



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA PROLACTINA (PRL) SOBRE
LA SUPERVIVENCIA DE LOS ASTROCITOS CORTICALES
SOMETIDOS A ESTRÉS OXIDATIVO.”**

TESIS INDIVIDUAL

Que para obtener el título de

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

KARLA GABRIELA ORTIZ GÓMEZ

DIRIGIDA POR

DRA. EDITH ARNOLD HERNÁNDEZ

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2016.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA

**“ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA PROLACTINA (PRL) SOBRE
LA SUPERVIVENCIA DE LOS ASTROCITOS CORTICALES
SOMETIDOS A ESTRÉS OXIDATIVO.”**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

KARLA GABRIELA ORTIZ GÓMEZ

DIRIGIDA POR

DRA. EDITH ARNOLD HERNÁNDEZ

SINODALES

DRA. EDITH ARNOLD HERNÁNDEZ
DIRECTOR

M. EN C. ALMA DELIA BERTADILLO JILOTE
ASESOR INTERNO

M. EN IM. DAVID GUSTAVO GARCÍA GUTIÉRREZ
SINODAL

DRA. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA
SINODAL

Agradecimientos

A mis padres, Aida y Ricardo, por siempre ser mi soporte, darme su apoyo y cariño, por estar conmigo en las buenas y en las malas, por ser mi ejemplo a seguir y por darme educación e inculcarme valores, porque gracias a ellos y a su apoyo pude llegar hasta aquí, sin ellos no lo habría logrado. Porque desde que nací me han cuidado y han procurado mi felicidad, han apoyado mis decisiones y en los años durante la licenciatura siempre estuvieron ahí al pie del cañón impulsándome y ayudándome a levantarme para lograr mis objetivos. Agradezco también a mi hermano, Erick, que siempre estuvo ahí escuchándome, dándome consejos, platicando conmigo y apoyándome en lo que necesitara, porque con él comparto mis alegrías y mis tristezas, y porque desde pequeña siempre fue para mí un ejemplo a seguir. Amo a mi familia y les agradezco porque siempre me brindan su amor más sincero.

También quiero agradecer a mis primos porque siempre están conmigo y me demuestran la alegría más sincera, porque también son mis amigos, porque puedo desvelarme jugando cartas o turista con ellos y siempre serán un apoyo y me dan su cariño más sincero, a mis tíos y abuelos que siempre creyeron en mí.

Agradezco a mis amigos de la universidad, Christian (Lim), Pili, Kari, Miri, Nacho, Adán, Sebastián y Ricardo, porque me apoyaron siempre, porque pasé momentos inolvidables y divertidos con ellos, porque en los días de estudio también aprendimos la importancia de la amistad, porque siempre me motivaban a seguir adelante, también agradezco a Héctor por ser una persona muy especial y llegar a mi vida en el momento adecuado, por siempre confiar en mí y no dejarme caer jamás. Agradezco a los QFB's por ser el gran grupo que fueron y por dejarme crecer con sus enseñanzas, también agradezco al grupo 2 de la generación 2011-2015 por ser el grupo unido que fuimos y pasar buenos momentos juntos. Agradezco también a las personas que conocí durante mi estancia en el INB de la UNAM, Paco, Poncho, Juan Pablo, Lupita, porque me demostraron que se puede conseguir lo que uno desea, por sus consejos, sus pláticas, sus reuniones, por brindarme sus conocimientos.

Agradezco a mis amigas de la preparatoria Nancy, Vero, Cinthia, Susana y Mariana, por seguir conmigo hasta ahora, por escucharme, por apoyarme, por permitirme ser parte de su vida y estar para mí siempre, por ayudarme a levantarme cuando me caía, por pasar momentos difíciles juntas pero también por enseñarme que la amistad es un tesoro que se debe cuidar y por darme momentos de diversión y alegría. También agradezco a mis amigos de la secundaria porque hemos estado juntos en las buenas y en las malas, siempre apoyándonos los unos a los otros, escuchándonos, divirtiéndonos, sonriendo y regando esta amistad para que florezca y se mantenga como hasta ahora, fuerte.

Quiero agradecer a Edith Arnold, mi directora de tesis, por brindarme apoyo, por creer en mí, por sus consejos y explicaciones. Agradezco a mis sinodales, maestra Alma Bertadillo, Dra. Laura Berumen y maestro David García, por aceptar formar parte de este proyecto, por sus consejos y enseñanzas. Quiero agradecer a todos los maestros por ser cada uno de ellos un escalón para llegar a la cima, para cumplir mi objetivo con sus enseñanzas y consejos, especialmente quiero agradecer a la maestra Alma Bertadillo, la maestra Ángeles Escamilla, la Dra. Rosario Mejía, por aconsejarme y escucharme cuando necesitaba de su apoyo y por ayudarme a seguir adelante.

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	PÁGINA
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	
1. ANTECEDENTES	2
1.1. Estructura y función de la prolactina	3
1.2. El receptor de prolactina	4
1.2.1. Dominio extracelular	5
1.2.2. Dominio transmembranal	5
1.2.3. Dominio intracelular	6
1.2.4. Vías de señalización	6
1.2.4.1. Activación de la vía Jak2	6
1.2.4.2. Activación de la vía Jak/Stat	7
1.2.4.3. Otras vías de señalización	9
1.3. Los astrocitos	10
1.4. El estrés oxidativo	13
2. HIPÓTESIS	15
3. OBJETIVOS	16
3.1. General	16
3.2. Específicos	16
4. METODOLOGÍA	17
4.1. Animales	17
4.2. Cultivo primario de astrocitos corticales	17
4.3. Inmunocitoquímica	18
4.4. RT-PCR	19

4.5. Tratamientos con prolactina ovina (oPRL) y peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂)	20
4.6. Ensayo MTT	20
4.7. Análisis estadístico	21
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
5.1. Establecimiento de cultivo primario de astrocitos	22
5.2. Caracterización del cultivo primario de astrocitos	24
5.3. Análisis de la expresión de GFAP y del receptor de prolactina	25
5.4. Tratamientos con peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂) y ensayo de viabilidad celular.	27
6. CONCLUSIONES	31
7. REFERENCIAS	32

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Expresión relativa de GFAP.	26
2. Expresión relativa del RPRL largo.	26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estructura primaria de la PRL.	4
2. Estructura terciaria de la PRL.	4
3. Vía de activación Jak2.	7
4. Vía de activación Jak/Stat.	9
5. Astrocitos protoplásmicos.	11
6. Astrocitos fibrosos.	11
7. Funciones de los astrocitos en un SNC sano.	12
8. Ratas Wistar neonatas (P0).	23
9. Pasos de la disección de la corteza de un cerebro de rata neonata.	23
10. Microfotografías en campo claro del cultivo de astrocitos a diferentes tiempos.	24
11. Inmunocitoquímica para GFAP.	25
12. Medición de la viabilidad celular de los astrocitos en respuesta al tratamiento con dosis crecientes de H ₂ O ₂ .	28
13. Efecto protector de la PRL sobre los astrocitos sometidos a distintas concentraciones de H ₂ O ₂ .	29
14. Efecto protector de la PRL sobre los astrocitos sometidos a un daño oxidativo con H ₂ O ₂ y medido mediante el ensayo de MTT.	30

RESUMEN

La prolactina (PRL) es una hormona peptídica sintetizada y secretada por los lactótrofos en la adenohipófisis, la cual, se ha descrito posee diversas funciones biológicas en la osmoregulación, el crecimiento, el desarrollo, la inmunoregulación y el metabolismo. El sistema nervioso central (SNC) es blanco de las acciones de la PRL, promoviendo la neurogénesis, modulando la respuesta al estrés y como factor neuroprotector. Debido a la alta actividad metabólica y consumo de oxígeno, las células del SNC son altamente susceptibles a sufrir daño oxidativo. El objetivo del presente trabajo es investigar el efecto de la PRL sobre los astrocitos corticales al ser sometidos a un estrés oxidativo con peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Para esto se obtuvieron cultivos primarios de astrocitos corticales de ratas neonatas, que fueron caracterizados mediante inmunocitoquímica para GFAP, se determinó la expresión del receptor de prolactina (RPRL) mediante PCR y se evaluó el efecto protector de la PRL sobre los astrocitos sometidos a un estrés oxidante mediante el ensayo de MTT. Los resultados obtenidos indican que el RPRL se expresa en los cultivos de astrocitos corticales, y la PRL protege a los astrocitos del daño oxidativo, generado por especies reactivas de oxígeno (ROS). En conclusión, este trabajo muestra que los astrocitos son blanco de las acciones directas de la PRL a través de su receptor y sugiere que ésta puede jugar un papel muy importante en la protección del SNC de enfermedades neurodegenerativas donde el incremento en el estrés oxidativo está directamente relacionado con el daño al tejido cerebral.

1. Antecedentes

La prolactina (PRL) es una hormona peptídica que es sintetizada y secretada por células especializadas localizadas en la hipófisis anterior, llamadas lactótrofos. Esta hormona fue descubierta a partir de su acción sobre la producción de leche en mamíferos. La PRL además de participar en múltiples funciones durante la reproducción, también tiene un papel importante en la homeostasis del organismo (Freeman y col., 2000). La PRL tiene múltiples acciones, se han descrito diversas funciones biológicas en la osmoregulación, el crecimiento, el desarrollo, la inmunoregulación y el metabolismo (Bole-Feysot y col., 1998). Además, se sabe que la síntesis y secreción de la PRL no ocurre únicamente en la hipófisis anterior sino también en algunos otros órganos y tejidos (Freeman y col., 2000). El paso inicial en la acción de la PRL, como en otras hormonas, es la unión específica a su receptor de membrana; el receptor de la PRL (RPRL) forma parte de la amplia clase de receptores conocida como la superfamilia de receptores de citocinas de clase 1 (Bole-Feysot y col., 1998).

