



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

EFEECTO DE LA PROLACTINA SOBRE LA RESPUESTA GLIAL EN EL
HIPOCAMPO DE LA RATA HEMBRA EN EL MODELO DE DAÑO NEURONAL
INDUCIDO POR EL ÁCIDO KAÍNICO

PRESENTA:

M EN C. JULIO DANIEL REYES MENDOZA

DIRECTORA DE TESIS

DRA. MARÍA TERESA MORALES GUZMÁN

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

COMITÉ TUTOR

DR. JOSÉ FERNANDO PEÑA ORTEGA

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

DRA. CLAUDIA GONZÁLEZ ESPINOSA

DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA, CINVESTAV SEDE SUR

CIUDAD DE MÉXICO, SEPTIEMBRE 2020



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.

Reconocimientos

El presente proyecto de doctorado se realizó en el laboratorio de Neuroanatomía Funcional y Neuroendocrinología del Departamento de Neurobiología Celular y Molecular del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México Campus Juriquilla, bajo la dirección de la Dra. María Teresa Morales Guzmán.

Dicha investigación fue realizada gracias al programa UNAM-DGAPA-PAPIIT-IN204718, además del apoyo económico del CONACYT A1S8948. El autor contó con beca del CONACYT (429388).

Contó con la guía constante del comité tutorial integrado por:

Dra. María Teresa Morales Guzmán

Dr. José Fernando Peña Ortega

Dra. Claudia González Espinosa

Además, agradecemos el apoyo técnico brindado por el personal del INB:

Biol. María Eugenia Ramos Aguilar

PhD. Preethi Jayakumar

I.S.C. Elsa Nydia Hernández Ríos

L.Q.C. Víctor Hugo Pérez Romero

Dra. Alejandra Castilla León

M.V.Z. Martín García Servín

Personal de apoyo del bioterio del INB

Resumen

La neuroinflamación involucra un conjunto de respuestas que ocurre como resultado de un daño al cerebro. Entre estas respuestas se encuentra un incremento en la astrogliosis y la microgliosis. En estudios previos del laboratorio demostramos que el tratamiento con la hormona prolactina (PRL) disminuye la pérdida neuronal en el hipocampo de ratas hembra ovariectomizadas, inducida por la administración del agonista glutamatérgico, ácido kaínico (KA). Este efecto estuvo relacionado con un decremento en la activación astrocítica.

En este trabajo, investigamos si el tratamiento previo con PRL disminuye la astrogliosis y microgliosis en el hipocampo dorsal y cómo es que se modula la expresión de diferentes factores inflamatorios como $TNF\alpha$, iNOS, IL-6, IL-10 e IL-4 en respuesta a la administración de KA. Para esto, ratas hembra ovariectomizadas fueron tratadas crónicamente con PRL (0.1mg / día / 4 días, SC). En el tercer día de tratamiento con la hormona, las ratas fueron administradas con una inyección de KA (7.5mg / Kg, IP) y fueron sacrificadas 24 y 48h después de la inducción del daño.

El tratamiento con la PRL redujo la astro y microgliosis inducidas por el KA, en las áreas CA4, CA3 y CA1 del hipocampo dorsal. En adición, un análisis morfométrico de la microglía en el área CA4, mostró que la PRL disminuye la activación de estas células en respuesta a la lesión. El análisis de los marcadores anti y proinflamatorios reveló que la PRL induce un incremento en la expresión de la IL-10 e IL-4 en las neuronas del hipocampo, lo cual fue acompañado de una disminución en la expresión de $TNF\alpha$ y la iNOS en ratas sujetas al daño en el hipocampo.

Además, experimentos preliminares en cultivos primarios de astrocitos indican que el tratamiento con PRL (10nM) disminuye la expresión de la iNOS, así como de la IL-1 β , ambas inducidas por el KA, lo que sugiere que la PRL tiene un efecto directo sobre los astrocitos en la disminución ambos marcadores inflamatorios.

En conjunto, estos resultados indican que la PRL tiene un efecto antiinflamatorio en el hipocampo, visto como una disminución en la astrogliosis y la activación microglial, así como por una reducción en la expresión en marcadores proinflamatorios, probablemente por una regulación de la IL-10 e IL-4 neuronal.

Abstract

Neuroinflammation involves a set of responses occurring as a result of brain damage including astro- and microgliosis. In previous studies, we showed that treatment with prolactin (PRL) decreased neuronal loss induced by kainic acid (KA) in the hippocampus of female rats. This effect correlated with a decrease in astrogliosis.

Here, we investigate whether treatment with PRL decreases astro- and microgliosis in the dorsal hippocampus, and how it modulates the expression of some important inflammatory factors such as TNF α , iNOS, IL-6, IL-10 and IL-4 after an excitotoxic lesion. For this, ovariectomized female rats were treated chronically with PRL (0.1 mg / day for 4 days, SC). On the third day of treatment, they received a KA injection (7.5 mg / kg, IP) and were sacrificed 24 or 48 h later.

Chronic treatment with PRL reduced the astro- and micro-gliosis in CA4, CA3, and CA1 hippocampal subfields induced by KA. Morphometric analysis in CA4 showed that PRL reduced microglial activation. The analysis for anti- and pro-inflammatory cytokines revealed an increase of IL-10 and IL-4 in neurons due to treatment with PRL, accompanied by a decrease in the expression of TNF α and iNOS in lesioned rats.

Furthermore, preliminary experiments in primary astrocyte cultures indicate that treatment with PRL (10nM) decreases the expression of iNOS, as well as IL-1 β both induced by KA, suggesting that PRL has a direct effect on astrocytes in the decrease of both inflammatory markers.

Together, these results indicate that PRL has anti-inflammatory actions in the hippocampus, both by decreasing the astrogliosis and microglial activation and by reducing the level of pro-inflammatory cytokines probably through the upregulation of neuronal IL-10 and IL-4.

Índice

1. Introducción.	1
2. Generalidades de la Prolactina.	2
3. PRL y neuroprotección.	3
4. Neurodegeneración por KA.	4
5. PRL y apoptosis.	6
6. PRL y enzimas antioxidantes.	7
7. PRL y neuroinflamación.	7
8. Antecedentes: PRL, KA y gliosis.	8
9. Planteamiento del problema.	11
10. Hipótesis.	12
11. Objetivos.	13
12. Material y método.	14
12.1. Sujetos.	14
12.2. Diseño experimental.	14
12.3. Obtención y procesamiento del tejido.	15
12.4. Inmunohistoquímica por Diaminobencidina (DAB).	16
12.5. Inmunohistoquímica por inmunofluorescencia.	16
12.6. Conteo celular.	17
12.7. Análisis morfométrico de la microglía.	17
12.8. Colocalización de marcadores.	18
12.9. Western blot.	18
12.10. Cultivo primario de astrocitos.	19
12.11. PCR cuantitativo en tiempo real.	20
12.12. Análisis estadístico.	21
13. Resultados.	22
13.1. El tratamiento con PRL incrementa los niveles de IL-4 e IL-10 en el hipocampo en ausencia de daño excitotóxico.	22

13.2 La PRL disminuye la astrogliosis en el hipocampo de sujetos administrados con KA.23
13.3 El tratamiento con PRL disminuyo la microgliosis inducida por el KA. .25	
13.4 El tratamiento con PRL redujo los niveles de citocinas proinflamatorias inducidas por la administración de KA.27
13.5 El tratamiento con PRL incrementó la IL-4 e IL-10 en las neuronas del hipocampo.29
13.6 El tratamiento con PRL reduce la expresión de la iNOS e IL-1 en cultivos de astrocitos.	29
14. Discusión de resultados.34
15. Conclusión.	39
16. Referencias.	40
17. Anexo I (Ovariectomía).	47

1. Introducción

Los astrocitos y la microglía son dos de los principales tipos de células gliales en el SNC. Entre sus funciones se encuentran el aclaramiento de neurotransmisores (Schousbe et al., 2014), el proveer de sustratos energéticos a las neuronas (Paliocelli et al. 2011), el mantenimiento del balance iónico (Quesseveur et al. 2013), entre otras. Además, durante un proceso neurodegenerativo ambos tipos celulares están encargados de llevar a cabo el proceso inflamatorio dentro del sistema nervioso central (SNC; Dong y Benveniste, 2001). Esta neuroinflamación está caracterizada por un incremento en la liberación de diversos elementos derivados de la microglía y los astrocitos como citocinas (DiSabato et al., 2016) y factores tróficos (Gomes et al., 2013) los cuales tienen como finalidad restablecer la homeostasis del sistema. Sin embargo, dicho proceso debe ser altamente regulado ya que un desbalance en esta respuesta puede llevar a un incremento en la degeneración neuronal. Durante la neuroinflamación las células gliales cambian considerablemente su fenotipo. En el caso del astrocito este se caracteriza por un incremento en la expresión de la proteína ácida fibrilar (GFAP) y una hipertrofia del soma y sus procesos (Liddel y Barres 2017). En relación a la microglía, existe una disminución en las ramificaciones de cada célula tomando una forma de tipo ameboide (Walker y Lue, 2015). En ambos casos existe un incremento en el número de células alrededor del sitio de la lesión (Jorgensen et al., 1993).

Por otra parte, durante un daño excitotóxico como el que es inducido por la administración de ácido kaínico (KA), existe un incremento en la gliosis en el hipocampo (Jorgensen et al., 1993), así como en la expresión de diversos marcadores inflamatorios (Zheng et al., 2010), los cuales se han propuesto que pueden contribuir a aumentar el proceso degenerativo, por ejemplo incrementando la excitabilidad de las neuronas (Zheng et al., 2010; Zhu et al., 2010).

En nuestro laboratorio hemos reportado el papel neuroprotector de la hormona prolactina (PRL) en el modelo de excitotoxicidad por la administración de KA, evidenciando que el tratamiento con esta hormona reduce la pérdida neuronal en el hipocampo de ratas ovariectomizadas (Tejadilla et al. 2010; Morales et al., 2014). Existen diversos mecanismos por los cuales la PRL puede proteger a las neuronas, entre ellos están una disminución en el proceso apoptótico, regulación del estrés oxidativo o una disminución en la respuesta inflamatoria mediada por la glía, sin embargo, la respuesta aún no es clara. Evidencia previa demuestra que cuando el tratamiento es dado después de inducir la lesión con KA, existe una correlación entre una disminución en la degeneración y un decremento de la astrogliosis en el

área CA1 del hipocampo (Reyes-Mendoza y Morales, 2016), sugiriendo una acción sobre los astrocitos.

Existen algunos reportes en los que se pone de manifiesto las acciones de la PRL sobre la glía. Por ejemplo, la PRL disminuye la proliferación de los astrocitos en el hipocampo (Torner et al., 2009) y en la retina (Arnold et al., 2014), además de que regula la expresión de diferentes citocinas como el TNF α (De Vito et al. 1995a). En el caso de la microglía, la PRL promueve la liberación de citocinas pro-inflamatorias e incrementa la actividad fagocítica de estas células (Benedetto et al., 2001).

Tomando en cuenta lo anterior, en este trabajo hipotetizamos que el papel neuroprotector de la PRL puede estar mediado por una regulación de las células gliales. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue investigar si el tratamiento crónico con PRL disminuye la activación de la glía inducida por la administración del KA y si esta hormona modula la expresión de diferentes citocinas inflamatorias como TNF α , iNOS, IL-6, IL-10, and IL-4 en el hipocampo de ratas ovariectomizadas. Encontramos que el tratamiento disminuyó la respuesta astrocítica y microglial inducida por el KA e incremento la expresión de IL-10 e IL-4 en neuronas del hipocampo. Finalmente, estudios preliminares en cultivos primarios de astrocitos sugieren que la PRL disminuye la expresión de la iNOS y la IL-1 β .

2. Generalidades de la Prolactina

La PRL es una hormona de carácter peptídico de entre 197 y 199 aminoácidos. Su síntesis en el organismo se da principalmente en lactotrofos de la hipófisis anterior, sin embargo, se ha determinado que existe síntesis extrahipofisaria en tejidos como la placenta, glándulas mamarias, el timo, entre otros (Freeman et al., 2000). En el sistema nervioso central (SNC), ha sido descrita la síntesis local de PRL en áreas como el hipotálamo, la amígdala, entre otras regiones (REF). Además de la síntesis en el cerebro, la PRL periférica puede cruzar la barrera hematoencefálica a través del plexo coroideo en un mecanismo mediado por su receptor (Walsh et al. 1984), sin embargo, recientemente ha sido propuesto que el ingreso de la PRL al SNC puede involucrar a un mecanismo independientemente del receptor a PRL (RPRL; Brown et al., 2015).

Una vez que la PRL llega a su célula blanco esta se une a su receptor para llevar a cabo sus funciones. El RPRL es una proteína transmembranal de alta afinidad que pertenece a la familia de receptores a citocinas de clase I, el cual comparte una gran similitud con el receptor a la hormona de crecimiento (RGH; Brooks, 2012). Se han descrito tres isoformas del RPRL (largo, corto e intermedio), derivadas de splicing alternativo de un mismo gene. Todos ellos comparten los dominios extracelular y transmembranal, diferenciándose en la longitud del dominio intracelular. Para iniciar

la cascada de señalización de la PRL es necesario la dimerización del RPRL para formar homodímeros. Se han descrito tres vías de señalización principales que sigue la PRL para ejercer sus funciones, la vía de las Jak-stat (stat3 y stat5), la de las MAP cinasas y la de PI3K-akt (Freeman et al., 2000). En el SNC el estudio de las vías de señalización que activa la PRL se ha centrado principalmente en el hipotálamo, donde se ha descrito que la administración de esta hormona activa principalmente la vía de la STAT5 (Yip et al., 2012). En relación a otras regiones cerebrales no hay evidencia suficiente acerca de la señalización por PRL considerando que se ha descrito la expresión del RPRL en diferentes áreas cerebrales (Kokay et al., 2018), incluido el hipocampo (Tejadilla et al., 2010).

Entre las funciones que lleva a cabo la PRL en el SNC se encuentran la regulación de la respuesta al estrés (Torner y Neumann, 2002), la estimulación de la neurogénesis (Shingo, 2003), la inducción de la conducta materna (Bridges et al., 1990), entre otras. En nuestro laboratorio, utilizando el modelo de daño neuronal inducido por el KA, hemos determinado que el tratamiento con PRL, antes o después de la inducción del daño neuronal, tiene un efecto neuroprotector en el hipocampo de ratas ovariectomizadas (OVX; Tejadilla et al., 2010; Reyes-Mendoza y Morales, 2016, 2020).

3. PRL y neuroprotección

El término neuroprotección hace referencia al conjunto de procesos que se dan para evitar la pérdida neuronal cuando el sistema es sometido a algún tipo de insulto. Entre estos procesos se encuentran una disminución en el estado inflamatorio, la inhibición de la apoptosis o una reducción en el estrés oxidativo (Majid, 2014).

Algunos estudios han identificado el papel neuroprotector de la PRL en diferentes modelos de daño. Por ejemplo, en un modelo de hipoxia-isquemia el tratamiento con PRL disminuye el área del infarto cerebral, regula los niveles de glutamato incrementados durante la inducción del daño y reduce la concentración de diferentes sustancias involucradas en la degeneración neuronal como el NO y el calcio (Vermani et al., 2020). Por otra parte, el tratamiento crónico con PRL previene la disminución de la neurogenesis en el hipocampo inducida por el estrés crónico (Torner et al., 2009).

Estudios de nuestro laboratorio, usando a la PRL como tratamiento, han mostrado que esta hormona tiene un efecto neuroprotector en el hipocampo de ratas OVX. Encontramos que el pre-tratamiento (Figura 1A; Tejadilla et al., 2010) disminuye la pérdida neuronal inducida por la administración de KA en el área CA4, CA3 y CA1 del hipocampo y también disminuye la marca positiva del marcador de neurodegeneración, fluorojade C. En contraste, el post-tratamiento con PRL (Figura

1B; Reyes-Mendoza y Morales, 2016) solo fue efectivo en el área CA1, donde fue la única área donde la PRL demostró evitar la muerte celular en comparación al grupo lesionado.

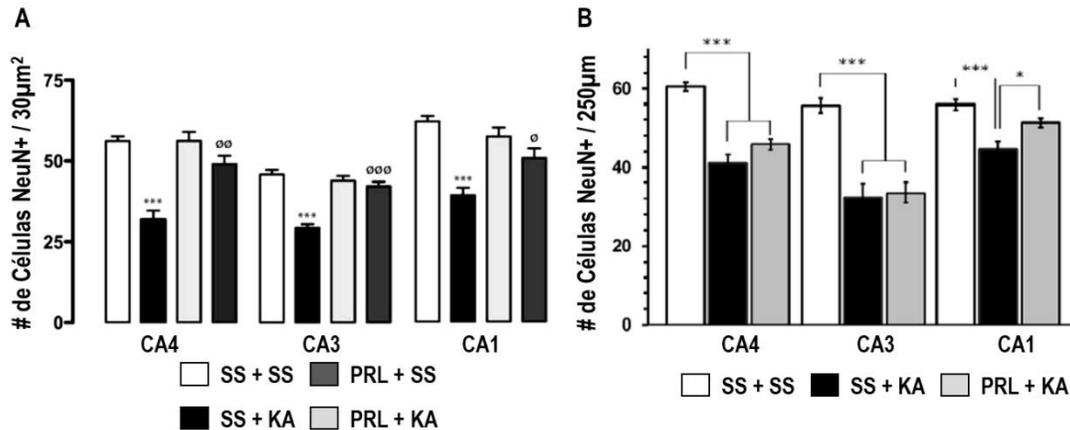


Figura 1. Efecto neuroprotector de la PRL. A) El pre-tratamiento con PRL disminuye el daño neuronal inducido por el KA en las áreas CA4, CA3 y CA1 del hipocampo dorsal. Modificado de: Tejadilla et al., 2010. B) Ilustra los datos de la pérdida neuronal cuando la PRL se administra después de la inducción del daño con KA. Solo en el área CA1 se evidencia el efecto protector de la PRL. Modificado de: Reyes-Mendoza y Morales, 2016.

Es importante mencionar que durante la lactancia, un estado reproductivo donde hay elevados niveles séricos de PRL, se tiene un efecto neuroprotector similar al del tratamiento únicamente con PRL (Vanoye-Carlo et al., 2008).

