



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**



FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**CENTRO MULTIDISCIPLINARIO DE ESTUDIOS EN
BIOTECNOLOGIA**

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ÁREA TEMÁTICA: BIOTECNOLOGÍA PECUARIA

TESIS

**“EFECTO DE LA PROLACTINA SOBRE LA ACTIVACIÓN MICROGLIAL Y
LA EXPRESIÓN DE CITOCINAS EN CRÍAS DE RATA MACHO”**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIÓLOGA

GUADALUPE ZINZUN IXTA

ASESORA

D en C: ALEJANDRA OCHOA ZARZOSA

CO-ASESORA

D en C: MARÍA DE LA LUZ TORNER AGUILAR

MORELIA MICHOACÁN, MÉXICO. AGOSTO 2017

El presente trabajo se realizó en el Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la asesoría de la D. C. Alejandra Ochoa Zarzosa y la co-asesoría de la D. C. María de la Luz Torner Aguilar.

Proyecto con financiamiento CONACyT CB-2014-01-243919. Beca N°. 572921. N°. Proyecto

IMSS: FIS/IMSS/PROT/1386

COMITÉ TUTORAL

Dr. Joel Edmundo López Meza

Dra. Esperanza Meléndez Herrera

Dr. Sergio Gutiérrez Castellanos

DEDICATORIA

Esta tesis primeramente se la dedico a dios por haberme permitido culminar con una meta más en mi vida. A mi madre por su apoyo incondicional porque siempre está conmigo en los buenos y malos momentos que la vida me brinda y por impulsarme a continuar luchando para vencer los obstáculos sin perder la esperanza de conseguir las metas propuestas. A mi padre que a pesar de nuestra distancia física, siento que estás conmigo siempre, aunque nos faltaron muchas cosas por vivir juntos sé que este momento sería importante para ti como lo es para mí. Siempre estás en mi mente y en mi corazón te extraño mucho papá.

AGRADECIMIENTOS

A mis herman@s que siempre me han impulsado a seguir adelante a pesar de las dificultades que se me han presentado durante este trayecto.

A las Doctoras Alejandra Ochoa Zarzosa y María de la Luz Torner Aguilar por darme la oportunidad de vivir la ciencia de cerca una vez más y por todo su apoyo y paciencia que me brindaron para que esta tesis culminara de una buena manera.

A mi comité tutorial el cual está integrado por el D en C. Joel Edmundo López Meza la D en C. Esperanza Meléndez Herrera y el D en C. Sergio Gutiérrez Castellanos. Por sus observaciones y aportaciones que fueron relevantes en mi formación y en la realización de este trabajo y por darse un poco de su valioso tiempo para hacer las correcciones necesarias de esta tesis.

A mis compañeros del CIBIMI Lety, Roberto, Edel y Aldo por compartir momentos agradables durante este tiempo.

Y de manera especial a un ser maravilloso que siempre está apoyándome incondicionalmente y esa persona es mi esposo Luis Miguel Saavedra Pimentel. Eres mi inspiración y mi motivación.

ÍNDICE GENERAL

	PAG
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	2
2.1. <i>La prolactina</i>	2
2.2. <i>La prolactina en el sistema nervioso central (SNC)</i>	4
2.3. <i>La prolactina en el sistema inmune (SI)</i>	5
2.4. <i>Sistema inmune cerebral (glía)</i>	6
2.5. <i>Microglía</i>	7
2.6. <i>Prolactina y microglía</i>	8
2.7. <i>Astrocitos</i>	9
2.8. <i>El origen y desarrollo de los astrocitos</i>	10
2.9. <i>Prolactina y astrocitos</i>	11
2.10. <i>Las citocinas y su papel en el sistema nervioso central (SNC)</i>	12
2.11. <i>Interleucina 1 (IL-1)</i>	12
2.12. <i>Factor de necrosis tumoral (TNF-α)</i>	13
2.13. <i>Interleucina 6 (IL-6)</i>	14
2.14. <i>Estrés</i>	14
2.15. <i>Hipocampo</i>	15
III. ANTECEDENTES DIRECTOS	17
IV. JUSTIFICACIÓN	18
V. HIPÓTESIS	19
VI. OBJETIVOS	19
6.1. <i>General</i>	19
6.2. <i>Particulares</i>	19
7. MATERIAL Y MÉTODOS	20
7.1. <i>Animales</i>	20
7.2. <i>Inyección de prolactina</i>	20
7.3. <i>Perfusión cardíaca</i>	20
7.4. <i>Procesamiento inicial del cerebro</i>	20
7.5. <i>Grupo de animales</i>	21
7.6. <i>Diseño experimental</i>	22
7.7. <i>Colección del tejido para la extracción del ARNm y muestras de sangre</i>	23

7.8.	<i>Síntesis de cDNA</i>	23
7.9.	<i>PCR punto final</i>	24
7.10.	<i>PCR tiempo real</i>	24
7.11.	<i>Determinación de citocinas en el suero</i>	25
7.12.	<i>Inmunohistoquímica</i>	25
7.13.	<i>Análisis morfológico de las células microgliales</i>	26
7.14.	<i>Análisis morfológico de los astrocitos</i>	27
7.15.	<i>Análisis estadístico</i>	27
	VIII. RESULTADOS	28
8.1.	<i>La administración de PRL no aumentó los parámetros de estrés en el neonato</i>	28
8.2.	<i>Expresión de citocinas en el hipocampo al PN 15</i>	28
8.3.	<i>Determinación de la concentración de citocinas en la circulación sanguínea</i>	32
8.4.	<i>Análisis de las células gliales en el GD del hipocampo</i>	34
	IX. DISCUSIÓN	38
	X. CONCLUSIÓN	45
	XI. REFERENCIAS	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Secuencia de oligonucleótidos</i>	25
Tabla 2. <i>El tratamiento con PRL no afecta los parámetros de estrés en el neonato</i>	28

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Estructura secundaria de la prolactina (PRL)</i>	3
Figura 2. <i>Anatomía del hipocampo</i>	17
Figura 3. <i>Grupos de animales</i>	21
Figura 4. <i>Diseño experimental</i>	22
Figura 5. <i>Niveles de expresión relativos del ARNm de IL-1β en crías de ratas macho al PN15</i>	29
Figura 6. <i>Niveles de expresión relativos del ARNm de TNF-α en crías de ratas macho al PN15</i>	30
Figura 7. <i>Niveles de expresión relativos del ARNm de IL-6 en crías de ratas macho al PN15</i>	31
Figura 8. <i>Concentraciones circulantes de IL-1β al PN15</i>	32
Figura 9. <i>Concentraciones circulantes de TNF-α al PN 5</i>	33
Figura 10. <i>Concentraciones circulantes de IL-6 al PN15</i>	34
Figura 11. <i>Análisis de la densidad y número de las células microgliales en el hilus hipocampal de las crías e ratas macho al PN15</i>	36
Figura 12. <i>Análisis de la densidad y número de las células astrogliales en el hilus hipocampal de las crías de ratas macho al PN15</i>	37
Figura 13. <i>Diferencias en la expresión de citocinas en el hipocampo y en la secreción de citocinas a la circulación en crías tratadas con PRL y en condiciones de estrés al PN15.</i>	42
Figura 14. <i>La PRL no altera la población de células microgliales pero si induce cambios en la población de células astrogliales en el hilus hipocampal en crías de rata macho al PN15.</i>	44

ABREVIATURAS

PRL. Prolactina

PN0. Día posnatal 0

PN1. Día posnatal 1

PN14. Día posnatal 14

PN15. Día posnatal 15

VEH. Vehículo

IL- β . Interleucina 1 β

TNF- α . Factor de necrosis tumoral

IL-6. Interleucina 6

SNC. Sistema nervioso central

RPRL. Receptor de PRL

Eje HPA. Eje hipotálamo hipofisario adrenal

RTT. Receptor tipo Toll

GFAP. Proteína acida glial fibrilar

CPNE. Células precursoras neuroepiteliales

ZV. Zona ventricular

ARNm. ARN mensajero

OACM. Oclusión de la arteria cerebral media

MDMA. 3,4-metilenodioximetanfetamina

SAM. Sistema simpático adrenal medular

GD. Giro dentado

DAB. Diaminobencidina

LES. Lupus eritematoso sistémico

AR. Artritis reumatoide

EM. Esclerosis múltiple

LCR. Líquido cefalorraquídeo

LES-SNC. Lupus eritematoso sistémico con afectación en el sistema nervioso central

