunas de las funciones de PRL en diversos tejidos.

Tabla 1. La función de la PRL en distintos sistemas.

Sistema blanco	Función	Referencia
Sistema Inmunológico	Regulación de linfocitos.	<i>Kelley et al., 2007.</i>
Sistema reproductivo	Embarazo y lactancia.	<i>Grattan y Kokay et al., 2008.</i>
Sistema nervioso	Induce neurogénesis y neuroprotección ante estrés y excitotoxicidad.	<i>Shingo et al., 2003.</i>
Sistema endocrino	Regulación de células β -pancreáticas y producción de insulina.	<i>Huang et al., 2009.</i>

1.2 La PRL en la neuroprotección

El término neuroprotección se define como el conjunto de procesos que resultan en evitar la pérdida de la función neuronal frente a un daño determinado, por ejemplo: la disminución del estado inflamatorio, inhibición de la apoptosis, reducción de estrés oxidante (Majid, 2014).

Actualmente se han dado a conocer algunas moléculas que pueden tener un efecto neuroprotector en el cerebro entre ellas están el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el factor de crecimiento tipo insulínico (IGF-1) y el factor de crecimiento nervioso (NGF), entre otros; así como las enzimas antioxidantes como la súperoxido dismutasa y reductasa; las hormonas como los estrógenos, la progesterona, la testosterona, la hormona del crecimiento (GH), las hormonas tiroideas, y la PRL (Redolat y Carrasco, 2007).

Se ha demostrado que las moléculas antes mencionadas tienen un efecto neuroprotector cuando se han sometido a un daño excitotóxico causado por la administración de amino ácidos excitadores como el ácido kaínico (KA) o el glutamato (Glu).

Por otro lado, nuestro grupo de trabajo ha descrito el efecto neuroprotector de la PRL ante estrés excitotóxico inducido por KA en dos modelos *in vivo*: uno con ratas hembra tratadas con PRL exógena y otro durante la lactancia. En ambos modelos se ha observado que las áreas hipocampales: CA1, CA3 y CA4 expuestas a KA presentan menor daño neuronal en comparación con ratas tratadas únicamente con KA (Vanoye-Carlo et al., 2008; Cabrera et al., 2009).

Además se ha descartado la influencia de hormonas ováricas sobre el efecto neuroprotector de la PRL a partir de la ovariectomización de las ratas. (Tejadilla et al., 2010).

Por otra parte, como se mencionó anteriormente, el término de neuroprotección se refiere a evitar la muerte neuronal frente a una lesión. Por ello, se puede decir que la PRL confiere neuroprotección al hipocampo de la rata. La forma en que dicha

hormona puede llevar a cabo este efecto protector involucra una gran variedad de procesos posibles, entre ellos están los cambios en la neurotransmisión, efectos antiapoptóticos o antinecróticos, la regulación en la expresión de factores tróficos, la modificación de la respuesta glial, entre otros. Además el papel neuroprotector, la PRL se ha relacionado con el proceso de neurogénesis (Torner et al., 2001) el cual ha sido implicado en procesos de recuperación de funciones cognitivas (Kleindienst et al., 2005).

En otros estudios experimentales, se ha observado que la administración de la PRL puede modificar la tasa de neurogénesis en el hipocampo. Por ejemplo, en un trabajo realizado por Walker y colaboradores en el 2012 se describió que la administración de PRL en cultivos *in vitro* generó un incremento en el número de neuroesferas obtenidas a partir del giro dentado del hipocampo de ratones. Por otra parte, el cultivo de neuroesferas obtenidas de ratones *knock out* de PRL fue menor comparado con ratones control que producían normalmente PRL, indicando que la PRL tiene un papel en la generación de precursores neurales. Sin embargo, al contabilizar el número de precursores neurales en el hipocampo, no se encontraron diferencias entre los ratones *knock out* y los que sintetizan PRL. Lo anterior puede decirnos que el evento neurogénico es dependiente de diversos factores, en el cual la PRL no juega un papel primordial para que se genere dicho proceso. Además se demostró que en los ratones carentes de PRL existe una alteración en tareas de aprendizaje y memoria, las cuales fueron restauradas una vez que se administró PRL.

Con los trabajos anteriores se sugiere que la PRL puede impactar sobre la neurogénesis en condiciones fisiológicas normales y cuando el sistema se somete a daño esta hormona tiene el papel de la neuroprotección lo cual podría tener una aplicación a futuro para mejorar el desempeño en tareas de aprendizaje y memoria dependientes del hipocampo. La tabla 2 resume algunos de los trabajos pioneros en este campo.

Tabla 2. La PRL en la neuroprotección

Modelo	Efecto	Referencia
<i>in vivo</i>	La PRL genera mejoras en el aprendizaje y la memoria.	<i>Kleindienst et al., 2005.</i>
<i>in vivo</i>	Disminución del daño neuronal en hipocampo tratadas con KA.	<i>Vanoye-Carlo et al., 2008</i> <i>Cabrera et al., 2009.</i>
<i>in vivo</i>	La PRL evita la disminución de precursores celulares en hipocampo de ratón sometidos a estrés crónico.	<i>Torner et al., 2009.</i>
<i>in vivo</i>	Protección de células hipocampales y disminución en frecuencia e intensidad de los ataques epilépticos.	<i>Tejadilla et al., 2010.</i>
<i>in vitro</i>	PRL estimula las células precursoras.	<i>Walker et al., 2012.</i>
<i>in vivo</i>	Hormonas del sistema endocrino en peces y ratas activan el sistema antioxidante cuando son sometidos a disruptores endocrinos.	<i>Abolaji et al., 2016.</i> <i>Dolci et al., 2014.</i>

2. EFECTOS PRODUCIDOS POR EXCITOXICIDAD

2.1 Funciones del Glutamato

La comunicación entre las neuronas del cerebro, en su mayoría, ocurre por medio de neurotransmisores. Dentro de esta gama de neurotransmisores, los aminoácidos son mayormente utilizados. Uno de los aminoácidos más estudiados es el glutamato (Glu) donde sus receptores participan en más de 80% de las sinapsis excitadoras del SNC y se han relacionado con procesos que rodean a la memoria y la transmisión nerviosa. Sin embargo su sobre-estimulación puede desencadenar la muerte neuronal. El Glu se encuentra ampliamente distribuido en todas las regiones del sistema nervioso central (SNC) (medula espinal, cerebelo, tálamo, hipotálamo, ganglios basales, hipocampo, corteza, entre otras) y es considerado como un compuesto de gran importancia fisiológica. (Broman et al., 2000).

El Glu fue descubierto en 1908 por Kikunae Ikeda, pero el hallazgo de que este compuesto puede excitar al tejido nervioso tomó aproximadamente 5 décadas (Chiosa y Gane, 1956; Curtis y Watkins, 1963). Sus propiedades como neurotransmisor se describieron por primera vez cuando se demostró que el Glu excitaba a una gran variedad de neuronas centrales (Curtis y Watkins, 1963; Watkins, 1962). Y fue en la década de los 70's cuando se realizaron la gran mayoría de trabajos donde se demostraba que el glutamato es un neurotransmisor

Sin duda la presencia de los receptores a Glu en la membranas neuronales (Evans et al., 1979), su liberación mediante las terminales nerviosas después de la excitación (Hamberger et al., 1970), así como el transporte específico de alta afinidad localizado tanto en glía como en la terminales nerviosas (Logan y Snyder, 1972) apoyaron fuertemente la hipótesis de que glutamato era el neurotransmisor excitador por excelencia en SNC de los mamíferos. (Fonnum, 1984)

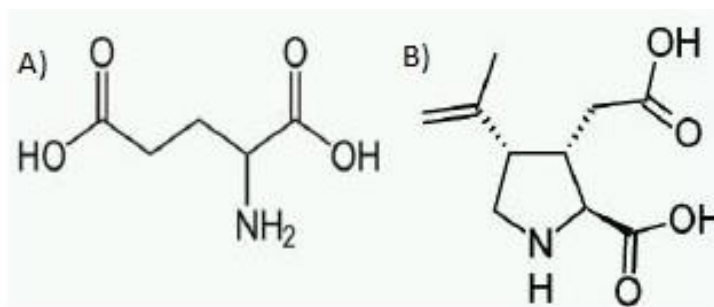


Figura 2. Conformación molecular de las moléculas A) Glutamato y B) Acido Kainico

En la literatura se ha descrito que el Glu es el principal neurotransmisor excitador del sistema nervioso central de los mamíferos y actúa a través de sus receptores que pueden estar acoplados a canales iónicos (ionotrópicos) o a proteínas G (metabotrópicos) (Geddes, 1999)

Los receptores ionotrópicos de glutamato están formados por 4 o 5 subunidades y se dividen en grupos según su comportamiento farmacológico. En la actualidad se cuenta con una gran cantidad de sustancias que pueden inducir excitotoxicidad a través de la sobreexcitación de los receptores ionotrópicos del glutamato entre ellos se encuentran el N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido- α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoazolpropionico (AMPA) y el ácido kainico (KA). (Zhou et al., 2013).

Tabla 3. Receptores glutamatérgicos ionotrópicos

Receptor/agonista	Propiedades	Función
AMPA	Activación de canales Na^+ y K^+	Excitación rápida
KA	Activación de canales Na^+ y K^+	Aun no descrito
NMDA	Activación de canales Na^+ , K^+ , y Ca	Excitación lenta y prolongada

En la actualidad se sabe que el glutamato participa en la degeneración y muerte celular en procesos neurológicos agudos como en el caso de accidentes cerebrovasculares (en el trauma-cerebral y en la hipoglicemia-isquemia) (Rothman y Olney 1986). También en diversas enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, la corea de Huntington y el proceso de neurodegeneración vinculado con epilepsia (Peña y Tapia, 2000)

2.2 Recaptura del glutamato

Una vez que el glutamato ha activado a sus receptores, es removido del espacio sináptico por un sistema de recaptura que consiste en una familia de proteínas específicas llamadas transportadores de glutamato de alta afinidad localizados en la membrana plasmática tanto en las neuronas como en las células gliales que producen la sinapsis . (Varoqui et al., 2002)

El glutamato captado por los astrocitos reacciona con el amoniaco para formar glutamina por medio de la glutamina sintetasa, enzima dependiente de adenosin trifosfato (ATP). La glutamina es exportada al líquido extracelular y tomada por las neuronas glutamatérgicas, en la terminal sináptica de estas neuronas, la glutamina es hidrolizada a ácido glutámico y amonio por la acción de la glutaminasa activada por fosfato, que es una enzima mitocondrial. Tanto los astrocitos como las neuronas tienen transportadores que son impulsados por un gradiente de Na^+ y concentran la glutamina dentro de las células. (Broman et al.,2000; Kandel et al., 2000; Hassel y Dingledine, 2006)

Estos transportadores utilizan gradientes electroquímicos de Na^+ , K^+ , H^+ y OH^- a través de la membrana plasmática como fuerza electromotriz para el proceso de transporte, el cual también está acompañado por cambio de voltaje y pH para remover al Glu del espacio sináptico hacia el interior de las neuronas y de las células gliales (Medina-Ceja et al., 2007)

2.3 Excitotoxicidad

La excitación neuronal en el sistema nervioso central (SNC) involucra a receptores glutamatérgicos de tipo ionotrópicos clasificados en NMDA y AMPA/kainato (Cardinali, 2007). La sobreexcitación de estos receptores por neurotransmisores excitadores puede llevar a la excitotoxicidad; que se refiere a un proceso patológico que causa lesión o muerte de neuronas debido a la sobre activación de los receptores de la sobre estimulación de este neurotransmisor excitatorio, glutamato, lo que da como resultado diferentes estados fisiopatológicos como la epilepsia, lesiones causadas por traumatismos cráneo-encefálicos e hipoxia-isquémica (Albensi, 2001)

3. ESTRUCTURA Y FUNCIONAMIENTO MITOCONDRIAL

La mitocondria posee un sistema de doble membrana, una externa y una interna, que separan tres espacios bien definidos: el citosol, el espacio intermembranal y la matriz mitocondrial. Las membranas mitocondriales se caracterizan por bajos niveles de ciertos lípidos como el ácido fosfático, las esfingomielinas y los glicolípidos característicos de las membranas de las células eucariotas.

Presenta un bajo porcentaje de colesterol entre el 7%- 11% en comparación con la membrana de una célula (25%-34%) (Lodish H. et al., 2014). El alto contenido de fosfatidilcolina, fosfatidilinositol, cardiolipinas y la escasa cantidad de fosfatidilserina, hacen que la membrana mitocondrial sea semejante a las membranas de ciertas bacterias.

Las mitocondrias son organelos especializados en suministrar la mayor parte de la energía necesaria para las actividades celular, sintetizando ATP mediante la fosforilación oxidativa.

En los organismos aeróbicos más del 90% del ATP proviene de las mitocondrias, el resto se forma en la glicólisis anaeróbica. (Lodish H et al., 2014).

Estas estructuras citoplasmáticas también son críticas en varios procesos celulares como las homeostasis del calcio, la regulación de la señalización redox para mediar la supervivencia, apoptosis y supresión de tumores.

Tiene un bajo contenido de colesterol y un alto contenido de cardiolipina (difosfatidil glicerol), lo que permite que los lípidos citosólicos entren a la matriz para llevar a cabo la β -oxidación. Estas características la hacen poco permeable a ciertos iones, excepto al ATP, ADP, ácido pirúvico, oxígeno y agua. Contiene tres tipos de proteínas: 1. Las que llevan a cabo las reacciones de oxidación de la cadena respiratoria, 2. Un complejo enzimático llamado ATPasa, que sintetiza el ATP en la matriz y 3. Proteínas transportadoras específicas que regulan el paso de metabolitos dentro y fuera de la matriz (Lehninger et al., 2002).

Entre las dos membranas queda delimitado un espacio intermembranal, compuesto de un líquido similar al hialoplasma, que contiene todas las moléculas que las porinas de la membrana externa dejan pasar.

Este espacio es rico en protones, los cuales proceden del funcionamiento de los complejos de la cadena respiratoria y desempeñan un papel esencial en la fosforilación de ADP (Lodish H et al., 2014). El espacio intermembranal contiene también componentes claves implicados en la muerte celular de tipo apoptótico, como algunas caspasas, el factor inhibidor de la apoptosis (AIF) y el *citocromo c*, que se localiza sobre la cara interna de la membrana interna (Lehninger et al., 2002).