Considerando lo anterior una pregunta que resalta es el cómo es que la PRL evita la neurodegeneración inducida por la administración del KA. Para poder resolver dicho problema, es importante conocer cuál es el mecanismo de acción que sigue el KA y así considerar posibles blancos que podría seguir la PRL.

4. Neurodegeneración por KA

El KA, es una sustancia aislada una alga roja que crece en zonas subtropicales, *Digenea simplex*. Al ser un agonista de los receptores glutamatérgicos AMPA-kainato, con una afinidad 30 veces mayor al glutamato (Bleakman y Lodge, 1998), dicha sustancia ha sido utilizada en estudios sobre neurodegeneración debido a que su administración produce un fenómeno de muerte celular denominado excitotoxicidad.

La término excitotoxicidad hace referencia al proceso patológico que causa la muerte de las neuronas debido a una activación exacerbada de los receptores del neurotransmisor excitatorio glutamato (Albensi, 2001). Este proceso es un fenómeno que se observa en cualquier tipo de proceso fisiopatológico como la

epilepsia o un evento hipóxico-isquémico. En el caso del KA, produce excitotoxicidad en regiones específicas del cerebro. Una de estas regiones es el hipocampo debido a que presenta una gran densidad de receptores a glutamato tipo kainato (Botana, 2000), lo cual la convierte en una región de alta sensibilidad a esta toxina.

En relación al mecanismo de acción del KA, este inicia con la unión ligando-receptor entre el KA y su receptor (Figura 2). Esto tiene como consecuencia un rápido incremento en el calcio intracelular que sobrepasa los mecanismos celulares de regulación de este ion. Dicho incremento en el calcio se da por diferentes factores: 1) La entrada de sodio debida a la activación del receptor KA despolariza la neurona blanco. 2) La activación del receptor NMDA, el cual presenta alta permeabilidad a calcio, debido a una liberación presináptica de glutamato inducida por el KA. 3) La activación de canales de calcio dependientes de voltaje que permiten el ingreso de calcio. 4) La salida de calcio del retículo endoplásmico. El incremento en el calcio intracelular tiene como consecuencia la activación de diferentes enzimas, por ejemplo, la NADPH oxidasa (NOX) y la óxido nítrico sintasa (NOS). Esta activación lleva a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS), las cuales dañan a la membrana celular, diversas proteínas y al ADN celular (Arundine y Tymianski, 2003; Wang et al. 2005). Por otro lado, el calcio también lleva a una disfunción de la mitocondria, lo que lleva a la muerte celular a través de la vía de las caspasas (Faherty et al., 1999).

Por otra parte, el KA también tiene un efecto sobre la glía, activándola y produciendo un fenómeno de gliosis (Jorgensen et al. 1993). Esto tiene como consecuencia la producción de citocinas proinflamatorias (Zhen et al., 2010; Zhu et al., 2010) y la liberación de aminoácidos excitadores como glutamato (Lehmann y Hanssón, 1988), así como ROS y RNS (Zhang y Zhu, 2011), lo cual trae como consecuencia una exacerbación del daño celular (Lull y Block, 2010).

Considerando el mecanismo de acción del KA descrito previamente, resaltan algunos elementos en los que la PRL podría estar incidiendo para reducir la muerte neuronal en el hipocampo. Tales elementos son una disminución en la apoptosis neuronal, una reducción en el estrés oxidativo o modificando el proceso inflamatorio mediado por los astrocitos y la microglía.

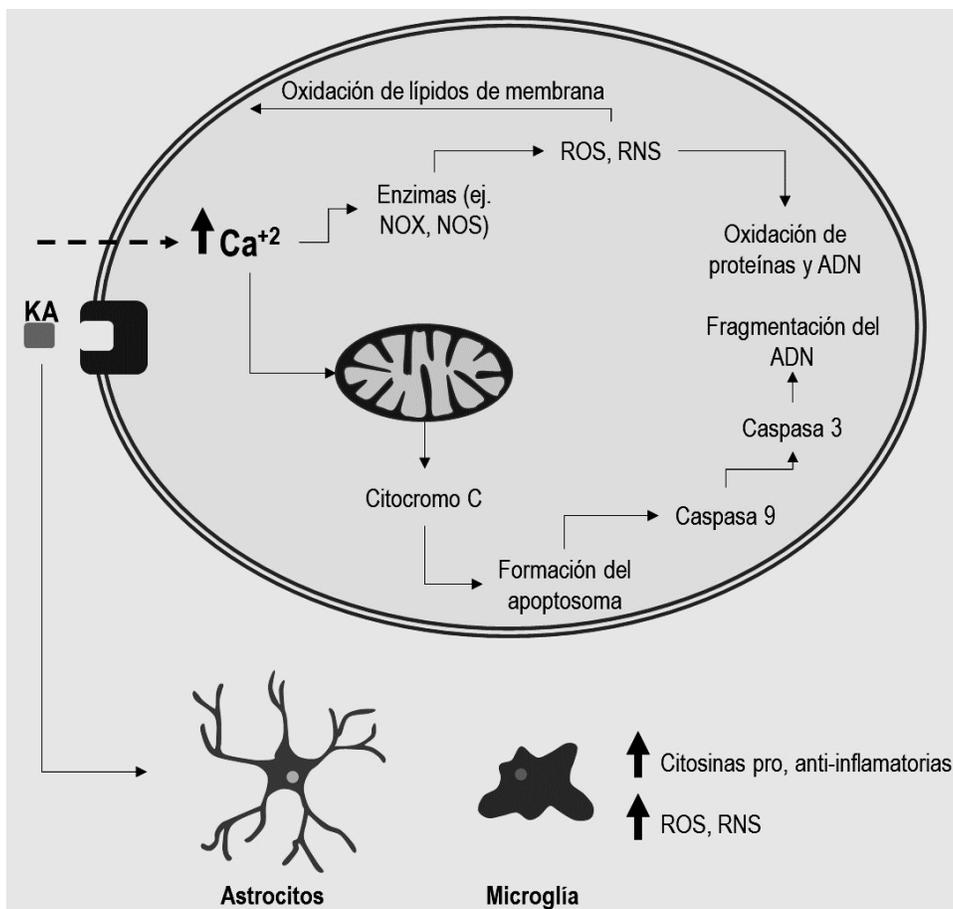


Figura 2. Mecanismo de acción del KA. La interacción del KA con su receptor produce un incremento en la entrada de Ca^{2+} a la célula. El elevado contenido de Ca^{2+} produce por un lado la activación de diferentes enzimas como la NADPH oxidasa (NOX) o la óxido nítrico sintasa (NOS), lo que incrementa los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS), dando como resultado daño a la membrana celular, a proteínas de la célula y el ADN. Por otro lado, el Ca^{2+} produce disfunción mitocondrial activando la vía de las caspasas 9 y 3, induciendo la muerte por apoptosis de la célula. También, el KA actúa sobre los astrocitos y la microglía, induciendo la liberación de citocinas pro y anti-inflamatorias, así como ROS y RNS.

5. PRL y apoptosis

En diversos trabajos utilizando tejidos periféricos, se ha puesto en evidencia el papel de la PRL disminuyendo la apoptosis. Por ejemplo, en células de linfoma Nb2, el tratamiento con dosis crecientes de PRL incrementa los niveles del ARN mensajero para la proteína antiapoptótica bcl-2 (Leff et al., 1996). Un efecto similar es visto en la expresión de la proteína bcl-x (Kochendoerfer et al., 2003). Ambas proteínas están involucradas en la inhibición de la liberación del citocromo C de la mitocondria en el proceso de apoptosis. Este sobre la apoptosis también se ha visto en células de cáncer de mama (Pierce y Chen, 2004). Finalmente, trabajos recientes in vitro en neuronas del hipocampo de roedores han demostrado que la PRL reduce la

relación entre la proteína proapoptótica Bax y bcl-2 en un modelo de muerte celular inducida por glutamato. Además, el efecto se vio relacionado con una disminución en la activación de la caspasa 3 (Rivero-Segura et al., 2017).

6. PRL y enzimas antioxidantes

En relación a una reducción en el estrés oxidativo por PRL, la información que se tiene disponible hace referencia a que esta hormona incrementa los niveles y la actividad de algunas enzimas antioxidantes. Por ejemplo, la administración de PRL a ratas hipofisectomizadas incrementa los niveles del ARN mensajero de la superóxido dismutasa (SOD) en el cuerpo lúteo de los ovarios (Sugino et al 1998). Esta enzima está encargada de la metabolización del radical superóxido a peróxido de hidrogeno. Además, en ratas hembra existe una correlación entre los niveles séricos de PRL y la actividad de la SOD (Bolzan et al., 1995). En el sistema nervioso, la PRL disminuye el daño en la retina inducido por la exposición a peróxido de hidrógeno, al reducir los niveles de ROS debido al incremento en la concentración de glutatión reducido y en la expresión de la enzima encargada de metabolizar al peróxido de hidrógeno, la catalasa (Meléndez et al., 2016; Thébault, 2017).

7. PRL y neuroinflamación

Los astrocitos y la microglía en condiciones fisiológicas desarrollan una gran variedad de funciones como el aclaramiento de neurotransmisores (Schousboe et al., 2014), la poda sináptica (Paolicelli et al., 2011), el mantenimiento del balance iónico y la liberación de factores neurotróficos (Quesseveur et al., 2013). En adición, también están involucrados en el proceso inflamatorio en el SNC cuando este es sometido a algún estrés (Dong y Benveniste, 2001). Este proceso neuroinflamatorio es caracterizado por un incremento en diversos factores como el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF α), la interleucina-4 (IL-4), ROS, entre otros (DiSabato et al., 2016; Gomes et al., 2013), con la finalidad de contener el daño neuronal. Sin embargo, varias de las moléculas liberadas pueden ser tóxicas, de tal suerte que una inflamación descontrolada puede conducir a un evento deletéreo para las neuronas.

Durante la inflamación los astrocitos cambian su fenotipo hacia uno caracterizado por un incremento en la expresión de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) e hipertrofia de su soma y procesos (Liddelow y Barres, 2017), además hay un incremento en el número de astrocitos (astrogliosis) en el área de daño (Joergensen et al., 1993). En el caso de la microglía, esta pasa de un estado en reposo altamente ramificado a uno activado en el que disminuyen el número de procesos o ramificaciones y adquiere una forma ameboide (Walker y Lue, 2015). Al igual que los astrocitos hay un incremento en el número de células de la microglía en el sitio de la lesión (Jorgensen et al., 1993). Por otra parte, hay un incremento en la

expresión de diferentes marcadores inflamatorios como TNF α , IL-1 β , iNOS, IL-6, IL-4, IL-10, entre otros.

En relación a la PRL y una disminución en la neuroinflamación existen algunos trabajos que demuestran que esta hormona puede disminuir la gliosis (Anagnostou et al., 2018). Por ejemplo, se ha visto que esta hormona disminuye el daño en la retina en un modelo de exposición constante a la luz y esto se vio asociado con una disminución en la expresión de GFAP (Arnold et al., 2014). Además, en ratones sometidos a estrés crónico, la PRL disminuye la proliferación de los astrocitos en el hipocampo (Torner et al., 2009) y el tratamiento con PRL modula la expresión de diferentes citocinas como el TNF α en astrocitos in vitro (De Vito et al., 1995). Respecto a la microglía, la información acerca de un posible efecto de la PRL sobre estas células es limitada. Estudios in vitro han demostrado que la PRL inhibe la replicación de *T. gondii* (Benedetto et al., 2001) y el crecimiento de *A. castellanii* (Benedetto y Aurialt, 2002). Ambos efectos son incrementados cuando se hace un cotratamiento con TNF α e INF γ . Finalmente, Modersheim et al. (2007) en un trabajo sobre isquemia cerebral sugirió que la PRL podría tener un efecto modulador de la microglía, ya que estas células presentaron inmunoreactividad a PRL.

En resumen, tomando en cuenta los diversos procesos que activa la administración de KA que pueden llevar a la muerte neuronal, la PRL puede estar actuando en algunos de ellos para evitar la pérdida neuronal en el hipocampo. Evidencia previa de nuestro laboratorio sugiere que la PRL disminuye el proceso neuroinflamatorio al modular la respuesta de los astrocitos y la microglía durante el proceso neurodegenerativo.

8. Antecedentes: PRL, KA y gliosis

Como se mencionó anteriormente, el post-tratamiento con PRL tiene un efecto protector del hipocampo ya que disminuye la pérdida neuronal en el área CA1 inducida por la administración del KA (Figura 1B). Un análisis de los astrocitos por inmunofluorescencia reveló que este efecto se vio acompañado por una disminución en la fracción de área positiva a GFAP en el área CA1 (Figura 3), a diferencia de CA4 y CA3. Al hacer un análisis de correlación se encontró que hubo una correlación negativa entre el número de neuronas y densidad de marca positiva para GFAP (Reyes-Mendoza y Morales, 2016), indicando que la PRL estaría disminuyendo el proceso de astrogliosis.

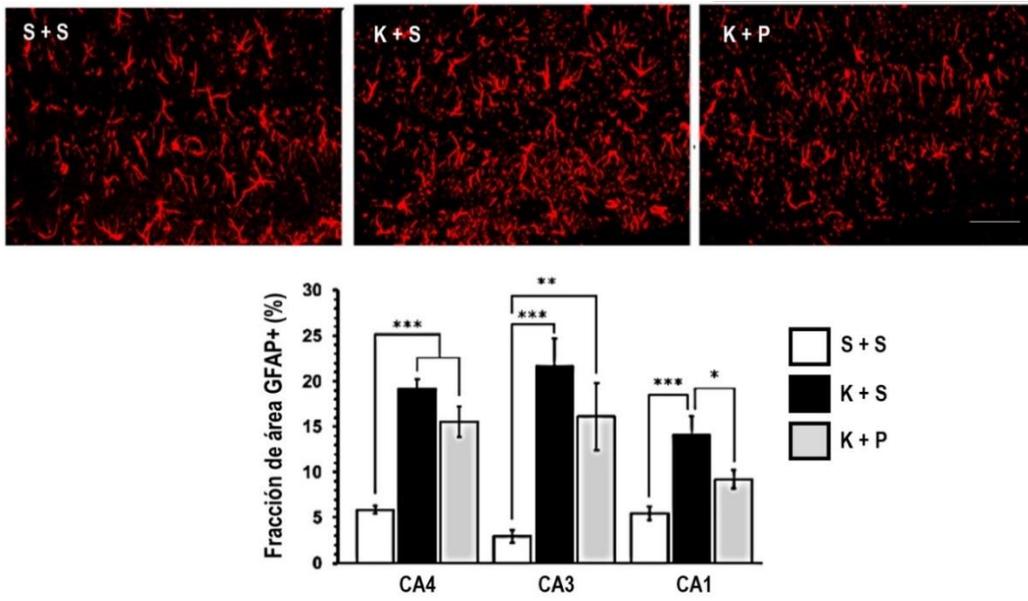


Figura 3. Efecto del post-tratamiento con PRL en CA1. En la parte superior, microfotografías de fluorescencia del área CA1 del hipocampo. El gráfico de barras muestra la cuantificación del porcentaje de píxeles positivos a GFAP, mostrando que en el área CA1 el tratamiento con PRL disminuye significativamente la marca de GFAP a diferencia de CA4 y CA3. S+S (salina + salina), K + S (KA + salina), K + P (KA + PRL). Barra de escala: 100µm. Modificado de: Reyes-Mendoza y Morales, 2016.

Por otra parte, datos no publicados de nuestro laboratorio acerca de la microglía en sujetos que fueron tratados con PRL después de la lesión con KA, muestran que la densidad de marca positiva al marcador específico de microglía, Iba1, no presenta diferencias estadísticamente significativas entre el grupo dañado con KA y el que recibió el post-tratamiento con PRL (Figura 4). Sin embargo, al hacer un acercamiento de las células microgliales, resalta que existe una diferencia en la morfología de las células de sujetos que fueron dañados con KA y aquellos que fueron tratados con PRL, siendo evidente una diferencia en la forma del soma de la microglía y el número de ramificaciones que esta presentó, lo cual sugiere que la PRL podría estar modulando la respuesta de la microglía.

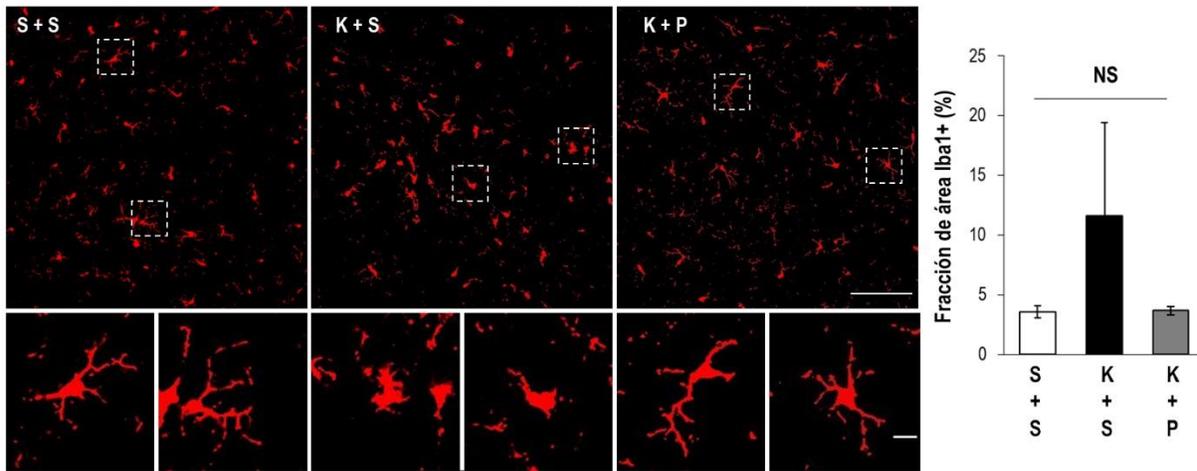


Figura 4. Efecto del post-tratamiento de PRL en la respuesta microglial al KA. Imágenes de fluorescencia del área CA4 utilizadas para la cuantificación del área positiva a Iba1. El tratamiento con PRL no reduce significativamente la respuesta de la microglía al KA. Sin embargo, un acercamiento a las células microgliales muestra que la PRL reduce la pérdida de las ramificaciones de la células, además de que presenta una morfología ramificada en comparación con células de sujetos que solo tienen KA. . S+S (salina + salina), K + S (KA + salina), K + P (KA + PRL). Barra de escala: 100µm, 10 µm. Datos no publicados.