RESUMEN

La prolactina (PRL) en el sistema inmune ejerce efectos paracrinos y autocrinos y ha sido relacionada con algunos procesos de autoinmunidad. Actualmente es considerada no solo como una hormona, sino también como una citocina. La PRL ejerce diferentes acciones dentro del cerebro; regula la neurogénesis y modula las funciones neuroendocrinas en el adulto. Sin embargo, sus efectos cerebrales durante la vida postnatal temprana son poco conocidos. La administración diaria de PRL en animales neonatos (días posnatales [PN] 1 al 14) afecta la neurogénesis en el hipocampo disminuyéndola al PN15. Dado que la PRL tiene efectos sobre el sistema inmune, podría afectar el sistema inmune cerebral. Nuestro objetivo fue analizar el efecto de la PRL sobre las células del sistema inmune cerebral (microglía y astrocitos) y la expresión de citocinas proinflamatorias IL-1 β , TNF- α , IL-6 en el hipocampo, así como en la respuesta periférica de estas citocinas al PN15. Utilizamos ratas neonatas de la cepa Sprague Dawley, a las que se les inyectó diariamente PRL (13 mg/kg de peso corporal) o solución salina (VEH) del PN1 al 14. Las crías se sacrificaron al PN15; unos grupos se sacrificaron en condiciones basales o de estrés y se les extrajo el hipocampo. Posteriormente se analizó la expresión de citocinas IL-1 β , TNF- α , IL-6 mediante RT-PCR y ELISA en el hipocampo y en el plasma sanguíneo, respectivamente. El día PN15 se sacrificaron otros grupos de ratas VEH y PRL, se extrajeron los cerebros completos y se realizaron técnicas de inmunohistoquímica con anticuerpos específicos para analizar la microglía y los astrocitos. Nosotros encontramos que la expresión basal de las citocinas IL-1 β , e IL-6 aumentó y TNF- α no se alteró en el hipocampo pero en condiciones de estrés disminuyó significativamente la expresión de IL-1 β , TNF- α e IL-6 en los animales tratados con PRL. Por otro lado no encontramos cambios en la concentración basal de IL-1 β , TNF- α e IL-6 en el plasma de los animales tratados con PRL, pero sí observamos un aumento significativo de TNF- α en el grupo tratado con PRL en condiciones de estrés. En cuanto a la densidad y morfología de las células del sistema inmune cerebral (microglía y astrocitos), la PRL no afectó el número total de las células microgliales ni su estado de activación en el hilus hipocampal, pero si disminuyó la densidad de astrocitos en esta región. En conclusión nuestros resultados sugieren un papel inhibitorio de la PRL de la respuesta neuroinmune durante el estrés, al administrarla crónicamente.

Palabras clave: prolactina, microglía, astrocitos, citocinas, hipocampo, estrés.

Abstract

Prolactin (PRL) exerts paracrine and autocrine effects in the immune system and has been linked to several autoimmune processes. It is currently considered not only as a hormone, but also as a cytokine. PRL exerts different actions within the brain; it regulates neurogenesis and modulates neuroendocrine functions in the adult. However, PRL's brain effects during early postnatal life are poorly understood. Daily administration of PRL in neonatal animals (postnatal days [PN] 1 to 14) decreases neurogenesis in the hippocampus at PN15. Since PRL has effects on the immune system, it could affect the cerebral immune system. Our objective was to analyze the effect of PRL on the cells of the cerebral immune system (microglia and astrocytes) and the expression of proinflammatory cytokines IL-1 β , TNF- α , IL-6 in the hippocampus, as well as the peripheral response of these cytokines at PN15. We used Sprague Dawley neonatal rats, injected daily with PRL (13 mg / kg body weight) or saline (VEH) from PN1 to 14. The offspring were sacrificed at PN15; some groups were sacrificed under basal or stress conditions and the hippocampus was removed. The expression of IL-1 β , TNF- α , IL-6 cytokines was then analyzed by RT-PCR in the hippocampus and by ELISA techniques in blood plasma, respectively. On day PN15, other groups of VEH and PRL rats were sacrificed, the whole brains were removed and immunohistochemical techniques were performed with specific antibodies to analyze microglia and astrocytes. We found that basal expression of IL-1 α , and IL 6 cytokines increased and TNF- α was not altered in the hippocampus, but under stress conditions the expression of IL-1 α , TNF- α and IL-6 was significantly decreased in the PRL - treated animals. On the other hand, we did not find changes in the basal concentration of IL-1 β , TNF- α and IL-6 in the plasma from animals treated with PRL, but did observe a significant increase of TNF- α in the PRL - treated group under conditions of stress. As for the density and morphology of cells of the cerebral immune system (microglia and astrocytes), PRL did not affect the total number of microglial cells or their activation state in hippocampal hilus, but astrocyte density was decreased. In conclusion our results suggest an inhibitory role of PRL in the neuroimmune response during stress, when administered chronically.

chronicall.

I. INTRODUCCIÓN

El desarrollo cerebral está dirigido por una interacción compleja entre la disposición genética y la adaptación de las redes neuronales inducida por la experiencia. La activación anormal de hormonas y de sistemas neuroquímicos en etapas tempranas de la vida provoca una alta vulnerabilidad a una serie de trastornos fisiológicos, psiquiátricos y de comportamiento a largo plazo. Por ejemplo, se ha observado que la inyección diaria de la hormona prolactina (PRL) con una dosis de 13 mg/ kg de peso corporal en animales neonatos (días posnatales [PN] 1 al 14) afecta la neurogénesis del hilus hipocampal disminuyéndola de forma significativa al PN15, la cual se asocia con una conducta tipo depresiva y de ansiedad en etapas adultas (Lajud et al., 2013). No obstante, se desconoce el mecanismo por el cual esta hormona ejerce dichos efectos; una posibilidad es que la PRL actúe como una citocina, ya que es conocido su papel como inmunomodulador, estimulando el sistema inmune cerebral y propiciando así el daño hipocampal en el neonato.

En el hipocampo se encuentra un grupo de células especializadas comprendido por células gliales a las cuales pertenecen las células microgliales y los astrocitos, que están distribuidas en todo el cerebro y pueden ser activadas por infecciones, inflamación, factores estresantes y son capaces de secretar citocinas inflamatorias (IL-1 β , TNF- α e IL-6, entre otras). Como se mencionó, esta área es afectada por la exposición crónica a la PRL en el periodo neonatal y también se afecta de forma importante durante el estrés. El hipocampo, además de ser una estructura crucial para la integración del aprendizaje en particular de tipo espacial, participa en la regulación negativa del eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal (eje HPA) el cual se activa en respuesta al estrés.

El objetivo de este estudio fue analizar el efecto de la PRL sobre el sistema inmune cerebral. Para ello se analizaron posibles cambios en la densidad y la morfología de células microgliales y astrocíticas en el hilus hipocampal, y se comparo la expresión de citocinas en el hipocampo y la concentración periférica

de citocinas proinflamatorias en respuesta al tratamiento con PRL en condiciones basales y bajo condiciones estimuladas por estrés, en el día PN15. Esta última estrategia permitirá conocer si el sistema inmune cerebral queda sensibilizado por la administración de PRL en etapas tempranas. A continuación se expondrá un resumen de los temas relevantes al problema de investigación propuesto.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. *La Prolactina*

La PRL es una hormona de naturaleza proteica globular de una sola cadena con 197-199 aminoácidos (aa) según la especie y tres puentes disulfuro intramoleculares (Cys4-Cys11, Cys58-Cys174 y Cys191-Cys199) (Blanco et al., 2012). El 50% de los aminoácidos en la cadena conforman una estructura secundaria de doble-hélice (**Figura 1**). La principal forma de PRL que se ha encontrado en la glándula pituitaria y suero tiene un peso molecular de 23 kDa, se han descrito distintas isoformas que resultan de modificaciones post-transcripcionales, post-traduccionales o modificaciones químicas en su cadena de aminoácidos: la glucosilada (25 kDa), que presenta una menor actividad biológica, la macroprolactina (big-big PRL >100 kDa) y la big PRL (40-60 kDa), dos isoformas de alto peso molecular que surgen de la dimerización o polimerización de la misma o de la unión con otras proteínas, como anticuerpos (150 kDa) y la de 16 kDa (potente factor anti angiogénico), producto de la degradación enzimática de la PRL de 23 kDa. (Bole et al., 1998; Nicoll et al., 1986; Brue et al., 1992; Fahie et al., 2005; Leaños et al., 1998; Freeman et al., 2000; Ferrara et al., 1991).

Por sus características genéticas, estructurales y funcionales, la PRL pertenece a la misma familia que la hormona de crecimiento y el lactógeno placentario, todos los cuales provienen de un mismo gen ancestral. El gen que codifica para PRL se localiza en el brazo corto del cromosoma 6 y está compuesto por cinco exones y cuatro intrones con un tamaño aproximado de 10 kb (Bole et al., 1998; Troung et al., 1984; Bazan et al., 1989). La expresión de este gen se ha identificado en varias regiones del cerebro, miometrio, timo, bazo, médula ósea, células

epiteliales mamarias, endometrio, en algunas líneas de células tumorales, en células del sistema inmunológico (linfocitos T y B), en fibroblastos y en glándulas sudoríparas (Maslar et al., 1979; Bole et al., 1998; Montgomery 2001; DiMattia et al., 1988). La PRL ejerce distintas acciones, y esto puede depender tanto de su polimorfismo estructural como de la amplia distribución de su receptor (Mendez et al., 2005).