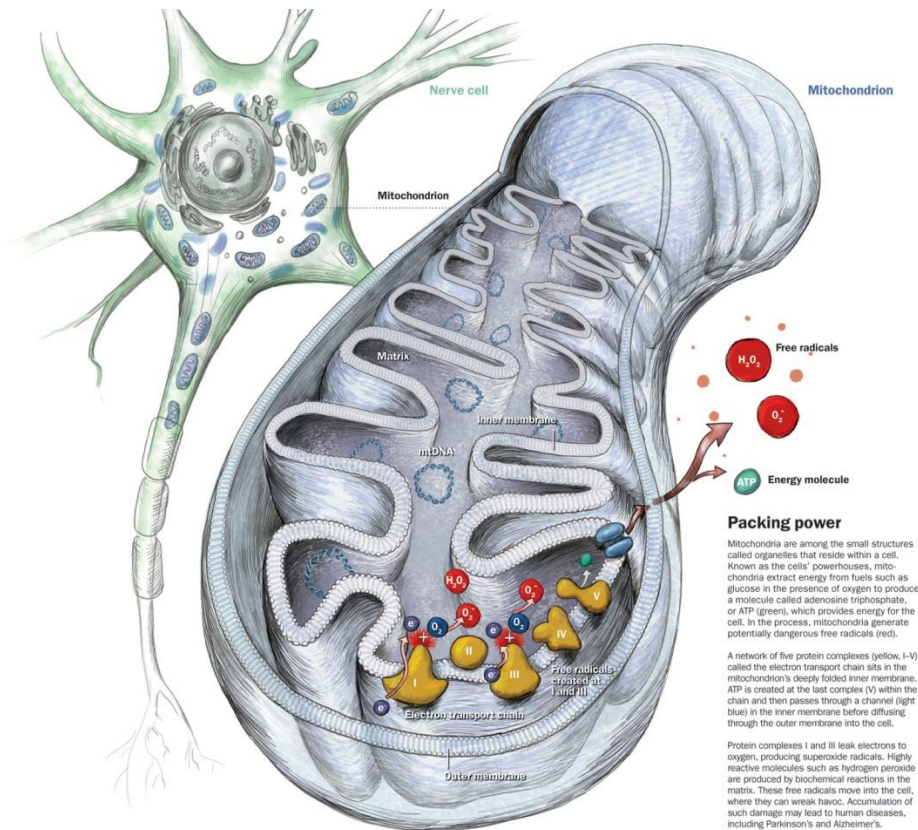


Figura 3. Estructura general de la mitocondria y la cadena transportadora de electrones en neuronas

3.1 Generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) en la mitocondria

La mitocondria es considerada como la fuente principal en la generación de $O_2^{\cdot-}$ produciendo alrededor del 85% de $O_2^{\cdot-}$ total de la célula. Esta producción se presenta cuando la mitocondria incrementa la actividad o hay inhibición de la cadena respiratoria, dando como resultado una producción aguda o crónica de este radical favoreciendo el estado oxidante celular (Maia et al., 2007)

El oxígeno se difunde hacia la matriz y el CO_2 lo hace hacia fuera. Los ácidos grasos se unen a la coenzima A (CoA) en la membrana mitocondrial externa, luego el grupo acilo se separa de la CoA y se liga a la carnitina para ser transportado a través de la membrana interna. El ácido graso se vuelve a unir a un CoA en el lado matricial de la membrana interna. La oxidación del piruvato en el

ciclo del ácido cítrico genera NADH y FADH₂. De estas coenzimas reducidas se transfieren los electrones al oxígeno a través de los cuatro complejos transportadores de electrones y al mismo tiempo se transportan iones de hidrogeno desde la matriz al espacio intermembranal, con la cual se genera la fuerza protón motriz (FPM) para realizar la síntesis de ATP (Lodish H et al., 2014).

En tres puntos de su descenso por toda la cadena transportadora, se liberan grandes cantidades de energía que propulsan el bombeo de protones hacia el espacio intermembranal de la mitocondria. Esto crea un gradiente electroquímico a través de la membrana interna. Cuando los protones atraviesan el complejo ATP sintetasa hacia la matriz, la energía liberada se utiliza para sintetizar moléculas de ATP. Este mecanismo por el cual se cumple la fosforilación oxidativa se conoce como hipótesis quimiosmótica. (Lodish H et al., 2014)

Por lo que la mayoría de las especies reactivas de oxígeno (EROs) que normalmente se producen en los sistemas biológicos provienen del metabolismo oxidante mitocondrial, de la actividad de la enzima xantina oxidasa y en menor proporción a la autoxidación de las catecolaminas y hemoproteinas que ocurren en el citoplasma, membrana nuclear, retículo endoplasmático y peroxisomas (Álvarez et al., 2010).

Se han identificado alrededor de 10 sistemas mitocondriales generadores de ERO. Dentro de estos sistemas, los complejos enzimáticos del ciclo de Krebs, como la alfa-cetoglutarato deshidrogenas, se consideran fuentes importantes de superóxido y peróxido de hidrogeno (Halliwell, 2001)

3.2. La cadena transportadora de electrones

La cadena transportadora de electrones (CTE) está formada por cuatro complejos proteicos (I-V) que a través de las reacciones redox secuenciales, transportan electrones de un complejo otro hasta llegar al oxígeno. En dicho transporte, los

complejos presentan cambios conformacionales para bombear protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembranal de la mitocondria complejos (I, III, IV), generando un gradiente electroquímico. Este gradiente electroquímico es esencial para el funcionamiento de la ATP sintasa o complejo V el cual al girar impulsa la fosforilación de ADP+P a ATP(Szewczyk y Wojtczak, 2002)

Durante el transporte de electrones en la CTE puede ocurrir una pérdida de un electrón y este puede reaccionar con otros compuestos para formar subproductos principalmente ERO, estas son generadas principalmente por los complejos I y III y han tomado importancia ya que se han descrito que tienen participación en diferentes rutas celulares (diferenciación celular, apoptosis envejecimiento, etc.) y cuando existe una sobreproducción de esta moléculas contribuyen a la patogenicidad de diferentes enfermedades (Hamanaka y Chandel, 2010)

3.3. Disfunción mitocondrial

Se define como la incapacidad de las mitocondrias para poder producir ATP de manera adecuada para poder satisfacer las necesidades energéticas del individuo. Por lo que se ha estudiado a el estrés oxidante como la principal causa de esta disfunción. Estudios señalan que los complejos I y III de la CTE son los principales sitios de producción de $O_2^{\cdot-}$ (Andreyen et al., 2005). Este $O_2^{\cdot-}$ que se genera por la respiración mitocondrial es liberado a la matriz mitocondrial donde será convertido en H_2O_2 por la superóxido dismutasa dependiente de manganeso (Mn-SOD). En el caso de que el $O_2^{\cdot-}$ sea producido por el complejo III se libera al espacio intermembranal donde es convertido por la superóxido dismutasa dependiente de cobre-zinc (Cu/Zn-SOD). La inhibición o disminución de la actividad de los complejos mitocondriales, genera una disminución en el bombeo de protones de la matriz intermembranal al espacio mitocondrial, generando una disminución de FPM, la cual es necesaria para la generación de ATP por la mitocondria (Wallace et al., 2010). Además se ha demostrado que la disfunción mitocondrial es uno de

los principales factores asociados a enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Huntington y el Parkinson (Coyle y Puttfarcken et al., 1993).

4. ESTRÉS OXIDANTE

4.1 Formación de especies reactivas de oxígeno (EROS)

El oxígeno (O) es un elemento químico gaseoso que se encuentra en el 99% en la atmosfera en su forma molecular como O₂. Este es producido por la oxidación del agua generada en el fotosistema I de las células fotosintéticas durante la fase luminosa de la fotosíntesis.

Aunque el oxígeno es indispensable para la vida de los organismos aerobios a altas concentraciones o bajo ciertas condiciones, a las concentraciones normales, este llega a ser tóxico. La toxicidad del oxígeno se puede explicar por la formación de ERO (Hansberg, 2002)

Las principales fuentes de ERO se forman por la reducción parcial del oxígeno lo cual forma el anión superóxido (O₂^{•-}), el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y el radical hidroxilo (OH•), estas moléculas tienen una gran capacidad de reacción debido a su alta inestabilidad química.

Las ERO se producen continuamente en las células de organismos aerobios como producto de procesos metabólicos, radiación ionizante, activación fagocítica, exposición a fármacos o compuestos químicos.

Así que la presencia de ERO se ha asociado a los procesos de envejecimiento, a los daños ocasionados por la isquemiareperfusión, enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y el Parkinson o bien la artritis reumatoide, la hipertensión, infarto al miocardio, cirrosis hepática, insuficiencia renal, la catarogenesis y la carcinogénesis entre otras. (Chirino y Pedraza-Chaverri, 2009)

4.2 Formación de radicales libres

Los radicales libres (RL), son cualquier especie química (atómica o molecular) capaz de existir independientemente de su configuración electrónica por lo que puede tener uno o más electrones desapareados ocupando un orbital atómico o molecular por si solos, ya sea por la pérdida o ganancia de un electrón, de un no radical o por la ruptura homolítica de una molécula. (Hansberg et al., 2002)

Los RL, son productos generados por el metabolismo celular para obtener energía necesaria para sus procesos biológicos y estos desempeñan un papel importante en la fisiología celular, señalización celular, diferenciación y crecimiento celular, neurotransmisión entre otros. (Sauer et al., 2001).

Cuando hay una sobreproducción de estos RL en el organismo se da una condición de desequilibrio provocando estrés oxidante (Hansberg et al., 2002).

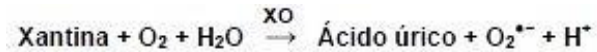
4.3 Estrés oxidante

El estrés oxidante es un estado celular que resulta de la condición de desequilibrio entre los sistema prooxidantes y antioxidantes en la célula, puede ser generado por el incremento a la exposición de agentes oxidantes, por la disminución de la protección de los sistemas antioxidantes o incluso por la aparición de ambas condiciones. El estrés oxidante da lugar a daño a moléculas como lípidos, proteínas y DNA, lo que puede originar disfunción y muerte celular (Valko et al., 2006)

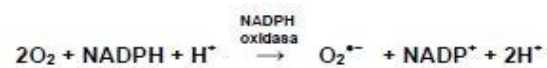
Anión Superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

El $O_2^{\cdot-}$ se libera como un subproducto de la cadena de transporte de electrones. En condiciones normales es producido por sistemas enzimáticos como la xantina/xantina oxidasa (XO), la ciclooxigenasa, la lipooxigenasa, la nicotinamida adenina dinucleotido fosfato (NADPH) oxidasa, la sintasa de óxido nítrico desacoplada y el citocromo P450. El O_2 tiene una función muy importante ya que

participa en la descarga respiratoria de las células fagocíticas como los monocitos y macrófagos que estos son un mecanismo de defensa contra organismos extraños.



El $\text{O}_2^{\bullet -}$ reacciona directamente con el ADN, proteínas o lípidos, pero puede inhibir la actividad de algunas enzimas como la 6-fosfogluconato deshidrogenasa, la aconidasa y la fumarasa, lo que afecta la reducción de nicotinamida adenin dinucleotido oxidado (NAD^+) y por lo tanto altera el metabolismo energético. Por lo que al entrar en contacto con el complejo enzimático de NADPH, reduce parcialmente al oxígeno.



Peróxido de hidrogeno (H_2O_2)

El H_2O_2 no es un radical ya que tiene todos sus electrones apareados y es un agente oxidante/reductor débil lo cual lo hace poco reactivo; pero debido a su configuración es capaz de difundir a través de las membranas ya que tiene lipofilidad (Nath y Norby, 2000) y reaccionar con el $\text{O}_2^{\bullet -}$ e interactuar con metales de transición como el hierro y el cobre en una reacción denominada de Fenton, dando lugar a la formación del radical hidroxilo (OH^\bullet) y el ion hidroxilo (OH^-) (Halliwell y Gutteridge et al., 2007). La toxicidad de ambas especies dependen de la disponibilidad y la distribución de los metales de transición en cada individuo.



Radical hidroxilo (OH^\bullet)

El OH^\bullet es un agente oxidante muy potente que puede reaccionar rápidamente con moléculas orgánicas e inorgánicas en la célula tales como ADN, proteínas, lípidos, aminoácidos, carbohidratos y metales. Se considera el radical más reactivo y

dañino de los sistemas biológicos, debido a que las células no poseen mecanismos antioxidantes específicos capaces de combatir su efecto tóxico. (Halliwell y Gutteridge, 2007)

Las fuentes de metales de transición pueden ser las proteínas encargadas de transportar a estos metales como la ferritina o la metalotioneína y los centros de hierro y azufre de algunas proteínas desnaturizadas por la interacción de O_2 . El OH^\bullet también se puede formar a partir de la reacción con el ácido hipoclorito (HOCl)



5. SISTEMAS ANTIOXIDANTES

Para contrarrestar el daño a los tejidos, existe un mecanismo de defensa desarrollado por un método de inactivación o disminución de ERO antes de que se genere un daño al sistema.

Entonces un antioxidante es aquella molécula o sustancia que cuando está presente a bajas concentraciones, en comparación con el sustrato oxidable, retarda o previene significativamente la oxidación del mismo.

Algunos de estos antioxidantes pueden ser bio-sintetizados por el organismo o bien pueden ser adquiridos exógenamente por medio de la dieta (Cárdenas - Rodríguez y Pedraza-Chaverri, 2006); además por su naturaleza y mecanismos de acción en directos, indirectos y bifuncionales (Dinkova-Kostova y Talalay, 2008).

Los antioxidantes directos son aquellos que tienen la capacidad de reducir u oxidar en poco tiempo y se consumen durante el proceso, se generan de acuerdo a la exposición a ERO. Los antioxidantes indirectos pueden tener o no actividad redox y favorecen su actividad por medio de proteínas citoprotectoras como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peróxidasa (GPx), glutatión

S-transferasas (GTS), tioredoxina-reductasa (Trx) y glutamato-cisteina ligasa (GCL).(Holtzclaw et al., 2004).

Estos antioxidantes tienen un tiempo de vida media más largo, no son consumidos durante su acción antioxidante y puede catalizar una amplia variedad de reacciones de detoxificación. Los antioxidantes bifuncionales tienen un papel protector dual y que pueden reaccionar con ERO de forma directa e instantánea, pero también pueden inducir la producción de proteínas citoprotectoras. (Dinkova-Kostova y Talalay et al., 2008).