9. Planteamiento del problema

Las evidencias mencionadas anteriormente demuestran el papel neuroprotector de la PRL frente al daño neuronal inducido por la administración de KA, sin embargo, no se explica de qué forma podría afectar la PRL para llevar a cabo dicha función. Evidencia preliminar sugiere que la PRL podría estar modulando la respuesta glial, tanto de astrocitos como microglía, disminuyendo la neuroinflamación frente al daño neuronal, lo cual traería como consecuencia la disminución de la pérdida neuronal.

Con el presente trabajo se pretendió determinar si la PRL disminuye la activación glial inducida por la administración de KA y si el tratamiento modula la respuesta inflamatoria al modular la expresión de moléculas como TNF α , iNOS, IL-6, IL-10, e IL-4, todas ellas presentes durante un proceso neurodegenerativo.

10. Hipótesis

El tratamiento con PRL disminuirá la astrogliosis y la microgliosis en el hipocampo dorsal de ratas ovariectomizadas, causada por la administración de KA. Además, el tratamiento con dicha hormona reducirá la expresión de marcadores proinflamatorios como $\text{TNF}\alpha$, la iNOS y la IL-6 inducidos por la lesión cerebral.

11. Objetivos

- A) Determinar si el tratamiento con PRL modifica la expresión de los marcadores inflamatorios $\text{TNF}\alpha$, iNOS, IL-6, IL-10 e IL-4, en ausencia de daño al hipocampo.

- B) Determinar si la PRL disminuye la astrogliosis y la microgliosis en el hipocampo de ratas administradas con KA.

- C) Determinar si el tratamiento reduce la expresión de marcadores inflamatorios inducidos por la administración de KA.

- D) Determinar si la PRL disminuye la expresión de marcadores inflamatorios inducidos por el tratamiento con KA en cultivos primarios de astrocitos.

12. Material y método

12.1 Sujetos

Los animales empleados en el presente estudio se obtuvieron del bioterio del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Todos los procedimientos experimentales se realizaron en concordancia con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. El protocolo de experimentación fue revisado y aprobado por el Comité de Bioética del INB. Se utilizaron ratas wistar (180-200g) de aproximadamente 2 meses de edad, mantenidas en condiciones de luz-oscuridad controladas (12: 12h, encendido de las luces a las 06:00 AM), una temperatura ambiental de $24 \pm 2^\circ\text{C}$ y acceso a agua y comida *ad libitum* (Rat Chow, Purina).

Los animales utilizados fueron sometidos a una cirugía para remover los ovarios (Ovariectomía, Anexo I) 30 días antes de iniciar el procedimiento experimental.

12.2 Diseño experimental

Experimento 1 (Figura 5). Ratas ovariectomizadas fueron administradas por cuatro días consecutivos con una dosis única de 0.1mg de PRL ovina (0.1 mg / 100 μl de solución salina 0.9%, SC; Sigma Aldrich, cat. L6520). Una hora después de la última administración los animales fueron sacrificados para coleccionar el tejido del hipocampal. Al grupo control se le administró el mismo volumen de solución salina 0.9% (100 μl , SC). Se utilizaron cuatro sujetos por condición y se organizaron en los siguientes grupos:

- S: solución salina 0.9% (SC).
- P0.1: 0.1 mg PRL (SC).

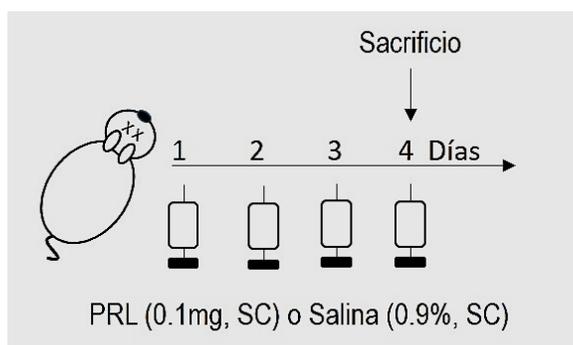


Figura 5. Experimento 1. Ratas OVX administradas subcutáneamente (SC) durante cuatro días con prolactina (PRL) o solución salina fisiológica. En el día cuatro una hora después los sujetos fueron sacrificados para su posterior análisis.

Experimento 2 (Figura 6). Siguiendo el protocolo publicado por Tejadilla et al. (2010), ratas ovariectomizadas fueron tratadas diariamente con PRL ovina (0.1 mg/ 100 µl de solución salina 0.9%, SC) o salina durante 4 días consecutivos. Al tercer día de tratamiento las ratas fueron administradas con KA (7.5 mg/ Kg de peso corporal, IP, Sigma Aldrich, cat. K0250) o un volumen similar de salina. Los animales fueron sacrificados 24 y 48h después de la administración de KA, para el análisis de western blot e inmunohistoquímica respectivamente como se explica más adelante. Se utilizaron cuatro sujetos por condición y se organizaron en los siguientes grupos:

- S+S: Solución salina (SC) + Solución salina (IP).
- S+K: Solución salina (SC) + KA (IP).
- P+S: PRL (SC) + solución salina (IP).
- P+K: PRL (SC) + KA (IP).

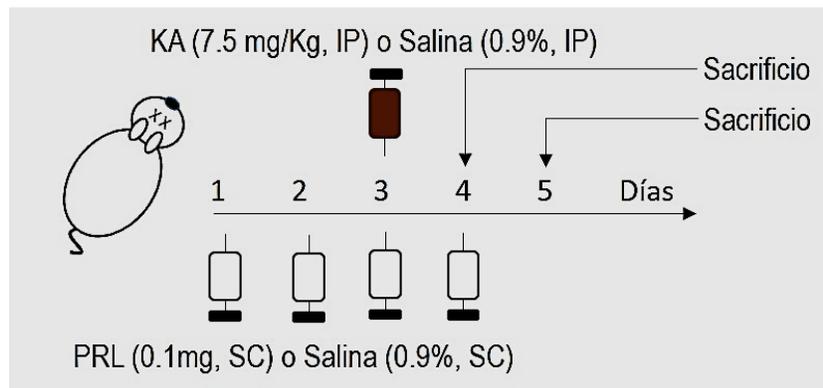


Figura 6. Experimento 2. Ratas OVX administradas subcutáneamente (SC) durante cuatro días con prolactina (PRL) o solución salina fisiológica. En el tercer día de tratamiento con PRL se administró por vía intraperitoneal (IP) ácido kaínico (KA) o solución salina. Los sujetos fueron sacrificados 24h y 48h después de la administración de KA.

En el caso de los animales que fueron administrados con KA, solo se utilizaron para el análisis aquellos que presentaron una conducta epiléptica de entre 3 y 5 en la escala de Zhang (Zhang et al. 1997).

12.3 Obtención y procesamiento del tejido

Los sujetos fueron anestesiados con una sobredosis de uretano (1.38 g/Kg de peso corporal) y perfundidos con 250 ml de solución salina (0.9%). Los cerebros fueron removidos y los dos hemisferios fueron separados con la finalidad de utilizarlos en diferentes análisis. El hemisferio derecho fue fijado durante 24h con paraformaldehído al 4.0% en buffer de fosfatos (PBS, pH 9.5, 4.0°C) y crioprotegido con una solución de sacarosa al 30% en PBS durante 2 o 3 días. Secciones coronales de 30 µm de grosor del hipocampo dorsal fueron obtenidas con un

microtomo de congelación (Leica 2000R). Los cortes se colectaron en 4 series en una caja estéril para cultivo de 24 pozos a fin de obtener una muestra representativa del hipocampo en cada serie. De esta forma cada serie contiene un corte cada 120 µm. Los cortes se almacenaron en una solución crioprotectora de sacarosa 20% y etilenglicol 30% en PBS 0.05 M. El tejido se almaceno a -20°C hasta su procesamiento histológico. Cada una de las series fue utilizada para el análisis inmunohistoquímico. El hemisferio izquierdo fue procesado para el aislamiento de proteínas (ver la sección de western blot para información detallada).

12.4 Inmunohistoquímica por diaminobencidina (DAB)

Con la finalidad de determinar el daño existente en el hipocampo dorsal, se procedió a hacer inmunohistoquímica para el marcador específico de neuronas NeuN. Además, para conocer la respuesta de los astrocitos y la microglía derivado del daño neuronal se utilizaron los marcadores específicos para cada tipo celular GFAP e Iba1 respectivamente.

Secciones en flotación fueron lavadas extensivamente con buffer salino de fosfato de potasio (KPBS, 0.02 M) e incubadas durante 10 minutos con H₂O₂ 0.3%. Para permeabilizar la membrana celular las secciones se incubaron con tritón X-100 1.0% en KPBS durante 30min. Posteriormente las secciones fueron lavadas con KPBS y se procedió a incubar con el anticuerpo primario en una solución de tritón X-100 0.5% en KPBS durante toda la noche a 4.0°C. Los Anticuerpos primarios utilizados fueron: NeuN (1:4000; Millipore, cat. MAB377B), GFAP (1: 3500; Dako, cat. Z0334) e Iba1 (1: 3500; Abcam, cat. ab108539). La detección de los anticuerpos primarios se realizó a través del uso de anticuerpos biotinilados incubados durante 2h a temperatura ambiente en triton X-100 0.5% en KPBS. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: goat anti-mouse y goat anti-rabbit (1:1000; Vector Laboratories, cat. BA9200 y BA100 respectivamente). Finalmente para la amplificación y detección de la señal se utilizó el sistema avidina-biotina (Vectastain Elite ABC kit, cat. NC9313719). El tejido se montó en portaobjetos gelatinados y cubiertos con DPX (Merk).

12.5 Inmunohistoquímica por inmunofluorescencia

Para determinar el tipo celular en el que se expresan los marcadores IL-4 e IL-10, se procedió a hacer una doble inmunotinción contra NeuN, GFAP e Iba1 con ambos marcadores inflamatorios.

El tratamiento utilizado fue el mismo que en inmunohistoquímica por DAB con algunas modificaciones. Para exponer los epítomos el tejido fue pretratado con Tween 0.05% en buffer de citratos 10 nM (pH. 6.0) durante 20 min a 100°C. Para

permeabilizar la membrana así como la incubación de los anticuerpos se utilizó tritón X-100 0.25% en KPBS. Las secciones fueron montadas en portaobjetos gelatinados y cubiertos con medio de montar para fluorescencia (Vectashield).

Los anticuerpos primarios fueron: NeuN (1:1000; Millipore, cat. MAB377B), GFAP (1: 1000; Abcam, cat. ab10062), Iba1 (1:1000; Abcam, cat. ab5076), IL-4 (1:750; Abcam, cat. ab9811), e IL-10 (1:750; Abcam, cat. ab9969). Anticuerpos secundarios: goat anti-mouse Cy3 (1:1500; Abcam, cat. ab97035), donkey anti-goat Cy3 (1:1000; Jackson Immuno Research, code 705-165-157) y donkey anti-rabbit Alexa 488 (1:1200; Jackson Immunoresearch, code 711-546-152).

12.6 Conteo celular

Utilizando las secciones de cerebro obtenidas de la inmunohistoquímica por DAB, se procedió a tomar fotografías del tejido con microscopio (Zeiss AX10) acoplado a una cámara fotográfica (AxioCam ICm1). Con el uso del programa Zen2011, se procedió a tomar series de imágenes para su posterior análisis. Las imágenes fueron exportadas y analizadas utilizando el programa de código abierto Fiji (NIH). La cuantificación se realizó en las áreas CA4, CA3 y CA1 del hipocampo utilizando 4 secciones de cerebro por cada animal. La extensión rostro-caudal analizada fue considerada de 2.45 a 4.20 de Bregma, delimitada de acuerdo al atlas de Swanson (1998).

La cuantificación celular fue realizada manualmente como se describió previamente (Tejadilla et al. 2010; Reyes-Mendoza y Morales, 2016). Una región de interés (ROI, CA4 y CA3: 920 x 860 pixeles que corresponden a 675 x 630 μ m y CA1: 1200 x 430 pixeles equivalentes a 880 x 315 μ m) fueron usados para determinar manualmente el número de células o la fracción de área positiva a NeuN, GFAP e Iba1. El número de neuronas es expresado como el número de células positivas a NeuN por condición respecto al número de células NeuN positivas del grupo S+S en el estrato piramidal del hipocampo. En el caso de los astrocitos y la microglía estos fueron cuantificados como el número de células GFAP e Iba1 positivas y como el porcentaje de pixeles positivos o fracción de área por ROI en cada región del hipocampo.

12.7 Análisis morfométrico de la microglía

Para el análisis morfométrico de la microglía, se utilizaron secciones de cerebro obtenidas por inmunofluorescencia. Células positivas a Iba1 fueron procesadas siguiendo el método descrito por Young y Morrison (2018) con algunas modificaciones. Microfotografías del área CA4 del hipocampo delimitadas de 2.85 a 3.90 de Bregma, fueron obtenidas con un microscopio confocal (Zeiss LSM 780).

Cada fotografía estuvo compuesta de un stack-Z de 20µm de grosor con una imagen cada 2 µm. Las imágenes fueron exportadas y analizadas con el programa Fiji utilizando el plug-in “skeleton” desarrollado por Arganda-Carreras et al. (2010). Se cuantificaron el número de puntos finales, el número de ramificaciones y la longitud total del árbol microglial, los cuales indican el nivel de complejidad de cada célula (Figura 7). Se cuantificaron un total de entre 50 y 60 células por condición.

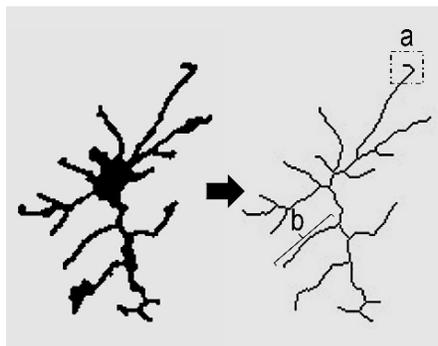


Figura 7. Parámetros evaluados de la microglía. Del lado izquierdo una representación de la microglía en formato binario. De esta imagen se obtuvo el esqueleto de la célula para el análisis. a) Representación de un punto final b) Representación de una ramificación. La longitud total del árbol microglial es la sumatoria de la longitud de todas las ramificaciones.

12.8 Colocalización de marcadores

Para determinar la expresión de IL-10 e IL-4 en neuronas, astrocitos y microglía, se obtuvieron imágenes de microscopia confocal del área CA4 del hipocampo del grupo S+S, así como el grupo P+S. Se obtuvieron microfotografías compuestas de un stack-Z de 10 µm de grosor con una imagen tomada cada 2 µm de los siguientes dobles marcajes: IL-4 con NeuN o GFAP o Iba1 e IL-10 con NeuN o GFAP o Iba1. Las imágenes fueron tomadas y analizadas con el programa Zen2011.

12.9 Western blot

Del hemisferio izquierdo de todos los sujetos experimentales (ver Obtención y procesamiento del tejido) se disectó y homogenizó el hipocampo en buffer de lisis (HEPES 50 mM, NaCl 150 mM, NP40 1.0%, y glicerol 20%) suplementado con inhibidor de proteasas y fosfatasa (Thermo Scientific, cat. 1861284). El Tejido fue rápidamente disgregado en frío con la ayuda de una jeringa con un calibre de 22G. Posteriormente se centrifugó a 4500 g por 15 min para obtener la mezcla proteica. El sobrenadante fue colectado y almacenado a -70°C hasta su uso. Se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford (BioRad) utilizando albúmina sérica bovina (Sigma-Aldrich, cat. A7888) como estándar. La mezcla proteica fue separada por electroforesis en gel de poliacrilamida (8-10%) con dodecilsulfato sódico (85V x 20 min y posteriormente 115V por 2 h) y

electrotransferida sobre membranas de fluoruro de polivinilideno (20V por 1 h). Para la identificación de marcadores blanco, las membranas fueron bloqueadas con leche sin grasa al 5.0% en solución salina tamponada con Tris (TBS) durante 2h a temperatura ambiente (TA) y posteriormente fueron incubadas toda la noche a TA con el anticuerpo primario en leche al 1.0%. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: iNOS (1:10000; Abcam, cat ab49999), TNF α (1:5000; Abcam, cat ab6671), IL-6 (1:5000; Abcam, cat. ab6672), IL-4 (1:5000; Abcam, cat. ab9811), IL-10 (1:5000; Abcam, cat. ab9969), p-ERK1/2 (Abcam, cat. ab4370), p-AKT (Abcam, ab78403), ERK1/2 (Santa Cruz, cat. sc-514302) y AKT (cell signaling, cat. 9272S). Para la identificación, se utilizaron anticuerpos secundarios acoplados a la enzima peroxidasa de rábano incubados durante 2 h a TA. Anticuerpos secundarios: goat anti-mouse HRP (1:4000; Invitrogen, cat. G21040) and goat anti-rabbit HRP (1:4000; BioRad, cat. 172-1019). Finalmente, las membranas fueron visualizadas incubando con un sustrato con quimioluminiscencia (ECL, GE Healthcare) y posteriormente expuestas a placas radiográficas. Para corregir las diferencias en la cantidad de proteína cargada por muestra, las membranas fueron incubadas con Tween al 0.05% en TBS durante 1h a 60°C y expuestas con el anticuerpo contra la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH, 1: 10000; Millipore, cat. MAB374) siguiendo el método de identificación expuesto previamente. Las placas radiográficas fueron escaneadas utilizando un sistema de fotodocumentación (Gel DOc EZ Gel Documentation BioRad System) y posteriormente se analizó la densidad óptica de la señal correspondiente utilizando el programa Fiji. Los resultados fueron expresados como el contenido de cada proteína normalizado a la cantidad de GAPDH como control de carga.