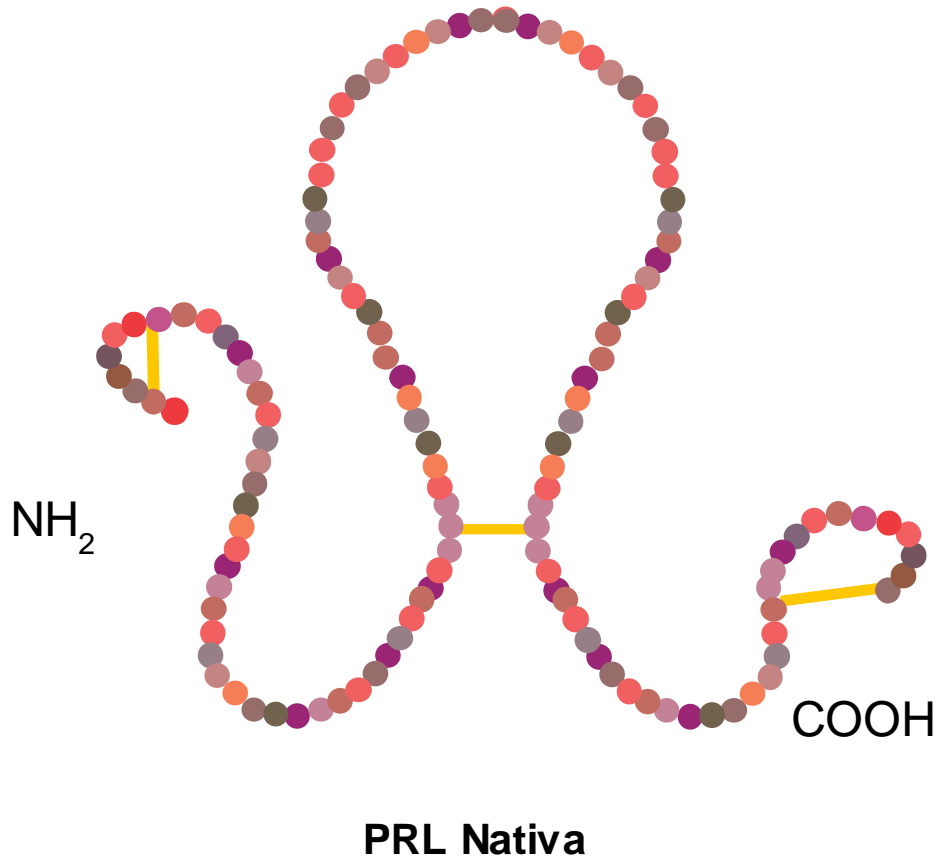


Figura 1. Estructura secundaria de la prolactina (PRL). La prolactina es una hormona de naturaleza proteica globular de una sola cadena con 197-199 aminoácidos (aa) según la especie y tres puentes disulfuro intramoleculares (Cys4-Cys11, Cys58-Cys174 y Cys191-Cys199). Tomada de (Blanco et al., 2012).

2.2. *Prolactina en el sistema nervioso central*

La PRL es sintetizada principalmente por las células lactotropas de la glándula pituitaria anterior y es considerada como una hormona pleiotrópica. Si bien su acción reguladora de la secreción láctea en las glándulas mamarias es la más conocida, la PRL ejerce diferentes acciones en todo el organismo, incluido el cerebro. Los receptores de PRL (receptor largo y receptor corto, (RPRL)) son del tipo de tirosina cinasas y pertenecen a la clase 1 de la familia de receptores de citocinas (Freeman et al., 2000).

La vía de homodimerización del RPRL ocurre a través de dos sitios diferentes sobre la PRL que conducen a la activación posterior de cinasas asociadas que fosforilan las dianas río-abajo. La mayoría de los estudios de señalización se han centrado en la vía de JAK-STAT, que es utilizada por todos los receptores de citocinas hematopoyéticas. La unión de PRL a su receptor evoca predominantemente la activación de JAK-2 que conduce a la fosforilación de tirosina del RPRL, permitiendo el reclutamiento de factores de transcripción citoplasmáticos I (STAT-1). La activación de JAK-2 por PRL activa principalmente STAT-5 y en menor medida STAT-1 y -3. El uso común de la vía JAK-STAT por PRL, GH y otras citocinas probablemente conduce a la redundancia en sus acciones (Chesnokova & Melmed., 2002).

La PRL actúa a través de sus receptores localizados en el SNC como es en el telencéfalo, corteza cerebral, hipocampo, amígdala, septum, (Díaz et al., 1989), putamen caudado (Emanuele et al.,1987; Harlan et al., 1989), tallo cerebral (Díaz et al., 1989; Harlan et al .,1989), cerebelo (Seroogy et al., 1988), médula espinal (Harlan et al., 1989; Siaud et al., 1989) y son particularmente abundantes en los plexos coroideos. Se ha descrito que la densidad de RPRL es muy abundante en todas las partes del organismo incluyendo el cerebro en la etapa fetal y es mucho menor en el adulto (Thompson, 1982).

Recientemente se describió que la PRL actúa como neuropéptido para regular la neurogénesis hipocampal y de la zona subventricular, las dos zonas germinales del cerebro en la etapa adulta. Estudios previos mostraron que esta

hormona actúa como neuropéptido liberándose activamente en el hipotálamo en respuesta al estrés (Torner et al 2004). Otras acciones incluyen la regulación de la conducta maternal, la modulación de la ansiedad y la inhibición del eje HPA (Freeman., 2005, Torner & Neumann, 2002).

Existen estudios que demuestran que la PRL actúa como neuroprotector ya que previene la disminución de la neurogénesis hipocampal provocada por el estrés en el adulto (Torner et al., 2009). Asimismo, estudios en ratas hembra mostraron que la PRL protege al hipocampo contra el daño evocado por la administración de ácido kaínico (Tejadilla et al., 2010). En contraste, en etapas tempranas de la vida se observó que el efecto de la PRL es el opuesto ya que la administración diaria de la hormona en los primeros 14 días PN disminuye la neurogénesis hipocampal de forma inmediata posterior a su administración PN15 (Lajud et al., 2013).

2.3. *La prolactina en el sistema inmune*

La PRL se considera como una citocina debido a que posee la capacidad de ejercer diversas acciones relevantes en la función del sistema inmune. Las citocinas comparten varias características, entre ellas participan en la respuesta inmune, son sintetizadas por múltiples tipos celulares, son pleiotrópicas, presentan efectos redundantes y actúan en conjunto con otras citocinas para producir efectos de adición, sinergismo o antagonizar mutuamente sus acciones. La PRL tiene una gran parte de estas características (Naylor et al., 2003; Van et al., 2004). Como ya se mencionó, sus receptores pertenecen a la gran familia de receptores a citocinas tipo I. Estos receptores han sido descritos en células B, T, monocitos y células NK (Dardenne et al., 1994). La PRL y su receptor son moduladores importantes de la respuesta inmune ya que la hormona estimula la proliferación de linfocitos T e influye en la activación y secreción de citocinas por las mismas células. Se ha considerado que aun cuando la respuesta inmune no depende estrictamente de la PRL, ésta tiene el potencial de afectar al fenotipo y funciones de las células de ambos brazos del sistema inmune (respuesta innata y respuesta adaptativa).

En el SNC estudios *in vivo* mostraron que la PRL estimula la proliferación de células gliales (astrocitos) y la expresión de citocinas como el TNF- α en respuesta a un daño inducido previamente al tejido cerebral (DeVito et al., 1995). También se observó la estimulación *in vitro* de la mitogénesis por PRL en cultivos de astrocitos (DeVito et al., 1992), junto con un aumento de la expresión de IL-1 α y de TNF- α (DeVito et al., 1995). En respuesta al daño por isquemia cerebral, la PRL activa a la microglía, la cual se observa inmunorreactiva con anticuerpos anti-PRL y estimula la proliferación glial (Mödersheim et al., 2007). Recientemente se demostró que la PRL puede modular las interacciones entre neuronas y células gliales en la retina (Arnold et al., 2014). Este estudio demostró que concentraciones elevadas de PRL (hiperprolactinemia) resultaron en la protección de la retina contra el daño evocado por exposición a la luz brillante. Este efecto fue mediado por un aumento de los RPRL en los astrocitos presentes en la retina, y una disminución de la gliosis reactiva. Además, los ratones deficientes del RPRL mostraron disfunción fotoresponsiva y gliosis los cuales se correlacionaban con niveles bajos de bFGF, GDNF y BDNF retinales (Arnold et al., 2014).

2.4. Sistema inmune cerebral (glía)

El SNC está constituido por dos tipos de células: las neuronas y las células gliales. Las células gliales se clasifican en: astrocitos, oligodendrocitos y microglía. Los astrocitos tienen forma de estrella, proporcionan soporte físico a las neuronas, limpian los desechos del cerebro, producen sustancias químicas que las neuronas necesitan para llevar a cabo sus funciones, ayudan a controlar la composición química del fluido que rodea a las neuronas captando o liberando activamente sustancias cuya concentración debe mantenerse dentro de niveles críticos (Vezzani, 2005; Vezzani, 2008). Algunas de las funciones de los oligodendrocitos son: proporcionar soporte a los axones y producir la vaina de mielina que los aísla entre sí. Por su parte, la microglía constituye el sistema inmune del cerebro por su capacidad de respuesta ante la invasión de microorganismos y la eliminación de los restos celulares (Aloisi, 2001; Hickey, 2011).