5.1 Sistemas antioxidantes enzimáticos

Glutación peroxidasa (GPx)

La enzima GPx es una selenoproteína, es decir, es una enzima selenio (Se) dependiente que, en las células animales, se ubica en la matriz mitocondrial y en el citosol de los eritrocitos, lisosomas de neutrófilos, macrófagos y otras células del sistema inmune; cataliza la reducción de peróxido de hidrógeno a lipoperóxido (L-OOH), usa como agente reductor a glutación (GSH), los productos de la reacción, son el glutación disulfuro (GSSG) y el agua (Cárdenas y Pedraza, 2006).



Catalasa (CAT)

La catalasa es una hemoproteína que contiene cuatro grupos hemo, de amplia distribución intracelular, alta concentración en hígado y riñón, baja concentración en tejido conectivo y epitelios, prácticamente nula en tejido nervioso y se localiza a nivel celular en mitocondrias, peroxisomas, citosol (eritrocitos) (Cárdenas y

Pedraza, 2006) señalaron que en general las bajas concentraciones de peróxido de hidrógeno estimulan la actividad de peroxidasas, mientras que las altas concentraciones de peróxido son preferentemente catalizadas por la catalasa.

Esta enzima, presenta 2 funciones fundamentales; la primera es catalítica (Blokhina *et al.*, 2003), ya que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno proveniente de la dismutación del superóxido en agua y oxígeno. Esta función es compartida con la enzima glutatión peroxidasa que no requiere de cofactores. La segunda función es peroxidativa y forma parte del sistema antioxidante catalasa/superoxido dismutasa (CAT/SOD) que actúa en presencia de altas concentraciones de H₂O₂ (Venereo, 2002).



Superóxido dismutasa (SOD)

Es una enzima que está presente en las células aerobias y fluidos extracelulares. (Cárdenas y Pedraza *et al.*, 2006) es una metaloproteína, es decir que está formada por un grupo de enzimas metaloides: Cu/Zn-SOD contiene cobre y zinc en su sitio activo y se encuentran en el citosol y en el espacio inter-membranoso mitocondrial; Mn-SOD: contiene manganeso y se localiza en la matriz mitocondrial; Fe-SOD: contiene hierro y se localiza en el espacio periplasmático de la *E. coli*, su distribución es amplia en el organismo.

Una de sus funciones es catalizar la dismutación de radicales libres O₂^{•-} a H₂O₂, lo que no requiere de co-sustratos, su principal función es la protección contra el O₂^{•-} (Venereo, 2002). La biosíntesis de esta enzima se encuentra fuertemente regulada por la concentración del sustrato sobre el cual actúa (Blokhina *et al.*, 2003).



Glutatión S-transferasa (GST)

La familia de GST se componen de citosólicas, mitocondriales y proteínas microsomales. Su función primaria es catalizar la conjugación de glutatión reducido (GSH) con una gran cantidad de compuestos orgánicos. Las GST pueden reducir hidroperóxidos de lípidos por medio de una actividad de glutatión peroxidasa independiente de selenio; también puede detoxificar al 4-hidroxinonenal un producto de la peroxidación de lípidos.



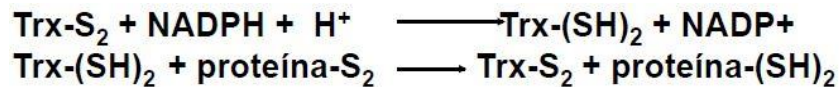
Peroxirredoxinas (Prxs)

Estas enzimas se caracterizan por poseer residuos de cisteína en su centro catalítico, lo cual las identifica como enzimas antioxidantes específicas para el grupo tiol. Los grupos cisteínas son oxidados a ácido sulfénico en forma reversible por los sustratos de estas enzimas (peróxidos). Están subdivididas en tres subclases: Prx 2-cisteína típica (Prx I-IV) se localiza en mitocondrias, Prx 2-cisteína atípica núcleo y citoplasma (Prx V) y Prx 1-cisteína citoplasma (Prx VI). Están envueltas en degradación enzimáticas de H_2O_2 , hidroperóxidos y peroxinitros, por lo tanto, las Prxs asumen un papel importante contra el estrés oxidante. La tiorredoxina puede regenerar la forma reducida de las Prx (Cárdenas y Pedraza, 2006).



Tiorredoxina reductasa (TrxR)

Esta enzima es una selenoproteína que contiene en su penúltimo carbono un residuo de selenocisteína, necesario para su actividad catalítica. Existen dos isosformas: la TrxR1 citosólica y la TrxR2 mitocondrial. Las dos isoformas cuentan con un FAD por subunidad, el cual reduce el grupo disulfuro del sitio activo, su función es catalizar la reducción del polipéptido tiorredoxina (Cárdenas y Pedraza, 2006).



5.2. Antioxidantes no enzimáticos

Los antioxidantes no enzimáticos, constituyen un grupo heterogéneo de moléculas hidrófobas e hidrófilas que capturan radicales libres y originan especies químicas menos nocivas para la integridad celular. En esencia, el mecanismo de acción involucrado es la donación de un electrón a un radical libre con el fin de estabilizarlo. Los antioxidantes no enzimáticos hidrofílicos, se ubican principalmente en el citosol, matriz mitocondrial y nuclear y en fluidos extracelulares; éstos incluyen vitamina C, glutatión, ácido úrico, ergotioneína y flavonoides polifenólicos (Chihualaf et al., 2002)

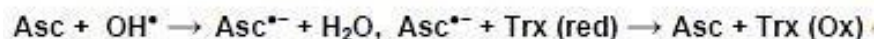
Vitamina A

Es un término genérico que abarca a los compuestos de origen animal que presentan actividad biológica de vitamina A. En los vegetales, existe como provitamina llamada β -caroteno. Por su conformación estructural son excelentes capturadores de radicales libres. Protegen contra la liperoxidación, sobre todo, la inducida por el sistema de la xantina oxidasa, y elimina el ion superóxido y los radicales peroxilos. Al igual que la vitamina C, puede comportarse como prooxidante, pueden inducir estrés oxidante incrementando la producción de radicales libres, aparentemente en condiciones de altas presiones parciales de oxígeno. Estas acciones dependen también de la presencia de otros carotenoides y de la interacción con antioxidantes como la vitamina E (Olguin et al., 2004).

Vitamina C

La vitamina C, es una sustancia hidrosoluble y es el antioxidante más importante en los líquidos extracelulares. Se encuentra bajo la forma de ascorbato, distribuido intra y extracelularmente. Reacciona en forma directa con los radicales libres, $\text{O}_2^{\cdot-}$,

OH• y varios hidroperóxidos lipídicos. La vitamina C protege contra el daño oxidante al ADN, proteínas y contra la peroxidación lipídica actuando sobre el radical libre tocoferoxilo regenerándolo a vitamina E. Este proceso transforma el ascorbato en el radical libre es hidroascorbato. La regeneración de la capacidad antioxidante del ácido ascórbico requiere la unión con los sistemas reductores no radicales como glutatión o niacina (NADH y NADPH)



Vitamina E

El nombre genérico de esta vitamina, hace referencia a sus ocho isómeros estructurales de tocoferol, de los cuales el α -tocoferol es una vitamina liposoluble, principal antioxidante en las membranas celulares y en las LDL, junto al γ -tocoferol, se le considera esencial en la defensa celular. Unida a la porción hidrofóbica del α -tocoferol existe un grupo OH, cuyo H⁺ puede removerse fácilmente y funcionar como donador de electrones (Oldfield, 2003).

La captura de radicales libres O₂^{•-}, OH• y LOO⁻, la desarrolla en membranas celulares y subcelulares (mitocondria y retículo endoplásmico liso) y detiene la propagación de la lipoperoxidación. Los radicales peroxilos generados durante la peroxidación lipídica extraen el H de la molécula del tocoferol. El radical tocoferol resultante es poco reactivo por lo que detiene la reacción en cadena. El radical tocoferol migra hacia la superficie de la membrana y se convierte en el radical libre tocoferoxilo; se regenera en alfa tocoferol a través de reacciones mediadas por la coenzima Q y en menor grado por las vitaminas C y A (Blokhina et al., 2003)



Ácido úrico

Aunque tradicionalmente ha sido considerado un producto terminal del metabolismo de las purinas, su función como antioxidante, tanto intra como extracelular, ha comenzado a reconocerse. Su mecanismo de acción aparentemente es prevenir la oxidación de la Vitamina C y formar complejos con los metales Fe y Cu (Olguín et al., 2004; Cárdenas y Pedraza, 2006).

Compuestos Polifenólicos

Estos compuestos que se encuentran en pequeñas cantidades en frutas, vegetales y granos, tienen actividad biológica entre la que destaca su actividad antioxidante, antiinflamatoria, como antiagregantes plaquetarios, antimicrobiana y antitumoral. Los principales son ácidos fenólicos (catequinas, cianidinas, quercetinas, flavonoides, flavonas, isoflavonas, flavonoles, derivados de la cumarina, derivados de fitoalexane, ácido cinámico y antocianidinas. Pueden ser lipo o hidrosolubles y se localizan tanto intra como extracelularmente. Los antioxidantes no enzimáticos de naturaleza hidrófoba se ubican en membranas y, generalmente, bloquean la formación de hidroperóxidos, o interrumpen la propagación de la lipoperoxidación entre sus funciones están actuar como capturadores de radicales libres, agentes reductores, formación de complejos con metales prooxidantes o extinguidores de la formación de $O_2^{\cdot-}$. La mezcla de estos compuestos puede actuar en forma sinérgica con las vitaminas funcionando como protectores y regeneradores de los antioxidantes (Olguín et al., 2004). Otros compuestos sugeridos con actividad antioxidante son la albúmina, el ácido lipoico, el fibrinógeno, la bilirrubina y la glucosa.

6. LA NEURODEGENERACION Y LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

El cerebro es susceptible a daños causados por el estrés oxidante hay estudios que mencionan que es una característica de enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad del Parkinson, la enfermedad de Huntington y la esclerosis amiotrofica (Barnham et al., 2004).

En la enfermedad de Alzheimer y en Parkinson donde hay una muerte neuronal por excitotoxicidad debido a que existe una pérdida de función del transportador a glutamato (GLT1) donde se ha observado que existe una oxidación de lípidos marcado por el 4-hidroxi-2-nonenal (4HNE) (Tamagno et al., 2003). Además hay un incremento en la oxidación de RNA y peroxidación de lípidos, lo que genera un aumento en la actividad de las enzimas antioxidantes como catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa (Sultana et al., 2006). En la enfermedad de Huntington también hay un incremento en los marcadores de daño oxidante, como la nitración de proteínas, peroxidación de lípidos y oxidación del DNA. Entonces el aumento en el estrés oxidante es ocasionado por una disfunción mitocondrial presente en estas enfermedades induciendo la muerte celular por apoptosis (Stack et al 2008).

Aunque el estrés oxidante no es la principal causa de estas enfermedades si tiene un efecto secundario para el ampliar y propagar el daño que lleva a una degeneración irreversible.

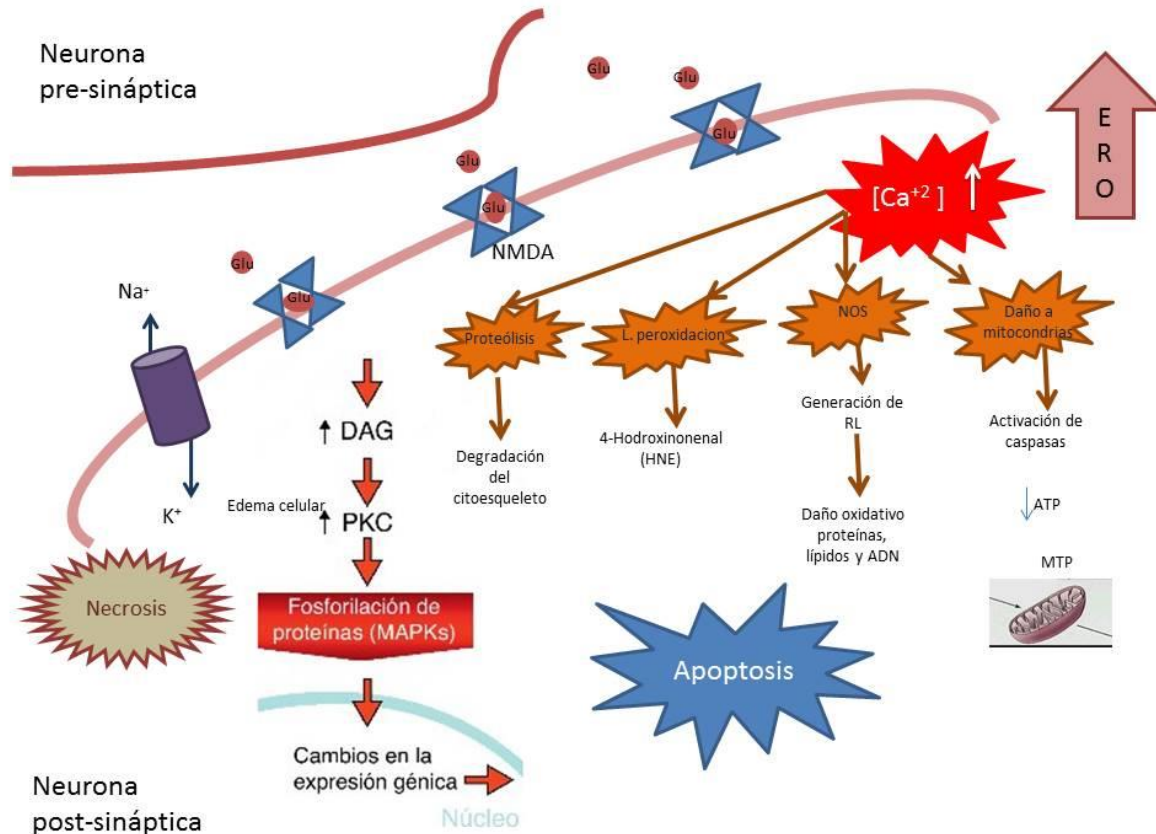


Figura 4. Esquema que presenta la secuencia de eventos que ocurren durante el daño que lleva a la muerte neuronal. El aumento en los niveles de ROS producen que la neurona presináptica libere el neurotransmisor excitatorio Glu que es captado por el receptor NMDA en la neurona postsináptica, la entrada de Glu lleva a un aumento de los niveles intracelulares de Ca^{+2} que activa a fosfolipasas, proteasas, y endonucleasas, así como a la sintasa de óxido nítrico (NOS). El aumento de los niveles de calcio y óxido nítrico en la mitocondria hace que disminuya la producción de ATP y se forme el poro de transición mitocondrial (MTP), el déficit de ATP no permite el funcionamiento de las bombas dependientes de ATP que se encuentran en la membrana citoplásmica, este hecho provoca una entrada masiva de H_2O y Na^+ y una salida de K^+ causando edema celular y muerte por necrosis. El daño mitocondrial y el daño al DNA induce la activación de genes que llevan a la muerte por apoptosis. Los astrocitos normalmente captan glutamato y lo regresan a la neurona en forma de glutamina (su precursor), pero cuando hay estrés oxidante los astrocitos liberan glutamato y óxido nítrico, incrementando y extendiendo el daño a las neuronas vecinas (Modificado de Dorado Martínez et al., 2003).

II. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades neurodegenerativas representan un problema de salud pública. Cada año estas enfermedades causan 7.2 millones de muertes a nivel mundial (WHO, 2012). Estos padecimientos dañan gravemente las funciones motoras, sensoriales y cognitivas del paciente, principalmente la memoria, el aprendizaje, el lenguaje y adaptación social.

Este tipo de padecimientos son multifactoriales, puede ser la predisposición genética o por factores ambientales (Manji et al., 2000, Berman et al., 1996, Payne et al., 2002). Uno de los factores que se ha asociado con la muerte neuronal en estos padecimientos es el estrés oxidante. En este sentido se ha estudiado la participación de los mecanismos de defensas antioxidantes para contrarrestar el daño. Por ello diferentes grupos de investigación han centrado su atención en la búsqueda de métodos preventivos y tratamientos que permitan contender contra los efectos producidos por el estrés oxidante en las enfermedades neurodegenerativas.

De acuerdo con los antecedentes, se ha descrito en la literatura que la PRL ejerce un papel neuroprotector ante daño por excitotoxicidad, sin embargo se desconoce el efecto de la PRL sobre las defensas antioxidantes en neuronas hipocampales. Por lo que el presente proyecto está dirigido a evaluar el efecto que tiene la PRL sobre los sistemas antioxidantes como una de las alternativas para disminuir o contrarrestar el daño causado por el efecto excitotóxico del glutamato. Con la finalidad que el conocimiento adquirido nos pueda proporcionar información para encontrar futuras aplicaciones terapéuticas.

III. HIPOTESIS

La PRL ejerce un efecto protector contra el estrés oxidante mediante la activación de los sistemas antioxidantes en un modelo *in vitro* de excitotoxicidad

IV. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la PRL sobre los sistemas antioxidantes enzimáticos en cultivos primarios de neuronas hipocampales ante daño excitotóxico

OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar la expresión proteica de superóxido dismutasa
- Evaluar la actividad enzimática de SOD
- Cuantificar la concentración de productos de lipoperoxidación.
- Evaluar la integridad la mitocondrial de las neuronas tratadas con PRL.

V. METODOLOGIA

5.1 Cultivos neuronales

Material para el cultivo celular

- Se utilizaron cultivos primarios de neuronas hipocampales de ratas Wistar.
- Solución de Krebs y tripsina al 0.25%.
- Tripsina al 0.8%.
- DNAsa al 0.52%.
- Medio neurobasal suplementado con una mezcla al 50% de B27, 0.5 mM de glutamina y 20 µg/ml de gentamicina, sin antioxidantes.
- Arabinocido de citosina (AraC) al 2 mg /10 ml
- Cajas Petri desechables, estériles de 30 mm previamente tratadas con poli-L-lisina (5 µg/ml).
- Placas de 96 pozos de 200 µl estériles
- Campana de flujo laminar horizontal.
- Incubadora a 37°C, 5% CO₂, en condiciones de humedad constante.

Técnica de cultivo celular

Se utilizaron cultivos primarios de neuronas del hipocampo obtenidas de embriones de rata Wistar de 17-18 días de gestación de acuerdo a Brewer y col (1993) con algunas modificaciones. Una vez realizadas la disección del hipocampo de 10-12 embriones, el tejido se disgregó con ayuda de una navaja para bisturí, posteriormente el homogenado resultante se resuspendió y disgregó en una solución de Krebs y se incubó 5 minutos a 37°C. Posteriormente la tripsina se inhibió con una solución con inhibidor de tripsina al 0.8% y DNAsa al 0.52%. Las células disgregadas se resuspendieron en un medio neurobasal. Las células se

sembraron a una densidad de 2×10^6 células en placas de cultivo celular. En placas de 96 pozos se sembraron 50×10^4 células para evaluar la viabilidad celular.

Tratamientos

Día 1: Cultivo celular primario con medio neurobasal

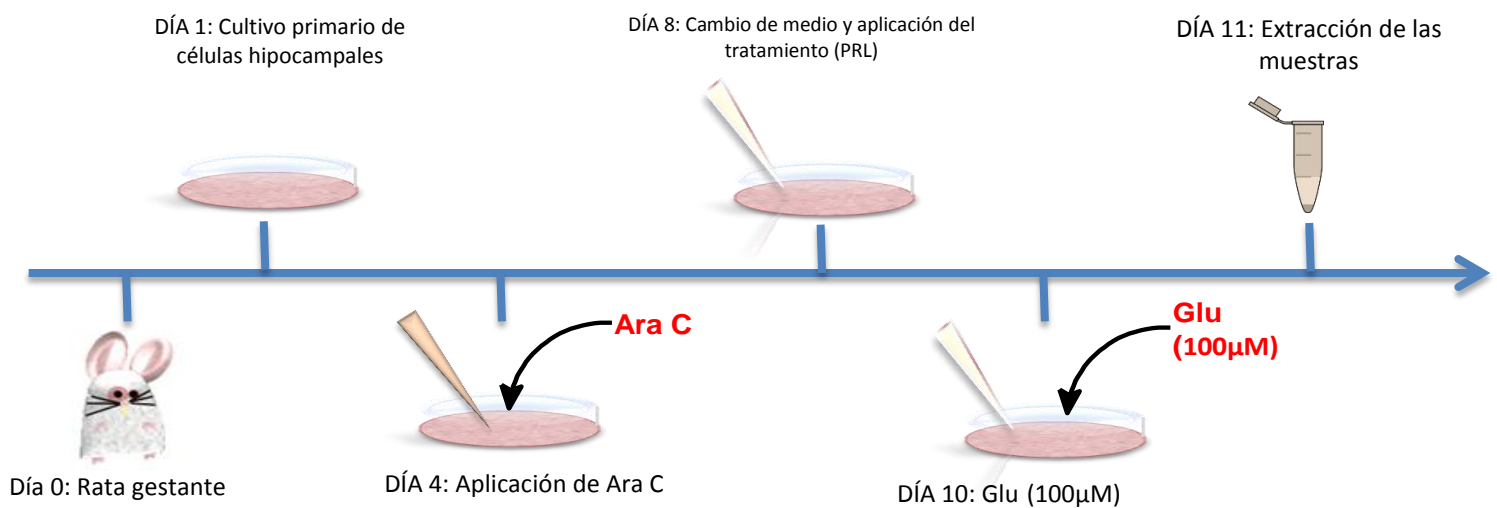
Día 4: una vez que las células fueron sembradas en las cajas se les adicionó medio neurobasal adicionado con suplementado con B27 y Ara C para evitar la proliferación de las células gliales y así garantizar que el cultivo es puro en neuronas hipocampales.

Día 8: Se retiran 500 μL de medio a cada caja de cultivo y se adicionan 600 μL de medio fresco. A las neuronas tratadas con PRL se les administran 10 ng/ml

Día 10: Se induce excitotoxicidad con Glu 100 μM , durante 24 horas.

Día 11: Las neuronas son cosechadas.

Por lo que se administraron tratamientos diferentes condiciones: vehículo (Ctrl), Prolactina (PRL) 10 ng / mL, Glutamato (Glu) 100 μM y con Prolactina más Glutamato (PRL / Glu).



5.2 Ensayo de Viabilidad Celular

Material para el ensayo

- Reactivo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazol (MTT) al 2.5 mg/mL, disuelto en PBS/EDTA esteril.
- Medio neurobasal suplementado con una mezcla al 50% de B27, 0.5 mM de glutamina y 20 µg/ml de gentamicina, sin antioxidantes Isopronol-HCl
- Placas de 96 pozos de 200 µl estériles
- Campana de flujo laminar horizontal.

Ensayo de MTT

Este ensayo consiste en la cuantificación de la reducción del bromuro de MTT por las deshidrogenasas mitocondriales activas de las células vivas, estas catalizan el corte de los anillos de tetrazolio de MTT, transformando la sal de MTT a una sal insoluble de formazan, cambiando la coloración del compuesto de amarillo a azul violeta.

Procedimiento de la técnica MTT

En placas de 96 pozos se sembraron 50×10^4 células con medio neurobasal. El MTT se incubó en cada condición durante 1 hora a 37°C y al término se observó la formación de cristales de color morado que se solubilizaron con isopropanol-HCl. La absorbancia de la solución se cuantificó en el espectrómetro a una densidad óptica de 570 nm. Los resultados se expresaron como porcentaje de reducción de MTT con respecto al control, el cual se normalizó al 100%.

5.3 Extracción y cuantificación de proteína.

Material y Reactivos

- Solución amortiguadora de lisis (Tris 25mM pH 7.5, SDS 1%, EDTA 1mM pH 8) con inhibidores de fosfatasas (miniComplete, ROCHE) y PSMF (Sigma-Aldrich CA USA).
- Kit Reagent protein assay BIO-RAD (no. de catálogo 500-0116)
250 mL de REAGENT A, solución alcalina de tartrato de cobre.
2000 mL de REAGENT B, dilución del reactivo de Forlin.
5 mL de REAGENT S.
- Placas de 96 pozos de 200 μ L
- Espectrofotómetro (Epoch, BioTek Winooski, VT, EE.UU).

Extracción de proteína

Se realizó la preparación de proteínas totales por métodos químicos y mecánicos. Las proteínas se extrajeron del cultivo celular al día 11 después de los tratamientos. Se incubaron en 30 μ L de amortiguadora de lisis en una cama de hielo y se realizó un raspado de las cajas petri, se recolectaron las muestras en tubos eppendorf. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 15,000 X G durante 10 minutos a 4°C. El botón celular se descartó y por otro lado se recuperó el sobrenadante. Las muestras obtenidas se guardaron a -70°C hasta su posterior utilización.

Cuantificación de proteínas totales de neuronas hipocampales de rata.

Las proteínas obtenidas fueron cuantificadas por el método de Lowry descrito por E. James Noble en el 2009. Para esto, se realizó curva con concentraciones conocidas de una proteína albúmina. (0,2,4,8,12 y 16 μ g/ μ L) y se leyó a una longitud de onda de 750 nm. Las muestras fueron tratadas del mismo modo con lo

cual se pudo determinar la concentración de proteína total presente en las muestras.

5.4 Analisis de expresión de proteínica por la técnica de Western Blot.

Material y reactivos

- Solución amortiguadora de carga: azul de Coomasie 5%, β – mercapto etanol mM.
- Solución de poliacrilamida al 30% BIO-RAD cat# 161-0156.
- Membranas de transferencia HybondTMECLTM de Amershan Biosciences y membranas ImmobilonTM P de Millipore.
- Solución amortiguadora de corrida: 25 mM de Tris Base, 250 mM de glicina, 0.1% de SDS a pH 8.3.
- Solución amortiguadora de transferencia: 25 mM de Tris Base, 150 mM de glicina.
- Solución TBS 1X: Tris-HCl 5M pH 7.5 y NaCl 1.5M).
- Tween 20, BIO-RAD.
- Anticuerpos primarios para detectar SOD-2 (FL-222), SOD-1 (FL-154), β -Actina (c-11). Anticuerpos secundarios anti-cabra y anti-ratón Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA.
- Solucion de quimioluminiscencia BIO-RAD.
- Camaras de electroforesis BIO-RAD, CA EUA.
- Scanner LI-COR, the C-DiGit Chemiluminescent Western Blot Scanner, Nebraska USA.

Procedimiento de la tecnica de Western Blot

Las proteínas fueron procesadas de acuerdo con el método descrito por Mendoza-Garces en 2013 una solución amortiguadora de carga y se incubó durante 5 minutos a 80°C.

Se cargaron 40 mg de proteína en geles de poliacrilamida al 12% en un equipo de electroforesis por 90 minutos a 100 mV en una solución amortiguadora de corrida.

La transferencia de proteínas se realizó en una cámara húmeda (300mA, 15 volts, 1h), sobre una membrana de transferencia y se bloquearon en una solución TBS 1X, con leche libre de grasa 10% y Tween-20 durante una hora.

Posteriormente se agregaron los anticuerpos primarios SOD-2 (1:200), SOD-1 (1:100) y β -Actina (1:10000) y se incubaron por 24 horas a 4 °C. Se retiró el exceso del anticuerpo primario de las membranas con una solución de TBS 1X con 500 μ L de Tween-20, con recambio del amortiguador de TBS cada 15 minutos durante una hora. A continuación, las membranas se incubaron 1 hora con su anticuerpo secundario correspondiente a temperatura ambiente y con agitación suave (14-16 rpm), el exceso de anticuerpo secundario se retiró realizando lavados con una solución de TBS 1X con 500 μ L de Tween-20 durante hora y media con recambios de la solución cada 10 minutos.

Finalmente se reveló en un scanner LI-COR con solución de quimioluminiscencia. Y se procedió a realizar la densitometría de las proteínas con el Image Studio Digital Ver 4.0

5.5 Determinación de la Actividad de SOD

Material y reactivos

- SOD de eritrocitos de bovino 20 U/L; Sigma Chemical St. Louis, USA.
- Kit SOD, 19160 SOD determination kit, Sigma-Aldrich, USA.
- Placas de 96 pozos para ELISA.