12.10 Cultivo primario de astrocitos

Para la obtención de cultivos primarios de astrocitos fueron utilizadas ratas wistar de 3 días de edad. Brevemente, las ratas fueron perfundidas con solución salina 0.9% y se extrajo el cerebro para colocarlo en medio de cultivo (DMEM). Se disectó la corteza y el hipocampo para disgregarlo mecánicamente con ayuda de puntas de micropipeta de 1000 μ l. La suspensión celular fue filtrada con ayuda de una malla con un tamaño de poro de 100 μ m. El filtrado se centrifugó a 400g por 6 min. El precipitado celular fue resuspendido en 8ml de medio de cultivo completo (FBS 10% + antibiótico 1% en medio 199) y colocado en frascos de cultivo de 75 cm² (NEST Biotech Co. Ltd.) precargados con poli-lisina. Las condiciones de cultivo fueron 37°C y 5% de CO₂. 24h después el medio de cultivo fue cambiado por 10 ml de medio de cultivo completo y las células se dejaron crecer durante una semana. En el día 7 de cultivo se procedió a la purificación del cultivo. Los frascos de cultivo fueron agitados durante 2 h a 200 RPM a 37°C, el medio fue cambiado por medio de cultivo nuevo

y se expuso durante tres días con citocina de arabinosa 10nM. Para la extracción de los astrocitos se procedió a incubar el cultivo a 37°C durante 15 min con medio de cultivo sin suero más tripsina-EDTA 0.05% en una relación de 6:2. La suspensión celular obtenida fue centrifugada a 300g por 3min y resuspendida en medio de cultivo completo para colocar en cajas de cultivo de 6 pozos (SPL Life Sciences) a una densidad de 1×10^6 células por pozo.

Para determinar la vía de señalización que activa la PRL en los astrocitos, se procedió a exponer a los astrocitos con PRL 10nM por diferentes tiempos de incubación (0, 5, 10, 20, 40, 80 min). Transcurrido ese tiempo se adicionó buffer de lisis y se procedió a realizar el western blot como se explicó previamente para evaluar la fosforilación de akt y erk 1/2. En relación a la expresión de diferentes marcadores inflamatorios, los astrocitos fueron expuestos a un cotratamiento durante 6h con PRL 10nM o 50nM y KA 100 μ M. Una vez transcurrido el tiempo se procedió a la purificación del ARN como se explica más adelante.

12.11 PCR cuantitativo en tiempo real

El ARN total de los astrocitos fue extraído usando TRIZOL y purificado en columnas con el kit Direct-zol RNA MiniPrep kit with Zymo-Spin™ IIC. La cantidad total de RNA aislado fue cuantificada usando un espectrómetro (NanoDrop; Thermo Scientific). Un microgramo de ARN total de cada muestra fue utilizado para la generación del cADN utilizando la transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen Cat no. 28025-013), usado hexanucleótidos aleatorios y oligo dT según las instrucciones del proveedor. El PCR cuantitativo se realizó utilizando el sistema Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific) con ayuda de un termociclador Stepone (Applied Biosystems) para la detección del amplicon. Se utilizaron las siguientes condiciones para para la amplificación: 95°C por 10min seguido de 40 ciclos de 95°C/ 15 s, 60°C/ 30 s y 72°C/ 30 s. Las muestras fueron comparadas usando el valor del Ct. Los resultados del PCR cuantitativo en tiempo real fueron presentados como el nivel de expresión de cada gen en relación al valor calculado para el gen 18srARN utilizado como control interno.

Los primers utilizados fueron:

Gen	Secuencia
iNOS	F: 5'-CTTTTAGAGACGCTTCTGAGG-3' R: 5'-GTCCTTTTCCTCTTTCAGGTC-3'
IL-1b	F: 5'-GCAATGGTCGGGACATAGTT-3' R: 5'-AGACCTGACTTGGCAGAGGA-3'
IL-6	F: 5'-TCTCTCCGCAAGAGACTTCCA-3' R: 5'-ATACTGGTCTGTTGTGGGTGG-3'

TNF α F: 5'-ACCACGCTCTTCTGTCTACTG-3'
R: 3'-CTTGGTGGTTTGCTACGAC-3'
18sARN F: 5'-ACCCGTTGAACCCCATTCGTGA -3'
R: 5'-GCCTCACTAAACCATCCAATCGG -3'

12.12 Análisis estadístico

Los datos son expresados como la media \pm el error estándar. Para el análisis estadístico se utilizó el programa Sigma Plot 12.0. Para el experimento 1, se empleó la prueba t de student para comparaciones de pares de grupos. En el caso del experimento 2, los datos obtenidos de células positivas a NeuN, GFAP e Iba1, así como de la expresión de citocinas fueron analizados utilizando un análisis de varianza unifactorial (ANOVA, por sus siglas en inglés) seguido de un análisis post hoc con una prueba Tukey. Respecto al análisis morfométrico (número de puntos finales, el número de ramificaciones y la longitud total del árbol microglial) de la microglía, los datos fueron expresados como la mediana \pm el valor máximo y mínimo. Se utilizó una prueba Kruskal-Wallis para datos no paramétricos seguido de una prueba post hoc por el método de Dunnett. Se consideró un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

13. Resultados

13.1 El tratamiento con PRL incrementa los niveles de IL-4 e IL-10 en el hipocampo en ausencia de daño excitotóxico

Con la finalidad de determinar si el tratamiento crónico con 0.1mg de PRL en ratas tratadas durante 4 días consecutivos con dicha hormona, puede modificar los niveles de diferentes marcadores inflamatorios, se procedió a evaluar por western blot la expresión de IL-4 e IL-10 como marcadores antiinflamatorios y de TNF α , la iNOS e IL-6 como elementos proinflamatorios.

En el caso de la IL-4 e IL-10 encontramos un incremento significativo en los niveles de ambas citocinas (Figura 8A, B; $p=0.039$ y $p=0.036$ respectivamente). En el caso de los marcadores proinflamatorios encontramos que hubo una tendencia a incrementar la cantidad de TNF α e IL-6 (Figura 8A, C), sin embargo, este incremento no fue significativo ($p=0.086$ y $p=0.162$ respectivamente). Respecto a la iNOS, no se encontraron diferencias significativas ($p=0.357$) entre el grupo control (S) y el tratado con PRL (P0.1).

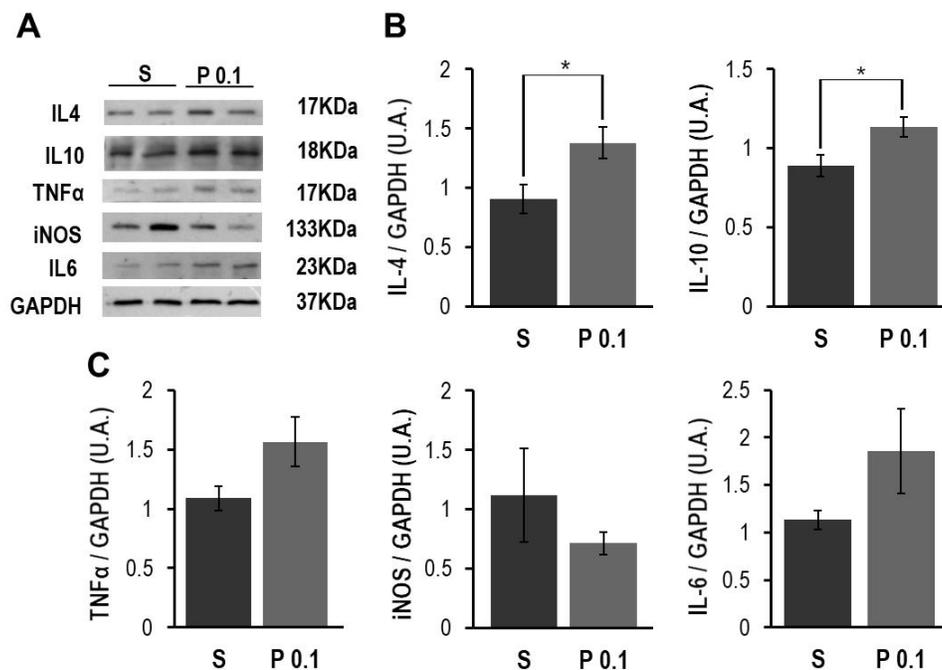


Figura 8. Análisis de la expresión de marcadores inflamatorios en ratas tratadas con PRL durante 4 días. A) Imágenes representativas obtenidas por western blot para IL-4, IL-10, TNF α , iNOS e IL-6. B) Un incremento en la expresión de IL-4 e IL-10 es mostrado en las ratas tratadas con 0.1mg de PRL (P0.1) en comparación con el grupo que solo recibió salina (S). C) La expresión de TNF α , iNOS e IL-6 no se modificó por el tratamiento con la PRL. Las columnas representan la media + SEM. * $p<0.05$ ($n=4$). Abreviaturas: S (salina), P0.1 (0.1mg de PRL).

13.2 La PRL disminuye la astrogliosis en el hipocampo de sujetos administrados con KA

Tomando en cuenta que la PRL modificó la expresión de marcadores inflamatorios, en específico la IL-4 e IL-10, procedimos a evaluar si el tratamiento con PRL disminuye la activación de los astrocitos en el hipocampo cuando el sujeto es sometido a un daño excitotóxico con KA.

En primer lugar se cuantificó el número de neuronas en las áreas CA4, CA3 y CA1 del hipocampo dorsal, para demostrar que el tratamiento disminuye la pérdida neuronal inducida por el KA. Como fue demostrado previamente por Tejadilla et al., (2010), el grupo tratado con PRL (P+K) presentó un mayor número de células NeuN positivas (Neuronas) en las áreas CA4 ($p=0.018$) y CA1 ($p<0.001$) en comparación con el grupo dañado (S+K; Figura 9), lo cual demuestra el efecto neuroprotector de la PRL. El número de neuronas fue similar entre los grupos S+S, P+S y P+K.

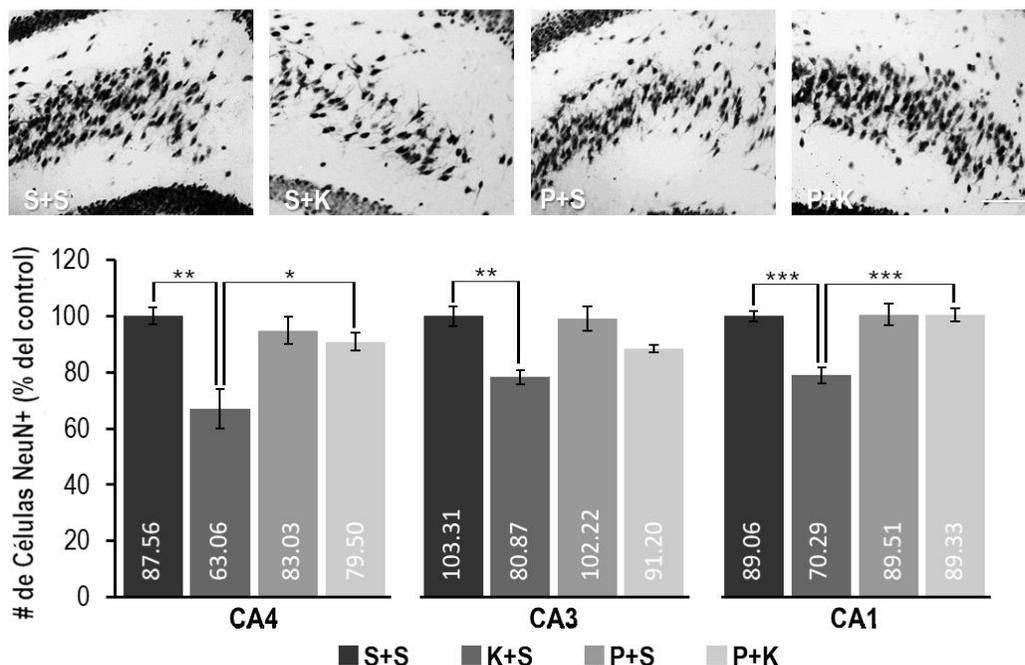


Figura 9. Cuantificación de células positivas a NeuN en el hipocampo de ratas tratadas con PRL (0.1mg) durante cuatro días y sacrificadas 48h después de la administración de KA. En la parte superior se muestran micrografías representativas de células positivas a NeuN (Neuronas) del área CA4 del hipocampo. Las gráficas muestran el porcentaje de neuronas en las áreas CA4, CA3 y CA1 respecto al grupo control (S+S). Dentro de cada columna se encuentra el número promedio en cada área del hipocampo para cada condición experimental. El tratamiento con PRL (P+K) redujo la pérdida neuronal inducida por el KA (S+K) en el área CA4 y CA1. No se encontraron diferencias entre los grupos S+K y P+K en el área CA3. Las columnas representan la media + SEM. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ ($n=4$). Abreviaturas: S+S (salina + salina), S+K (salina + KA), P+S (PRL + salina), P+K (PRL + KA). Barra de escala: 100 μ m.

Para evaluar si el tratamiento con PRL modifica la astrogliosis desencadenada como consecuencia del daño inducido por el KA, se evaluó el número de células positivas a GFAP (astrocitos) en las diferentes áreas del hipocampo, así como, la densidad total de marca positiva a GFAP.

Inmunohistoquímica contra GFAP (Figura 5A) revelo un que el KA (S+K) incrementó la marca positiva a GFAP, dicho incremento fue disminuido por la PRL (P+K). Además se observó que los astrocitos del grupo S+K presentan una mayor cantidad de procesos así como en la intensidad de la marca positiva a GFAP (Figura 10A insertos) en comparación con el resto de los grupos. Al realizar la cuantificación astrocitos se encontró que el grupo P+K presentó una menor cantidad de células positivas a GFAP (Figura 10B) en las áreas CA4 ($p=0.028$) y CA3 ($p=0.002$) en comparación con el grupo que solo recibió el KA (S+K). En CA1 no se encontraron diferencias entre los diferentes tratamientos. Por otra parte, el tratamiento con PRL (P+K) disminuyo la fracción de área positiva a GFAP en CA4 ($p=0.013$) y CA3 ($p=0.012$) en comparación con el grupo S+K. En contraste al número de astrocitos en CA1, el porcentaje de marca positiva a GFAP se vio disminuido en el grupo P+K ($p=0.013$) respecto al grupo lesionado (S+K). Lo anterior indica que la PRL disminuye la astrogliosis inducida por el KA.

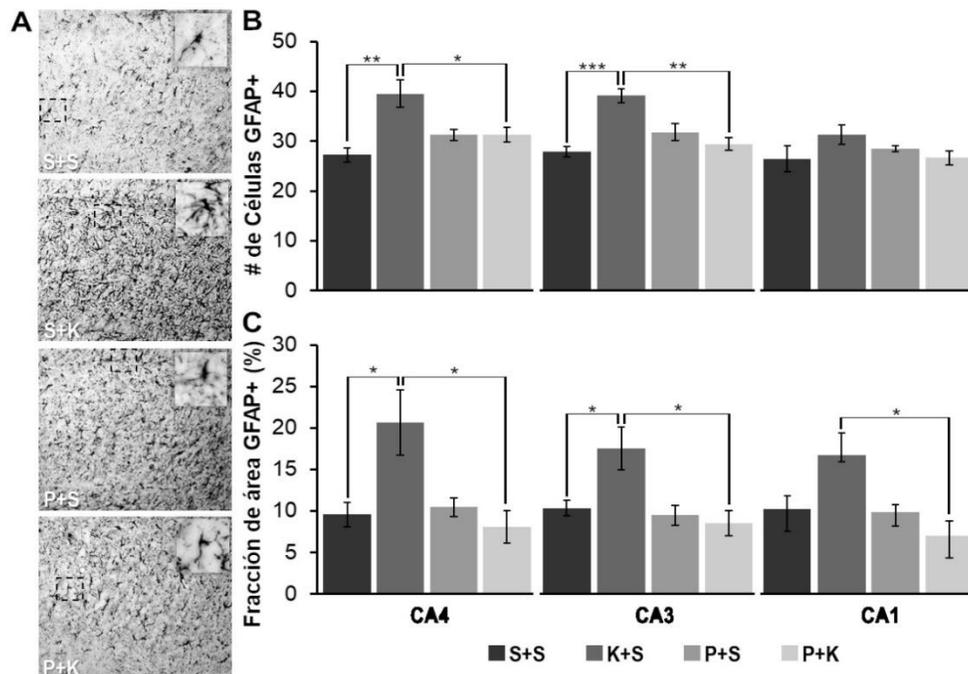


Figura 10. Cuantificación de células positivas a GFAP en el hipocampo de ratas tratadas con PRL (0.1mg) durante 4 días y sacrificadas 48h después de la administración de KA. A) Microfotografías del área CA4 del hipocampo muestran un incremento en la marca positiva a GFAP en el grupo S+K comparado con los grupos S+S, P+S y P+K. En la esquina superior izquierda se muestra una amplificación de los astrocitos de cada condición. B) Número de células positivas a GFAP y C)

Fracción de área positiva a GFAP de las áreas CA4, CA3 y CA1 del hipocampo. Un incremento en la astrogliosis fue observado en todas las áreas de hipocampo del grupo S+K. El tratamiento con PRL (P+K) redujo el número de células positivas a GFAP en CA4 y CA3 y la fracción de área positiva en CA4, CA3 y CA1, indicando que el tratamiento reduce la astrogliosis inducida por el KA. Las columnas representan la media + SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ ($n = 4$). Abreviaturas: S+S (salina + salina), S+K (salina + KA), P+S (PRL + salina), P+K (PRL + KA). Barra de escala: 100 μm .

13.3 El tratamiento con PRL disminuyó la microgliosis inducida por el KA

Considerando que la PRL redujo la astrogliosis y que además regula a la alta la expresión de citocinas proinflamatorias como la IL-4 e IL-10, entonces procedimos a evaluar la respuesta microglial en presencia o ausencia de PRL, 48h después de la inducción del daño con KA (Figura 11A).