Durante mucho tiempo las células gliales han sido consideradas un simple soporte de la estructura del tejido nervioso, hoy en día se les atribuye una participación más activa en la modulación y transmisión de las señales nerviosas (Kirchhoff et al., 2001). En condiciones fisiológicas las células gliales desempeñan funciones tales como la producción de factores neurotróficos, regulación de la homeostasis del entorno neuronal, mantenimiento de la capacidad de la señalización de las células nerviosas y la preservación de la sinapsis. La glía posee la capacidad de responder experimentando cambios morfológicos y funcionales de manera gradual y estereotípica, acompañados por la producción de citocinas proinflamatorias, lo que se denomina como "gliosis reactiva o glía activada" (Raivich et al., 1999). No toda la glía responde de la misma manera ante un daño neuronal, los astrocitos y microglía son las dos mayores poblaciones de células gliales reactivas.

2.5. *Microglía*

La microglía contiene células con capacidad fagocítica de origen hematopoyético que reside en el SNC. Cumple funciones relacionadas con la respuesta inmune en una gran variedad de procesos neuroinflamatorios y es rápidamente activada en numerosos desafíos que afectan al SNC, mostrando gran plasticidad funcional (Lund et al., 2006). La microglía activada posee una gran variedad de receptores de reconocimiento de la familia de los receptores tipo Toll (RTT) para detectar microbios intrusos (Jack et al., 2005). Reportes recientes establecen una relación inversa entre la activación de la microglía y la neurogénesis (Ekdahl et al., 2003). La microglía una vez activada es capaz de iniciar una cascada proinflamatoria que resulta en la liberación de moléculas citotóxicas como citocinas, proteínas del complemento, proteasas y otras proteínas de fase aguda. La microglía libera citocinas tales como: IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, IL-16, IL-23, TNF- α , TGF- β ; quimiocinas: CC (CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α , CL4/MIP-1 β , CCL5/RANTES); CXC (CXCL8/IL-8, CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CXCL12/SDF-1 α); CX3C (CX3CL1/fractaline); metaloproteinasas de matriz: MMP-2, MMP-3, MMP-9; eicosanoides: PGD2, leucotrieno C4, catepsinas B y L, y factores del complemento: C1, C3, C4 (Bryan et al., 2004);

provocando además, la quimiotaxis de astrocitos (Glass et al 2010). La microglía activada libera además, cantidades excesivas de glutamato, induciendo excitotoxicidad y con ello a la neurodegeneración (Suzumura et al., 2009). Existen algunas diferencias estructurales entre la microglía y las células fagocíticas del sistema inmune, ya que la microglía se caracteriza por tener un soma pequeño y numerosas ramificaciones, mientras que los monocitos/macrófagos en reposo son ovoides. Sin embargo, esta observación resulta poco útil porque después de la activación, la microglía acorta sus procesos celulares y engrosa su soma, asumiendo así una morfología similar a los macrófagos periféricos (Simard et al., 2006).

Existen dos teorías acerca de cómo se origina la microglía, la primera se basa en que la microglía se originó a partir del subependimal adyacente a los ventrículos laterales, de los pericitos asociados a los vasos sanguíneos o de los macrófagos del saco vitelino (Lewis, 1968), (Mori and Leblond, 1969; Barón y Gallego, 1972) (Alliot et al., 1999). Por otro lado, se considera que la microglía, al igual que los fagocitos mononucleares que se encuentran en los tejidos periféricos, derivó de monocitos sanguíneos circulantes los cuales provienen de la médula ósea (MO) (Chan et al., 2007). Existen pruebas que se oponen a la teoría monocítica y apoyan a la teoría del saco vitelino. Esta teoría fue propuesta en 1999 y plantea que las microglías se derivan de células progenitoras mieloides primitivas del saco vitelino (Ginhoux et al., 2010; Schulz et al., 2012; Kierdorf et al., 2013). Los macrófagos derivados del saco vitelino invaden el cerebro en etapas embrionarias tempranas y finalmente representan la gran mayoría de microglía en el adulto. Esto ya se ha demostrado en el pez cebra, aves, roedores y humanos (Herbomel et al., 2001; Cuadros et al., 1993; Ashwell et al., 1989; Sorokin et al., 1992; Santos et al., 2008; Rigato et al., 2011; Swinnen et al., 2013; Rezaie et al., 1999; Rezaie, 2003; Monier et al., 2007; Verney et al., 2010).

2.6. *Prolactina y microglía*

Diversos estudios han sugerido que la microglía activada por lesiones que regulan la respuesta neuroinflamatoria, funciona como macrófago mediante la

eliminación de desechos celulares del sitio de la lesión (Schilling et al., 2005). Por otro lado, se ha observado la inmunoreactividad positiva a PRL en la microglía activada, la cual presenta una morfología ameboide con procesos cortos. Sin embargo, no se ha detectado la presencia del receptor de prolactina en estas células reactivas, lo que sugiere que estas son una fuente de PRL, en lugar de un blanco de la misma. Sin embargo, se requieren más estudios para aclarar este punto.

2.7. *Astrocitos*

Los astrocitos son las células gliales más abundantes (constituyen el 25% del volumen cerebral) (Tower et al., 1973). Estos se clasifican en 2 grandes grupos: protoplásmicos y fibrosos. Los astrocitos protoplásmicos se encuentran en la sustancia gris y sus procesos envuelven una gran cantidad de sinapsis, alrededor de 100, 000 por astrocito (Ogata et al., 2002). Presentan una morfología globosa, con varias ramas principales que dan lugar a procesos muy ramificados con distribución uniforme. Los astrocitos fibrosos se localizan en la sustancia blanca y contactan con los nodos de Ranvier y con los vasos sanguíneos. Su ramificación es menor y sus procesos más alargados, a modo de fibras. El término astrogliosis reactiva hace referencia a una serie de cambios en los astrocitos los cuales ocurren a nivel celular, molecular y funcional como respuesta a daños y enfermedades del SNC. Los cambios que sufren los astrocitos reactivos varían según el grado de severidad de la lesión, son regulados por moléculas de señalización inter e intracelular y modifican la actividad astrocitaria, ya sea mediante la pérdida de funciones, lo que puede afectar a las células circundantes (Sofroniew et al., 2009). De acuerdo con esta definición, la astrogliosis reactiva no es un «todo o nada», sino un continuo de cambios progresivos. Así, se pueden distinguir 3 grados de severidad (Sofroniew et al., 2010): 1) Astrogliosis reactiva leve o moderada, en este nivel aumenta la expresión de la proteína ácida glial fibrilar (GFAP) por los astrocitos y hay hipertrofia tanto del cuerpo celular como de los procesos astrocitarios. Esto se produce dentro del propio dominio del astrocito que no se sobrepone con astrocitos vecinos, hay poca proliferación celular. Este

grado de astrogliosis reactiva es reversible y se presenta en traumatismos leves y no penetrantes, en caso de activación difusa de la inmunidad innata y en áreas distantes de una lesión. 2) Astrogliosis reactiva severa difusa; ésta se presenta en caso de lesiones focales graves, infecciones o áreas con neurodegeneración crónica, la sobreexpresión de la GFAP y la hipertrofia del cuerpo celular y los procesos son más pronunciados. Además, hay sobreposición de astrocitos y aumento de su proliferación. Estos cambios pueden conducir a una reorganización tisular duradera. 3) Astrogliosis reactiva severa con formación de cicatriz glial compacta; en este caso, además de los cambios anteriores, se forma la cicatriz glial, que inhibe la regeneración axonal y la migración celular (Silver et al., 2004), pero también protege frente a la llegada de células inflamatorias y agentes infecciosos (Bush et al., 1999; Bush et al., 1999). Los desencadenantes son lesiones graves del SNC penetrantes y/o continuas, infecciones invasivas y abscesos, neurodegeneración crónica e incluso infecciones sistémicas. La cicatriz glial supone reorganización tisular y cambios estructurales persistentes, que permanecen incluso cuando ha desaparecido el agente desencadenante (Bush et al., 1999; Bush et al., 1999).