Procedimiento para medir la actividad de SOD

Se utilizó un kit para medir la actividad enzimática de la superóxido dismutasa. Este ensayo se realizó de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el

fabricante. El fundamento de éste ensayo se basa en la técnica reportada por McCord y Fridovich usando un generador de radicales superóxido a partir de la reacción de la xantina con xantina oxidasa, SOD-Kit de ensayo WST que es una sal de tetrazolio soluble en agua, WST-1 (2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-sulfofenil)-2 tetrazolio, sal monosódica) que produce un colorante formazán soluble en agua después de la reducción con un anión superóxido. detectando la inhibición de la reacción por medio de la formación de formazan a partir del WTS. Bajo estas condiciones, una unidad de actividad de SOD se considera como la cantidad de enzima que inhibe 50% de la formación de formazan, tomando en cuenta una curva testigo con SOD pura. Dicha curva testigo fue realizada bajo las mismas condiciones ya descritas, pero usando SOD de eritrocitos de bovino en lugar de las muestras experimentales y expresando la actividad como mU/mg

La velocidad de la reducción con O_2 son linealmente relacionada con la actividad de la xantina oxidasa (XO), y es inhibida por SOD. Por lo tanto, la IC_{50} (actividad de inhibición de 50% de SOD o SOD-en la muestra) se puede determinar por un método colorimétrico. El espectro de absorción de WST-1 formazan. Dado que la absorbancia a 440 nm es proporcional a la cantidad de anión superóxido, la actividad SOD como una actividad de inhibición puede cuantificarse mediante la medición del desarrollo de coloración a 440 nm.

5.6 Cuantificación de los productos de liperoxidación en cultivos primarios de neuronas hipocampales de rata.

Material y reactivos

- Solucion amortiguadora de lisis: Tris 25mM pH 7.5, SDS 1%, EDTA 1mM pH 8 con inhibidores de fosfatasa miniComplete, ROCHE y PSMF Sigma-Aldrich CA EUA
- Solucion de butilhidroxitolueno (BHT) en metanol al 4%
- Solucion amortiguadora de fosfatos 1M pH 7.4

- Solucion de KCl al 5%
- n-Butanol grado HPLC
- Tetraetoxipropano Sigma-Aldrich
- Acido tiobarbiturico 0.8 M Sigma-Aldrich

Ensayo de TBAR´s descrito por Pérez-Torres et al., 2008

Se determinó el contenido de productos de lipoperoxidación en los cultivos primarios de neuronas hipocampales. Las neuronas se homogeneizaron en un amortiguador de lisis, se midieron los índices de lipoperoxidación, un marcador de daño causado por los RL a los lípidos insaturados de la membrana celular, con el método convencional de sustancia reactiva del ácido tiobarbiturico o TBARs por sus siglas en ingles de Thiobarbituric Acid Reactive Substances. El ensayo de TBARs se fundamenta en la reacción del malondialdehido (MDA) son dos moléculas de ácido tiobarbiturico en un medio ácido y a temperatura aproximada de 100°C, formando un complejo colorido.

Procedimiento de TBAR´s

A 100 µg de proteína; se le agregaron 50 µl de metanol con BHT al 4% y 1 ml de amortiguador de fosfatos a pH 7.4, se mezcló vigorosamente en vortex por 5 seg, se incubo 30 minutos en baño maría a 37°C. Al final de la incubación, se agregaron 1.5 ml de ácido tiobarbiturico y se incubo 1 hora a baño maría de aproximadamente a 100°C, después de ese tiempo y para detener la reacción, las muestras se colocaron en hielo y se agregó 1 mL de KCl por muestra mas 5 mL de n-butanol, se mezclo vigorosamente con vortex durante 30 seg y se centrifugo a 400 g a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después de la centrifugación se extrajo la fase de organica y se midió la absorbancia de la fase acuosa a 532 nm. La curva de calibración se realizó utilizando tetraetoxipropano.

VI. RESULTADOS

6.1 La PRL induce sobrevivencia neuronal ante excitotoxicidad

A los 11 días de haber sido sembradas, la sobrevivencia celular se determinó por medio de MTT y se monitoreo la sobrevivencia neuronal a los 60 minutos, por medio de la reducción del MTT. Se determinó viabilidad neuronal después de los diversos tratamientos, los resultados pueden observarse en la figura 5. Como se puede observar la PRL no modificó la viabilidad neuronal, pero si ejerció un efecto de neuroprotección ante glutamato. En el grupo en donde tenemos PRL+Glu, vemos que la PRL está ejerciendo un cambio en la viabilidad respecto a los tratamientos con Glu. Esto se ha descrito previamente en nuestro grupo por Vergara et, al., 2016, donde la prolactina está contrarrestando el daño por excitotoxicidad.

El caso de las células tratadas con Glu se observó una disminución de la viabilidad, estos resultados que concuerdan con lo previamente reportado donde el glutamato induce muerte neuronal por procesos apoptóticos. (Green y Kroemer, et al., 2005). Las proteasas que participan en este tipo de muerte celular son las caspasas, en nuestro grupo de trabajo se ha estudiado previamente la muerte celular por apoptosis en un modelo de excitotoxicidad *in vitro* con Glu por medio de la determinación de caspasa total y caspasa 3 activa. (datos no publicados)

Figura 5. Ensayo de MTT

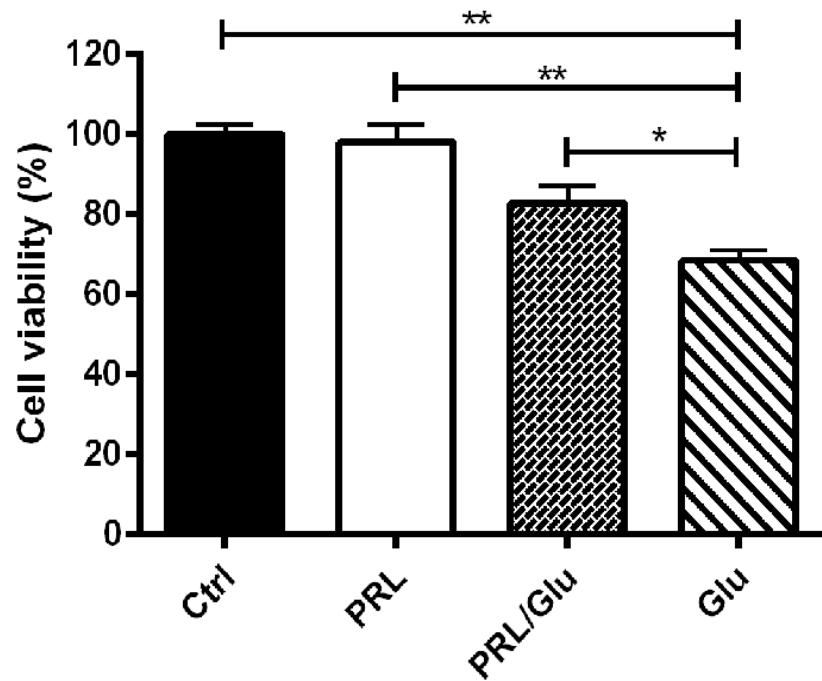


Figura 5. Ensayo de MTT, donde se analizó la DO de las muestras respecto al Ctrl y se tomó a este grupo como 100% de la respuesta. Se correlacionaron los tratamientos respecto al Ctrl. Las condiciones para los cultivos fueron PRL: 10 ng/mL y Glu: 100 μ M. Se analizaron los datos estadísticos por ANOVA: ** $p < 0.01$ Ctrl vs Glu; PRL vs Glu; * $p < 0.05$ PRL/Glu vs Glu. $n = 3$. Los resultados se expresan como el % de viabilidad celular.

6.2 La PRL activa el sistema antioxidante SOD

SOD-1

Se realizaron Western blot para determinar la expresión de Cu/Zn-SOD o bien SOD-1 en nuestros tratamientos, como una enzima que participa en el recaptura de ERO a nivel citosólico. Para este estudio se puede observar en la **figura 6** el contenido de SOD-1 con una comparación con su control de carga donde posteriormente se hizo una correlación con cada grupo para determinar por densitogramas (cuantificación por píxeles) la cantidad de esta enzima presente en cada uno de los experimentos.

Se observa que hay una sobreexpresión de esta enzima cuando las células son tratadas con PRL. Una de las posibilidades es que la PRL este favoreciendo la activación de este sistema. Además si comparamos las células Ctrl vs PRL se observa que hay incremento en la expresión de SOD-1 después del análisis estadístico se determina que el cambio es significativo con una $***p < 0.001$ y en el caso contrario cuando Ctrl vs Glu las células pierden la actividad de defenderse ante el daño excitotóxico o bien las células ya están muertas lo cual concuerda con nuestra curva de viabilidad celular (ANOVA $***p < 0.01$)

Además también hay diferencias significativas cuando tenemos PRL vs Glu se observa un aumento 2 veces mayor el de PRL con respecto al Glu

Ahora si hacemos una comparación con las células Ctrl y la PRL/Glu se puede observar un aumento de aproximadamente el 50% con respecto al Ctrl lo que nos lleva a decir que efectivamente la PRL está favoreciendo la expresión de SOD-1 en este modelo.

Figura 6. Determinación de SOD 1

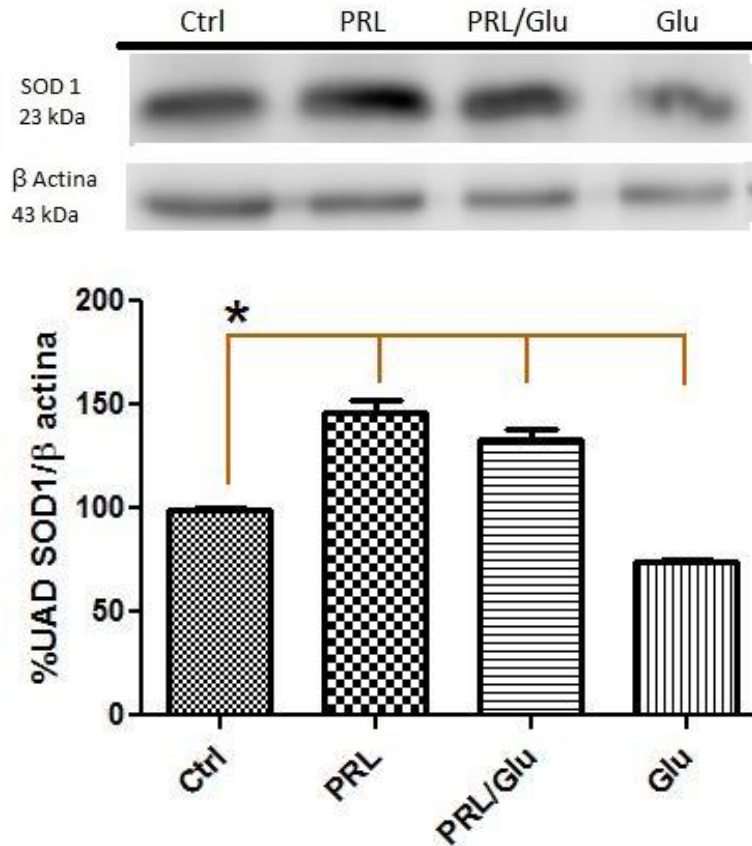


Figura 6. Análisis de Western blot para la expresión de SOD-1. Análisis por densitometría determinando el contenido de SOD-1 en los tratamientos se observan datos significativos respecto al Ctrl. *** $p < 0.001$ con una ANOVA con una prueba post-hoc Tukey $n=5$

SOD-2

Los efectos de la MnSOD o bien SOD-2 en regiones específicas del cerebro tienen implicaciones importantes en diversos trastornos neurológicos. (Marcus et al. 2006) Estudio la expresión de SOD-2 en la hipocampo de pacientes con la enfermedad de Alzheimer y pacientes sin Alzheimer y encontró un aumento estadísticamente significativo en la expresión de SOD-2 en regiones CA1, CA2 / 3 y C4 de el hipocampo lo que sugiere que las neuronas hipocampales en el intento por contrarrestar el aumento de ERO asociado a la enfermedad observaron el aumento en la expresión de SOD-2

Con base en lo antes mencionado se volvió a observar el papel de la PRL pero ahora para la expresión de SOD-2 y se obtiene una tendencia similar a la de SOD-1 donde efectivamente la PRL si está favoreciendo la expresión de esta enzima para cada tratamiento y la poca expresión se da cuando está expuesta al daño excitotóxico.

Cuando compramos PRL vs Ctrl podemos observar que esta aumenta por lo que la sobreexpresión de SOD-2 está siendo favorecida como lo fue en el caso anterior con SOD-1 y los datos son estadísticas significativas (ANOVA *** $P < 0.001$) pero esta misma tendencia también está con PRL vs Glu y como ya he mencionado se debe al daño por la excitotoxicidad.

Pero cuando comparamos PRL vs PRL/Glu no se ve reflejado un aumento tan favorecedor, aunque si son estadísticamente significativas (ANOVA *** $p < 0.001$), En cuanto a los resultados de la expresión de SOD-2 para Ctrl vs PRL/Glu aunque si observamos un aumento pero no hay diferencias significativas.

Figura 7. Determinación de SOD-2

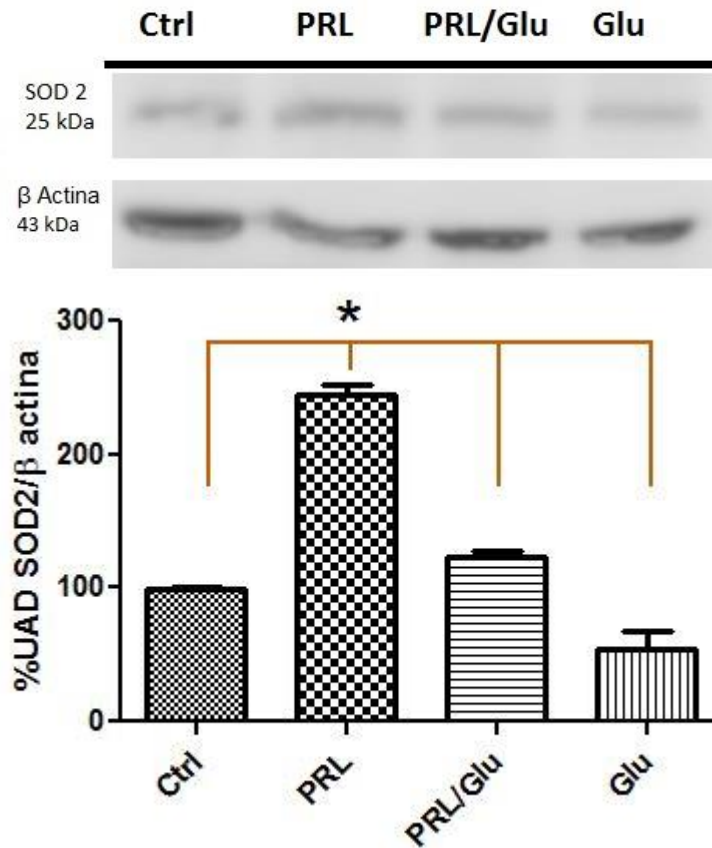


Figura 7. Análisis de Western blot para la expresión de SOD-2. Análisis por densitometría determinando el contenido de SOD-2 en los tratamientos se observan datos significativos respecto a la PRL. *** $p < 0.001$ con una ANOVA con una prueba post-hoc Tukey $n=5$

6.3 Determinación de la Actividad de SOD

La actividad de la SOD se calculó a partir de la absorbancia obtenida de la cuantificación espectrofotométrica, descrita previamente en la metodología y la concentración obtenida a partir de la curva estándar. En la gráfica se muestran los valores de la actividad expresados en % de la actividad de SOD.