Diversos estudios indican que el sistema nervioso central es blanco de las acciones de la PRL. A nivel de órgano, la PRL actúa sobre el cerebro regulando su propia secreción; estimulando la conducta maternal y reduciendo la ansiedad; promoviendo el apetito; induciendo neurogénesis y promoviendo la gliosis reactiva. Además en la retina, una prolongación del sistema nervioso central, la PRL actúa como un factor trófico para las neuronas y la glía que es capaz de limitar la muerte por apoptosis, la gliosis y modular cambios en la expresión de neurotrofinas en modelos de degeneración retiniana. Además de que la PRL regula de manera endógena la responsividad fotoeléctrica de la retina. En su conjunto estas evidencias muestran que la PRL es una molécula importante en la regulación de la fisiología del sistema nervioso central, por lo tanto, este proyecto abordará la hipótesis de que en condiciones de estrés oxidativo la PRL inhibe la muerte de los astrocitos de la corteza, es decir, las células gliales del cerebro. A continuación se describen antecedentes generales sobre la estructura y función de la PRL y su receptor, los astrocitos y el estrés oxidativo en el cerebro.

1.1. Estructura y función de la prolactina

Con base en su genética, estructura y, propiedades funcionales y de unión, la PRL pertenece a la misma familia que la hormona del crecimiento (GH) y el lactógeno placentario (PL) ya que comparten un gen ancestral. En el genoma humano, el gen que codifica para la PRL se encuentra localizado en el cromosoma 6, tiene una longitud de 10 kb y está compuesto de 5 exones y 4 intrones. La transcripción del gen de PRL está regulada por dos regiones promotoras independientes. La región proximal, de 5 000 pb dirige la expresión pituitaria específica, mientras que la región promotora corriente arriba es la responsable de la expresión extrapituitaria (Freeman y col., 2000).

Tres décadas después de su identificación, se determinó la secuencia de aminoácidos de PRL de oveja y se demostró que es una proteína que tiene un peso molecular de 23 kDa (Bole-Feysot y col., 1998). La homología de la secuencia puede variar desde un 97% entre primates y hasta un 65% entre primates y roedores; en cerdos, humanos, vacas y ovejas, la PRL es una cadena de 199 aminoácidos, mientras que ratas y ratones, la PRL pituitaria consiste de 197 aminoácidos (Bole-Feysot y col., 1998).

La cadena peptídica de la PRL contiene seis cisteínas formando tres enlaces disulfuro intramoleculares (Cys4–11,58–174, y 191–199 en la PRL humana) (Figura 1). Diversos estudios han demostrado que la estructura secundaria de la PRL se encuentra conformada en un 50% de la cadena de aminoácidos por alfa hélices mientras que el resto se encuentra formando asas. En cuanto a la estructura terciaria de la PRL, se realizó una predicción por modelado de proteínas por homología, basándose en las similitudes entre dicha hormona y otras proteínas, especialmente con la GH (Freeman y col., 2000) y se encontró que la estructura terciaria de la PRL está compuesta por cuatro alfa hélices antiparalelas estabilizadas por tres puentes disulfuro (Figura 2) (Ben-Jonathan y col., 2008).

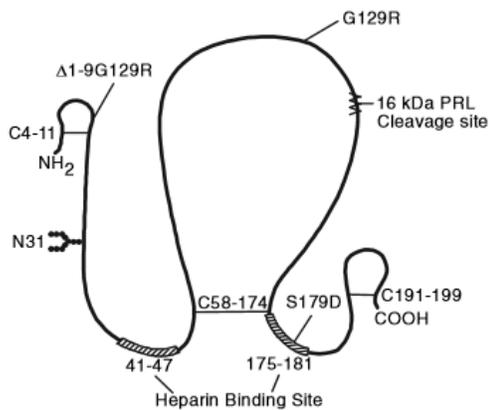


Figura 1. Estructura primaria de la PRL (Ben-Jonathan y col., 2008)

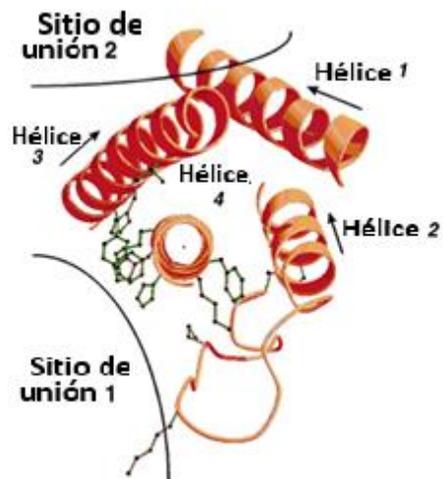


Figura 2. Estructura terciaria de la PRL (Bole-Feysot y col., 1998).

Como se mencionó anteriormente, la PRL puede ser secretada por las células llamadas lactótrofos, las cuales están presentes en la hipófisis anterior y conforman del 20 al 50% de la población celular, sin embargo, la PRL no sólo es sintetizada por la hipófisis sino también por el cerebro, la placenta, el líquido amniótico, el útero y las glándulas mamarias. La secreción de PRL es inducida por una gran variedad de estímulos, el más importante para la elevación del nivel de PRL en la sangre es el amamantar, seguido del estrés (Freeman y col., 2000). La PRL juega un papel importante en la regulación de su propio receptor, induciendo el aumento o la disminución de los niveles del mismo de acuerdo a la concentración y duración de PRL liberada, así como de la duración de dicha liberación (Boutin y col., 1988).

1.2. EL receptor de PRL

El receptor de prolactina (RPRL) pertenece a la familia de los receptores de citocinas tipo I, los cuales son proteínas transmembrana de paso único que carecen de actividad de tirosina cinasa intrínseca que pueden ser fosforilados por proteínas citoplasmáticas.

El gen que codifica para el RPRL se encuentra localizado en el cromosoma 5 y contiene por lo menos 10 exones. La regulación transcripcional del gen del RPRL se logra mediante tres distintas regiones promotoras específicas para diferentes tejidos.

El promotor I es específico para las gónadas, el promotor II lo es para el hígado y el promotor III es genérico, es decir, se encuentra en ambos tejidos, gonadales y no gonadales. Existen numerosas isoformas del RPRL dependiendo del tejido en donde se encuentren. Estas isoformas son el resultado de la transcripción a partir de sitios de iniciación alternativos de los diferentes promotores del RPRL, así como de transcripciones alternativas de corte y empalme de exones codificantes y no codificantes. Las isoformas varían en el largo y la composición de su dominio citoplasmático, sin embargo, su dominio extracelular es idéntico. Las tres mayores isoformas descritas en ratas son la corta (291 aminoácidos), la intermedia (393 aminoácidos) y la larga (591 aminoácidos) (Freeman y col., 2000). La isoforma larga del RPRL es considerada la principal isoforma a través de la cual la PRL transmite su señal. Tiene una masa molecular de 90kDa.

El RPRL está compuesto por un dominio extracelular, un dominio transmembranal corto y un dominio intracelular variable (Ben-Jonathan y col., 2008).

1.2.1. Dominio extracelular

Consiste en 210 aminoácidos y muestra secuencias similares con otros receptores de citocinas (domino homólogo del receptor de citocina, CRH). Se puede dividir en dos subdominios, D1 subdominio amino terminal y D2 dominio membrana proximal. Ambos dominios muestran analogías con la molécula de fibronectina tipo III, la cual dirige las interacciones ligando-receptor. Dos características altamente conservadas que se encuentran en el dominio extracelular del receptor de citocina son: dos pares de enlaces disulfuro de cisteínas en subdominio D1 (Cys 12-22 Cys 51-62, en el RPRL humano), y un pentapéptido denominado "WS motif" en el subdominio D2 (Freeman y col., 2000).

1.2.2. Dominio transmembranal

Así como todos los receptores de citocinas, el RPRL es una cadena transmembranal de paso único. El dominio transmembranal está compuesto por 24 aminoácidos. Se

desconoce la forma en que esta región se involucra con la actividad funcional del receptor (Freeman y col., 2000; y Bole-Feysot y col., 1998).

1.2.3. Dominio intracelular

El dominio citoplásmico de los receptores de citocinas presenta una similitud secuencial más restringida que el dominio extracelular. Este dominio es clave para la iniciación de los mecanismos de transducción de señales asociadas al RPRL. Existen dos regiones conservadas denominadas box 1 y box 2. Box1 es una región membrana proximal conformada por 8 aminoácidos y altamente enriquecida de prolina y residuos hidrófobos, box 2 es menos conservado que box 1 y consiste en una sucesión de residuos hidrófobos, cargados negativa y positivamente. Mientras box1 se conserva en todas las membranas de las isoformas del RPRL, box2 se encuentra ausente en las isoformas cortas (Freeman y col., 2000; y Bole-Feysot y col., 1998).

1.2.4. Vías de señalización

La activación del RPRL involucra la unión del ligando al receptor para promover una dimerización secuencial. Cada molécula contiene dos sitios de unión (el sitio 1 involucra las hélices 1 y 4, mientras que el sitio 2 engloba las hélices 1 y 3). Inicialmente, el sitio 1 de unión de la PRL interactúa con una molécula de RPRL, formando un complejo hormona-receptor, el cual es un pre-requisito para la interacción del sitio 2 de unión en la misma molécula de PRL con una segunda del RPRL (Freeman y col., 2000).

1.2.4.1. Activación de Jak2

La activación del RPRL mediante la unión de un ligando origina la fosforilación de numerosas proteínas intracelulares, incluyendo al mismo receptor. La región membrana-proximal del dominio intracelular está constantemente asociada con una

cinasa de tirosinas, denominada cinasa Janus 2 (Jak2). La fosforilación de Jak2 ocurre dentro del primer minuto después de la unión de la PRL al RPRL.

La activación de Jak2 se produce mediante la transfosforilación sobre la dimerización del receptor, lo cual trae dos moléculas de Jak2 cerca una de la otra. Las cinasas Jak2 se transfosforilan mutuamente y se ven envueltas en la fosforilación de residuos de tirosina del mismo RPRL. Aunque la fosforilación de Jak2 ocurre en todas las isoformas activas del RPRL, la fosforilación de tirosina del mismo receptor no ocurre sobre la activación de la isoforma corta, a pesar de la presencia de cuatro residuos de tirosina en el dominio intracelular (Figura 3) (Freeman y col., 2000).