2.8. El origen y desarrollo de los astrocitos

Los astrocitos se originan del linaje neural (Skoff, 1990; Noctor et al., 2004, 2008). En los ratones, la astrogénesis comienza en la edad embrionaria 18 (E18) y dura aproximadamente hasta el día PN7. La astrogénesis es similar a la neurogénesis del cerebro adulto (Zhao et al., 2007). Por ejemplo un grupo homogéneo de precursores neurales (NPCs) en el tubo embrionario, también denominados células precursoras neuroepiteliales (CPNE), se transforman en glía radial, es decir, células madre neurales pluripotentes localizadas en la zona ventricular (ZV), que generan secuencialmente neuronas y macroglía (Malatesta et al., 2000, 2003; Sauvageot & Stiles., 2002; Kriegstein & Noctor., 2004; Miller & Gauthier., 2007). Cuando la neurogénesis llega a su fin, la glía radial puede diferenciarse directamente en astrocitos o producir células intermedias que se convierten en astrocitos. Una vez producidos, los astrocitos en desarrollo se

diferencian en maduros, un proceso caracterizado por cambios en la morfología, la conectividad y las propiedades electrofisiológicas (Yang et al., 2013). La comprensión de los pasos precisos de la maduración de las células progenitoras en un grupo distinto de astrocitos es incompleta (Molofsky & Deneen., 2015). Algunas de las dificultades involucradas se enlistan enseguida. (1) la falta de marcadores confiables y específicos para definir células progenitoras y astrócitos inmaduros durante sus etapas de desarrollo. (2) la dificultad para manipular específicamente genes que sólo afectan a la astrogénesis y no a la neurogénesis, debido al hecho de que los promotores de astrocitos hasta ahora identificados también son activos en células madre neurales (Chaboub & Deneen., 2012; Molofsky & Deneen., 2015). Por otro lado mencionan el hecho de que los astrocitos se sigan dividiendo en la etapa adulta como un tercer factor limitante para estudiar el desarrollo de los mismos (Chaboub & Deneen, 2012).

2.9. *Prolactina y astrocitos*

Existen varios estudios tanto *in vivo* como *in vitro* que han demostrado el efecto de la PRL sobre los astrocitos. Se sabe que la PRL tiene efecto mitogénico sobre la astrogía, por otra parte estudios previos han observado la proliferación de astrocitos después del tratamiento con PRL *in vitro* y en el hipotálamo tras una lesión (DeVito et al., 1992, 1993, 1995b; Mangoura et al., 2000). En trabajos anteriores demuestran la expresión del ARNm del RPRL en cultivos de astrocitos, y también observaron que la glía presenta mayor expresión el ARNm de este receptor que las neuronas, la función específica de la PRL en los eventos astrocíticos aún está por establecerse, pero puede estar asociada con una inmunorregulación dentro del cerebro lesionado (DeVito et al. 1995a, b), ya que el tratamiento con PRL mostró un aumento en la expresión de factores inmunoreguladores por los astrocitos incluyendo el TNF- α tanto *in vitro* como *in vivo*, en el hipotálamo lesionado. Dado que los astrocitos son células inmunocompetentes (Chung et al., 1991) y que la PRL es un inmunoregulador en la periferia (Draca, 1995; Bole-Feysot et al., 1998; Goffin et al., 1998), la PRL

podría estar involucrada en la regulación de la expresión de citocinas astrocíticas en el SNC lesionado (DeVito et al., 1995b).

2.10. Las citocinas y su papel en el sistema nervioso central

Las citocinas son un grupo de proteínas y glucoproteínas producidas por diversos tipos celulares que actúan fundamentalmente como reguladores de las respuestas inmunitaria e inflamatoria. Asimismo, intervienen como factores de crecimiento de distintas células, entre las cuales destacan las células hematopoyéticas. Entre las citocinas proinflamatorias se encuentran las quimocinas, grupo de péptidos de bajo peso molecular entre los que se encuentra la IL-8, que están implicados en la quimiotaxis y en la activación de los distintos tipos celulares que participan en la inflamación. En el cerebro existen muchos tipos celulares capaces de secretar citocinas como la microglía y los astrocitos. Las citocinas circulantes están involucradas en la inflamación cerebral y los monocitos, linfocitos T, células NK y polimorfonucleares pueden contribuir a la inflamación del SNC. Las principales citocinas que actúan en el proceso de inflamación son: interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), TNF- α , etc. (Cuenca et al., 2010).

2.11. Interleucina-1 (IL-1)

La IL-1 es primariamente producida por macrófagos y monocitos, también por células no inmunológicas, tales como fibroblastos y células endoteliales activadas durante la lesión celular, la infección, el estrés, la invasión y la inflamación. Existen dos tipos conocidos: IL-1 α y IL-1 β , con 31 a 33 kDa, respectivamente. Estas actúan sobre los mismos receptores, IL-1RI y IL-1RII. Al IL-1RI se le considera el receptor activo, mientras que el IL-1RII no posee una molécula de transducción y es funcionalmente inactivo. La IL-1 puede ser secretada en respuesta al TNF- α . Normalmente la IL-1 es sintetizada en el SNC por la microglía, astrocitos, neuronas y células endoteliales en niveles bajos. Después de un proceso isquémico se ha observado que aumenta la expresión del ARNm de IL-1 β (Buttini et al., 1994), conduciendo a un aumento de la proteína

horas después. En modelos animales se observó que a los pocos minutos después de una obstrucción cerebral transitoria aumentaron los niveles del ARNm de la IL-1 β durante la reperfusión temprana y también en las 6 a 24 h posteriores, sugiriendo una expresión bifásica de la IL-1 β (Haqqani et al., 2005). Se ha correlacionado el aumento de los niveles de IL-1 derivados de la isquemia con el aumento del volumen del infarto. Los niveles elevados de IL-1 se han asociado a un mal pronóstico en pacientes con infarto cerebral. Una explicación posible es que la IL-1 es un fuerte pirógeno que facilita el aumento de la temperatura corporal (Azzimondi et al., 1995).

Otro estudio ha mostrado que la inyección intraventricular de IL-1 β recombinante después de la oclusión de la arteria cerebral media (OACM) incrementa la formación de edema cerebral, el tamaño de la zona infartada y la infiltración de neutrófilos en ratas (Yamasaki et al., 1995). Es controvertido el rol neurotóxico de la IL-1, dado que la administración de IL-1 en un cerebro sano no causa ningún daño, y cuando se utiliza en cultivos celulares tampoco induce su muerte. Otros estudios proclaman cierto efecto neuroprotector de esta citocina, dado que cuando se adiciona IL-1 a cultivos celulares de neuronas corticales de ratones produce una atenuación en la neurotoxicidad asociada a la 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA).

2.12. *Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)*

El TNF- α es una proteína proinflamatoria que es liberada por células del sistema inmune. En el SNC, esta citocina constituye el principal mediador de inflamación, que induce una cascada de eventos celulares que culminan con la muerte neuronal. El TNF- α posee una variedad de funciones implicadas en la defensa inmunitaria, homeostasis celular y protección frente a varios. Barone et al. (1997) han demostrado que después de una OACM la inducción del TNF- α se asocia con el aumento del déficit neurológico y el incremento del tamaño del infarto cerebral (Buttini et al., 1996; Barone et al., 1997). La concentración del TNF- α en el líquido cefalorraquídeo aumenta en pacientes con infarto cerebral agudo (Vila et al., 2000). Las concentraciones elevadas de TNF- α plasmáticas en

pacientes con infartos lacunares se han asociado con deterioro neurológico (Sriram et al 2007; Liu et al., 1994).

2.13. *Interleucina 6 (IL-6)*

La IL-6 es una glucoproteína secretada por macrófagos, células T, células endoteliales y fibroblastos. Su liberación es inducida por IL-1 y aumenta en respuesta al TNF- α . Su función es activar la formación de inmunoglobulinas por parte de los linfocitos B. La IL-6 puede contribuir al daño provocado por la inflamación en el cerebro, y está implicada en la regulación de la apoptosis neuronal (Herrmann et al., 2003). Diversos estudios sugieren que la IL-6 está sobrerregulada después de la isquemia cerebral (Wang et al., 1994) postulándose que tiene efectos perjudiciales en la misma. En consecuencia, los niveles elevados de IL-6 podrían ser un buen indicador de deterioro neurológico temprano (Vila et al., 2000), ya que los niveles elevados de IL-6 se asocian a un mayor volumen infartado (Castillo et al., 2004) y a un mal pronóstico (Smith et al., 2004). Así se ha demostrado una asociación entre los niveles plasmáticos de IL-6 y el deterioro neurológico precoz, que es independiente del tamaño inicial, la topografía o el mecanismo del infarto (Vila et al., 2000). En otro estudio se encontró que los pacientes cuyos niveles de IL-6 son mayores a 5 pg/ml tienen una probabilidad 25 veces mayor de desarrollar un nuevo evento vascular, y una probabilidad 19 veces mayor de fallecer por un problema de origen vascular. Estudios previos han mostrado los efectos de IL-6 en el SNC, por ejemplo puede ocasionar astrocitosis reactiva y daño neural (Campbell et al., 1993). Otro estudio reveló que altas concentraciones de IL-6 se relaciona con déficit de aprendizaje (Heyser et al., 1997).

2.14. *Estrés*

Los primeros estudios sobre estrés fueron hechos por Walter Cannon y Hans Selye en la década de 1930. Cannon fue el primero en utilizar el término “pelea o huida” (Fight or flight) como una respuesta fisiológica ante estresores agudos. El término estrés fue acuñado por Hans Selye, quien examinó el efecto

del estrés crónico sobre la fisiología de los organismos, y lo definió como una respuesta inespecífica del cuerpo ante el estresor continuo que conduce a un estado patológico e incluso puede llevar a la muerte del individuo (Handa & Weiser, 2013). En la actualidad hay diversas definiciones de estrés. Selye define al estrés como la respuesta no específica del organismo a cualquier demanda del exterior; esta respuesta es de tipo conductual (ira, huida, pelea, etc.) y de tipo fisiológico activación del sistema simpático adrenal medular (SAM), del eje HPA; esto se ha observado en distintos organismos, desde ratas hasta humanos. Dependiendo de la duración del estresor, este puede ser clasificado como agudo o crónico.