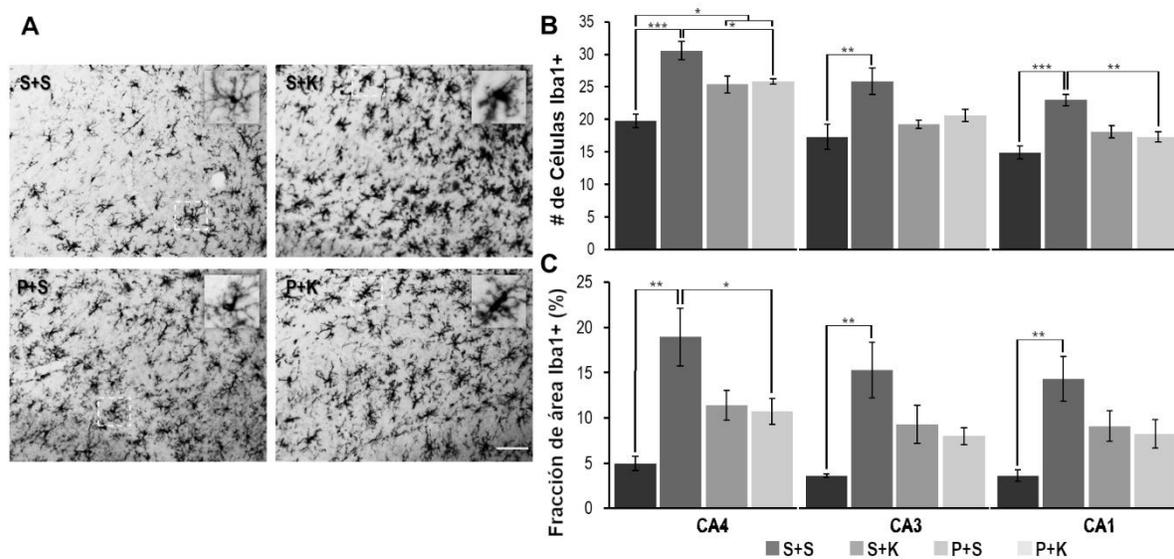


Figura 11. Cuantificación de células positivas a Iba1 en el hipocampo de ratas tratadas con PRL (0.1mg) durante 4 días y sacrificadas 48h después de la administración de KA. A) Microfotografías del área CA4 del hipocampo muestran un incremento en la marca positiva a Iba1 del grupo S+K el cual fue reducido por la administración de PRL (P+K). Una disminución en las ramificaciones de la microglía es visto en el grupo S+K en comparación con los grupos S+S y P+K. (insertos). B) El tratamiento con PRL disminuyó el número de células positivas a Iba1 en CA4 y CA1 en el grupo P+K comparado con el grupo S+K. El tratamiento de PRL en condiciones control (P+S) incrementó en número de células microgliales en CA4. C) Una reducción en la fracción de área positiva a Iba1 fue encontrada en CA4 en el grupo P+K en relación al grupo S+K. Las columnas representan la media + SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ ($n = 4$). Abreviaturas: S+S (salina + salina), S+K (salina + KA), P+S (PRL + salina), P+K (PRL + KA). Barra de escala: 100 μm .

Un claro incremento en la marca positiva al marcador microglial, Iba1, fue inducido por la administración de KA (Figura 11). La cuantificación del número de células positivas a Iba1 muestra que el grupo S+K presenta un incremento significativo en las áreas CA4 (Figura 10B; $p < 0.001$), CA3 ($p = 0.008$) y CA1 ($p < 0.001$). Además,

hubo un incremento en la fracción de área positiva las tres áreas hipocampales (Figura 11C; CA4, $p=0.002$; CA3, $p=0.005$; CA1, $p=0.004$). Al tratar a los sujetos con PRL (P+K), se encontró una disminución significativa en el número de células positivas a Iba1 en el área CA4 ($p=0.048$) y CA1 ($p=0.004$), así como también en la fracción de área positiva en CA4 ($p=0.050$) en comparación con el grupo S+K. Es de resaltar que el grupo no dañado pero que recibió PRL (P+S) mostró un incremento significativo en el número de células positivas a Iba1 en el área CA4 ($p=0.019$). Los resultados anteriores indican un claro efecto de la PRL sobre la microglía en condiciones normales y de daño.

Por otra parte, cambios en la morfología de la microglía han sido asociados como un indicador de cambios funcionales en la célula (Walker y Lue, 2015). En condiciones normales o en reposo la microglía presenta una morfología principalmente ramificada. En contraste, cuando hay un daño o estrés al sistema la microglía se vuelve activa y adquiere un fenotipo de carácter amebode con una disminución en el número de ramificaciones. Al observar las células microgliales (Figura 6A, insertos) encontramos que las ratas que recibieron la administración de KA (S+K) y aquellas que fueron tratadas con PRL (P+S y P+K), desarrollaron un cambio en el fenotipo celular en comparación con el grupo control (S+S) que incluyen un cambio en la forma y el número de ramificaciones o procesos. Por lo anterior, se procedió a realizar un análisis morfométrico más detallado para determinar el estado en que se encuentra la microglía.

Es de resaltar que en las imágenes de inmunohistoquímica de la microglía (Figura 11) los grupos S+S, P+S y P+K presentan una mayor cantidad de ramificaciones en contraste con el grupo S+K. Además, se evidencia un incremento en el área del soma celular. Al realizar la cuantificación de los parámetros morfométricos (Figura 12), se encontró que en el caso de las células controles tratadas con KA (S+K), presentan una disminución en el número de ramificaciones ($p<0.05$), en la longitud total de las ramificaciones ($p<0.05$) y del número de puntos finales ($p<0.05$) en comparación con el grupo control (S+S). En contraste, el grupo P+K presentó un decremento en el número y longitud de las ramificaciones así como en el número de puntos finales ($p<0.05$) en relación con el grupo S+K. Es de resaltar que el grupo control tratado con PRL (P+S) tuvo una disminución significativa en el número y la longitud de las ramificaciones de la microglía ($p<0.05$) respecto al grupo S+S, indicando que en ausencia de daño la PRL tiene un efecto per se sobre la microglía. En resumen, los datos morfométricos sugieren una reducción en la activación microglial inducida por el KA debido al tratamiento con PRL.

13.4 El tratamiento con PRL redujo los niveles de citocinas proinflamatorias inducidas por la administración de KA

Sabiendo que la PRL disminuyó la gliosis inducida por el daño al hipocampo, además del incremento de la IL-4 e IL-10, se procedió a evaluar si el tratamiento reduce los niveles de los marcadores inflamatorios TNF α , iNOS e IL-6, en respuesta a la administración de KA.

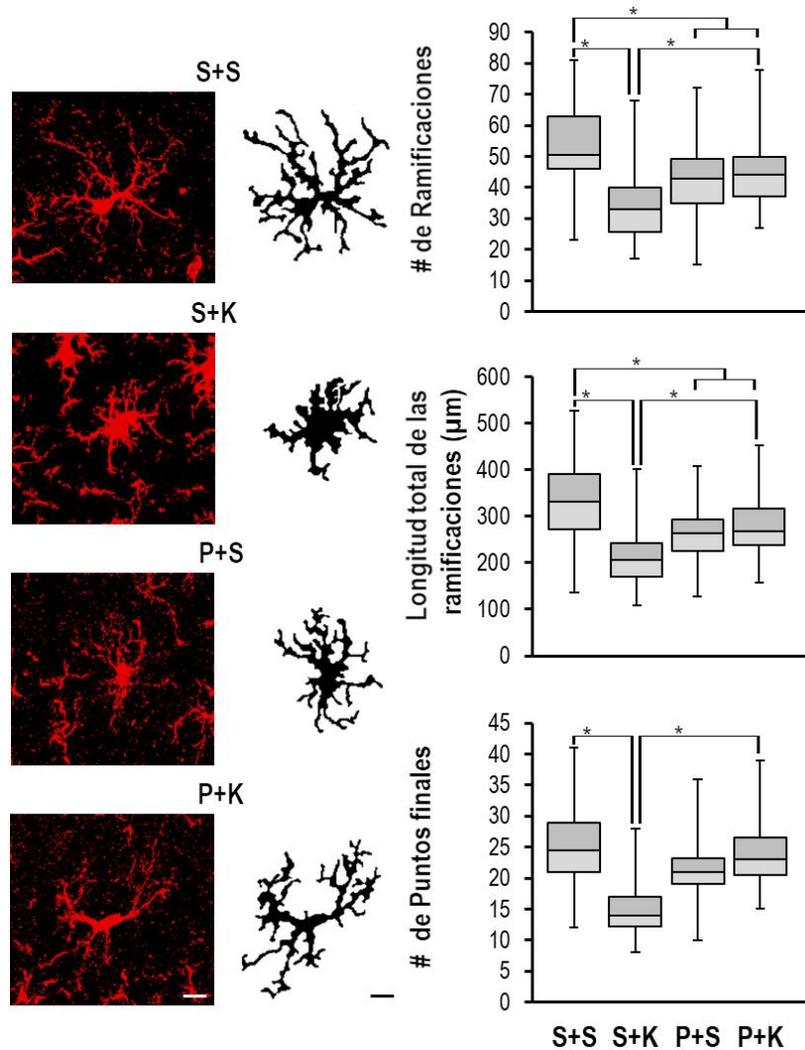


Figura 12. Análisis morfométrico de la microglía. Microfotografías de inmunofluorescencia de células positivas a Iba1 (Panel izquierdo). Proyección binaria de las imágenes fluorescentes, utilizadas para el análisis de los parámetros morfométricos (Panel central). Del lado derecho los gráficos de cajas muestran el número de ramificaciones por célula, la longitud total de las ramificaciones por célula y el número de puntos finales por célula. El tratamiento con PRL (P+K) redujo los cambios morfológicos inducidos por el KA (S+K), sin embargo, no a los valores del grupo S+S. La PRL en condiciones control (P+S) disminuye el número y la longitud de las ramificaciones respecto al grupo

S+S. Las cajas representan la mediana + max/min. * $p < 0.05$ Abreviaturas: S+S (salina + salina), S+K (salina + KA), P+S (PRL + salina), P+K (PRL + KA). Se cuantificaron entre 50 y 60 células por condición. Barra de escala: 10 μm .

La evaluación de los niveles de expresión de las diferentes citocinas medidas por western blot 24h después de la inducción del daño con KA, mostraron un incremento significativo de $\text{TNF}\alpha$ (Figura 13A, C; $p = 0.036$) y la iNOS ($p = 0.034$) en el grupo S+K en comparación al S+S. En contraste, las ratas que recibieron la PRL antes de la administración de KA (P+K), disminuyeron significativamente los niveles de la iNOS ($p = 0.021$). En el caso del resultado en los niveles de $\text{TNF}\alpha$, el tratamiento con PRL muestra una tendencia en disminuir el incremento debido a la administración de KA, sin embargo, esta disminución no fue estadísticamente significativa ($p = 0.199$). Además, el grupo P+K tampoco fue diferente respecto al grupo control (S+S; $p = 0.733$). No se encontraron cambios en los niveles de la IL-10 en ninguno de los grupos. En el caso de las interleucinas IL-4 e IL-10, el tratamiento con KA (S+K) o modificó los niveles de ellas (Figura 13A, B) al comparar con el grupo S+S. En contraste, una diferencia significativa es vista en la IL-4 debido al tratamiento con PRL (S+K vs P+K, $p = 0.003$).

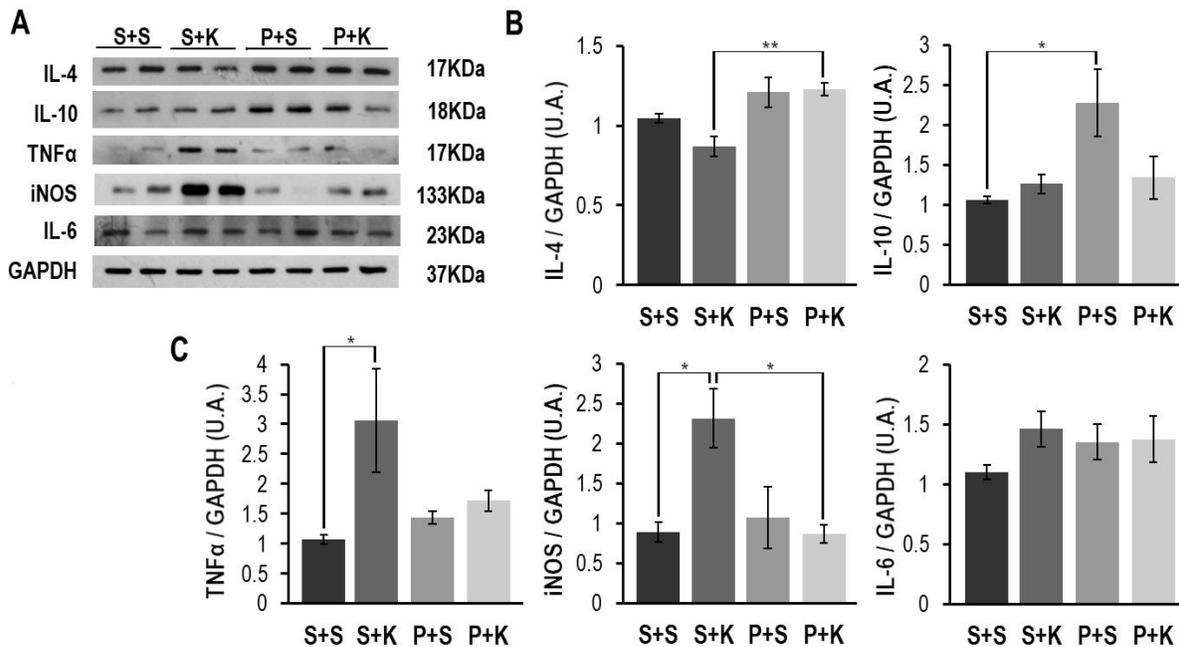


Figura 13. Análisis de la expresión de marcadores inflamatorios en ratas tratadas con PRL durante 4 días y sacrificadas 24h después de la administración de KA. A) Imágenes representativas obtenidas por western blot para IL-4, IL-10, $\text{TNF}\alpha$, iNOS e IL-6. B) La cuantificación de citocinas antiinflamatorias muestra un incremento en la expresión de IL-4 en el grupo tratado con PRL (P+K) comparado con el grupo S+K. La IL-10 muestra un incremento en la IL-10 en relación al grupo control (S+S vs (P+S). c) El grupo control tratado con KA (S+K) incrementa los niveles de $\text{TNF}\alpha$ y la iNOS respecto al grupo S+S. El tratamiento con PRL falla en disminuir la expresión de $\text{TNF}\alpha$ (S+K vs P+K),

sin embargo, los valores de expresión no son diferentes a los del grupo control (S+S vs P+K). El tratamiento con PRL disminuye el incremento en los niveles de la iNOS debido al KA (S+K vs P+K) a niveles similares al grupo S+S. No se aprecian cambios significativos en la IL-6 en ninguno de los grupos. Las columnas representan la media + SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (n=4). Abreviaturas: S+S (salina + salina), S+K (salina + KA), P+S (PRL + salina), P+K (PRL + KA).

13.5 El tratamiento con PRL incrementó la IL-4 e IL-10 en las neuronas del hipocampo

Considerando que la PRL incrementó los niveles de IL-4 e IL10, evaluamos si tal incremento es visto en neuronas, astrocitos y microglía.

Doble inmunomarcaje de IL-4 e IL-10 con NeuN, GFAP o Iba1 revelaron que existe colocalización de NeuN con IL-4 (Figura 14) o IL-10 (Figura 15) en el hipocampo de ratas tratadas con PRL. Tal colocalización fue encontrada principalmente en las neuronas encontradas en el hilus del giro dentado del hipocampo. Además, es de resaltar que la IL-4 se encuentra en la zona subgranular del DG. En el caso de GFAP (astrocitos) e Iba1 (microglía), mostraron una baja colocalización con ambas citocinas, IL-4 e IL-10.

13.6 El tratamiento con PRL reduce la expresión de la iNOS e IL-1 en cultivos de astrocitos

Ya que la PRL disminuyó la astrogliosis en el hipocampo, así como la expresión de diferentes citocinas y tomando en cuenta que ha sido reportado que esta hormona tiene efectos sobre la regulación de diferentes marcadores inflamatorios en astrocitos (De Vito et al., 1995), procedimos a evaluar si la PRL tiene regula la expresión de la iNOS, $TNF\alpha$, IL-1 β y la IL-6 cuando se hace un cotratamiento con KA.

En primer lugar evaluamos si la PRL tiene efecto sobre los astrocitos. Para ello analizamos si la PRL induce la activación de las vías de señalización de ERK1/2 y Akt, ambas reportadas como blancos de la PRL en diferentes modelos, mapeando a diferentes tiempos de tratamiento. Como resultados iniciales, encontramos que el tratamiento con PRL (10 nM) induce una disminución de la fosforilación de ERK1/2 a los 5 minutos de tratamiento el cual vuelve a incrementar los 80 minutos (Figura 16A). En relación a la AKT el tratamiento no modificó los niveles de fosforilación de esta proteína a lo largo del tiempo medido.