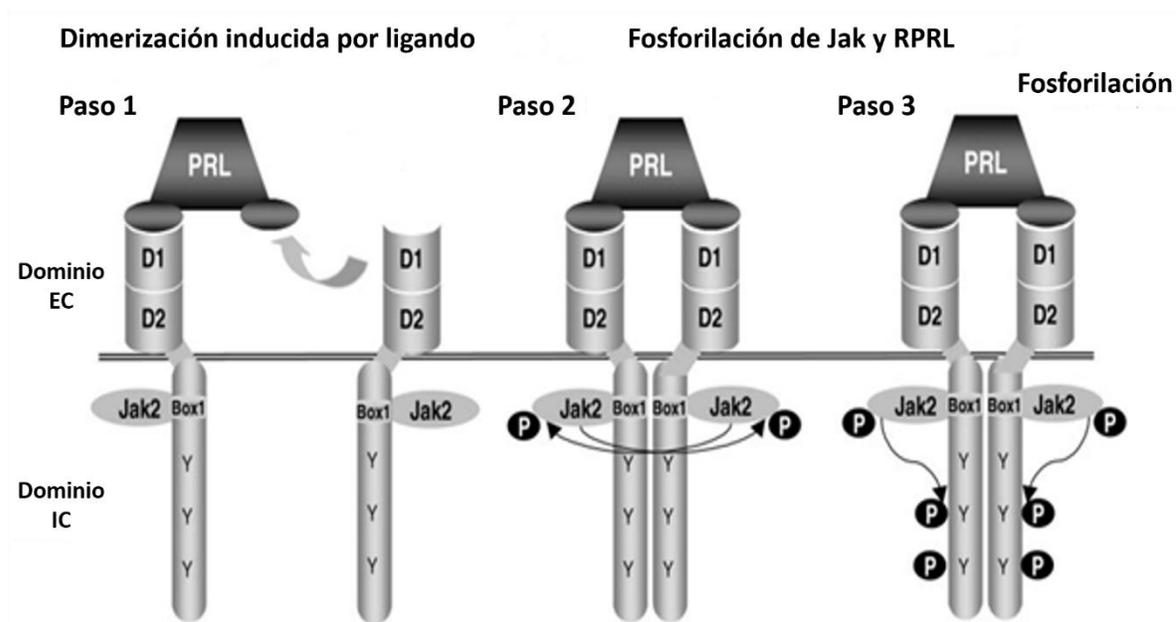


Figura 3. Vía de activación Jak2 (Freeman y col., 2000).

1.2.4.2. Activación de la vía Jak/Stat

La vía Jak/Stat (Figura 4) es la vía de activación del RPRL mejor caracterizada (Ben-Jonathan y col., 2008). En un modelo simple, la vía Jak/Stat tiene tres componentes: el receptor, Jak cinasa y el factor Stat (Watson y Burdon, 1996). Mientras que Jak es una cinasa de tirosinas del receptor, la familia de los Stats son factores de

transcripción citoplasmáticos compuestos por una estructura modular de cinco dominios. Jak2 es rápidamente activado después de la dimerización del receptor y fosforila residuos de tirosina en el RPRL. Las proteínas Stat, unidas por dominios SH2 a los residuos de fosfotirosina en el RPRL, son también blanco de Jak2 que fosforila a Stat 5a y Stat 5b. Después de la fosforilación, las proteínas Stat se desacoplan del RPRL, se homo o heterodimerizan y se traslocan al núcleo, donde promueven la transcripción de los genes blanco. Por ejemplo, la activación de las células hematopoyéticas por la IL-3 parece conducir a la activación de múltiples proteínas Stat, incluyendo Stat-1, Stat-3, Stat-5 y Stat-6 (Rane y Reddy, 2000).

La terminación de la señalización es un componente importante de la acción de la PRL. La vía Jak/Stat utiliza varios pasos para la terminación de la señal, incluyendo la inhibición por los supresores de la señalización de citocina (SOCS), la desfosforilación, y la ubiquitinación. Las proteínas SOCS se unen al receptor o a Jak2 y atenúan la señalización por competencia con las Stats por los sitios de unión del receptor y también interactúan con las proteínas de degradación. La PRL activa rápidamente a SOCS-1, SOCS-3 y CIS (dominio SH2 conformado por proteínas inducibles por citocinas) en neuronas hipotalámicas, adipocitos y células mamarias. Existe evidencia de que la PRL induce la internalización de su receptor, especialmente en la isoforma corta (Ben-Jonathan y col., 2008).

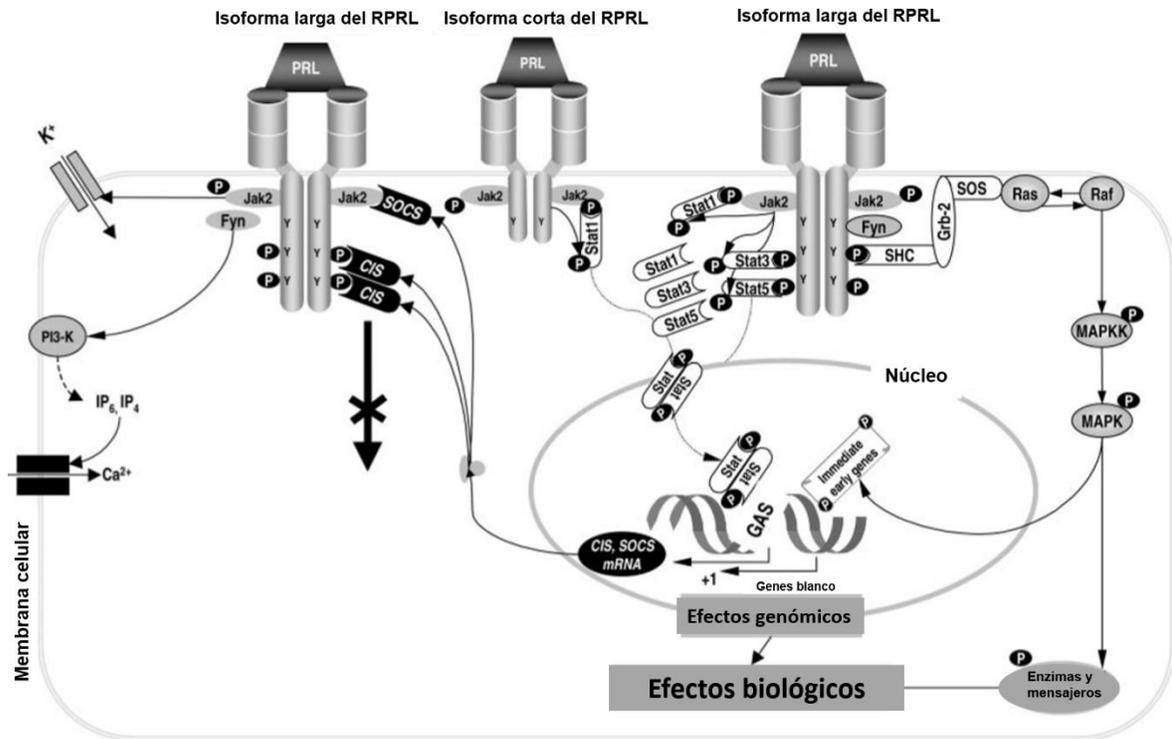


Figura 4. Vía de activación Jak/Stat (Freeman y col., 2000).

1.2.4.3. Otras vías de señalización

La vía de Ras/Raf/MAPK también es mediadora de las acciones de la PRL a través de su receptor. Aunque Jak2/Stat es la vía de activación del RPRL más importante, numerosos estudios indican que también se presenta la activación de la cascada de las MAPKs (proteínas cinasas activadas por mitógenos). Los residuos de fosfotirosina del RPRL pueden servir como sitios de unión para las proteínas adaptadoras (Shc/Grb2/SOS) que conectan al receptor con la cascada de Ras/Raf/MAPK (Freeman y col., 2000). La activación de esta cascada resulta en la translocación de MAPK y la consecuente fosforilación y activación de diversos factores de transcripción incluyendo Myc, Jun y Fos. Las cinasas ERK1/2 y la cinasa c-jun son activadas por la PRL (Freeman y col., 2000). La señalización de esta vía contribuye con la progresión del ciclo celular; en las células Nb2 la PRL estimula la fosforilación de ERK1/2 en cuestión de minutos promoviendo su proliferación. La especificidad de esta vía se encuentra limitada puesto que cualquier receptor de

membrana puede activar la cascada (Clevenger y Kline, 2001). Esta vía no desempeña un papel importante en la síntesis de proteínas de la leche (Ben-Jonathan y col., 2008).

Por otra parte, la PRL también activa la vía de PI3K/Akt. PI3K es una molécula dimérica, la cual consta de una unidad catalítica de 110kDa y una unidad reguladora de 85kDa. La unión de la subunidad p85 de la PI3K con el RPRL forman un complejo que es activado por la estimulación de la PRL. La interacción entre PI3K y el RPRL contribuye a la motilidad celular inducida por PRL (Clevenger y Kline 2001), por medio de la modulación del citoesqueleto y la interacción con cinasas de adhesión (Ben-Jonathan y col., 2008). La vía PI3K involucra la activación de Akt. En estudios previos se ha demostrado que la activación de Akt promueve la supervivencia celular, lo cual depende de su actividad cinasa. La PRL tiene un efecto antiapoptótico mediado por Akt en la decidua de rata a través de la inhibición de la actividad de caspasa 3, y también previene la apoptosis en células epiteliales mamarias de una manera dependiente de Akt.