Diversos estudios indican que la exposición al estrés ya sea agudo o crónico altera la sobrevivencia y función glial. Se ha demostrado que un estresor en edad temprana, como la separación materna SM induce cambios en el número de astrocitos en algunas zonas del SNC en la edad adulta. Esto podría ser debido a que el estresor genera una alteración del microambiente celular afectando la sobrevivencia y función de las células gliales (Bautista & Dueñas, 2012).

2.15. *Hipocampo*

Es una estructura fundamental para el almacenamiento de la memoria explícita, lo cual se fundamenta en las características de plasticidad que presentan sus neuronas. En el ser humano y roedores el sistema hipocampal se asocia a la llamada memoria episódica y a la memoria espacial. El hipocampo deriva de la región medial del telencéfalo, forma parte del sistema límbico y tiene un papel importante en la adquisición del aprendizaje espacial y la consolidación de la memoria a largo y corto plazo. Anatómicamente, está organizado en el cuerno de Amón (hipocampo propio) y el giro dentado (separados por la fisura hipocampal); el complejo subicular, formado por el *presubiculum*, el *subiculum* y el *parasubiculum*; y la corteza entorrinal (Amaral et al., 1989; Lavenex et al., 2007; Kivisaari et al., 2013). El cuerno de Amón está dividido en tres áreas: CA1, CA2 y CA3 (Figura 2).

La mayor entrada de fibras en el hipocampo proviene de la corteza parahipocampal que es la principal vía de entrada de aferencias neocorticales de procesamiento provenientes de distintas áreas dorsales, como la corteza parietal posterior, la corteza retrosplenial, la corteza prefrontal dorsolateral o de la parte dorsal del surco temporal superior formando estructuras estrechamente asociadas en la codificación de la localización espacial de los estímulos (Witter et al., 2000; Lavenex et al., 2004). Estas aferencias son distribuidas hacia la corteza entorrinal. Las células de las capas II y III de esta corteza envían sus axones hasta el giro dentado y el hipocampo a través de la vía perforante, atravesando la capa de células piramidales del *subiculum* (Witter et al., 199; Khalaf et al., 2013). Por otra parte, las neuronas piramidales de la región CA3 proyectan sus axones hacia las dendritas de las neuronas piramidales de la región CA1 mediante los colaterales de Schaffer. Así mismo, los axones provenientes de la región CA3 proyectan hacia todo el hipocampo mediante proyecciones comisurales, entre hemisferios y/o asociativas, en el mismo hemisferio (Laurberg et al., 1981; Ishizuka et al., 1990; Frotscher et al., 1991). Mientras que, las neuronas granulares del giro dentado proyectan sus axones o fibras musgosas hacia las dendritas proximales de las neuronas piramidales de la región CA3, atravesando el hilus (Chicurel et al., 1999; Suzuki et al., 2003). El circuito del procesamiento de la información de la memoria declarativa es el llamado circuito trisináptico (Kim et al., 2012). Este circuito inicia en la vía perforante de la corteza entorrinal. Primeramente, las neuronas de la corteza entorrinal envían sus proyecciones hacia las células granulares del giro dentado. En seguida, estas células proyectan sus axones hacia las neuronas piramidales de la región CA3, las cuales envían sus axones hasta las neuronas piramidales de la región CA1 mediante los colaterales de Schaffer (Figura 2). La información procesada mediante este circuito trisináptico permite relacionar diferentes aferencias sensoriales pertenecientes a diversos estímulos gracias a que las células piramidales del hipocampo tienen un alto grado de interconexión, facilitando las relaciones entre las diferentes entradas de información (Zhang et al., 2013).

IV. JUSTIFICACIÓN

El aumento anormal de la PRL durante el periodo postnatal temprano podría asociarse a efectos negativos sobre la ontogenia del sistema nervioso central. Como ejemplo, durante las convulsiones del infante, la PRL es la hormona que se eleva de forma marcada, por lo que incluso se le considera un marcador de crisis convulsivas (Morales et al., 1995). Las concentraciones séricas de PRL correlacionan con la severidad de los daños al cerebro evaluadas mediante encefalografía. En estudios previos de nuestro laboratorio se demostró que la PRL disminuye la neurogénesis del hipocampo al administrarse en los primeros días de vida (Lajud et al., 2013); sin embargo, se desconoce cuál es el mecanismo de acción que media dicho daño. Debido a que la PRL tiene funciones como citocina, y sus receptores están presentes en células gliales, se propone que parte del mecanismo podría deberse a la estimulación del sistema inmune cerebral por esta hormona. Por otro lado se ha documentado que el estrés por SM activa el sistema inmune cerebral en etapas tempranas de la vida e incrementa la expresión de citocinas proinflamatorias en el hipocampo (Roque et al., 2015).

V. HIPÓTESIS

La PRL activa a las células del sistema inmune cerebral (microglía y astrocitos) en el hipocampo, estimulando la expresión de citocinas proinflamatorias en este tejido y en la circulación periférica de crías de ratas macho al PN15 en respuesta al estrés.

VI. OBJETIVOS

6.1. General

Analizar el efecto de la PRL sobre la activación de las células del sistema inmune cerebral (microglía y astrocitos) en el hipocampo y sobre la expresión de citocinas proinflamatorias en este tejido y en la circulación periférica de crías de rata macho al PN 15 en respuesta al estrés.

6.2. Particulares

- 1.- Determinar el efecto de la PRL sobre la expresión de citocinas proinflamatorias (IL-1 β , TNF- α e IL-6) en el hipocampo de crías de rata macho al PN15 en respuesta al estrés.
- 2.- Analizar el efecto de la PRL sobre las concentraciones circulantes de citocinas proinflamatorias (IL-1 β , TNF- α e IL-6) en crías de rata macho al PN15 en respuesta al estrés.
- 3.- Evaluar el efecto de la PRL sobre el número y la morfología de las células del sistema inmune cerebral (microglía y astrocitos) en el hilus del giro dentado (GD) del hipocampo en crías de rata macho al PN15.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1. *Animales*

Se utilizaron crías de rata macho del día PN15 de la cepa Sprague-Dawley, los cuales se mantuvieron bajo ciclo de luz-obscuridad (12:12), temperatura (22-26 °C), humedad 50-60 %, con agua y alimento *ad libitum*. Cada camada se ajustó a 8 crías, 4 hembras y 4 machos. Para este estudio solo se utilizaron los machos. El día del parto se consideró como el día 0 posparto, contándose a partir de éste los días posnatales.

7.2. *Inyección de prolactina*

Las crías se inyectaron de forma intraperitoneal con PRL ovina con una dosis de (13 mg/kg de peso corporal) de los días PN1 al PN14. Al grupo denominado “control vehículo” se le inyectó solución salina durante el mismo periodo.

7.3. *Perfusión cardíaca*

Los animales se sacrificaron al día PN 15 con una dosis letal de pentobarbital sódico (45 mg/kg de peso corporal), y se perfundieron por vía cardíaca con 100 ml de solución salina (NaCl 0.9%) y 100 ml de solución fijadora (paraformaldehído 4% en amortiguador de fosfatos [PB] 0.1 M, PH 7.4). Al terminar la perfusión los cuerpos fueron decapitados y se procedió a aislar el cerebro.

7.4. *Procesamiento inicial del cerebro*

Para el análisis morfológico celular se utilizó una *n* de 9 cerebros por grupo. Los cerebros se extrajeron y se colocaron en la solución fijadora por 24 h y posteriormente se pusieron en una solución de sacarosa al 20% y 24 h después en sacarosa al 30% en PB hasta su procesamiento. Los cerebros se congelaron y se obtuvieron cortes coronales seriados de 40 micrómetros de grosor en un criostato a -22°C y se colocaron en solución crioprotectora (glicerol 25%, PB 50%) a 4°C hasta la inmunotinción.

7.5. Grupos de animales

Las camadas se dividieron en los siguientes grupos: Grupo Vehículo (VEH), el cual se inyectó con solución salina, y Grupo Prolactina (PRL) el cual se inyectó con una dosis de 13 mg/ kg de peso corporal. El PN15 los grupos se subdividieron cada uno en dos grupos: basal y estrés, dependiendo de las condiciones al sacrificarlos. En el grupo basal los animales se sacrificaron inmediatamente después de sacarlos del nido para evitar una respuesta al estrés, mientras que en el grupo "estrés" las crías se separaron de su madre durante 3 h (estímulo de estrés) y se sacrificaron al término de dicho periodo. Estos grupos de animales se utilizaron para el análisis de la expresión de citocinas (IL-1 β , TNF- α , IL-6) en el hipocampo y de la secreción en la circulación sanguínea de las mismas. Grupos adicionales de animales se dividieron en VEH y PRL y se destinaron para realizar el análisis morfológico de las células microgliales y astrocitos en el hilus hipocampal (**Figura 3**). Estos fueron sacrificados al PN15 en condiciones basales mediante perfusión cardíaca.