Se realizaron lecturas de 0, 10, 20 y 30 min para analizar en cuál tiempo se presentaba una actividad máxima respecto a la curva estándar.

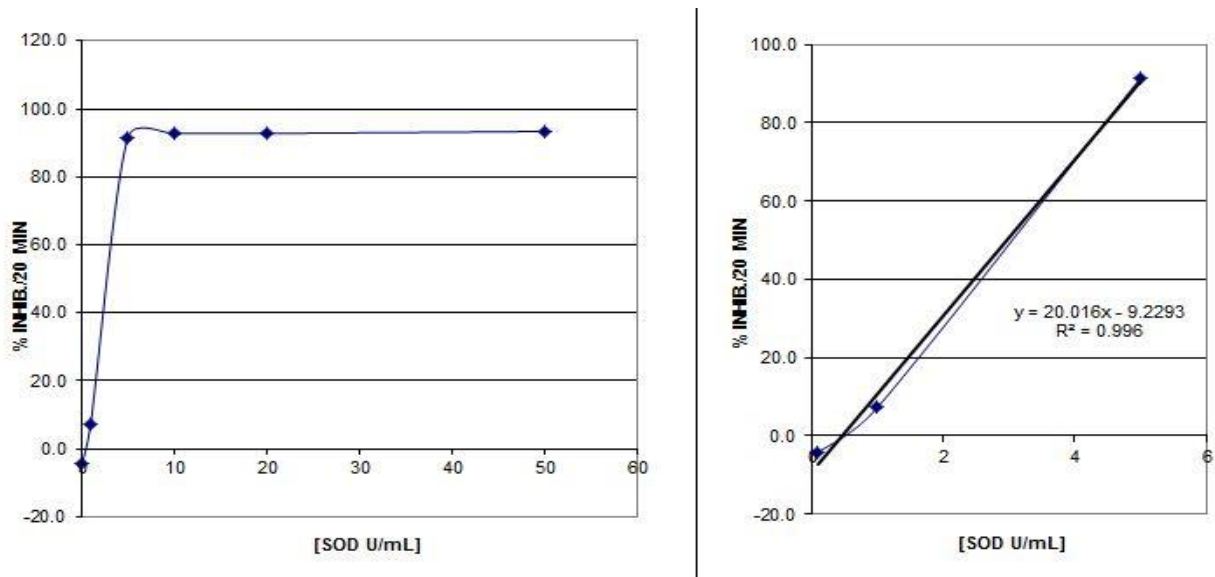
El tiempo seleccionado fue a los 20 min obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 4. Curva estándar a los 20 minutos.

	[SOD U/mL]	Promedio Abs	% INHIB.
A	50	0.054	93.4
B	20	0.059	92.8
C	10	0.060	92.7
D	5	0.069	91.5
E	1	0.758	7.2
F	0.1	0.852	-4.3

Posteriormente se realizó la curva estándar para observar la cinética de la reacción; cinética de orden cero, se tomaron los datos lineales como se observa en la **gráfica 2** donde se obtuvo la ecuación de la recta y con esto se procedió a calcular los datos para las muestras o bien el % de Inhibición.

Figura 8. Curva estándar; Cinética de Orden Cero para 20 minutos



En la **figura 8** podemos observar la tendencia que tienen los datos donde los grupos que tiene PRL se observa un pico en la actividad de SOD lo que corrobora la sobreexpresión vista en los análisis de western blot. Para el caso de PRL/Glu disminuye la actividad pero no decae se mantuvo en todos los grupos. Y en caso de Glu la actividad cae y los datos prueban que están por debajo del grupo Ctrl esto también como resultado de la excitotoxicidad causa por el Glu.

Una vez que se realizó el análisis de todos los datos, se calculó el promedio de las actividades para poder analizar los datos con mayor profundidad.

Se conjuntaron los datos obtenidos y se realizó una prueba ANOVA seguida de una prueba post-hoc, donde se pudo ver una diferencia significativa con $***P < 0.01$ La actividad de SOD se incrementó cuando las células fueron tratadas con PRL y además es mayor la actividad basal de las células.

A tiempos cortos (0 y 10min) se observa esta misma tendencia aunque los porcentajes de inhibición son menores a el tiempo de 20 min y los 30 min esta actividad es nula. Lo que sugiere que la PRL podría estar teniendo su efecto a tiempos mucho más prolongados

Figura 9. % de la Actividad de SOD

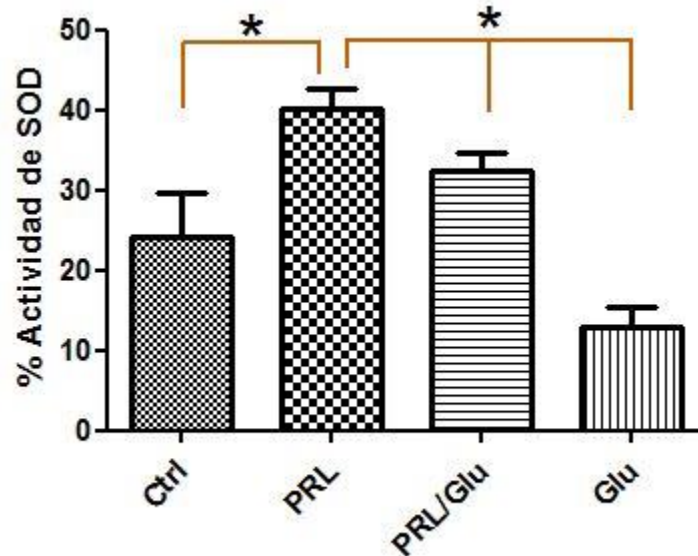


Figura 9. Niveles de la actividad de SOD para cada tratamiento, 24 horas después de la administración de Glu. Cuando las células son tratadas con PRL se observa un aumento significativo en la actividad de SOD. **** $p < 0.01$** con ANOVA con una prueba post-hoc Tukey $n=7$ para PRL vs Glu y PRL/Glu vs Glu.

6.4 Ensayo de Lipoperoxidación

Uno de los blancos de los ERO son las membranas celulares como se había mencionado con anterioridad estructuralmente tienen ácidos grasos insaturados, pero cuando tienen un daño llevan a una distorsión de su espacio hidrofóbico y a una pérdida de su función biológica. Por lo que ensayo de TBARS nos permite analizar uno de los factores biológicos de una causa probable de muerte neuronal.

Como podemos observar en el **grafica 4** el efecto excitotóxico producido por el Glu refleja un aumento en la peroxidación de lípidos. Se realizó un análisis de ANOVA con $P < 0.001$.

En una comparación de PRL/Glu vs Glu, podemos observar que la PRL está contrarrestando el daño aproximadamente en un 25%, manejando valores muy similares a los controles o las que fueron tratadas con la PRL.

Los grupos de Ctrl, PRL y PRL/Glu tienen tendencias muy similares entre ellas y no se encontraron datos significativos.

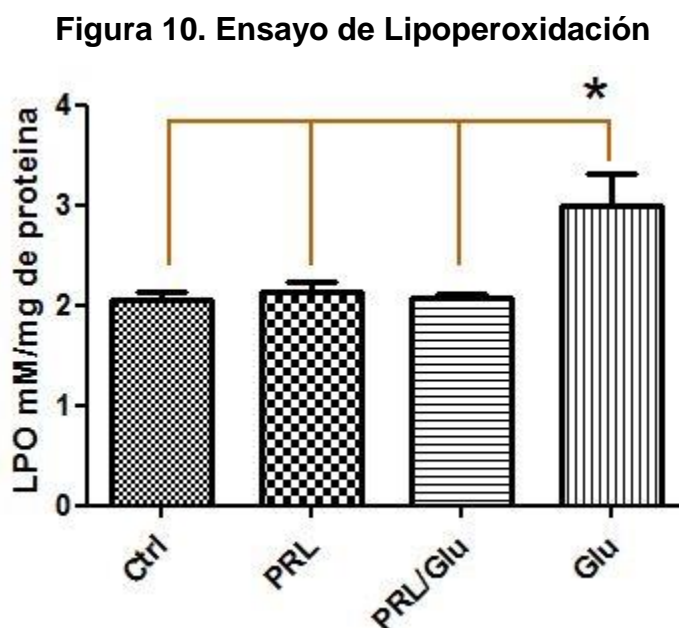


Figura 10. Análisis de TBARS para evaluar el efecto causado por el efecto excitotóxico por Glu observando un posible daño a nivel de membrana celular ANOVA con una prueba post-hoc Tukey * $p < 0.001$ Ctrl vs Glu; PRL/Glu vs Glu, PRL vs Glu; $n=5$**

VII. DISCUSIÓN

La neuroprotección es un proceso biológico complejo en el que intervienen múltiples factores y a diferentes niveles celulares.

Uno de los primeros estudios que se ha realizado sobre el impacto que tienen las hormonas sobre la neuroprotección, fue descrita por Briton en 1996 donde se utilizó la Terapia de remplazo hormonal (TRH) en pacientes con Alzheimer, observo que la TRH beneficia a el sistema nervioso central, una de las causas era observar el efecto de los estrógenos sobre, la protección contra las lesiones neurológicas y además concluyó que había menor riesgo a padecer enfermedades como el Alzheimer y la mejora la función cognitiva (Brinton et al., 1999 y Henderson, 2007).

Posteriormente en modelos *in vitro* se demostró que los estrógenos aumentan la supervivencia neuronal cuando son sometidos a estrés oxidante, excitotoxicidad y daños β -amiloide (Behl y Holsboer et al., 1999). Aunque no todos los mecanismos se han descrito, estudios recientes han demostrado que la tirosina cinasa / proteínas cinasas activadas por mitógenos o MAPK tiene una cascada de transducción de señales que puede estar implicada en la neuroprotección mediada por estrógenos. (Brinton y colaboradores et al., 2000)

Los estrógenos activan rápidamente la tirosina cinasa y la actividad de MAPK (Zhao, 2013) y el efecto neuroprotector de estos contrarresta la toxicidad ejercida por glutamato ya que fue bloqueada por inhibidores de la tirosina cinasa y MAPK. La vía MAPK se cree que desempeñan un papel importante en las acciones de las neurotrofinas, y su activación podría dar lugar a una mayor expresión de genes antiapoptóticos. (Fang et al., 2013)

El gen antiapoptótico, Bcl-2, está implicado en la supervivencia neuronal mediada por el factor de crecimiento neuronal (NGF), en las neuronas sensoriales dependientes e inhibe la muerte en respuesta a la toxicidad del glutamato. Además, la expresión de Bcl-2 se incrementa en respuesta a tratamiento con

estrógenos de las células neuronales (Zhao et al., 2013; Fang et al., 2013; Ye et al., 2012).

Por lo que las hormonas ováricas pueden proteger contra algunos tipos de daño neuronal, neurodegeneración, y por lo tanto del deterioro cognitivo. En especial los estrógenos, como ha sido demostrado en diferentes reportes que demuestran que el estradiol parece proteger específicamente neuronas corticales y del hipocampo de la lesión isquémica y de daños causados por las convulsiones severas (Hoffman et al., 2006)

En nuestro laboratorio se ha estudiado el papel neuroprotector de la PRL en modelos *in vivo* de excitotoxicidad por KA. En trabajos previos se describió que la administración crónica de PRL previa a una lesión por KA evita la pérdida neuronal en las áreas CA1, CA3 y CA4 del hipocampo (Tejadilla, 2010) Con lo anterior se propuso utilizar un modelo *in vitro* de cultivo primario de neuronas hipocampales de rata, el estudiar neuronas hipocampales es porque se ha descrito que es uno de los primeros blancos en enfermedades neurodegenerativas ya que en la literatura el hipocampo es una estructura involucrada en diversas funciones como el aprendizaje, la memoria (espacial y no espacial), el reconocimiento y en la respuesta al estrés (Machon et al., 2007; Broadbent et al., 2004) entre otras por ello el estudio sobre este modelo.

Sin embargo, los mecanismos moleculares por los que la PRL induce su efecto neuroprotector no se han dilucidado totalmente. En el presente trabajo se describió el efecto de la PRL sobre el contenido y actividad enzimática de las isoformas de la superóxido dismutasa (SOD-1, SOD-2), además se cuantificó el contenido de productos de lipoperoxidación (4OH-nonanal y malonaldehído), en un modelo de cultivo primario de neuronas hipocampales de rata.

La PRL previene de muerte neuronal ante estrés excitotóxico

De acuerdo con la **figura 5**, la viabilidad celular cuantificada por MTT indica un aumento del 10% la densidad óptica de las neuronas tratadas con PRL/Glu en comparación con las neuronas únicamente tratadas con Glu. De hecho estos datos concuerdan con lo publicado por Vergara-Castañeda, et al., 2016. En cuanto a las neuronas tratadas únicamente con PRL no hubo cambios estadísticamente significativos con respecto al control. En la literatura se ha descrito que el efecto del Glu desencadena una excitabilidad celular por la sobreactivación de los receptores NMDA debido a la presente liberación de glutamato, sin embargo la muerte neuronal requiere de un mecanismo intracelular mediado por Ca^{2+} a través de estos receptores. (Corona y Tapia, 2007)

Por lo que aumento de los niveles de calcio en la mitocondria hace que disminuya la producción de ATP y se forme el poro de transición mitocondrial (MTP) este hecho provoca la entrada masiva de agua (H_2O) y sodio (Na^+) y la salida de potasio (K^+) causando edema celular y muerte por necrosis (Dorado Martinez et al., 2003). Esto genera un estado de estrés oxidante, lo que conyeva al daño y la muerte neuronal por lo que un factor importante en las enfermedades neurodegenerativas pero aún no está claro si contribuye iniciando el proceso o es una consecuencia del mismo. (McCord JM, 2000)

Entonces el aumento del estrés oxidante es ocasionado por una disfunción mitocondrial induciendo la muerte celular por apoptosis (Stack et al., 2008) lo que pone en riesgo la producción de energía, que es importante para la sinapsis y para mantener el funcionamiento normal de receptores de glutamato (Estrada-Sánchez et al., 2010) y así evitar el daño excitotóxico.