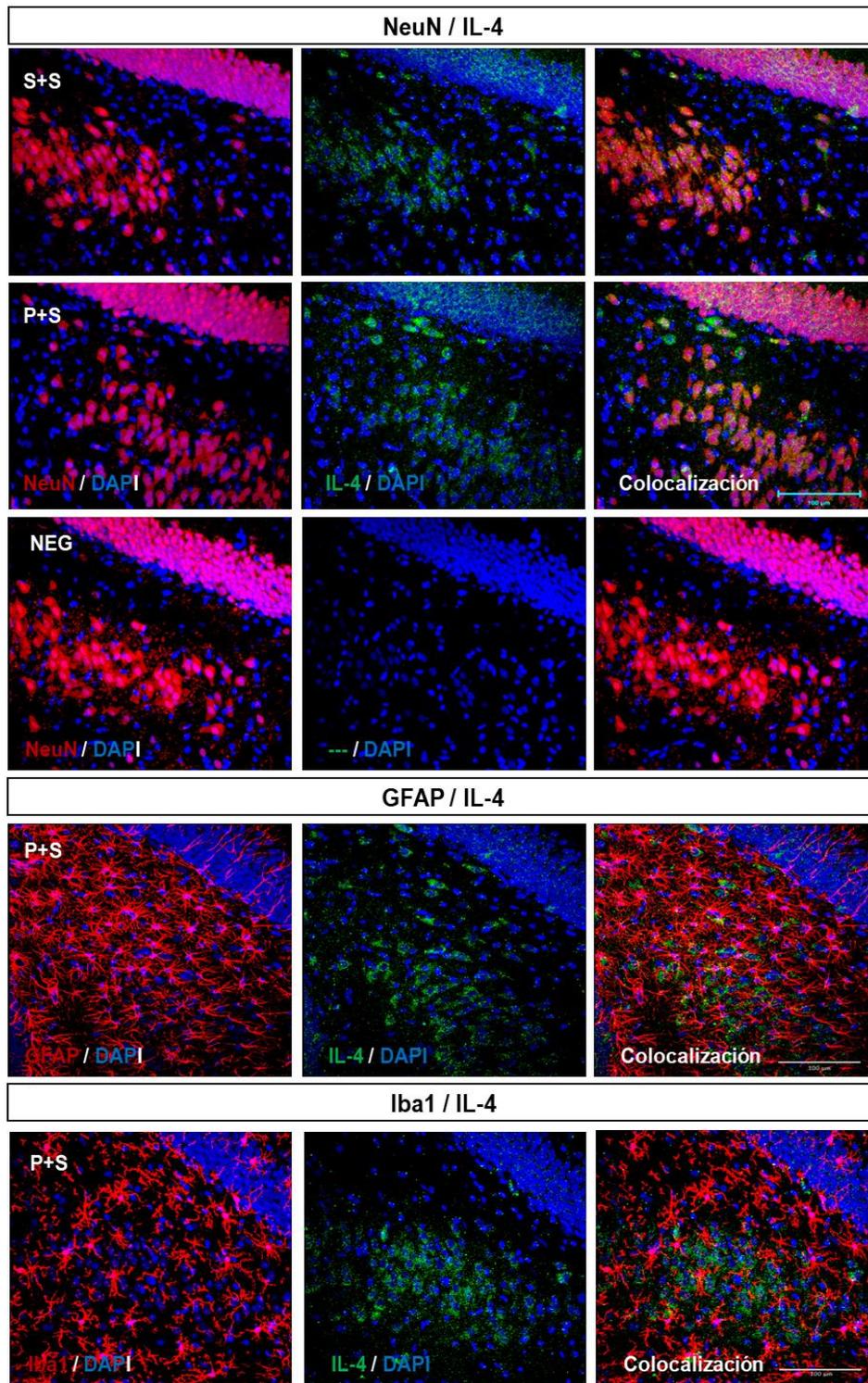


Figura 14. Microfotografías representativas del área CA4 del hipocampo de ratas tratadas con PRL. Las imágenes muestran dobles tinciones contra IL-4 y NeuN (neuronas), GFAP (astrocitos) o Iba1 (microglía). Un incremento en el nivel de IL-4 es visto en neuronas tratadas con PRL (P+S) en comparación con el grupo control (S+S). En el caso de neuronas y microglía se presentó un bajo

nivel de colocalización entre los marcadores. Abreviaturas: S+S (salina + salina), P+S (PRL + salina). Neg: control negativo de la inmunofluorescencia contra la IL-10. Barra de escala: 100 μ m

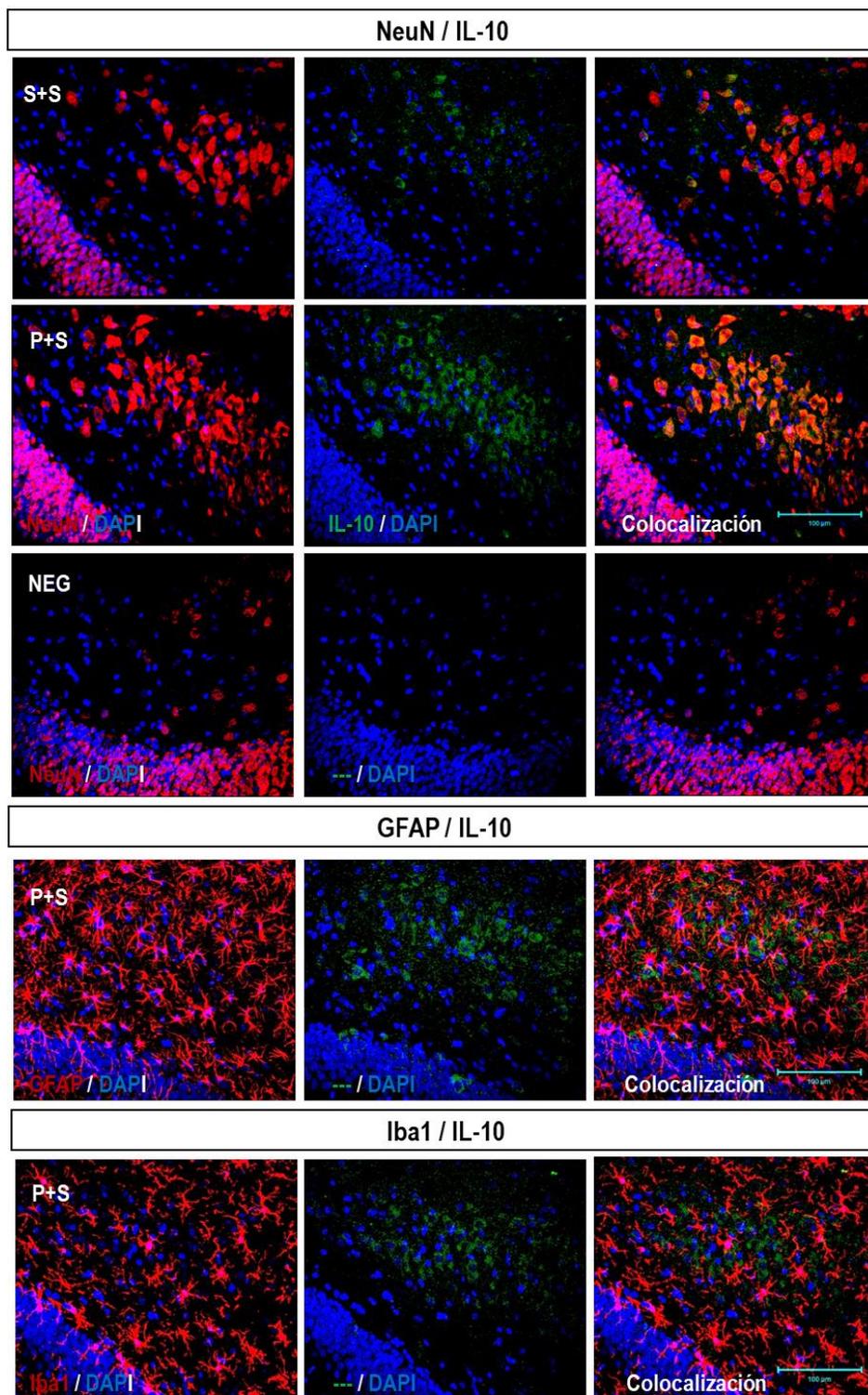


Figura 15. Microfotografías representativas del área CA4 del hipocampo de ratas tratadas con PRL. Las imágenes muestran dobles tinciones contra IL-10 y NeuN (neuronas), GFAP (astrocitos) o Iba1

(microglía). Un incremento en el nivel de IL-10 es visto en neuronas tratadas con PRL (P+S) en comparación con el grupo control (S+S). En el caso de neuronas y microglía se presentó un bajo nivel de colocalización entre los marcadores. Abreviaturas: S+S (salina + salina), P+S (PRL + salina). Neg: control negativo de la inmunofluorescencia contra la IL-10. Barra de escala: 100 μ m

Por otra parte, resultados preliminares indican que el KA (100 μ M) promueve un incremento en la expresión de la iNOS, la IL-1 β e IL-6 (Figura 16B). El tratamiento con PRL a una concentración de 10 nM promueve una tendencia a reducir la expresión de la iNOS y la IL-1 β . Al hacer inmunofluorescencia en el cultivo de astrocitos notamos que el tratamiento con PRL (10 nM) redujo la marca positiva a la iNOS, la cual se vio incrementada en el grupo que solamente recibió el tratamiento con KA (Figura 17). Tomando en cuenta estos resultados, se sugiere que la PRL tiene un efecto directo sobre los astrocitos reduciendo la expresión de la iNOS.

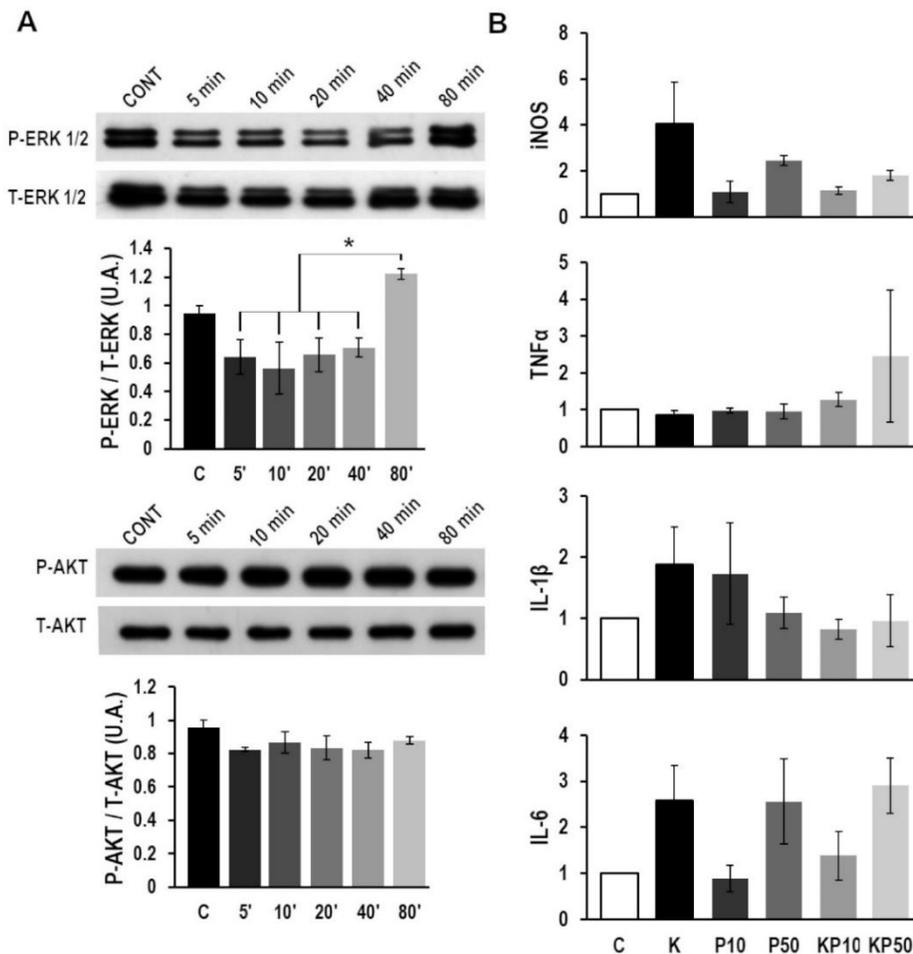


Figura 16. Efecto de la PRL en la expresión de marcadores inflamatorios inducidos por el KA en cultivos primarios de astrocitos. A) La PRL disminuye la fosforilación de ERK1/2 a los 5 min de tratamiento, retornando a su nivel después de 80 min. No se aprecian modificaciones en la

fosforilación de AKT. B) El tratamiento con KA (100 μ M) muestra una tendencia a incrementar la expresión de la iNOS, la IL-1 β e IL-6. El cotratamiento con PRL (10 nM) redujó la expresión de la iNOS e IL-1 β . Las columnas representan la media \pm SEM. * p <0.05 (n=3). Abreviaturas: Abreviaturas: K: ácido kaínico, KP10: KA+PRL (10 nM), KP50: KA+PRL (50 nM).

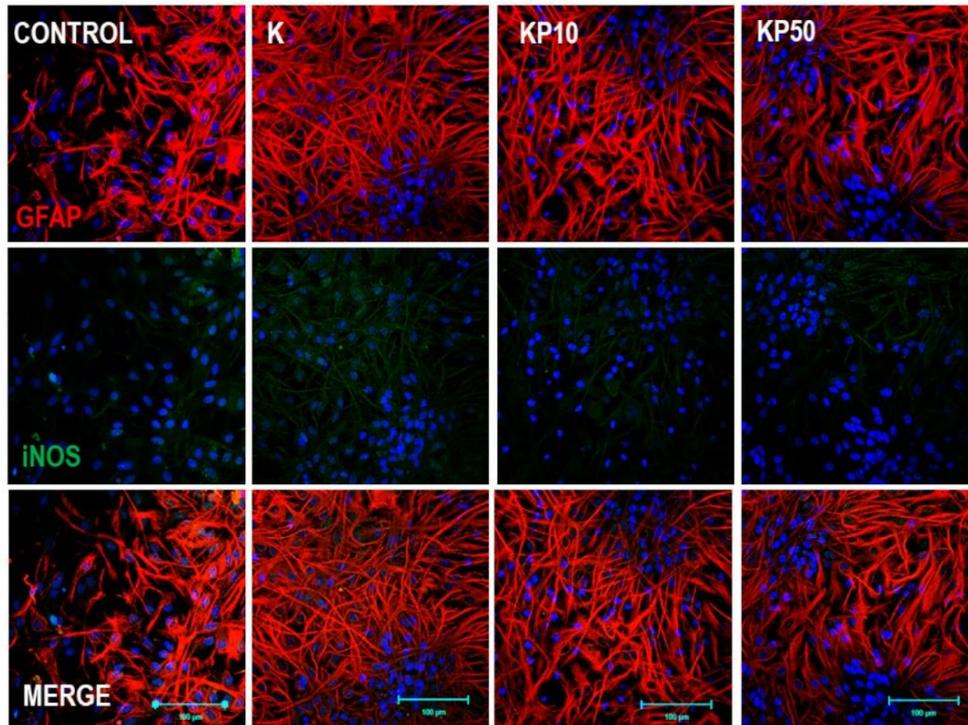


Figura 17. Microfotografías representativas de cultivos primarios de astrocitos tratados con PRL y KA. Las imágenes muestran dobles tinciones contra la iNOS, contrateñidas con DAPI (azul). Un incremento en el nivel de la iNOS es visto en astrocitos tratados con KA(100 μ M) en comparación con el grupo control. Cuando se hace el cotratamiento con PRL a 10 y 50nM se observa una disminución en la marca positiva de la iNOS. Abreviaturas: K: ácido kaínico, KP10: KA+PRL (10 nM), KP50: KA+PRL (50 nM). Barra de escala: 100 μ m

14. Discusión de resultados

El objetivo de este estudio fue determinar si el efecto neuroprotector de la PRL en el modelo de excitotoxicidad por KA (Tejadilla et al., 2010; Morales et al., 2014; Reyes-Mendoza y Morales, 2016), está asociado con una disminución en la activación de la glía y si tal efecto se ve acompañado en la alteración de diferentes marcadores inflamatorios. Para este propósito, se procedió a evaluar cambios que sufren los astrocitos y la microglía en respuesta al daño neuronal, así como la modificación en los niveles de expresión de citocinas pro y antiinflamatorias. Aquí reportamos que el tratamiento con PRL atenúa la gliosis (astro y microgliosis) inducida por el KA en las áreas CA4, CA3 y CA1 del hipocampo. Además, un análisis de la morfología de la microglía, específicamente en CA4, demostró que la PRL redujo la activación de las células en respuesta al daño visto a través de un mayor número de ramificaciones y longitud total de las mismas, así como un mayor número de puntos finales respecto al grupo de sujetos lesionados. Además, encontramos que la PRL incrementa la expresión de las citocinas IL-10 e IL-4 y reduce la expresión de la iNOS y TNF α en respuesta al daño neuronal. Finalmente, encontramos que la expresión de la IL-10 e IL-4 se da principalmente en células neuronales del hipocampo y no en astrocitos y microglía.

Ya que la PRL ha sido relacionada con acciones en la modulación del sistema inmune (Shelly et al., 2012), evaluamos si una tratamiento crónico durante 4 días con PRL, podía modificar los niveles de expresión de diferentes citocinas en el hipocampo de ratas. El tratamiento incremento los niveles de expresión de las citocinas antiinflamatorias IL-4 e IL-10 en el hipocampo de ratas. En el SNC, no ha sido reportado que la PRL modifique la expresión de ambas citocinas, sin embargo, en tejidos periféricos se ha visto que el tratamiento con PRL o estadios en los que existan niveles séricos de PRL elevados están asociados con un incremento en la expresión de IL-4 e IL-10 (Matalka, 2003; Ochoa-Amaya et al., 2015). En contraste, no encontramos modificaciones significativas en los niveles de expresión de TNF α , iNOS e IL-6 en el hipocampo. Aunque en tejidos periféricos se ha documentado que la PRL incrementa los niveles de estos marcadores inflamatorios (Tripathi y Sodhi, 2007), aquí no encontramos que el tratamiento modifique a alguno de ellos. Por otra parte, en cultivos primarios de astrocitos el tratamiento con PRL incrementa la concentración de diferentes citocinas, incluido el TNF α (De Vito et al., 1995). Es posible que esta discrepancia en la ausencia de efecto de la PRL se deba en primer lugar a una regulación diferencial en la producción de TNF α , iNOS e IL-6 entre tejidos periféricos y el hipocampo, y en relación a la producción de TNF α reportada por astrocitos, es importante considerar que se trata de un modelo in vitro. Considerando estos resultados y tomando en cuenta el efecto neuroprotector de la

PRL (Tejadilla et al., 2010), investigamos como la PRL afecta la respuesta glial en el modelo de daño neuronal por KA.

El KA es un agonista glutamatérgico ampliamente utilizado por su capacidad de producir muerte neuronal por excitotoxicidad en regiones específicas del cerebro, incluido el hipocampo (Lévesque y Avoli, 2013). Esta toxina desencadena diferentes eventos deletéreos para las células neuronales iniciados por un incremento descontrolado en la entrada de calcio a las neuronas, resultando en su eventual muerte (Zhang y Zhu, 2011; Zhen et al., 2011) y una consecuente alteración cognitiva (Maia et al., 2014). Uno de los principales fenómenos vistos después de la administración de KA es un incremento en el proceso neuroinflamatorio, particularmente un incremento en la astrogliosis (Jorgensen et al., 1993).