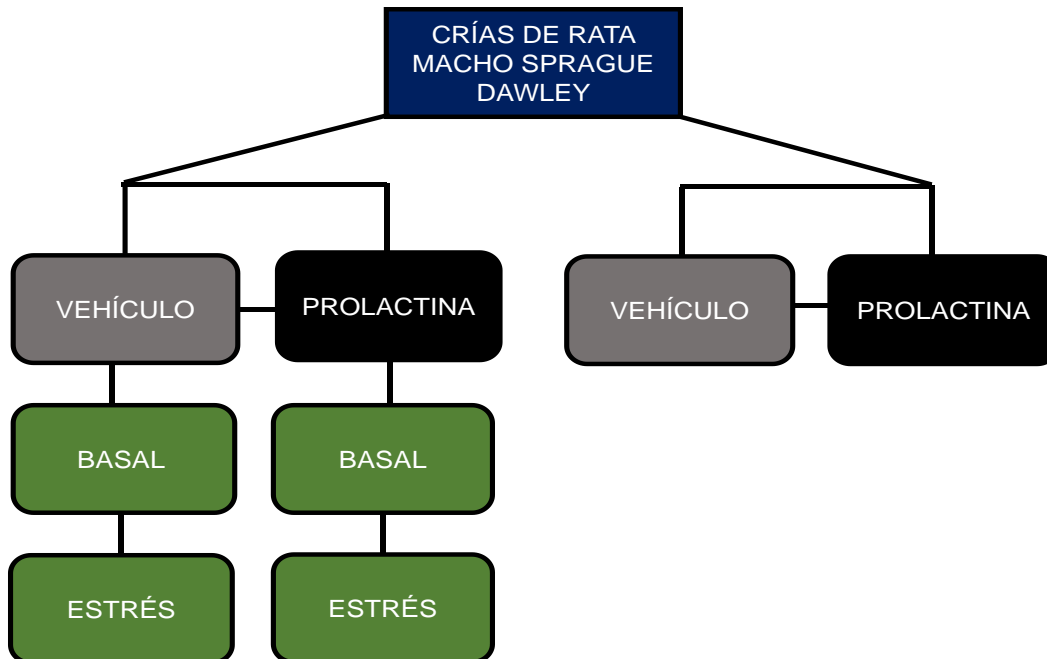


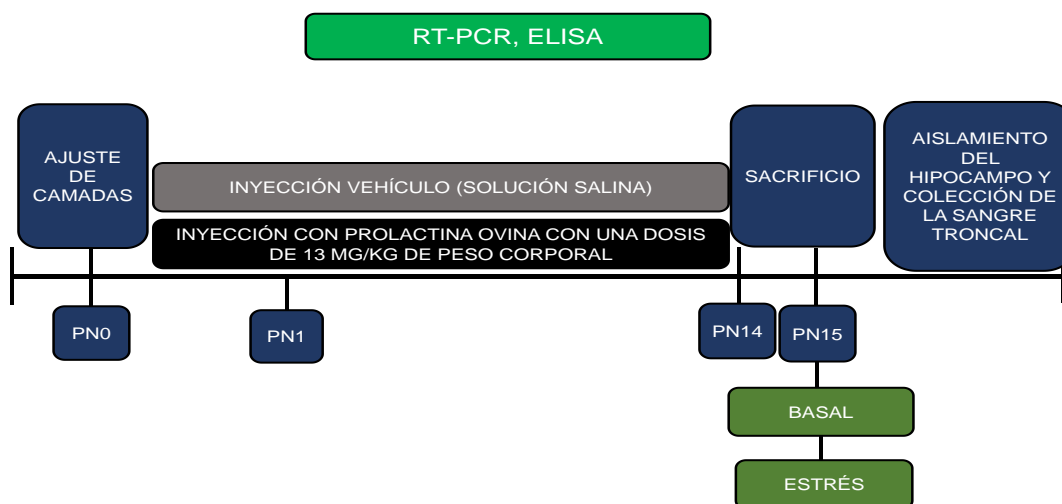
Figura 3. Grupos de animales. Las camadas se dividieron en los siguientes grupos: Vehículo (VEH) y Prolactina (PRL); el PN15 estos grupos se subdividieron en dos grupos basal y estrés, el grupo basal los animales se sacrificaron inmediatamente después de sacarlos del nido para evitar una respuesta al estrés, en el grupo estrés las crías se

separaron de su madre durante 3 h y se sacrificaron inmediatamente después. Otros grupos de animales se dividieron en VEH y PRL.

7.6. *Diseño experimental*

El día PN0 se consideró el día del nacimiento de las crías; el PN1 las camadas se ajustaron a 8 crías 4 hembras y 4 machos. Los animales se dividieron en grupos como se describió anteriormente. Posteriormente se extrajo el hipocampo y se colectó la sangre troncal de cada animal para realizar los análisis de expresión de citocinas por RT-PCR y la evaluación de la concentración de citocinas en el plasma por ELISA, respectivamente. Los otros grupos de animales VEH y PRL el día PN15 se anestesiaron con pentobarbital sódico, se sacrificaron mediante perfusión cardíaca y se extrajeron los cerebros, los cuales fueron fijados posteriormente. Estos tejidos fueron destinados para realizar el análisis morfológico de las células microgliales y astrocitos en el hipocampo (**Figura 4**).

A)



B)

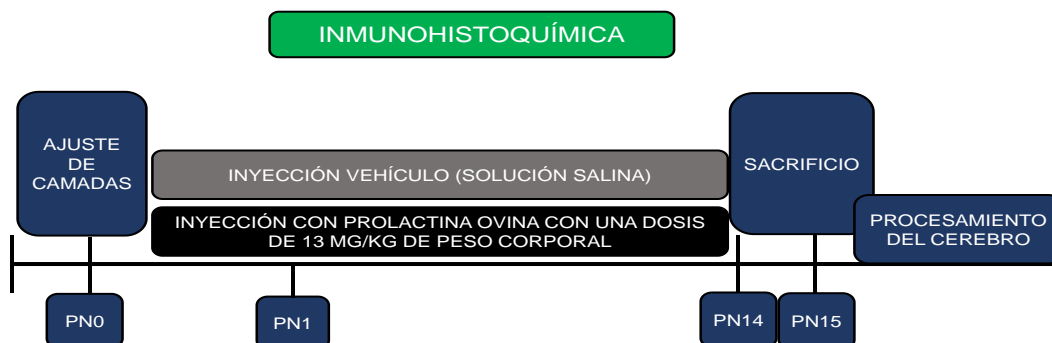


Figura 4. Diseño experimental. A). El día PN 0 se consideró el día del nacimiento de las crías; el PN1 las camadas se ajustaron a 8 crías: 4 hembras y 4 machos, aunque para el presente trabajo solo se emplearon los machos. Las camadas se inyectaron solución salina grupo vehículo (VEH) y el grupo prolactina (PRL) se inyectó con prolactina ovina una dosis de 13 mg/kg de peso corporal, del PN1 al PN14. El día PN15 todas las crías se sacrificaron y se subdividieron en dos grupos: basal y estrés; en el grupo basal los animales se sacrificaron inmediatamente después de sacarlos del nido para evitar una respuesta al estrés, en el grupo estrés las crías se separaron de su madre durante 3 horas y se sacrificaron. Posteriormente se extrajo el hipocampo y se colectó la sangre troncal para realizar RT-PCR y ELISA. **B).** Otros grupos de animales vehículo (VEH) y prolactina (PRL) el día PN15 se sacrificaron y se extrajo el cerebro y posteriormente se realizaron inmunotenciones.

7.7. Colección de tejido para la extracción de ARN y muestras de sangre

Las crías fueron sacrificadas por decapitación inmediatamente después de sacarlas del nido para la extracción de ARN y cuantificación de citocinas. Se extrajeron los siguientes tejidos: el timo y las suprarrenales para obtener su peso; también se colectó la sangre troncal para la determinación de citocinas en tubos Eppendorf limpios conteniendo el inhibidor de proteasas aprotinina y EDTA al 10%, estas muestras fueron centrifugadas para separar el plasma, y se almacenaron a -20°C hasta ser procesadas. La extracción de ARN se llevó a cabo con Trizol (Invitrogen) de acuerdo al protocolo descrito por el fabricante. Posteriormente, el producto obtenido se analizó en el espectrofotómetro multimodo (Varioskan flash) para analizar la concentración y pureza del mismo.