La actividad y contenido de las isoformas de la superóxido dismutasa aumentan en neuronas hipocampales tratadas con PRL

La oxidación causa alteraciones en la estructura de algunas proteínas y la formación de agregados proteínicos, estas proteínas anormales inducen daño oxidante y están presentes en las enfermedades neurodegenerativas

Por lo que una mayor actividad de sistemas antioxidantes pueden favorecer a disminuir el daño causado por ERO. El sistema antioxidante evaluado fue SOD-1 y SOD-2 donde se observó como la PRL favorece la expresión de ambas isoformas.

La cuantificación por WB del contenido proteico de SOD-1 (**Figura 6**) y SOD-2 (**Figura 7**), nos muestra un aumento estadísticamente significativo en neuronas tratadas con PRL en comparación con las neuronas control y las neuronas tratadas con Glu. Tal como lo descrito en la literatura se esperaba que el Glu disminuyera el contenido de dichas enzimas. (Cong et al., 2015)

En cuanto a la actividad de la SOD existe una asociación entre el aumento del contenido proteico y el aumento en la actividad de dicha enzima, en la literatura se describe que la PRL induce aumento en enzimas de los sistemas antioxidantes cuando se produce un daño por el glutamato además de que la actividad también se ve aumentada (Olatunji et al., 2015)

Detectamos la expresión basal de SOD y observamos que PRL indujo un incremento tanto en su actividad como en su expresión. Ya que se observó una sobreproducción de SOD en los tratamientos con la PRL podemos sugerir que están favoreciendo la cascada para la activación de SOD lo cual genera una protección al sistema si lo comparamos con lo que sucede con el Glu en donde esta enzima tuvo su menor expresión así como una baja actividad.

La prolactina previene del daño a membranas lipídicas en neuronas hipocampales expuestas ante estrés excitotóxico.

Tal como se indica en la introducción, el estrés excitotóxico tiene como característica la generación de EROs por desacoplamiento mitocondrial y como consecuencia las membranas lipídicas se ven seriamente dañadas formando productos de lipoperoxidación.

La formación de lípidos modificados por oxidación puede causar disfunción celular y en células posmitóticas como las neuronas, la muerte.

La peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados en las membranas celulares, inicia un deterioro acumulativo de las funciones membranales y provoca disminución en la fluidez, reducción en el potencial electroquímico y el aumento de la permeabilidad de la membrana. (Harman, 1994 y Zaccai, 2000)

Cuando evaluamos la lipoperoxidación se observó que el daño inducido por el glutamato aumentó en un 30% en comparación con los grupos Ctrl, PRL y PRL/GLU. En los grupos tratados con PRL hubo una disminución o se mantuvieron como el Ctrl en la formación de lípidos oxidados siendo así que la PRL está contrarrestando el daño a la membrana, mostrando niveles bajos de lipoperoxidación en comparación con el Glu.

En resumen, los resultados obtenidos en el presente trabajo nos demuestran que la administración de PRL ejerce un efecto neuroprotector en las neuronas hipocampales de rata expuestas ante estrés excitotóxico posiblemente con la contribución de un aumento de la actividad y contenido proteico de las isoformas de la SOD. Reduciendo así el estrés oxidante (ERO) y con ello disminuyendo el daño a membranas lipídicas.

VIII. CONCLUSIÓN

Parte del mecanismo por el cual la PRL induce neuroprotección ante daño excitotóxico causado por el Glu puede estar mediado por el incremento en el contenido proteico y la actividad de SOD, lo que está generando sobreexpresión de este sistema antioxidante y esto favorece la disminución de EROs.

En caso contrario el Glu induce una disminución de la actividad de estos sistemas lo cual correlacionó con una disminución en el número celular y se observó que induce una mayor concentración de productos derivados de lipoperoxidación lo que probablemente causa muerte neuronal. De manera opuesta la PRL disminuye la lipoperoxidación causada por daño excitotóxico por lo que puede en forma alternativa contribuir a contrarrestar el daño producido por el incremento en ERO.

IX. PERSPECTIVAS

- Evaluar el efecto de la PRL sobre la capacidad antioxidante total.
- Evaluar el efecto de PRL sobre otros sistemas antioxidantes enzimáticos: GSH y peroxirredoxina.
- Cuantificar la generación de ROS en neuronas tratadas con PRL y PRL/Glu (2,4-diclorofluoresceína).
- Caracterizar la estructura y funcionamiento mitocondrial (Mitotracker Red FM).

X. BIBLIOGRAFÍA

Albensi, B. C. (2001). *Models of brain injury and alterations in synaptic plasticity*. Journal of neuroscience research, 65(4), 279-283.

Abolaji, A. O., Adesanoye, O. A., Awogbindin, I., & Farombi, E. O. (2016). *Endocrine disruption and oxidative stress implications of artemether–lumefantrine combination therapy in the ovary and uterus of rats*. Human & experimental toxicology, 0960327115626580.

Álvarez Fernández G., Bustos Jaimes I., Castañeda Patlan C., Guevara Fonseca J., Romero Álvarez I., Vázquez Meza H., (2010). *Radicales libres y estrés oxidativo en las enfermedades neurodegenerativas*. Mensaje Bioquímico, 34: 43-59.

Andreyen A.Y., Kushnareva Y.E., Starkov A.A. (2005). *Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species*. Biochemistry 70 (2):200-214.

Barnham, K. J., Masters, C. L., & Bush, A. I. (2004). *Neurodegenerative diseases and oxidative stress*. Nature reviews Drug discovery, 3(3), 205-214.

Beckman, K. B., & Ames, B. N. (1998). *The free radical theory of aging matures*. Physiological reviews, 78(2), 547-581.

Behl, C., & Holsboer, F. (1999). *The female sex hormone oestrogen as a neuroprotectant*. Trends in pharmacological sciences, 20(11), 441-444.

Ben-Jonathan, N., Mershon, J. L., Allen, D. L., & Steinmetz, R. W. (1996). *Extrapituitary Prolactin: Distribution, Regulation, Functions, and Clinical Aspects**. *Endocrine reviews*, 17(6), 639-669.

Berman, R. M., Krystal, J. H. & Charney, D. S. (1996). *Biology of Schizophrenia and Affective Disease* (ed. Watson, S. J.) 295–368 American Psychiatric Press, Washington, D.C.

Blokhina, O., Virolainen, E., & Fagerstedt, K. V. (2003). *Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review*. *Annals of botany*, 91(2), 179-194.

Brewer, G. J., Torricelli, J. R., Evege, E. K., & Price, P. J. (1993). *Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented neurobasal™, a new serum-free medium combination*. *Journal of neuroscience research*, 35(5), 567-576.

Brinton, R. D. (1998). *A women's health issue: Alzheimer's disease and strategies for maintaining cognitive health*. *International journal of fertility and women's medicine*, 44(4), 174-185.

Brinton, R. D., Chen, S., Montoya, M., Hsieh, D., & Minaya, J. (2000). *The estrogen replacement therapy of the Women's Health Initiative promotes the cellular mechanisms of memory and neuronal survival in neurons vulnerable to Alzheimer's disease*. *Maturitas*, 34, S35-S52.

Broadbent, N. J., Squire, L. R., & Clark, R. E. (2004). *Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101(40), 14515-14520.

Broman J., Hassel B., Rinvik E., (2000), *Biochemistry DNA anatomy of neurotransmitter glutamate*, in *Handbook of chemical neuroanomy: Glutamate*, Vol 18 pp 1-44. El servier, Amsterdam.

Cabrera, V., Cantú, D., Ramos, E., Vanoye-Carlo, A., Cerbón, M., & Morales, T. (2009). *Lactation is a natural model of hippocampus neuroprotection against excitotoxicity*. Neuroscience letters, 461(2), 136-139.

Cárdenas-Rodríguez N, Pedraza-Chaverri J. (2006). *Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes; aspectos básicos*. Educación Química 17(2): 164-173.

Cardinali, D. P. (2007). *Neurociencia aplicada: sus fundamentos*. Ed. Médica Panamericana.

Carter, D.A., Lightman, S.L., (1987). *Oxytocin responses to stress in lactating and hyperprolactinaemic rats*. Neuroendocrinology 46, 532–537.

Chihuailaf, R. H., Contreras, P. A., & Wittwer, F. G. (2002). *Patogénesis del estrés oxidativo: Consecuencias y evaluación en salud animal Pathogenesis of oxidative stress: Consequences and evaluation in animal health*. Vet. Méx, 33(3), 265.

Chiosa, L., & Gane, P. (1956). *Action of glutamic acid on the higher nervous activity of small laboratory animals (rats); considerations on the relations between the biochemical substratum and the higher nervous activity*. *Revue des sciences médicales*, 1(1), 165.

Chirino, Y. I., & Pedraza-Chaverri, J. (2009). *Role of oxidative and nitrosative stress in cisplatin-induced nephrotoxicity*. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 61(3), 223-242.

Cong, L., Cao, C., Cheng, Y., & Qin, X. Y. (2015). *Green Tea Polyphenols Attenuated Glutamate Excitotoxicity via Antioxidative and Antiapoptotic Pathway in the Primary Cultured Cortical Neurons*. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016.

Corona, J. C., & Tapia, R. (2007). *Ca²⁺-permeable AMPA receptors and intracellular Ca²⁺ determine motoneuron vulnerability in rat spinal cord in vivo*. *Neuropharmacology*, 52(5), 1219-1228.

Coyle, J. T., & Puttfarcken, P. (1993). *Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders*. *Science*, 262(5134), 689-695.

Curtis, D. R., & Watkins, J. C. (1963). *Acidic amino acids with strong excitatory actions on mammalian neurones*. *The Journal of physiology*, 166(1), 1.

de Souza-Pinto, N. C., Wilson, D. M., Stevnsner, T. V., & Bohr, V. A. (2008). *Mitochondrial DNA, base excision repair and neurodegeneration*. *DNA repair*, 7(7), 1098-1109

Dinkova-Kostova, A. T., & Talalay, P. (2008). *Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins*. *Molecular nutrition & food research*, 52(S1), S128-S138.

Dolci, G. S., Vey, L. T., Schuster, A. J., Roversi, K., Roversi, K., Dias, V. T., & Glanzner, W. G. (2014). *Hypoxia acclimation protects against oxidative damage and changes in prolactin and somatolactin expression in silver catfish (Rhamdia quelen) exposed to manganese*. *Aquatic Toxicology*, 157, 175-185.

Donner, N., Bredewold, R., Maloumy, R., & Neumann, I. D. (2007). *Chronic intracerebral prolactin attenuates neuronal stress circuitries in virgin rats*. *European Journal of Neuroscience*, 25(6), 1804-1814.

Dorado-Martínez C, Rogerio-Vargas C, Rivas-Arancibia S.(2003) *Estrés oxidativo y neurodegeneración*. *Revista Facultad de Medicina UNAM* 46(6): 229-235.

Dumont, M., Wille, E., Stack, C., Calingasan, N. Y., Beal, M. F., & Lin, M. T. (2009). *Reduction of oxidative stress, amyloid deposition, and memory deficit by manganese superoxide dismutase overexpression in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease*. *The FASEB Journal*, 23(8), 2459-2466.

Estrada-Sánchez, A. M., Montiel, T., & Massieu, L. (2010). *Glycolysis Inhibition Decreases the Levels of Glutamate Transporters and Enhances Glutamate Neurotoxicity in the R6/2 Huntington's Disease Mice*. *Neurochemical research*, 35(8), 1156-1163.

Evans, R. H., Francis, A. A., Hunt, K., Oakes, D. J., & Watkins, J. C. (1979). *Antagonism of excitatory amino acid-induced responses and of synaptic excitation*

in the isolated spinal cord of the frog. British journal of pharmacology, 67(4), 591-603.

Fang, X. X., Jiang, X. L., Han, X. H., Peng, Y. P., & Qiu, Y. H. (2013). *Neuroprotection of interleukin-6 against NMDA-induced neurotoxicity is mediated by JAK/STAT3, MAPK/ERK, and PI3K/AKT signaling pathways*. Cellular and molecular neurobiology, 33(2), 241-251.

Featherstone, K., White, M. R. H., & Davis, J. R. E. (2012). *The Prolactin Gene: A Paradigm of Tissue-Specific Gene Regulation with Complex Temporal Transcription Dynamics*. Journal of neuroendocrinology, 24(7), 977-990.

Fonnum, F. (1984). *Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain*. Journal of neurochemistry, 42(1), 1-11.

Freeman, M. E., Kanyicska, B., Lerant, A., & Nagy, G. (2000). *Prolactin: structure, function, and regulation of secretion*. Physiological reviews, 80(4), 1523-1631.

Geddes, J. W. (1999). *Glutamate receptors and excitotoxic mechanisms in Alzheimer's disease*. In Cerebral Cortex (pp. 655-679). Springer US.

Grattan, D. R., & Kokay, I. C. (2008). *Prolactin: a pleiotropic neuroendocrine hormone*. Journal of neuroendocrinology, 20(6), 752-763.

Grattan, D. R., Steyn, F. J., Kokay, I. C., Anderson, G. M., & Bunn, S. J. (2008). *Pregnancy-induced adaptation in the neuroendocrine control of prolactin secretion*. Journal of neuroendocrinology, 20(4), 497-507.

Green, D. R., & Kroemer, G. (2005). *Pharmacological manipulation of cell death: clinical applications in sight?*. *The Journal of clinical investigation*, 115(10), 2610-2617.

Halliwell, B. (2001). *Role of free radicals in the neurodegenerative diseases*. *Drugs & aging*, 18(9), 685-716.

Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, USA.

Hamanaka, R. B., & Chandel, N. S. (2010). *Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes*. *Trends in biochemical sciences*, 35(9), 505-513.

Hamberger, A., Hedquist, B., & Nyström, B. (1979). *Ammonium ion inhibition of evoked release of endogenous glutamate from hippocampal slices*. *Journal of neurochemistry*, 33(6), 1295-1302.

Hansberg, T.W. (2002). *Biología de las especies de oxígeno reactivas*. *Mensaje bioquímico*;26:19-54.