1.3. Los astrocitos

Los astrocitos son células gliales especializadas muy abundantes en el sistema nervioso central (SNC) pues se ha estimado que ocupan un 50% del volumen del cerebro humano. Los astrocitos proveen soporte estructural, trófico y metabólico a las neuronas, y además modulan la actividad sináptica. Se sabe que los astrocitos promueven la homeostasis del tejido neural mediante diversas acciones como son: la captación y la liberación de glutamato en las sinapsis, la eliminación de radicales libres, el transporte de agua, la producción de citocinas y óxido nítrico (Chen y Swanson, 2003), además, de que regulan el pH extracelular y los niveles de K^+ (Dong y Benveniste, 2001). Los astrocitos, también intervienen en la formación y mantenimiento de la barrera hematoencefálica (BHE) (Chen y Swanson, 2003).

Los astrocitos se han dividido en dos subtipos, protoplasmáticos (Figura 5; Sun y col., 2010) o fibrosos (Figura 6; Sun y col., 2010), de acuerdo con su morfología celular y su localización anatómica. Los astrocitos protoplasmáticos se encuentran

en la materia gris, y en cuanto a su morfología, tienen una distribución redonda con unas prolongaciones que dan lugar a otras finas ramificaciones llamadas “procesos pediculares”, mientras que los astrocitos fibrosos se encuentran a lo largo de la materia blanca y tienen una estructura fibrosa (Sofroniew y Vinters, 2009), sin embargo sus prolongaciones son más largas y cilíndricas, son los clásicos astrocitos en “forma de estrella” (Molofsky y col., 2012). Estudios neuroanatómicos han demostrado que ambos subtipos de astrocitos tienen contacto con los vasos sanguíneos. Análisis de microscopía electrónica han revelado que los procesos pediculares de los astrocitos protoplásmicos se involucran en la sinapsis y los procesos de los astrocitos fibrosos se encuentran en contacto con los nódulos de Ranvier, además, ambos tipos de astrocitos forman uniones tipo gap entre los astrocitos cercanos.

Los astrocitos participan en la sinapsis, se unen a los vasos sanguíneos y realizan uniones tipo gap. En la sinapsis, los astrocitos liberan sustratos energéticos (lactato), precursores de transmisores (glutamina), transmisores (glutamato), purinas (ATP), factores de crecimiento (TNF α) y neuroesteroides además, captan K⁺, H₂O, transmisores (glutamato, GABA y glicina). En cuanto a la regulación del flujo sanguíneo, diversos estudios han demostrado que los astrocitos producen y liberan diversos mediadores moleculares como las prostaglandinas, el óxido nítrico y el ácido araquidónico, los cuales pueden aumentar o disminuir el diámetro de los vasos sanguíneos de manera coordinada. Por medio de las uniones que tiene con los vasos sanguíneos y la sinapsis, los astrocitos valoran el flujo sanguíneo en relación con los niveles de actividad sináptica. Las ramificaciones de los astrocitos son ricas en el canal de agua de la aquaporina 4 y en transportadores para la absorción de K⁺. Tienen diversos medios de transportar protones incluyendo el intercambio de Na⁺/H⁺, transportadores de bicarbonato, transportadores de ácidos monocarboxílicos, y la bomba ATPasa de tipo vacuolar, de esta manera es como se lleva a cabo la regulación del pH y extracelular y de los niveles iónicos, para mediar la homeostasis (Figura 7) (Sofroniew y Vinters, 2009).

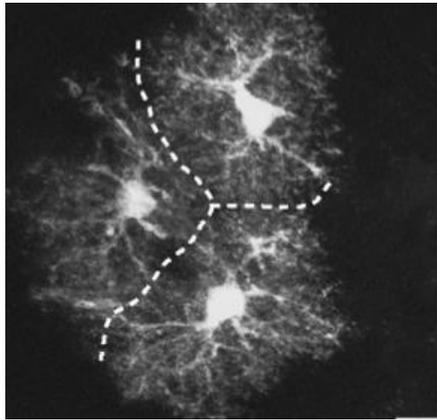


Figura 5. Astrocitos protoplásmicos (Sun y col., 2010)

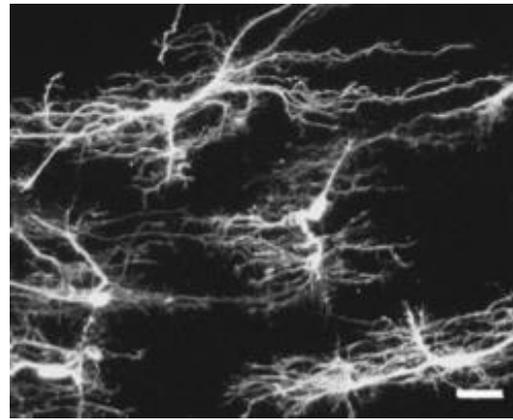


Figura 6. Astrocitos (Sun y col., 2010)

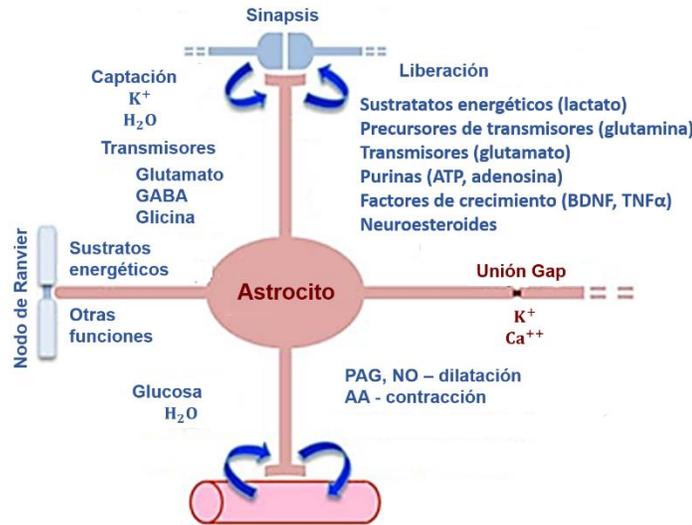


Figura 7. Funciones de los astrocitos en un SNC sano (Sofroniew y Vinters, 2009).

Los astrocitos, a diferencia de las neuronas, no son excitados por potenciales eléctricos, sino por la regulación de la concentración de calcio intracelular, la cual tiene gran importancia funcional en la comunicación intercelular astrocito-astrocito y astrocito-neurona.

Finalmente, los astrocitos son sometidos a un proceso de proliferación, cambios morfológicos, y aumento de la expresión de la proteína gliofibrilar ácida (GFAP), denominado astrogliosis que es un distintivo común de las enfermedades neurodegenerativas. Sin embargo, la astrogliosis puede ser benéfico desde el punto de vista de la producción de factores de crecimiento y neurotrofinas que aumentan

el soporte neuronal o perjudicial desde el punto de vista de la formación de cicatrices gliales (Dong y Benveniste, 2001).

1.4. El estrés oxidativo

El estrés oxidativo es el desequilibrio entre la producción y captación de radicales libres (Butterfield, 2011). Debido al alto consumo de oxígeno y el enriquecimiento de ácidos grasos poliinsaturados en sus membranas, las células del SNC son altamente susceptibles a sufrir daño oxidativo. El estrés oxidativo inducido por una producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS) ha sido implicado en el proceso patológico asociado a lesiones cerebrales y otras enfermedades neurodegenerativas. El exceso de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) puede dañar las células a través de la oxidación directa de lípidos, proteínas y ADN o puede actuar como una molécula de señalización que desencadena vías intracelulares que conducen a la muerte de la célula.

Los astrocitos dan protección a sí mismos y a las células neuronales contra el estrés oxidativo y el daño cerebral. El nivel de glutamato extracelular aumenta produciendo apoptosis, los astrocitos toman este exceso para reducir su nivel y, de esta manera protegen a las neuronas para su supervivencia. Además, para protegerse y proteger a las neuronas contra el estrés oxidativo en el cerebro, los astrocitos producen y liberan glutatión (GSH) y metalotioneína, y mejoran la descarga de ATP para regular positivamente la expresión de tiorredoxina reductasa a través del receptor de ATP (Ito y col., 2015). La recuperación a largo plazo de las neuronas después de un daño cerebral se lleva a cabo por medio de extensión de las neuritas a través de plasticidad sináptica o regeneración neuronal, lo cual es influenciado por los astrocitos por medio de moléculas de expresión superficiales y liberación de factores tróficos (Chen y Swanson, 2003). Las neuronas son más susceptibles que los astrocitos al daño por oxidación, sin embargo, los astrocitos también pueden verse alterados en sus funciones debido al estrés oxidativo generándose la muerte celular debido a una peroxidación lipídica ya que ésta se encuentra asociada con modificaciones en las proteínas de membrana que conducen a una homeostasis alterada de los niveles

intracelulares de Ca^{2+} y de las cinasas dependientes de Ca^{2+} , lo que conlleva a una disfunción mitocondrial y la activación de vías apoptóticas (Zhu y col., 2005). En el presente estudio investigamos el efecto de la PRL frente a la muerte celular generada en los astrocitos sometidos a un estrés oxidativo originado por H_2O_2 .

2. Hipótesis

La PRL inhibe la muerte celular de los astrocitos inducida por un estrés oxidativo.

3. Objetivos

3.1. General

- Evaluar la acción protectora de la PRL contra la muerte celular de los astrocitos inducida por un estrés oxidativo con peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

3.2. Específicos

- Implementar y caracterizar un cultivo primario de astrocitos de corteza de rata neonata.
- Determinar la expresión de PRL y del RPRL en los astrocitos
- Analizar el efecto de la PRL en la supervivencia de los astrocitos sometidos a un estrés oxidativo.

4. Metodología

4.1. Animales.

Para cada aislamiento se utilizaron tres ratas neonatas (P0-P1) albinas de la cepa Wistar que se obtuvieron del bioterio el día del aislamiento y se manejaron de acuerdo al reglamento de la Asociación para la Investigación en Visión y Oftalmología de EUA (ARVO). El comité de bioética del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) aprobó todos los protocolos experimentales utilizados. Los animales se anestesiaron por hipotermia colocándolos por 15-20 minutos cubiertos con papel absorbente plastificado adentro de una bandeja con hielo.