La astrogliosis como consecuencia de un evento de excitotoxicidad puede tener un efecto dual. Por una parte, puede estar involucrado en la neuroprotección del sistema ya que participa en procesos como el mantenimiento del balance iónico, el aclaramiento y metabolismo del glutamato, la producción de factores neurotróficos (Li et al., 2008; Becerra-Calixto y Carona-Gomez, 2007), entre otros. Al mismo tiempo, también se ha asociado con un incremento en la neurodegeneración debido a la producción de factores citotóxicos como especies reactivas de oxígeno (ERO), citocinas proinflamatorias (Zhang y Zhu, 2011) y aminoácidos excitatorios (Harada et al., 2016), que pueden incrementar el proceso de muerte neuronal. Por lo tanto, la inhibición de la astrogliosis ha demostrado reducir la pérdida neuronal en diferentes modelos de daño, incluido la neurodegeneración por KA (Ganesh y Chintala, 2011; Livne-Bar, et al., 2016). Diferentes estudios, incluido el presente trabajo, han reportado acciones tróficas de la PRL sobre los astrocitos, por ejemplo, la PRL incrementa la proliferación de astrocitos (Mödersheim et al., 2007) y los niveles de interleucina-1 α (IL-1 α), del factor de crecimiento transformante- α (TGF α) y de TNF α (De Vito et al., 1995) en estudios in vivo. Además, la PRL incrementa la expresión de GFAP en el hipotálamo en un modelo de daño neuronal por estrés mecánico (De Vito et al., 1995) y regula a la alta la expresión del receptor a PRL (RPRL) en astrocitos después de un proceso de isquemia (Mödersheim et al., 2007). En suma, estos antecedentes sugieren que la PRL puede modular la respuesta y acción de los astrocitos en condiciones normales y de daño.

En el presente estudio, demostramos que el pre-tratamiento con PRL disminuyó el incremento en el número de astrocitos, así como en la densidad de marca positiva al marcador GFAP en el hipocampo inducida por la administración del KA. Esto estuvo acompañado de una disminución en la pérdida neuronal en las áreas CA4, CA3 y CA1 como se había demostrado previamente cuando el tratamiento de

administra después de la inducción del daño (Reyes-Mendoza y Morales, 2016). Está decremento en la proliferación de los astrocitos se ha visto en otros modelos de daño, por ejemplo, la PRL disminuye la proliferación de astrocitos hipocampales en sujetos sometidos a estrés crónico (Torner et al. 2009) y reduce la expresión de GFAP en la retina de ratones sometidos a daño por exposición continua a la luz (Arnold et al., 2014). El mecanismo fino del cómo es que la PRL atenúa o disminuye la respuesta de los astrocitos requiere de un mayor análisis.

Además del incremento en la astrogliosis, el daño neuronal genera la activación de las células inmunes del SNC, la microglía. En el proceso de daño, la microglía se activa con la finalidad de mantener la integridad del tejido al liberar factores tróficos, participando en el aclaramiento de detritos celulares (Bachiller et al., 2018; Akaki et al., 2019), entre otras funciones. En el caso de este proyecto, se ha reportado que la administración de KA produce un incremento en la microglía reactiva y en la microgliosis (Akiyama et al., 1994; Sabilallah et al., 2016). Al igual que los astrocitos, la microglía puede incrementar la pérdida neuronal al liberar moléculas citotóxicas (Lull y Block, 2010). Por ejemplo, el KA promueve la liberación de diversas citocinas como la IL-1 β (Zheng et al., 2010) y TNF α . Ambas citocinas han mostrado incrementar la excitabilidad neuronal y promover la apoptosis de las neuronas hipocampales. En consecuencia, ha sido propuesto que la inhibición de la activación microglial reduce la muerte neuronal (Cho et al., 2008; Hong et al., 2010).

En el caso de la relación entre PRL y microglía, se ha visto que la PRL promueve la liberación de factores pro-inflamatorios como IL-3, IL-6, TNF α , IL-1 β y NO, además incrementa la actividad fagocítica de la microglía contra *toxoplasma gondii* in vitro (Benedetto et al., 2001). También, Modersheim et al. (2007) reportó inmunoreactividad para PRL in microglía in vivo, sugiriendo que este tipo celular es una fuente de esta hormona en el SNC, sin embargo, no se descarta posibles efectos de la PRL sobre la microglía. Aquí, encontramos que el tratamiento con PRL redujo la microgliosis inducida por el KA, visto como una reducción en el número de células positivas a Iba1, así como en el área positiva a Iba1. Dicho efecto fue particularmente evidente en el área CA4 del hipocampo en relación a CA3 y CA1. Además, el análisis morfométrico de la microglía mostró que la PRL redujo la activación microglial inducida por el KA, ya que el número de puntos finales por célula fue similar al grupo control (S+S) y el número y la longitud total de las ramificaciones por célula fueron significativamente mayores al grupo S+K. Estos resultados coinciden con un trabajo reciente en el cual se muestra que la PRL reduce la expresión del marcador microglial CD11b, el cual se expresa durante el proceso de activación microglial. Además, disminuye el número de células positivas a CD11b (Cabrera-Reyes et al., 2019). Por lo tanto, el presente trabajo indica que

la PRL disminuye la activación microglial causado por la lesión, lo cual se relaciona con la neuroprotección de esta hormona en el hipocampo. Al igual que con los astrocitos, son necesarios más experimentos para elucidar el mecanismo celular involucrado en esta acción de la PRL.

Por otra parte, nuestros resultados muestran que la PRL reduce la expresión de la iNOS y restringe el incremento en TNF α causado por el KA, considerando que no hubo diferencias significativas respecto al grupo control (S+S). Además, la PRL por si misma elevó el nivel de IL-10 e IL-4 en el hipocampo. Se ha reportado que la IL-4 e IL-10 disminuyen la expresión de diferentes marcadores inflamatorios como TNF α , iNOS, entre otros (Fenn et al., 2012; Laffer et al., 2019) en diferentes modelos de daño, reduciendo así la neurodegeneración. Es conocido que los astrocitos y la microglía liberan ambas citocinas en diferentes condiciones experimentales (He et al., 2017). Por lo tanto, analizamos cuál es la posible fuente de IL-10 e IL-4 al hacer dobles marcajes con neuronas, astrocitos y microglía. Encontramos que en caso del área CA4 del hipocampo, ambas interleucinas colocalizan principalmente con neuronas a diferencia de las células gliales. En la literatura encontramos pocos trabajos evidenciando la expresión de IL-10 o IL-4 en neuronas, sin embargo, hay reportes mostrando células doble positivas IL-10 / NeuN (Kaizaki y Watanabe, 2017; Wu et al., 2017) e IL-4 / NeuN (Zhao et al., 2015), lo cual está relacionado con disminución de la generación en un fenómeno de isquemia. Así, hipotetizamos que el incremento en los niveles de IL-10 e IL-4 en neuronas hipocampales debido al tratamiento con PRL están involucrados en la reducción de la inflamación y el resultante decremento en la neurodegeneración.

En relación al efecto de la PRL sobre los astrocitos se sabe que estas células expresan el RPRL (Modersheim et al., 2007). Además, se ha reportado que la PRL induce la proliferación de los astrocitos a través de la activación de la vía Jak/Stat (Mangoura et al., 2000). Resultados preliminares encontrados en este trabajo mostraron que la PRL disminuye la fosforilación de ERK1/2 a los 5min de tratamiento y se mantiene hasta los 80min. Estudios en el ovario y la decidua indican que la PRL disminuye la fosforilación de ERK a través de un mecanismo mediado por la fosfatasa DUPD1, la cual interacciona con el receptor corto de la PRL (Devi et al., 2011), por lo que es posible que en astrocitos la PRL tenga un mecanismo similar. Cuando se expuso a los astrocitos con KA se aprecia un incremento en la expresión de la iNOS e IL-1 β , visto por PCR o por inmunofluorescencia. Se ha reportado que el KA incrementa la expresión de citocinas in vivo (Zhang et al., 2011), sin embargo, reportes acerca de la relación del KA en cultivos de astrocitos es escasa. Un posible mecanismo involucra un incremento en la fosforilación de ERK1/2 (Mao et al., 2004; López-Colomé y Ortega, 1997), lo cual ha sido asociado a un incremento en la

expresión de citocinas proinflamatorias en otros modelos (Bhat et al., 1998). Cuando se hizo el cotratamiento con PRL se aprecia una disminución en la expresión de la iNOS e IL-1 β . Esto puede ser consecuencia de una disminución en la fosforación de ERK lo cual puede reducir la expresión de ambos marcadores como se ha visto en el modelo de la administración de LPS (Bhat et al., 1998), sin embargo, es necesario realizar más experimentos para confirmar esta hipótesis.

Finalmente, es importante tomar en cuenta que en adición a la reducción de la astrocytosis y microglia, es posible que otros mecanismos estén involucrados en el efecto neuroprotector de la PRL, incluyendo una disminución en el estrés oxidativo, en la modulación de la homeostasis del calcio, reducción de la apoptosis neuronal, entre otros. Se ha reportado que la PRL incrementa la expresión de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa en tejidos periféricos (Bolzán et al., 1995), además disminuye el daño neuronal inducido por el peróxido de hidrógeno en la retina al disminuir los niveles de ROS e incrementar la concentración de glutatión reducido y la expresión de la enzima antioxidante, catalasa (Meléndez et al., 2016; Thébault, 2017). En relación a la homeostasis del calcio y acciones antiapoptóticas, estudios *in vitro* muestran que la PRL disminuye la muerte de neuronas hipocámpicas al disminuir la sobrecarga de calcio intracelular inducido por el glutamato. Además incrementa la expresión de la proteína antiapoptótica bcl-2, reduciendo la relación bax / bcl-2. Este mecanismo es mediado posiblemente por Nf κ B (Rivero-Segura et al., 2017). También, la PRL incrementa la expresión de las proteínas antiapoptóticas bcl-2 y bcl-x en células linfoides y de tejido mamario (Leff et al., 1996; Ploszaj et al., 1998), de tal suerte que es posible que una disminución en la apoptosis neuronal mediada por PRL, esté involucrada en la neuroprotección del hipocampo.

15. Conclusión

Los resultados del presente estudio demuestran que el tratamiento con la hormona PRL reduce la astrogliosis en respuesta a la administración de KA. Al mismo tiempo, evita la activación microglial y la microgliosis inducida por la lesión. Este resultado fue acompañado por una reducción de los marcadores proinflamatorios TNF α e iNOS y un incremento en los marcadores antiinflamatorios IL-4 e IL-10 en el hipocampo.

Con base en estos resultados, sugerimos que este efecto es mediado por un incremento en la expresión de IL-4 e IL-10 en las neuronas del hipocampo, las cuales pueden inhibir la inducción de marcadores proinflamatorios y el incremento en la gliosis, resultando como consecuencia en una disminución de la degeneración inducida por el KA. Sin embargo, son necesarios estudios más específicos célula-célula para determinar con exactitud el mecanismo molecular exacto por el cual la PRL modula a las células gliales en respuesta al daño.

16. Referencias

Akaki, T., Ikegaya, Y. y Koyama, R. (2019). Microglia Attenuate the Kainic Acid-Induced Death of Hippocampal Neurons in Slice Cultures. *Neuropsychopharmacology Reports*, 1-7.

Akiyama, H., Tooyama, I., Kondo, H., Ikeda, K., Kimura, H., McGeer, E. G. y McGeer, P. L. (1994). Early Response of Brain Resident Microglia to Kainic Acid-Induced Hippocampal Lesions. *Brain Research*, 635, 257-268.

Albensi, B. C. (2001). Models of Brain Injury and Alterations in Synaptic Plasticity. *Journal of Neuroscience Research*, 65, 279–283. Anagnostou, I., Reyes-Mendoza, J. and Morales, T. (2018). Glial Cells as Mediators of Protective Actions of Prolactin (PRL) in the CNS. *General and Comparative Endocrinology*, 265, 106-110.

Arganda-Carreras, I., Fernandez-Gonzalez, R., Munoz-Barrutia, A. y Ortiz-De-Solorzano, C. (2010). 3D Reconstruction of Histological Sections: Application to Mammary Gland Tissue. *Microscopy Research and Technique*, 73(11), 1019-1029.

Arnold, E., Thebault, S., Baeza-Cruz, G., Zamarripa, D. A., Adán, N., Quintanar-Stéphano, A., Condés-Lara M., Rojas-Poloni G., Binart N., Martínez de la Escalera G. y Clapp, C. (2014). The Hormone Prolactin Is a Novel, Endogenous Trophic Factor Able to Regulate Reactive Glia and to Limit Retinal Degeneration. *The Journal of Neuroscience*, 34(5), 1868-1878.

Arundine, M., y Tymianski, M. (2003). Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium*, 34, 325-337.

Bachiller, S., Jiménez-Ferrer, I., Paulus, A., Yang, Y., Swanberg, M., Deierborg, T. y Boza-Serrano, A. (2018). Microglia in Neurological Diseases: A Road Map to Brain-Disease Dependent-Inflammatory Response. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12(488).

Becerra-Calixto, A. y Cardona-Gómez, G. P. (2017). The Role of Astrocytes in Neuroprotection After Brain Stroke: Potential in Cell Therapy. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10(88).

Benedetto, N., Folgore, A., Romano Carrateli, C. y Galiero, F. (2001). Effects of Cytokines and Prolactin on the Replication of *Toxoplasma gondii* in Murine Microglia. *Eur. Cytokine Netw*, 12(2), 348-358.

Benedetto, N. y Auriault, C. (2002). Prolactin-Cytokine Network in the Defence Against *Acanthamoeba castellanii* in Murine Microglial [corrected]. *Eur Cytokine Netw*, 13(4), 447-455.

Bhat, N. R., Zhang, P., Lee, J. C. y Hogan, E. L. (1998). Extracellular Signal-Regulated Kinase and p38 Supgroups of Mitogen-Activated Protein Kinases Regulate Inducible Nitric Oxide Synthase and Tumor Necrosis Factor- α Gene Expression in Endotoxin-Stimulated Primary Glial Cultures. *The Journal of Neuroscience*, 19(5), 1633-1641.

Bleakman, D., y Lodge, D. (1998). Neuropharmacology of AMPA and kainate receptors. *Neuropharmacology*, 37, 1187-1204.

Bolzán A., Brown O., Goya R. y Bianchi M. (1995) Hormonal Modulation of Antioxidant Enzyme Activities in Young and Old Rats. *Exp. Gerontol.* 30, 169-175

- Botana, L. M. (2000). *Seafood and Freshwater Toxins: Pharmacology, Physiology, and Detection*. EUA: Pharmacology, Physiology and Detection.
- Bridges, R. S., Numan, M., Ronsheim, P. M., Mann, P. E., y Lupini, C. E. (1990). Central prolactin infusions stimulate maternal behavior in steroid-treated, nulliparous female rats. *Neurobiology*, 87, 8003-8007.
- Brooks C. L. (2012). Molecular Mechanisms of Prolactin and Its Receptor. *Endocrine Reviews*, 33(4), 504-525
- Brown R. S. E., Wyatt A. K., Herbison R., E., Knowles P. J., Ladyman S. R., Binart N., Banks W. A. y Grattan D. R. (2015). Prolactin Transport Into Mouse Brain is Independent of Prolactin Receptor. *FASEB Journal*, 30(2), 1002-1010
- Cabrera-Reyes, E. A., Vanoye-Carlo, A., Rodríguez-Dorantes, M., Vázquez-Martínez, E. R., Rivero-Segura, N. A., Collazo-Navarrete, O. y Cerbón, M. (2019). Transcriptomic Analysis Reveals New Hippocampal Gene Networks Induced by Prolactin. *Scientific Reports*, 9.
- Cho, I.-H., Hong, J., Suh, E. C., Kim, J. H., Lee, H., Lee, J. E., Lee S., Chong-Hyun K., Kim D. W., Eun-Kyeong J. Lee K. E., Karin M. y Lee, S. J. (2008). Role of Microglial IKKb in Kainic Acid-Induced Hippocampal Neuronal Cell Death. *Brain*, 131, 3019-3033.
- De Vito, W. J., Avakian, C., Stone, S., Okulicz, W. C., Tang, K.-T. y Shamgochian, M. (1995). Prolactin Induced Expression of Interleukin-1 Alpha, Tumor Necrosis Factor-Alpha, and Transformin Growth Factor-Alpha in Cultured Astrocytes. *Journal of Cellular Biochemistry*, 57, 290-298.
- De Vito, W. J., Stone, S. y Shamgochian, M. (1995). Prolactin Induced Expression of Glial Fibrillary Acidic Protein and Tumor Necrosis Factor-alpha at a Wound Site in the Rat Brain. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 108, 125-130.
- Devi, Y. S., Seibold, A. M., Shehu, A., Maizels, E., Halperin, J., Le, J., Nadine B., Bao L. y Gibori, G. (2011). Inhibition of MAPK by Prolactin Signaling Through the Short Form of Its Receptor in the Ovary and Decidua. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(9), 7609-7618.
- DiSabato, D. J., Quan, N. y Godbout, J. P. (2016). Neuroinflammation: the Devil is in the Details. *Journal of Neurochemistry*, 139(Suppl. 2), 136-153.
- Dong, Y. y Benveniste, E. N. (2001). Immune Function of Astrocytes. *Glia*, 36, 180-190.
- Faherty, C. J., Xanthoudakis, S., y Smeyne, R. J. (1999). Caspase-3-dependent neuronal death in the hippocampus following kainic acid treatment. *Molecular Brain Research*, 70, 159-163.
- Fenn, A. M., Henry, C. J., Huang, Y., Dugan, A. y Godbout, J. P. (2012). Lipopolysaccharide-Induced Interleukin (IL)-4 Receptor- α Expression and Corresponding Sensitivity to the M2 Promoting Effects of IL-4 are Impaired in Microglia of Aged Mice. *Brain, Behaviour, and Immunity*, 26, 766-777.
- Freeman, M. E., Kanyicska, B., Lerant, A., y Nagy, G. (2000). Prolactin: Structure, Function, and Regulation of Secretion. 80, 1523-1586.