Harman, D. (1992). *Free radical theory of aging*. *Mutation Research/DNAging*, 275(3-6), 257-266.

Hassel, B., & Dingledine, R. (2006). *Glutamate*. *Basic neurochemistry*, 7, 267-290.

Henderson, V. W. (1997). *Estrogen, cognition, and a woman's risk of Alzheimer's disease*. The American journal of medicine, 103(3), 11S-18S.

Hoffman, G. E., Merchenthaler, I., & Zup, S. L. (2006). *Neuroprotection by ovarian hormones in animal models of neurological disease*. Endocrine, 29(2), 217-231.

Holtzclaw, W. D., Dinkova-Kostova, A. T., & Talalay, P. (2004). *Protection against electrophile and oxidative stress by induction of phase 2 genes: the quest for the elusive sensor that responds to inducers*. Advances in enzyme regulation, 44(1), 335-367.

Huang, C., Snider, F., Cross, J.C., (2009). *Prolactin receptor is required for normal glucose homeostasis and modulation of beta-cell mass during pregnancy*. Endocrinology 150, 1618–1626.

Wu, J., Sun, Y., Zhao, Y., Zhang, J., Luo, L., Li, M., ... & Xiong, G. (2015). *Deficient plastidic fatty acid synthesis triggers cell death by modulating mitochondrial reactive oxygen species*. Cell research, 25(5), 621-633.

Kandel, E. R., Schwartz, J. H., & Jessell, T. M. (Eds.). (2000). *Principles of neural science* (Vol. 4, pp. 1227-1246). New York: McGraw-hill.

Kelley, K. W., Weigent, D. A., & Kooijman, R. (2007). *Protein hormones and immunity*. Brain, behavior, and immunity, 21(4), 384-392.

Kleindienst, A., McGinn, M.J., Harvey H. B., Colello, R. J., Hamm, R. J., y Bullock, M. R. (2005). *Enhanced Hippocampal Neurogenesis by Intracentricular S100B Infusion is Associated with Improved Cognitive Recovery after Traumatic Brain Injury*. Journal of Neurotrauma, 22, 645-55.

Kokay, I. C., Bull, P. M., Davis, R. L., Ludwig, M., & Grattan, D. R. (2006). *Expression of the long form of the prolactin receptor in magnocellular oxytocin neurons is associated with specific prolactin regulation of oxytocin neurons*. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 290(5), R1216-R1225.

Krystal, J. H., D'Souza, D. C., Petrakis, I. L., Belger, A., Berman, R. M., Charney, D. S., & Madonick, S. (1999). *NMDA agonists and antagonists as probes of glutamatergic dysfunction and pharmacotherapies in neuropsychiatric disorders*. Harvard review of psychiatry, 7(3), 125-143.

Lehninger D., Michael N., Cox M.. (2002). Principles of Biochemistry. Fourth Edition. pg. 659-670.

Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Krieger, M., Bretscher, A., Ploegh, H., & Amon, A. (2014). *Biologia celular e molecular*. Artmed Editora.

Logan, W. J., & Snyder, S. H. (1972). *High affinity uptake systems for glycine, glutamic and aspartic acids in synaptosomes of rat central nervous tissues*. Brain Research, 42(2), 413-431.

Machon, O., Backman, M., Machonova, O., Kozmik, Z., Vacik, T., Andersen, L., & Krauss, S. (2007). *A dynamic gradient of Wnt signaling controls initiation of neurogenesis in the mammalian cortex and cellular specification in the hippocampus*. *Developmental biology*, 311(1), 223-237.

Majid A. (2014). *Neuroprotection in stroke: past, present and future*. Hindawi, 1-17

Maia, M. R., Chaudhary, L. C., Figueres, L., & Wallace, R. J. (2007). *Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 91(4), 303-314.

Manji, H. K., Moore, G. J., Rajkowska, G., & Chen, G. (2000). *Neuroplasticity and cellular resilience in mood disorders*. *Molecular psychiatry*, 5(6), 578-593.

Marcus, D. L., Strafaci, J. A., & Freedman, M. L. (2005). *Differential neuronal expression of manganese superoxide dismutase in Alzheimer's Disease*. *Medical Science Monitor Basic Research*, 12(1), BR8-BR14.

Marin-Guzman, J., Mahan, D. C., & Pate, J. L. (2000). *Effect of dietary selenium and vitamin E on spermatogenic development in boars*. *Journal of animal science*, 78(6), 1537-1543.

McCord, J. M. (2000). *The evolution of free radicals and oxidative stress*. *The American journal of medicine*, 108(8), 652-659.

Medina-Ceja, L., Guerrero-Cazares, H., Canales-Aguirre, A., Morales-Villagrán, A., & Feria-Velasco, A. (2007). *Características estructurales y funcionales de los transportadores de glutamato: su relación con la epilepsia y el estrés oxidativo*. *Rev Neurol*, 45(6), 341-352.

Mendoza-Garcés, L., Rodríguez-Dorantes, M., Álvarez-Delgado, C., Vázquez-Martínez, E. R., Garcia-Tobilla, P., & Cerbón, M. A. (2013). *Differential DNA methylation pattern in the A and B promoters of the progesterone receptor is associated with differential mRNA expression in the female rat hypothalamus during proestrus*. *Brain research*, 1535, 71-77.

Nath, K. A., & Norby, S. M. (2000). *Reactive oxygen species and acute renal failure*. *The American journal of medicine*, 109(8), 665-678.

Noble, J. E., & Bailey, M. J. (2009). *Quantitation of protein*. *Methods in enzymology*, 463, 73-95.

Olatunji, O. J., Chen, H., & Zhou, Y. (2015). *Lycium chinensis Mill attenuates glutamate induced oxidative toxicity in PC12 cells by increasing antioxidant defense enzymes and down regulating ROS and Ca²⁺ generation*. *Neuroscience letters*. 616:111-8.

Oldfield, J. E. (2003). *Some recollections of early swine research with selenium and vitamin E*. *Journal of Animal Science*, 81(14_suppl_2), E145-E148.

Olguín, C.G.; Guiller, G.M.; Zúñiga, R.R.A.; Pasquetti, P.A. (2004). *Antioxidantes y arterosclerosis*. Revista de Endocrinología y Nutrición Vol. 12, No. 4 pp 199-206.

Payne, J. L., Quiroz, J. A., Zarate, C. A., & Manji, H. K. (2002). *Timing is everything: does the robust upregulation of noradrenergically regulated plasticity genes underlie the rapid antidepressant effects of sleep deprivation?*. Biological psychiatry, 52(10), 921-926.

Pena, F., & Tapia, R. (2000). *Seizures and neurodegeneration induced by 4-aminopyridine in rat hippocampus in vivo: role of glutamate- and GABA-mediated neurotransmission and of ion channels*. Neuroscience, 101(3), 547-561.

Pérez-Torres, I., El Hafidi, M., Infante, O., & Baños, G. (2008). *Effects of sex hormone levels on aortic vascular reactivity and variables associated with the metabolic syndrome in sucrose-fed female rats*. Canadian journal of physiology and pharmacology, 86(1-2), 25-35.

Redolat, I. R., y Carrasco, P.C. (2007). *Hormonas esteroides y procesos cognitivos*. En Z. M. Almela, Hormonas, Estado de Animo y función Cognitivo pp 183-185. España: Publicaciones Delta.

Rothman, S. M., & Olney, J. W. (1986). *Glutamate and the pathophysiology of hypoxic-ischemic brain damage*. Annals of neurology, 19(2), 105-111.

Sauer, H., Wartenberg, M., & Hescheler, J. (2001). *Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation*. Cellular Physiology and Biochemistry, 11(4), 173-186.

Shingo, T., Gregg, C., Enwere, E., Fujikawa, H., Hassam, R., Geary, C., Cross, J.C., Weiss, S., (2003). *Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin*. *Science* 299, 117–120.

Smirnoff, N. (Ed.). (2008). *Antioxidants and reactive oxygen species in plants*. John Wiley & Sons. Blackwell Publishing UK.

Stack, E. C., Matson, W. R., & Ferrante, R. J. (2008). *Evidence of oxidant damage in Huntington's disease: translational strategies using antioxidants*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1147(1), 79-92.

Sultana, R., Perluigi, M., & Butterfield, D. A. (2006). *Protein oxidation and lipid peroxidation in brain of subjects with Alzheimer's disease: insights into mechanism of neurodegeneration from redox proteomics*. *Antioxidants & redox signaling*, 8(11-12), 2021-2037.

Szewczyk, A., & Wojtczak, L. (2002). *Mitochondria as a pharmacological target*. *Pharmacological reviews*, 54(1), 101-127.

Tamagno, E., Robino, G., Obbili, A., Bardini, P., Aragno, M., Parola, M., & Danni, O. (2003). *H₂O₂ and 4-hydroxynonenal mediate amyloid β -induced neuronal apoptosis by activating JNKs and p38 MAPK*. *Experimental neurology*, 180(2), 144-155.

Tejadilla, D., Cerbón, M. & Morales, T. (2010). *Prolactin reduces the damaging effects of excitotoxicity in the dorsal hippocampus of the female rat independently of ovarian hormones*. *Neuroscience* 169, 1178–1185

Torner, L., Toschi, N., Pohlinger, A., Landgraf, R., & Neumann, I. D. (2001). *Anxiolytic and anti-stress effects of brain prolactin: improved efficacy of antisense targeting of the prolactin receptor by molecular modeling*. *The Journal of Neuroscience*, 21(9), 3207-3214.

Townsend, J., Cave, B. J., Norman, M. R., Flynn, A., Uney, J. B., Tortonesi, D. J., & Wakerley, J. B. (2005). *Effects of prolactin on hypothalamic supraoptic neurones: evidence for modulation of STAT5 expression and electrical activity*. *Neuroendocrinology letters*, 26(2), 125-130.

Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M. M., & Mazur, M. (2006). *Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer*. *Chemico-biological interactions*, 160(1), 1-40.

Vanoye-Carlo, A., Morales, T., Ramos, E., Mendoza-Rodríguez, A., & Cerbón, M. (2008). *Neuroprotective effects of lactation against kainic acid treatment in the dorsal hippocampus of the rat*. *Hormones and behavior*, 53(1), 112-123.

Varoqui, H., Schäfer, M. K. H., Zhu, H., Weihe, E., & Erickson, J. D. (2002). *Identification of the differentiation-associated Na⁺/PI transporter as a novel vesicular glutamate transporter expressed in a distinct set of glutamatergic synapses*. *The Journal of neuroscience*, 22(1), 142-155.

Venereo Gutiérrez, J. R. (2002). *Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes*. *Revista Cubana de medicina militar*, 31(2), 126-133.

Vergara-Castañeda, E., Grattan, D. R., Pasantes-Morales, H., Pérez-Domínguez, M., Cabrera-Reyes, E. A., Morales, T., & Cerbón, M. (2016). *Prolactin mediates neuroprotection against excitotoxicity in primary cell cultures of hippocampal neurons via its receptor*. *Brain research*, 1636, 193-199.

Walker, T. L., Vukovic, J., Koudijs, M. M., Blackmore, D. G., Mackay, E. W., Sykes, A. M., ... & Bartlett, P. F. (2012). *Prolactin stimulates precursor cells in the adult mouse hippocampus*. *PLoS One*, 7(9), e44371.

Wallace, D. C., Fan, W., & Procaccio, V. (2010). *Mitochondrial energetics and therapeutics*. *Annual review of pathology*, 5, 297.

Watkins, J. C. (1962). *The synthesis of some acidic amino acids possessing neuropharmacological activity*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 5(6), 1187-1199.

World health organization (WHO), *Neurological disorders affect millions globally: WHO report*. Recuperado el 22 de enero de 2016, de <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2007/pr04/en/>

Ye, Z., Guo, Q., Wang, N., Xia, P., Yuan, Y., & Wang, E. (2012). *Delayed neuroprotection induced by sevoflurane via opening mitochondrial ATP-sensitive potassium channels and p38 MAPK phosphorylation*. *Neurological Sciences*, 33(2), 239-249.

Zaccai, G. (2000). *How soft is a protein? A protein dynamics force constant measured by neutron scattering*. *Science*, 288(5471), 1604-1607.

Zhao, L., Liu, X., Liang, J., Han, S., Wang, Y., Yin, Y., & Li, J. (2013). *Phosphorylation of p38 MAPK mediates hypoxic preconditioning-induced neuroprotection against cerebral ischemic injury via mitochondria translocation of Bcl-xL in mice*. *Brain research*, 1503, 78-88..

Zhou, X., Hollern, D., Andrechek, E., y Wang, H. (2013). *NMDA receptor-mediated excitotoxicity depends on the coactivation of synaptic and extrasynaptic receptors*. *Cell Death and Disease*, 4, 1-11

XI. Abreviaturas

4HNE	4-hidroxi-2-nonenal.
ADP	Adenosin difosfato.
AIF	Factor inhibidor de la apoptosis.
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4 isoxazolpropiónico.
ARN	Ácido ribonucleico.
ATP	Adenosin trifosfato.
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro.
CAT	Catalasa.
CoA	Coenzima A.
CTE	Cadena transportadora de electrones.
DNA	Acido desoxirribonucleico.
ELA	Esclerosis amiotrófica lateral.
ERO	Especies reactivas de oxígeno.
FADH ₂	Flavin adenin dinucleotido.
FPM	Fuerza protón motriz.
GCL	Glutamato-cisteína ligasa.
GH	Hormona del crecimiento.
GLU	Glutamato.
GLU1	Transportador de glutamato.
GPx	Glutación peróxidos.
GTS	Glutación S-trasferasas.
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno.
IGF-1	Factor de crecimiento tipo insulínico.
LDL	Lipoproteína de baja densidad.
L-OOH	Lipoperóxido.
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazol.
NAD ⁺	Nicotinamida adenin dinucleotido oxidado.
NADH	Dinucleotido de nicotinamida-adenina fosfato.

NADPH	Nicotinamida adeninucleotido fosfato reducido.
NGF	Factor de crecimiento nervioso.
NMDA	N-metil-D-aspartato.
O_2^- ,	Anion superoxido.
OH	Radical hidroxilo.
PRL	Prolactina.
RL	Radicales libres.
SNC	Sistema nervioso central.
SOD	Superóxido dismutasa.
Trx	Tioredoxina-redutasas
WST	2-(4-yodofenil)-3- (4-nitrofenil) -5- (2,4-sulfofenil) - 2 Tetrazolio, sal monosódico.
XO	Xantina oxidasa.