4.2. Cultivo primario de astrocitos corticales:

El cultivo primario de astrocitos se obtuvo bajo rigurosas condiciones de esterilidad, para ello se colocó el microscopio estereoscópico, el instrumental de disección y material para el cultivo dentro de la campana de flujo laminar y se encendió luz UV durante 30 minutos. En la mesa de trabajo del laboratorio, se durmió a las ratas, una vez anestesiadas las ratas se rociaron con alcohol al 70% y se sacrificaron por decapitación. Se colocaron las cabezas en una placa de Petri y se transportaron al cuarto de cultivo para continuar con el resto del procedimiento en la campana de flujo laminar. Por la parte dorsal se retiró la piel y huesos del cráneo, se desprendió el cerebro introduciendo una pinza fina por debajo de los bulbos olfatorios y de los nervios ópticos. Los cerebros se colocaron en una solución amortiguadora constituida por Solución salina balanceada de Hank libre de calcio y magnesio (HBSS, #14175095, Invitrogen, EUA) suplementado con HEPES (#3375, Sigma-Aldrich, EUA) a una concentración final de 1mM y Penicilina-Estreptomina (#15148, GIBCO, Invitrogen, EUA) al 1%, mantenida previamente en frío.

Se retiraron las meninges y la materia blanca de cada cerebro con cuidado, y las cortezas se depositaron en otra placa de Petri con solución de disección en frío. Posteriormente, las cortezas se retiraron de la disolución de disección y se colocaron

en la tapa de una placa Petri y se disgregaron finamente con un bisturí. Se transfirió el tejido a un tubo cónico de 50 mL y se agregaron 3 mL de tripsina-EDTA 0.05%/0.02% (#R001100 Gibco, Invitrogen, EUA), se agitó manualmente y se incubaron a 37°C en el baño de agua caliente durante 5 minutos. Se retiró el tubo del baño y en la campana se disgregó el tejido con la micropipeta de 1000µL un par de veces y se colocó nuevamente en baño caliente por 5 minutos más. Nuevamente se disgregó el tejido con la micropipeta para obtener una suspensión celular homogénea y luego se adicionaron 10 mL de medio de cultivo de astrocitos compuesto por DMEM alta glucosa (11965-092, Invitrogen, EUA) suplementado con suero fetal bovino (Bio-S1650, Biowest, México) al 10% y penicilina-estreptomicina al 1%, para detener la acción de la enzima. Se centrifugó por 5 minutos a 3000 rpm, se aspiró el sobrenadante y se agregaron 10 mL del medio de cultivo de astrocitos por cada cerebro aislado. Se resuspendió el pellet y se colocaron 10 ml de la suspensión celular en cada una de las botellas de cultivo de 75cm², previamente recubiertas e incubadas con una solución de poli-D-lisina (#P6407-5MG, Sigma-Aldrich, EUA) a una concentración de 1 µg/mL. Las botellas del cultivo se incubaron a 37°C y el medio de cultivo se cambió tres o cuatro días después.

4.3. Inmunocitoquímica

Los astrocitos fueron sembrados a una densidad de 50000 células/cm² en cubreobjetos (18mm) previamente recubiertos con una solución de poli-D-lisina (#P6407-5MG, Sigma-Aldrich, EUA) a una concentración de 10 µg/mL, colocados en los pozos de una placa para cultivo celular de 12 pozos y se incubaron a 37°C durante 5 días. Transcurrido ese tiempo los cubreobjetos se lavaron con PBS y las células fueron fijadas con 1 mL de paraformaldehído al 4% durante 15 minutos. Posteriormente se retiró el paraformaldehído y se hicieron tres lavados con PBS; luego las células fueron permeabilizadas con una solución de Triton-100X (X198-07, J.T. Baker, México) al 0.1% en PBS durante 10 minutos y se lavaron una vez con PBS. Los cubreobjetos se transfirieron a una cámara húmeda y se bloquearon con una solución de suero de cabra normal al 10% (NGS) durante una hora a temperatura

ambiente. Posteriormente se incubaron con un anticuerpo primario policlonal dirigido contra la proteína ácida fibrilar de la glia (GFAP) diluído 1:1000 en una solución de albúmina al 0.1% y se incubaron a 4°C durante toda la noche: el control negativo sólo fue incubado con la solución de albúmina sin anticuerpo primario. Al día siguiente, el anticuerpo primario fue aspirado y se realizaron tres lavados con PBS de 5 minutos; luego se agregó un anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a Alexa 555 (1:1000, Abcam, ab150078), y se incubó a temperatura ambiente por 1 hora, posteriormente se hicieron cuatro lavados con PBS por 5 minutos. Finalmente cada cubreobjeto se montó en un portaobjetos utilizando una gota de medio de montaje Vectashield conteniendo DAPI y se sellaron con barniz. Las laminillas fueron examinadas con un microscopio confocal Zeiss LSM 780 (Zeiss, Alemania)

4.4. RT-PCR

El aislamiento de ARN se realizó con un Mini Kit (QIAGEN, cat. 74104) de acuerdo a las instrucciones. A cada pozo de una placa de cultivo de 6 pozos se le aspiró completamente el medio y se adicionaron 350µL de Buffer RTL, se rasparon las células con una espátula y se recolectaron en el buffer en un microtubo y se congelaron. El día del aislamiento de ARN, se descongelaron los tubos con las muestras, se vortexearon para promover el rompimiento de las células y a cada muestra se le adicionó un volumen igual de etanol al 70% y se mezcló pipeteando. Posteriormente se transfirió la mezcla a una mini columna para separar el ARN, se centrifugó y se eliminó el sobrenadante, luego se realizaron una serie de lavados del ARN atrapado en el filtro de la columna y finalmente se adicionaron 40µL de agua libre de ARNsas y se centrifugó para recuperar el ARN.

Para la síntesis de ADN se utilizaron 3 µg de ARN y se incubaron con la enzima Reverse Transcriptase (RT) y oligonucleótidos. Adicionalmente, se preparó una reacción blanco (negativo) sin enzima y un negativo sin sustrato. La reacción se llevó a cabo en el termociclador (Eppendorf #22331, Hamburg, Alemania) con el siguiente programa: 1 ciclo a 25°C durante 10 minutos, 1 ciclo a 37°C durante 2 horas, 1 ciclo a 85°C durante 5 minutos.

A cada muestra se le adicionaron 8 μL de una mezcla de reacción, compuesta de 2 μL de agua libre de ARNsas, 1 μL de primers (#115723, GIBCO, USA) y 5 μL de la enzima Taq (#MO486S, Biolabs, New England), además, se adicionó 1 μL de ADN a cada muestra para obtener un volumen final de 9 μL por muestra. Las muestras se analizaron en un gel de agarosa (#50070, SEAKEM, USA) al 1.2% con bromuro de etidio. en 100 mL de buffer TAE 1X. Finalmente, la reacción se llevó a cabo en el termociclador (Eppendorf #22331, Hamburg) con el siguiente programa: 1 ciclo a 95°C durante 1 minuto, 1 ciclo a 95°C durante 15 segundos, 1 ciclo a 60.4°C durante 15 segundos, 1 ciclo a 72°C durante 10 segundos, 1 ciclo a 72°C durante 5 segundos, 1 ciclo a 4°C al ∞ . Una vez concluida la reacción, se corrió el gel colocando el marcador de peso molecular, las muestras y un control positivo.

4.5. Tratamientos con prolactina ovina (oPRL) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

Los astrocitos fueron sembrados en placas de 96 pozos a una densidad de 15000 células/ cm^2 y se incubaron durante 40 horas a 37°C. Posteriormente las células fueron tratadas o no con PRL ovina (L-6520, Sigma-Aldrich, EUA) a dosis de 1 nM, 10 nM y 100nM e incubadas a 37°C durante 24 horas; después se procedió a realizar los tratamientos con peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Las diluciones de H_2O_2 se prepararon a partir de un stock 9.8 M justo antes de ser adicionado a las células. En todos los casos 12 μl de la dilución de H_2O_2 en DMEM fueron adicionados a cada pozo correspondiente para obtener una concentración final de 100 μM , 200 μM , 400 μM , y 800 μM y se incubaron a 37°C durante 3 horas, para posteriormente realizar el ensayo de MTT.

4.6. Ensayo MTT

La viabilidad metabólica de los astrocitos después de los tratamientos con H_2O_2 se evaluó mediante el ensayo de MTT. A cada pozo se le adicionaron 10 μL de una solución de Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) a una concentración de 5 mg/mL (M5655, Sigma, EUA) en PBS. Posteriormente la placa

se incubó a 37°C durante 3 horas protegida de la luz y al término se aspiró el medio y se agregó a cada pozo 100 μ L del disolvente constituido por una solución de SDS al 10% y 0.01 N de HCl, se dejó en agitación lenta toda la noche y al día siguiente se midió la densidad óptica con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm.

4.7. Análisis estadístico

Los datos se presentan como promedio \pm error estándar de la media. La significancia estadística se determinó por el análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Turkey. El análisis estadístico se llevó a cabo usando el programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA). Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

5. Resultados y discusión

5.1. Establecimiento de cultivo primario de astrocitos

En este trabajo se logró aislar y estandarizar un cultivo primario de astrocitos corticales. Los astrocitos han sido aislados de diversas especies de roedores, en este caso se utilizaron ratas neonatas (P0-P1) albinas de la cepa Wistar (Figura 8). Se extrajo el cerebro completo, se removieron los bulbos olfatorios, el cerebelo y la materia blanca para dejar únicamente las cortezas cerebrales a las que les fueron retiradas las meninges para evitar la contaminación del cultivo con fibroblastos procedentes de este tejido (Figura 9 A-D). Las cortezas fueron sometidas a una digestión enzimática con tripsina, la cual es una enzima proteolítica del páncreas, que degrada proteínas de la matriz extracelular dividiendo los enlaces peptídicos internos de las cadenas polipeptídicas (Fox, 2011). El homogenado fue sembrado en botellas para cultivo celular recubiertas con poli-D-lisina, para favorecer la adhesión de los astrocitos ya que la poli-D-lisina es un compuesto policationico que mejora la adherencia celular y la absorción de proteínas a través de la interacción entre las superficies polianiónicas de las células (Mazia y col., 1975). Se realizó un seguimiento diario del cultivo para observar la eficiencia en la adhesión y la proliferación de los astrocitos. A los 5 días después del aislamiento de los astrocitos, se pueden observar algunos astrocitos ya adheridos, sin embargo es hasta 10 días después del aislamiento que se observa un incremento significativo en la proliferación y el número de astrocitos en el cultivo; posteriormente, a los 15 días se observa una confluencia celular de alrededor del 70% (Figura 10 A-D).