- Ganesh, B. S. y Chintala, S. K. (2011). Inhibition of Reactive Gliosis Attenuates Excitatory-Mediated Death of Retinal Ganglion Cells. *PLOS one*, 6(3).
- Gomes, C., Ferreira, R., George, J., Sanches, R., Rodrigues, D., Gonçalves, N. y Cunha, R. A. (2013). Activation of Microglial Cells Triggers a Release of Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF) Inducing their Proliferation in an Adenosine A2a Receptor Dependent Manner: A2a Receptor Blockade Prevents BDNF Release and Proliferation of Microglia. *Journal of Neuroinflammation*, 10(16).
- Harada, K., Kamiya, T. y Tsuboi, T. (2016). Gliotransmitter Release from Astrocytes: Functional, Developmental, and Pathological Implications in the Brain. *Frontiers in Neuroscience*, 9(499).
- He, M. L., Lv, Z. Y., Shi, X., Yang, T., Zhang, Y., Li, T.-Y. y Che, J. (2017). Interleukin-10 Release from Astrocytes Suppresses Neuronal Apoptosis Via the TLR2/NFkB Pathway in a Neonatal Rat Model of Hypoxic-Ischemic Brain Damage. *Journal of Neurochemistry*, 142, 920-933.
- Hong, J., Cho, I.-H., Kwak, K., Suh, E. C., Seo, J., Min, H. J., Choi S.-Y., Kim C.-H., Park S. H., Jo E.-K., Lee S., Lee K. E. y Lee, S. J. (2010). Microglial Toll-like Receptor 2 Contributes to Kainic Acid-Induced Glial Activation and Hippocampal Cell Death. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(50), 39447-39457.
- Jorgensen, M., Finsen, B. R., Jensen, M. B., Castellano, B., Diemer, N. H. y Zimmer, J. (1993). Microglial and Astroglial Reactions to Ischemic and Kainic Acid-Induced Lesions of the Adult Rat Hippocampus. *Experimental Neurology*, 120, 70-88.
- Jung, Y. J., Tweedie, D., Scerba, M. T. y Greig, N. H. (2019). Neuroinflammation as a Factor of Neurodegenerative Disease: Thalidomide Analogs as Treatments. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7(313).
- Kaizaki, M. y Watanabe, R. (2017). IL-10 Expression in Pyramidal Neurons After Neuropathogenic Coronaviral Infection. *Neuropathology*, 37, 398-406.
- Kochendoerfer S. K., Krishnan N., Bucley D. J. y Bucley A. R. (2003). Prolactin Regulation of Bcl-2 Family Members: Increased Expression of bcl-xl but not mcl-1 or bad in Nb2-T cells. *Journal of Endocrinology*. 178, 265-273.
- Kokay, I., Wyatt, A., Phillipps, H. R., Aoki, M., Ectors, F., Behm, U., y Grattan, D. R. (2018). Analysis of Prolactin Receptor Expression in the Murine Brain Using a Novel Prolactin Receptor Reporter Mouse. *Journal of Neuroendocrinology*, 30(9).
- Laffer, B., Bauer, D., Wasmuth, S., Busch, M., Jalivand, T. V., Thanos, S., zu Hörste G. M., Loser K., Langmann T., Heiligenhaus A. y Kasper, M. (2019). Loss of IL-10 Promotes Differentiation of Microglia to a M1 Phenotype. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13(430).
- Leff M., Buckley D. J., Krumenacker J., Reed J., Myashita T. y Buckley A. (1996). Rapid Modulation of the Apoptosis Regulatory Genes, Bcl.2 and Bax by Prolactin in Rat Nb2 Lymphoma Cell. *Endocrinology*. 144, 2102-2110

Lehmann A. y Hanssón E. (1988). Kainate-induced Stimulation of Amino Acid Release From Primary Astroglial Cultures of the Rat Hippocampus. *Neurochemistry International*, 13(4), 557-561

Lévesque, M. y Avoli, M. (2013). The Kainic Acid Model of Temporal Lobe Epilepsy. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 37, 2887-2899.

Li, L., Lundkvist, A., Andersson, D., Wilhelmsson, U., Nagai, N., Pardo, A. C., Nodin C., Stahlberg A., Aprico K., Larsson K., Yabe T., Moons L., Fotheringham A., Davies I., Carmeliet P., Schwartz J. P., Pekna M., Kubista M., Blomstrand F., Maragakis N., Nilsson M. y Pekny, M. (2008). Proective Role of Reactive Astrocytes in Brain Ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 28, 468-481.

Liddelov, S. A. y Barres, B. A. (2017). Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. *Immunity*, 46, 957-967.

Livne-Bar, I., Lam, S., Chan, D., Guo, X., Askar, I., Nahirnyj, A., Flanagan J. G. y Sivak, J. M. (2016). Pharmacologic Inhibition of Reactive Gliosis Blocks TNF- α -Mediated Neuronal Apoptosis. *Cell Death and Disease*, 7.

López-Colomé, A. M., y Ortega, A. (1997). Activation of p42 Mitogen-Activated Protein Kinase by Glutamate in Cultured Radial Glia. *Neurochemical Research*, 22(6), 679-685.

Lull, M. E. y Block, M. L. (2010). Microglial Activation and Chronic Neuroregeneration. *Neurotherapeutics*, 7, 354-365.

Maia, G. H., Quesado, J. L., Soares, J. I., do Carmo, J. M., Andrade, P. A., Andrade, J. P. y Lukoyanov, N. V. (2014). Loss of Hippocampal Neurons After Kainate Treatment Correlates with Behavioral Deficits. *PLOS one*, 9(1).

Majid, A. (2014). Neuroprotection in Stroke: Past, Present and Future. *Hindawi*, 1-17.

Mangoura, D., Pelletiere, C., Leung, S., Sakellaridis, N., y Wang, D.-X. (200). Prolactin Concurrently Activates Src-PLD and Jak/Stat Signaling Pathways to Induce Proliferation While Promoting Differentiation in Embryonic Astrocytes . *International Journal of Developmental Neuroscience*, 693-704.

Mao, L., Tang, Q., Samdani, S., Liu, Z., y Wang, J. Q. (2004). Regulation of MARK/ERK Phosphorylation Via Ionotropic Glutamate Receptors in Cultured Rat Striatal Neurons. *European Journal of Neuroscience*, 19, 1207-1216.

Matalka, K. Z. (2003). Prolactin Enhances Production of Interferon- γ , Interleukin-12 and Interleukin-10, but not of Tumor Necrosis Factor- α in a Stimulus-Specific Manner. *Cytokine*, 21, 187-194.

Meléndez G. R., Arredondo Z. A., Arnold E., Ruiz-Herrera X., Noguez I. R., Baeza C. G., Adán N., Binart N., Riesgo-Escobar J., Goffin V., Ordaz B., Peña-Ortega F., Martínez-Torres A., Clapp C. y Thebault S. (2016). Prolactin Protects Retinal Pigment Epithelium by Inhibiting Sirtuin2-Dependent Cell Death. *EbioMedicine*. 7, 35-49

- Mödersheim, T., Gorba, T., Pathipati, P., Kokay, I., Grattan, D. R., Williams, C. E. y Scheepens, A. (2007). Prolactin is Involved in Glial Responses Following a Focal Injury to the Juvenile Rat Brain. *Neuroscience*, 145, 863-973.
- Morales, T., Lorenson, M., Walker, A. M. y Ramos, E. (2014). Both Prolactin (PRL) and a Molecular Mimic of Phosphorylated PRL, S179D-PRL, Protect the Hippocampus of Female Rats Against Excitotoxicity. *Neuroscience*, 258, 211-217.
- Ochoa-Amaya, J. E., Hamasato, E. K., Tobaruela, C. N., Queiroz-Hazarbassanov, N., Anselmo Franci, J. A., Palermo-Neto, J., Greiffo F. R., Aparecida de Britto A., Vieira R. P., Ligeiro de Oliveira A. P. Massoco C. de O., y Felicio, L. F. (2015). Short-term Hyperprolactinemia Decreases Allergic Inflammatory Response of the Lungs. *Life Sciences*, 142, 66-75.
- Paolicelli, R. C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., Giustetto M., Alves Ferreira T., Guiducci E., Dumas L., Ragozzino D. y Gross, C. T. (2011). Synaptic Pruning by Microglia is Necessary for Normal Brain Development. *Science*, 333, 1456-1458.
- Peirce, S. K., y Chen, W. Y. (2004). Human Prolactin and its Antagonist, hPRL-G129R, Regulate bax and bcl-2 Gene Expression in Human Breast Cancer Cells and Transgenic Mice. *Oncogene*, 23, 1248-55.
- Ploszaj T., Motyl T., Orzechowski A., Zimowska W., Wareski P., Skierski J. y Zwierchowski L. (1998). Antiapoptotic Action of Prolactin is Associated with Up-regulation of Bcl-2 and Down-regulation of Bax in HC11 Mouse Mammary Epithelial Cells. *Apoptosis* 3, 295-304.
- Quesseveur, G., David, D., Gaillard, M., Pla, P., Wu, M., Nguyen, H. T., Nicolas V., Auregan G., David I., Dranovsky A., Hantraye P., Hen R., Gardier A. M., Déglon N. y Guiar, B. P. (2013). BDNF Overexpression in Mouse Hippocampal Astrocytes Promotes Local Neurogenesis and Elicits Anxiolytic-Like Activities. *Transl Psychiatry*, 3.
- Reyes-Mendoza, J. y Morales, T. (2016). Post-treatment with Prolactin Protects Hippocampal CA1 Neurons of the Ovariectomized Female Rat Against Kainic Acid-Induced Neurodegeneration. *Neuroscience*, 328, 58-68.
- Reyes-Mendoza J. y Morales T. (2020). Prolactin Treatment Reduces Kainic Acid-induced Gliosis in the Hippocampus of Ovariectomized Female Rats. *Brain Research*, 1746
- Rivero-Segura N. A., Flores-Soto E., García de la Cadena S., Coronado-Mares I., Gomez-Verjan J. C., Ferreira D. G., Cabrera-Reyes E. A., Lopes L. V., Massieu L. y Cerbón M. (2017). Prolactin-Induced Neuroprotection Against Exitotoxicity is Mediated by the Reduction of [Ca²⁺]_i Overload and NF-κB Activation. *PlosOne* 12, (5).
- Sabilallah, M., Fontanaud, P., Linck, N., Boussadia, B., Peyroutou, R., Lasgouzes, T., Rassendren F. A., Marchi N. y Hirbec, H. E. (2016). Evidence for Status Epilepticus and Pro-Inflammatory Changes After Intranasal Kainic Acid Administration in Mice. *PLOS one*, 11(3).
- Schousboe, A., Scafidi, S., Bak, L. K., Waagepetersen, H. S. y McKenna, M. C. (2014). Glutamate Metabolism in the Brain Focusing on Astrocytes. *Adv. Neurobiol.*, 11, 12-30.

- Shelly, S., Boaz, M. y Orbach, H. (2012). Prolactin and Autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*, 11, A645-A470.
- Shingo T., G. C. (2003). Pregnancy-Stimulated Neurogenesis in the Adult Female Forebrain Mediated by Prolactin. *Science*, 299, 117-120.
- Sun, Y., Ma, J., Li, D., Li, P., Zhou, X., Li, Y., He Z., Qin L., Liang L. y Luo, X. (2019). Interleukin-10 Inhibits Interleukin-1 β Production and Inflammasome Activation of Microglia in Epileptic Seizures. *Journal of Neuroinflammation*, 16(66).
- Sugino N., Hirosawa-Takamori M., Zhong L., Telleria C. M., Shiota K. y Gibori G. (1998). Hormonal Regulation of Copper-Zinc Superoxide Dismutase and Manganese Superoxide Dismutase Messenger Ribonucleic Acid in the Rat Corpus Luteum: Induction by Prolactin and Placental Lactogens. *Biology of Reproduction*, 59, 599-605.
- Swanson L. (1998). *Brain Maps: Structure of the Rat Brains*. New: Elsevier.
- Tejadilla, D., Cerbón, M. y Morales, T. (2010). Prolactin Reduces the Damaging Effects of Excitotoxicity in the Dorsal Hippocampus of the Female Rat Independently of Ovarian Hormones. *Neuroscience*, 169, 1178-1185.
- Thébault S. (2017). Potential Mechanisms Behind the Antioxidant Actions of Prolactin in the Retina. *Experimental Eye Research*. 160, 56-61
- Torner, L., Karg, S., Blunne, A., Kandasamy, M., Kuhn, H.-G., Winkler, J., Aigner L. y Neumann, I. D. (2009). Prolactin Prevents Chronic Stress-Induced Decrease of Adult Hippocampal Neurogenesis and Promotes Neuronal Fate. *The Journal of Neuroscience*, 29(6), 1826-1833.
- Torner, L., y Neumann, I. D. (2002). The Brain Prolactin System: Involvement in Stress Response Adaptations in Lactation. *Stress*, 5, 249-257.
- Tripathi, A. y Sodhi, A. (2007). Prolactin of Nitric Oxide Murine Peritoneal Macrophages in vitro on Treatment with Prolactin and Growth Hormone: Involvement of Protein Tyrosine Kinases, Ca⁺⁺, and MAP kinase Signal Transduction Pathway. *Molecular Immunology*, 44, 3185-3194.
- Vanoye-Carlo, A., Morales, T., Ramos, E., Mendoza-Rodríguez, A., y Cerbón, M. (2008). Neuroprotective effects of lactation against kainic acid treatment in the dorsal hippocampus of the rat. *Hormones and Behavior*, 53, 112-123.
- Vermani, B., Mukherjee, S., Kumar, G., y Patnaik, R. (2020). Prolactin Attenuates Global Cerebral Ischemic Injury in Rat Model by Conferring Neuroprotection. *Brain Injury*, 34(5), 685-693.
- Walker, D. G. y Lue, L.-F. (2015). Immune Phenotypes of Microglia in Human Neurodegenerative Disease: Challenges to Detecting Microglial Polarization in Human Brains. *Alzheimer's Research and Therapy*, 7(56).
- Walsh, R., Posner B. y Patel, B. (1984). Binding and Uptake of [125I]iodoprolactin by Epithelial Cells of the Rat Choroid Plexus: An in vivo Autoradiographic Analysis. *Endocrinology*, 114(5), 1496-1505.

- Wang, Q., Yu, S., Simonyi, A., Sun, G. Y., y Sun, A. Y. (2005). Kainic Acid-Mediated Excitotoxicity as a Model for Neurodegeneration. *Molecular Neurobiology*, 31, 3-16.
- Wu, H.-Y., Tang, X.-Q., Mao, X.-F. y Wang, Y.-X. (2017). Autocrine Interleukin-10 Mediates Glucagon-Like Peptide-1 Receptor-Induced Spinal Microglial B-Endorphin Expression. *The Journal of Neuroscience*, 37(48), 11701-11714.
- Yip, S. H., Eguchi, R., Grattan, D. R., y Bunn, S. (2012). Prolactin Signalling in the Mouse Hypothalamus is Primarily Mediated by Signal Transducer and Activator of Transcription Factor 5b but not 5a. *Journal of Neuroendocrinology*, 24, 1484-1491
- Young, K. y Morrison, H. (2018). Quantifying Microglia Morphology from Photomicrographs of Immunohistochemistry Prepared Tissue Using Image. *J. Vis. Exp*, 136.
- Zhang, X.-M. y Zhu, J. (2011). Kainic Acid-Induced Neurotoxicity: Targeting Glial Responses and Glia-Derived Cytokines. *Current Neuropharmacology*, 9, 388-398.
- Zhao, X., Wang, H., Sun, G., Zhang, J., Edwards, N. J. y Aronowski, J. (2015). Neuronal Interleukin-4 as a Modulator of Microglial Pathways and Ischemic Brain Damage. *The Journal of Neuroscience*, 35(32), 11281-11291.
- Zhen, X.-Y., Zhag, H.-L., Luo, Q. y Zhu, J. (2011). Kainic Acid-Induced Neurodegenerative Model: Potentials and Limitations. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011.
- Zheng, H., Zhu, W., Zhao, H., Wang, X., Wang, W. y Li, Z. (2010). Kainic Acid-Activated Microglia Mediate Increased Excitability of Rat Hippocampal Neurons in vitro and in vivo: Crucial Role of Interleukin-1beta. *Neuroimmunomodulation*, 17, 31-38.
- Zhu, W., Zheng, H., Shao, X., Wang, W., Yao, Q. y Li, Z. (2010). Excitotoxicity of TNF α Derved from KA Activated Microglia on Hippocampal Neurons in vitro and in vivo. *Journal of Neurochemistry*, 114, 386-396.

17. Anexo I (Ovariectomía)

Objetivo: Remover los ovarios de la rata (castración).

Materiales y Método.

- Ratas hembra de la cepa *Wistar* de entre 180-200g.
- Material de cirugía (Pinzas de disección, tijeras finas, hilo y aguja para suturar, grapas para sutura).
- Solución de Ketamina + Xilacina (70mg + 6mg / ml, *Cheminova de México*).
- Material para sanitización (alcohol 96%, cloruro de benzalconio, algodón, toallas de papel).

Procedimiento.

Después de anestesiar al animal con 0.25 ml de la solución de Ketamina-Xilacina (IP), se procedió a rasurar y desinfectar el lado izquierdo-dorsal del animal por debajo de las costillas. Posteriormente se realizó una incisión de aproximadamente 1.0 cm cortando primero la piel y posteriormente el músculo para así tener acceso a una de las gónadas. Con ayuda de unas pinzas de disección se extrae el ovario dejando expuesto aproximadamente 1.0 cm de la trompa de Falopio y la arteria útero-ovárica, las cuales serán ligadas con un hilo de sutura por debajo del ovario para evitar una hemorragia una vez que éste sea seccionado. Finalmente la trompa de Falopio es reintroducida a la cavidad del animal y se procede a suturar con hilo el músculo con el fin de evitar herniado de algún órgano y posteriormente la piel con ayuda de 2 grapas para sutura. El mismo procedimiento es llevado a cabo del lado contrario del animal para extraer el segundo ovario. El animal es limpiado en la zona expuesta a cirugía con cloruro de benzalconio y posteriormente es colocado en su caja para monitorear su completa recuperación en los días siguientes.