Los astrocitos han sido reconocidos por ser células versátiles que participan en procesos biológicos esenciales para el desarrollo y funcionamiento normal del cerebro, así como para la reparación del sistema nervioso central. Los cultivos primarios de células gliales aislados de la corteza cerebral de roedores son utilizados ampliamente para el estudio de las funciones de los astrocitos y los factores que los regulan en el cerebro en un ambiente controlado. Los cultivos primarios de astrocitos son fáciles de preparar, son reproducibles y se pueden obtener de cualquier región del SNC, además, a diferencia de las neuronas, los astrocitos son capaces de

reingresar al ciclo celular (Manfredi y Kawamata, 2011), es por esto que se estableció un cultivo primario de astrocitos corticales.



Figura 8. Ratas Wistar neonatas (P0).

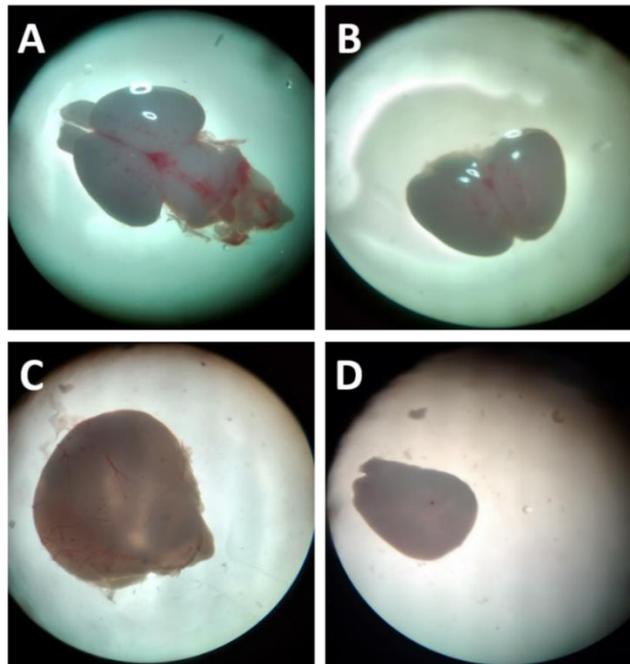


Figura 9. Pasos de la disección de la corteza de un cerebro de rata neonata. (A) Cerebro completo. (B) Cerebro sin bulbos olfatorios ni cerebelo. (C) Cortezas cerebrales con meninges. (D) Cortezas cerebrales sin meninges. Magnificación 5X.

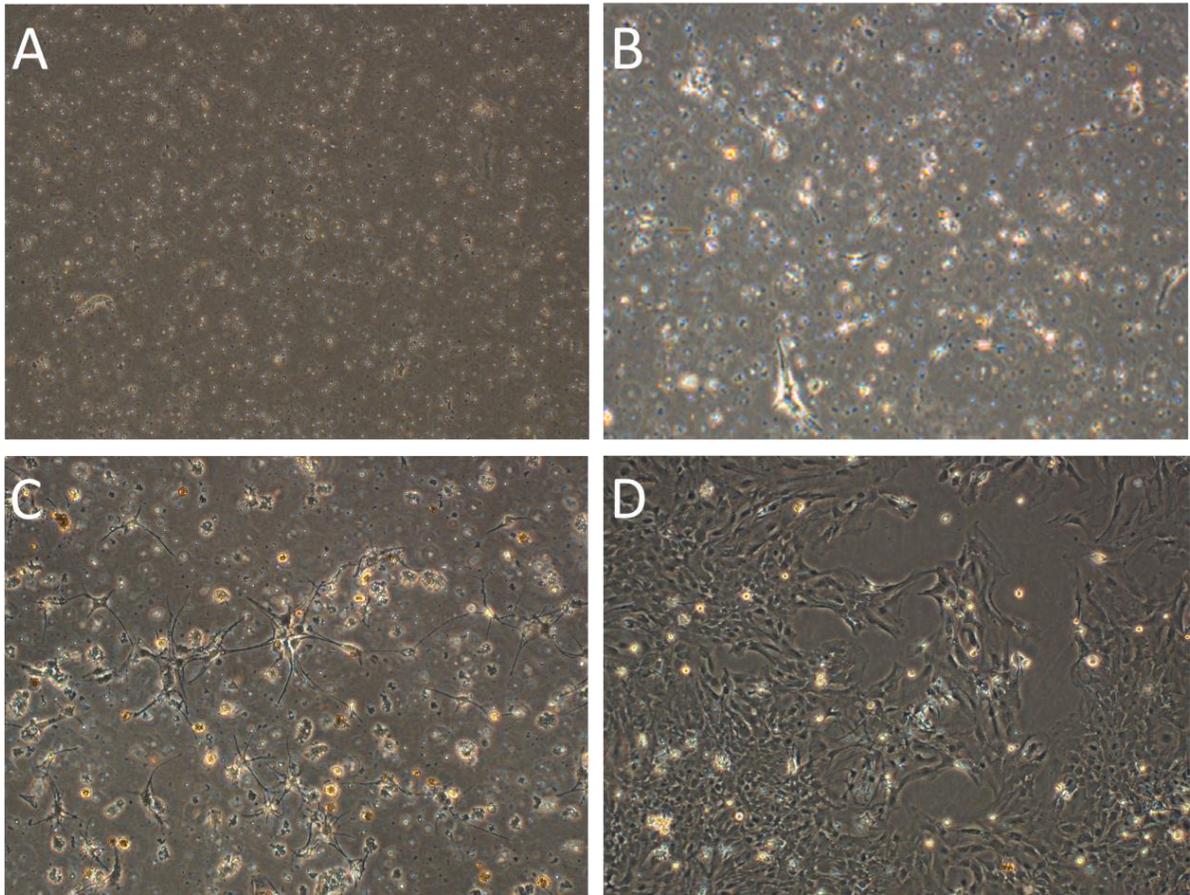


Figura 10. Microfotografías en campo claro del cultivo de astrocitos a diferentes tiempos. (A) Inmediatamente después de haber sido sembradas las células y (B) 5, (C) 10 y (D) 15 días después de haber sido sembrados los astrocitos. Magnificación 10X.

5.2. Caracterización del cultivo primario de astrocitos

La pureza del cultivo primario de astrocitos fue evaluada mediante inmunocitoquímica utilizando como marcador celular anticuerpos específicos para la proteína glial fibrilar ácida (GFAP) (MAB360, Millipore, EUA). En la Figura 11 se puede observar un control negativo carente del anticuerpo primario contra GFAP, lo cual permite demostrar que la señal detectada es específica del GFAP proveniente de las células en cuestión. Por otro lado, se puede observar que el cultivo es de alta pureza para astrocitos dado que todas las células evidenciadas por la tinción de sus núcleos con DAPI muestran una señal positiva para la presencia de GFAP en el

citoesqueleto de los astrocitos. Ésta técnica se basa en la gran especificidad y alta afinidad que tienen los anticuerpos para reconocer moléculas y unirse a ellas; en este caso la proteína GFAP se encuentra en el citoesqueleto de las células gliales y constituye los filamentos intermedios en los astrocitos protoplásmicos y fibrilares del sistema nervioso central (Eng y col., 2000). Además, se utilizó DAPI, un marcador fluorescente del núcleo celular, el cual se une en el surco menor de la doble cadena de ADN con una preferencia por los grupos de adenina-timina (Chazotte, 2011). Es importante tener cultivos puros de un linaje celular para asegurar que los resultados de los diversos estudios, ya sean de división celular, actividad celular, evaluación de la respuesta celular hacia sustancias activas, entre otros, provienen de las células en cuestión y no de contaminaciones con otras células.

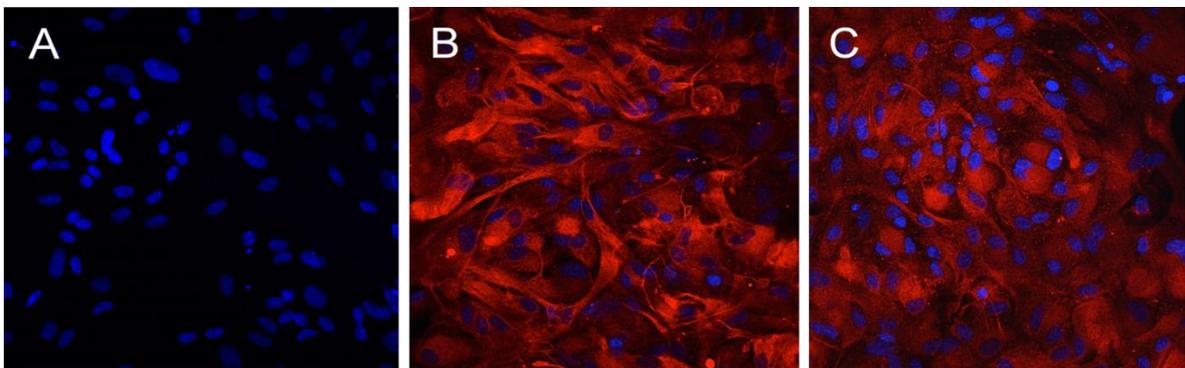


Figura 11. Inmunocitoquímica para GFAP. (A) Control negativo sin anticuerpo primario. (B-C) Tinción positiva para GFAP. Magnificación 25X

5.3. Análisis de la expresión de GFAP y del receptor de prolactina

El análisis mediante RT-PCR de la expresión de GFAP en los cultivos primarios de astrocitos demostró la expresión de dicha proteína en el cultivo primario corroborando el resultado de la inmunocitoquímica (Cuadro 1). Además se encontró que los astrocitos expresan la isoforma larga del RPRL y se puede observar la cantidad de gen expresada por los valores de Ct en el Cuadro 2. Lo cual sugiere que la PRL

mediante la activación de la isoforma larga de su receptor puede estar transmitiendo sus señales en los astrocitos en cultivo.

Para realizar los cálculos del análisis de RT-PCR cuantitativa se utiliza un gen de carga, en este caso Hprt, debido a que se expresa en niveles relativamente altos y de manera constitutiva en todas las células, generando controles de referencia ideales para el cálculo de la expresión relativa del gen en estudio (Huggett y col., 2005). Para el cálculo de la expresión relativa del gen del RPRL en cuestión se utilizó la siguiente ecuación:

$$Expresión\ relativa = 2^{(Ct_{Hprt} - Ct_{muestra})}$$

En una reacción de una eficiencia del 100%, un ciclo corresponde a 2 y Ct es el punto de inflexión, es decir, es el punto en el cual se empieza la síntesis del gen estudiado (Dheda y col., 2004). La expresión de la isoforma larga del RPRL es prácticamente tan abundante como la del gen de referencia como lo mostraron sus niveles de Ct.

Cuadro 1. Expresión relativa de GFAP.

Muestra	Ct Hprt	Ct GFAP	Expresión relativa de GFAP (UA)
Astrocitos corticales	21.22	15.73	44.32
Astrocitos corticales	22.86	16.37	90.20
Astrocitos corticales	23.32	17.96	40.93

Cuadro 1. Expresión relativa de RPRL.

Muestra	Ct Hprt	Ct RPRL largo	Expresión relativa de RPRL largo (UA)
Astrocitos corticales	21.22	26.13	0.03
Astrocitos corticales	22.86	23.7	0.56
Astrocitos corticales	23.32	23.87	0.68

La isoforma larga del RPRL activa vías de señalización involucradas en sus acciones protectoras y de supervivencia

Los resultados muestran que la expresión de la isoforma larga del RPRL en los astrocitos es menos en comparación con la expresión de una proteína constitutiva como la GFAP. Sin embargo, la presencia del mensajero del RPRL sugiere que estas células están expresando esta proteína y que puede ser a través de la cual la PRL esté ejerciendo su efecto protector en los astrocitos. En este sentido, estudios previos han demostrado que la isoforma larga del RPRL activa vías de señalización involucradas en sus acciones protectoras y de supervivencia (Ben-Jonathan y col., 2008). Asimismo, se sabe que la PRL, a través de la activación de la isoforma larga de su receptor, protege a las neuronas hipocampales, en cultivos primarios, contra el daño inducido por excitotoxicidad (Vergara-Castañeda y col, 2016), de igual manera, se ha demostrado que la prolactina es una molécula protectora de la supervivencia y función retiniana a través de la activación de su receptor (Arnold y col, 2014). Por lo tanto, es posible que en los astrocitos corticales la PRL este protegiéndolos del estrés oxidativo mediante la activación de su receptor.

5.4. Tratamientos con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y ensayo de viabilidad celular.

Primero se realizó una curva de dosis respuesta con H_2O_2 , para determinar la dosis letal (LD50), es decir, la concentración de H_2O_2 a la cual disminuye el 50% de las células viables (Figura 12). La viabilidad celular se midió mediante el ensayo de MTT y se determinó que la LD50 del H_2O_2 es de 400 μM , y a concentración de 800 μM se mueren más del 90% de los astrocitos. El ensayo de MTT se utiliza para determinar el efecto citotóxico de un agente, en este caso el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Este ensayo se basa en la reducción metabólica del bromuro del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-

deshidrogenasa en un compuesto de color azul (formazán), lo cual permite determinar la viabilidad metabólica de las células de tal manera que la cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido.

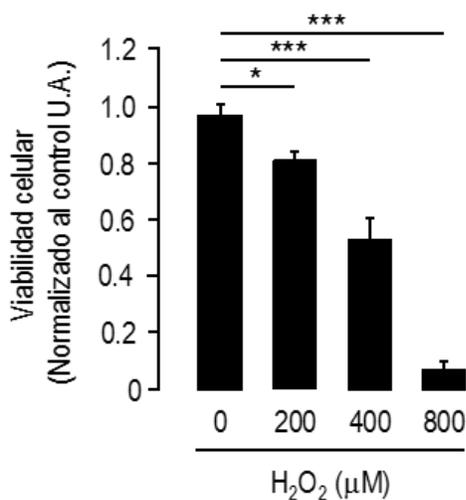


Figura 12. Medición de la viabilidad celular de los astrocitos en respuesta al tratamiento con dosis crecientes de H₂O₂. *p<0.05, ***p<0.001 vs. 0 μM H₂O₂

Posteriormente, con el fin de evaluar el efecto protector de la PRL, los astrocitos fueron tratados con dosis crecientes de PRL entre 1 y 100nM durante 24 horas, al cabo de las cuales se sometieron al daño oxidativo con H₂O₂.

Los cristales de formazán poseen un intenso color morado y se acumulan dentro de células metabólicamente activas una vez que éstas han sido incubadas con el MTT, estos cristales pueden ser observados fácilmente por microscopía de campo claro. El efecto citotóxico del tratamiento con H₂O₂ se observa claramente en la disminución de la cantidad de células con cristales de formazán y corroboramos que a una dosis de 800 μM de H₂O₂ no se observan células viables, denotado por la completa ausencia de cristales de formazán (Figura 13, D). De manera cualitativa se determinó que el tratamiento con PRL a dosis de 10nM y 100nM tiene un efecto citoprotector en respuesta al daño inducido con una dosis de 400 μM de H₂O₂, ya que se observa un mayor número de células adheridas y con cristales de formazán en su interior en

comparación con las células que no recibieron los tratamientos con PRL (Figura 13, C, G, K).

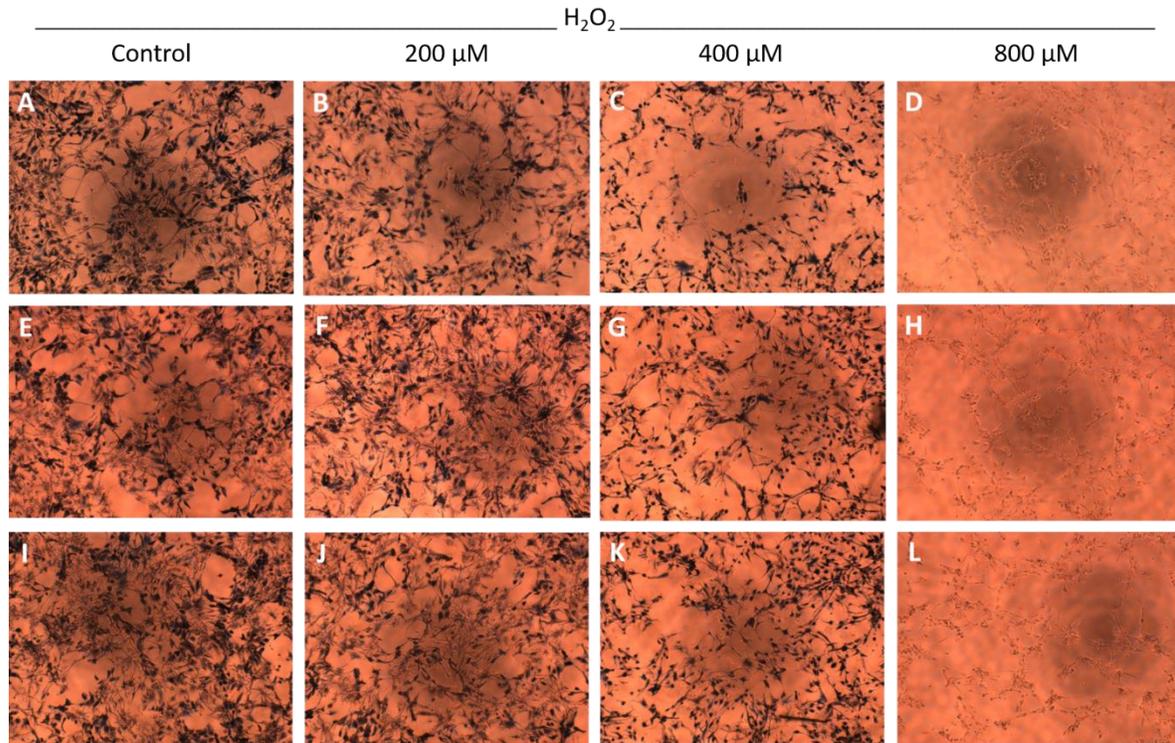


Figura 13. Efecto protector de la PRL sobre los astrocitos sometidos a distintas concentraciones de H_2O_2 . Microfotografías de campo claro de astrocitos control (A-D) y tratados con una dosis de PRL 10 nM (E-H) o de PRL 100 nM (I-L) y sometidos a dosis crecientes de H_2O_2 . Magnificación 10X.

Después, los cristales de formazán fueron disueltos y se realizó una medición de la densidad óptica con un espectrómetro, en donde se obtuvieron valores cuantitativos. Los resultados muestran que la PRL a una concentración de 1, 10, 50 y 100 nM previene de manera significativa la disminución de la viabilidad de los astrocitos ante el daño oxidativo inducido con una dosis de 400 μM de H_2O_2 (Figura 14). A una dosis de 200 μM de H_2O_2 no se indujo un daño significativo a los astrocitos por lo que no hubo diferencias en presencia del tratamiento con PRL. Estos resultados muestran por primera vez los efectos protectores de la PRL en los astrocitos corticales ante un daño oxidativo. Si bien se conocía el efecto de la PRL en la supervivencia de distintos tipos celulares tales como células inmunes (Kochendoerfer y col., 2003; Leff y col.,

1996), células epiteliales de próstata (Ahonen y col., 2002), células de la decidua (Tessier y col., 2001), células β -pancreáticas (Fujinaka y col., 2007), células de la granulosa (Perks y col., 2003), entre otras; no se conocían sus efectos antioxidantes sobre las células gliales. Nuestros resultados sugieren que el efecto protector de la PRL en los astrocitos corticales puede estar mediado por el RPRL expresado en estas células; sin embargo se desconoce la vía de señalización a través de la cual la PRL inhibiría la muerte de los astrocitos inducida por el estrés oxidativo.

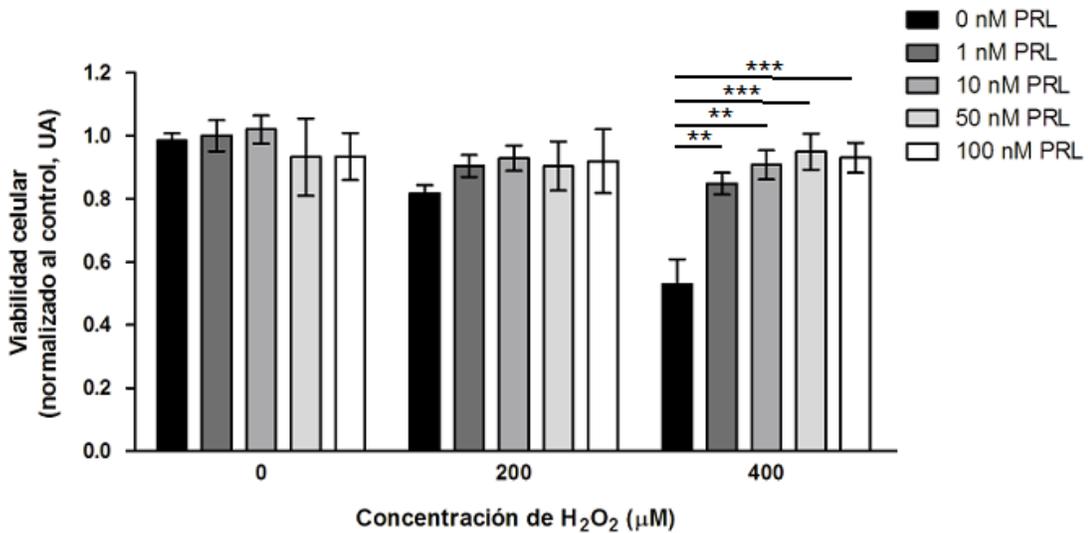


Figura 14. Efecto protector de la PRL sobre los astrocitos sometidos a un daño oxidativo con H₂O₂ y medido mediante el ensayo de MTT. **p<0.01, ***p<0.001 vs. 0 nM PRL

6. Conclusiones

En este trabajo se obtuvo y caracterizó un cultivo primario de astrocitos corticales y se mostró que es un buen modelo in vitro para el estudio de los efectos de la PRL sobre este tipo celular, ya que el cultivo de astrocitos es lo suficientemente puro y se encontró que expresan la isoforma larga del receptor de la PRL.

Los hallazgos obtenidos demuestran el efecto protector de la PRL sobre los astrocitos sometidos a un estrés oxidativo. Este trabajo mostró que desde dosis bajas de 1 y 10 nM la PRL media la protección y aumento de la viabilidad celular de los astrocitos. Esto es relevante porque los astrocitos han demostrado ser críticos para la función normal del SNC y su degeneración podría contribuir a las alteraciones relacionadas con enfermedades pro-oxidantes como la diabetes y el Alzheimer. Los resultados sugieren que la PRL ejerce su efecto protector a través de la activación de la isoforma larga de su receptor, la cual es responsable de la proliferación y supervivencia celular inducida por la PRL. Los resultados que obtuvimos en este trabajo permiten concluir que la PRL protege a los astrocitos corticales ante un daño oxidativo.

7. Referencias

Ahonen T, Harkonen P, Rui H, Nevalainen M. PRL signal transduction in the epithelial compartment of rat prostate maintained as long-term organ cultures in vitro. *Endocrinology* **2002**; 143(1), 228-238.

Arnold E, Thebault S, Baeza-Cruz G, Arredondo D, Adán N, Quintanar-Stéphano A, Condés-Lara M, Rojas-Piloni G, Binart N, Martínez de la Escalera G, Clapp C. The hormone prolactin is a novel, endogenous trophic factor able to regulate reactive glia and to limit retinal degeneration. *The Journal of Neuroscience* **2014**; 34(5):1868-1878

Ben-Jonathan N, LaPensee C, LaPensee E, What Can We Learn from Rodents about Prolactin in Humans? *Endocrine Reviews* **2008**; 29(1):1–41

Boutin J M, Jolicoeur J, Okmura H, Gagnon J, Edery M, Shirota M, Banville D, Dusanter-Fourt I, Djiane J, Kelly P. Cloning and expression of the rat prolactin receptor, a member of the receptor gene hormone/prolactin receptor gene family **1988**; 53:69-77.

Boyle-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly P. Prolactin (PRL) and its receptor: Actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in prl receptor knockout mice. *The Endocrine Society* **1998**; 19(3): 225-268.

Bustin S, Nolan T. Pitfalls of Quantitative RealTime Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction. *Journal of Biomolecular Techniques* **2004**; 15:155-166.

Butterfield A. Oxidative Stress in Alzheimer Disease: Synergy Between the Butterfield and Markesbery Laboratories. *National Institute of Health* **2011**; 13(1): 19-22.

Chazotte B. Labeling nuclear DNA using DAPI, Cold Spring Harbor, **2010**; 80-82.

Chen Y, Swanson R. Astrocytes and brain injury. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **2003**; 23:137-149.

Clevenger C, Kline J. Prolactin receptor signal transduction. *Lupus* **2001**; 10:706-718.

Dheda K, Huggett J, Bustin S, Johnson M, Rook G, Zumula A. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *BioTechniques* **2004**; 37:112-119.

Dong Y, Benveniste E. Immune function of astrocytes. *GLIA* **2001**; 36:180-190.

Eng L.F., Ghirnikar R. S, Lee Y. L. Glial Fibrillary Acidic Protein: GFAP-Thirty-One Years (1969–2000). *Neurochemical Research* **2000**; 25:1439–1451.

Freeman M, Kanyicsa B, Lerant A, Nagy G. Prolactin: Structure, Function, and Regulation of Secretion. *American Physiological Society* **2000**; 80:1523-1631.

Fujinaka Y, Takane K, Yamashita H, Vasavada R. Lactogens promote beta cell survival through JAK2/STAT5 activation and Bcl-XL upregulation. *J Biol Chem* **2007**; 282(42), 30707-30717.

Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumula A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes and Immunity* **2005**; 6:279–284.

Fox I. *Fisiología Humana*, doceava edición, Editorial Mc GrawHill, **2011**, 643-645.

Ito, J, Nagayasu Y, Ogawa T, Okihara H, Michikawa M. Biochemical properties in membrane of rat astrocytes under oxidative stress. *Brain research* **2015**; 1615: 1-11.

Kochendoerfer S, Krishnan N, Buckley D, Buckley A. Prolactin regulation of Bcl-2 family members: increased expression of bcl-xL but not mcl-1 or bad in Nb2-T cells. *J Endocrinol* **2003**; 178(2), 265-273.

Leff M, Buckley D, Krumenacker J., Reed J., Miyashita T, Buckley A. Rapid modulation of the apoptosis regulatory genes, bcl-2 and bax by prolactin in rat Nb2 lymphoma cells. *Endocrinology* **1996**; 137(12), 5456-5462

Manfredi G, Kawamata H. *Neurodegeneration. Methods and protocols*. New York: Editorial Springer, **2011**; 63-71.

Mazia D, Schatten G, Sale W. Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. *Journal of cell biology*, **1975**; 66:198-200.

Molofsky A, Krenick R, Ullian E, Tsai H, Deneen B, Richardson W, Barres B, Rowitch D. Astrocytes and disease: a neurodevelopmental perspective. *Genes & Development* **2012**; 26:891-907.

Perks C, Newcomb P, Grohmann M, Wright R, Mason H, Holly J. Prolactin acts as a potent survival factor against C2-ceramide-induced apoptosis in human granulosa cells. *Hum Reprod* **2003**; 18(12), 2672-2677.

Peuchen S, Bolaños J.P., Heales S.J.R., Almeida A, Duchen M.R., Clark J.B. Interrelationships between astrocyte function, oxidative stress and antioxidant status within the central nervous system. *Progress in Neurobiology* **1997**; 52:261-281.

Rane S, Reddy P. Janus kinases: components of multiple signaling pathways. *Oncogene* **2000**; 19:5662-5679.

Sofroniew M, Vinter H. Astrocytes: biology and pathology. *Neuropathology* **2009**; 119:7-35.

Sun D, Lye-Barthel M, Masland R, Jakobs T. Structural Remodeling of Fibrous Astrocytes after Axonal Injury. *The journal of Neuroscience*. **2010**; 30 (42):14008-14019.

Tessier C, Prigent-Tessier A, Ferguson-Gottschall S, Gu Y, Gibori G. PRL antiapoptotic effect in the rat decidua involves the PI3K/protein kinase B-mediated inhibition of caspase-3 activity. *Endocrinology* **2001**; 142(9), 4086-4094

Vergara-Castañeda E, Grattan D, Pasantes-Morales H, Pérez-Domínguez M, Cabrera-Reyes E, Morales T, Cerbón M. Prolactin mediates neuroprotection against excitotoxicity in primary cell cultures of hippocampal neurons via its receptor. *Brain Research* **2016**; 196-199.

Watson C, Burdon T. Prolactin signal transduction mechanisms in the mammary gland: the role of the Jak/Stat pathway. *Journals of Reproduction and Fertility* **1996**; 1:1-5.

Zhu D, Tan K, Zhang X, Sun A, Sun G, Lee J. Hydrogen peroxide alters membrane and cytoskeleton properties and increases intercellular connections in astrocytes. *Journal of Cell Science* **2005**; 118:3695-3703.