7.8. Síntesis de cDNA

Para la síntesis de cDNA se utilizó 1 µg de la muestra de ARN con: 1 µl de buffer de DNAsa I 10X (Invitrogen), 1 µl de DNAsa I (1 U/µl, Invitrogen) y agua tratada con Dietilpirocarbonato (DEPC, 0.1%) en un tubo libre de RNAsas. Se incubó por 15 min a temperatura ambiente, posteriormente se inactivó la DNAsa I agregando 1 µl de solución de EDTA mM (Invitrogen). Se cuantificó el ARNm en un espectrofotómetro multimodo (Varioskan flash). En un tubo nuevo, se agregó 1 µg del ARNm, 1 µl de oligo dT 12-18 (500 µg/ml, Invitrogen), 1 µg de dNTP mix 10 mM (Invitrogen) y agua libre de RNAsa para un volumen final de 20 µl, posteriormente se agregó 4 µl de First-strand buffer 5x (Invitrogen), 2 µl de DTT

(0.1 M, Invitrogen) y 1 μ l de RNase OUT (40 U/ μ l, Invitrogen), se agregó 1 μ l de M-MLV RT (200 U, Invitrogen) y se incubó por 50 min a 37 °C, se inactivó por calor a 70 °C por 15 min, por último se cuantificó el cDNA en el espectrofotómetro multimodo (Varioskan flash) para determinar la concentración y pureza del mismo.

7.9. PCR punto final

Se diseñaron las secuencias de oligonucleótidos para la determinación de las citocinas proinflamatorias en el cerebro de rata (Tabla 1) con el programa DNASTAR (Primer desing). Para ello se utilizaron las secuencias del ARNm de la base de datos del Genbank del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Las secuencias de oligonucleótidos se validaron por medio de la técnica de PCR punto final, para lo cual se utilizó lo siguiente: 2 μ l de buffer PCR 10X, 2 μ l de dNTPs 2 mM, 0.6 μ l de cloruro de Magnesio al 50 mM (Invitrogen), 1 μ l de oligo directo, 1 μ l de oligo reverso, 1 μ l de Taq polimerasa (1 U/ μ l, Invitrogen), 1 μ l de cDNA. Las mezclas de los diferentes oligos se colocaron en un termociclador de gradiente de temperaturas Veriti (Applied Biosystems), en donde la temperatura de desnaturalización fue de 95 °C durante 5 min, seguido de 35 ciclos con 15 s de desnaturalización a 94 °C; 30 s de alineamiento a 59 °C para la IL-6, y 62 °C para IL-1 β , TNF- α y β actina (gen endógeno), y 30 seg de extensión a 72 °C. Después de un paso final de extensión de 7 min a 72°C se mantuvo a 4°C. Posteriormente se verificó que el producto de amplificación correspondiera con el tamaño esperado, en una electroforesis en gel de agarosa al 2%.

7.10. PCR tiempo real

El número de animales utilizados para este procedimiento fueron 5 individuos por condición (Basal/ Estrés) por grupo. En esta técnica se utilizaron 3 μ l (500 μ g) de cDNA, 5 μ l de Veriquest Fast Sybr Green Master Mix (USB Affymetrix Inc.), 0.9 μ l de oligo directo (10 pM/ μ l, Elim), 0.9 μ l de oligo inverso (10pM/ μ l, Elim) (Tabla 1) y 0.2 μ l de agua grado biología molecular, para obtener un volumen final de 10 μ l por reacción. Se utilizó un termociclador tiempo real (StepOne Plus, Applied Biosystems). La temperatura inicial de desnaturalización

fue de 95 °C durante 5 min, seguido de 35 ciclos con 15 s de desnaturalización a 94 °C; 30 s de alineamiento a 59 °C para IL-6, 62°C para IL-1 β , TNF- α y β actina; y 30 s de extensión a 72°C. Se normalizaron los datos y se analizaron por el método delta-delta CT. Se realizaron duplicados de cada muestra.

Tabla 1. Secuencia de oligonucleótidos

Secuencias de oligonucleótidos

Gen	Secuencia 5'-3'	Tm	Producto de amplificación
TNF- α	Directo TGGCGTGTTTCATCCGTTCTCTACC Reverso CCCGCAATCCAGGCCACTACTT	62 °C	215 pb
IL-1 β	Directo TGAGGCTGACAGACCCCAAAGAT Reverso GCTCCACGGGCAAGACATAGGTAG	60 °C	181 pb
IL-6	Directo AGCCACTGCCTTCCCTACTTCA Reverso GCCATTGCACAACCTTTTCTCA	59 °C	154 pb
β Actina	Directo GTCCACCCGCGAGTACAACCTTCT Reverso TCCTTCTGACCCATACCCACCATC	62 °C	219 pb

7.11. Determinación de citocinas en el suero

Se destinaron 6 individuos por condición para la evaluación de citocinas (IL-1 β , TNF α , IL-6,) en cada grupo. Se determinó la concentración de citocinas en plasma bajo condiciones basales y de estrés. Se utilizaron estuches comerciales de ELISA para la IL-1 β (R&D Systems), su límite de detección fue menor a 5 pg/ml y su coeficiente de variación fue 7.46%; para la citocina TNF- α (R&D Systems) el límite de detección fue menor a 5 pg/ml, y su coeficiente de variación de 3.62%. La IL-6 (R&D Systems) tuvo un límite de detección de 14 pg/ml, y un coeficiente de variación de 6.14%.

7.12. Inmunohistoquímica

Para los análisis morfológicos se utilizó una "n" biológica de 9 individuos por grupo. Los cerebros se cortaron en un criostato a -22°C (Triangle biomedical sciences, TBS) a 40 μ m de grosor, con una distancia de 240 μ m cada uno. Posteriormente los cortes fueron inmunoteñidos con anticuerpos específicos para

identificar microglía (anti-Iba1, Millipore) y astrocitos (anti-GFAP, Abcam). Para la tinción de los astrocitos los cortes fueron pre-tratados con una solución de peróxido de hidrógeno al 10% en PB con tritón X-100 (PBT 0.1M, tritón X-100 3%) para bloquear las peroxidases endógenas. Después se lavaron con PB y se incubaron en solución bloqueadora (suero de caballo 5%, PBT 0.1M) por 30 min; luego se incubaron por 48 h con un anticuerpo primario (Rabbit anti-GFAP 1:25000, Abcam). Se lavó el tejido con PB y se incubó con el anticuerpo secundario acoplado a biotina (anti-rabbit IgG 1:750, Sigma) por 2 h, seguido de una incubación con el complejo avidina-biotina (Elite ABC kit, Vector Laboratories). Para el revelado se utilizó un kit de diaminobencidina (DAB, Vector Laboratories). Se detuvo la reacción con PB y los cortes se montaron en laminillas gelatinizadas (gretina al 1%) y se dejaron secar. Se les colocó medio de montaje "cytoseal", se cubrieron con un cubre objetos y se dejaron secar. Para la tinción de la microglía los cortes fueron pre-tratados con una solución de peróxido de hidrógeno al 10% en PBT para bloquear las peroxidases endógenas. Posteriormente, se lavaron con PB y se incubaron en solución de bloqueo por 30 min. A continuación fueron incubados con el anticuerpo primario (mouse anti-IBA1/IAF1 1:3000, Millipore) por 48 h, luego se lavaron y se dejaron incubar por 2 h con el anticuerpo secundario (anti-mouse IgG 1:750, Vector Laboratories). Después se incubaron con un conjugado avidina-biotina y se revelaron con el kit de revelado de diamino bencidina (DAB). Finalmente los tejidos se montaron en laminillas gelatinizadas.

7.13. Análisis morfológico de las células microgliales

Se realizó un muestreo aleatorio a lo largo del plano rostro-caudal del hipocampo. Para llevar a cabo esto, se seleccionaron al azar uno de cada 10 cortes de 40 μm de grosor. Las células microgliales fueron detectadas con el anticuerpo anti-Iba1. Para el conteo se consideraron las células positivas para IBA-1 en el hilus del GD del hipocampo. Se analizaron 10 cortes. Se tomaron registros fotográficos de los cortes con un microscopio de campo claro acoplado a una cámara de video digital (AxioCam MRC, Carl Zeiss). La evaluación del área (μm^2) de cada campo analizado se realizó por medio del programa analizador de

imágenes Axiovision Rel 4.0 (Carl Zeiss). El área de conteo en el hilus se delimitó y se contaron las células dentro de la misma; con estos datos se calculó la densidad de las células marcadas con IBA-1 en el área examinada (número de células / mm²).

Se cuantificó la microglía total en el hilus hipocampal, y posteriormente se clasificó de acuerdo a la descripción de Diz-Chavez y col (2012), como microglía en reposo (soma pequeño y ramificaciones largas y delgadas) y microglía activada (soma de gran tamaño casi ameboide y con ramificaciones cortas y gruesas).

7.14. Análisis morfológico de los astrocitos

Para el análisis de los astrocitos se realizó un muestreo sistemático aleatorio a lo largo del plano rostro-caudal del cerebro. Para llevar a cabo esto, se seleccionaron al azar uno de cada diez cortes de 40 µm de grosor, como se describió anteriormente. Para el conteo se consideraron las células positivas para GFAP (es una proteína del citoesqueleto que es expresada en esta estirpe celular) en el hilus del GD del hipocampo.

7.15. Análisis estadístico

Los resultados se analizaron utilizando los programas estadísticos GB-Stat 6.0, de Dynamic Microsystems, Silver Springs, MD, USA. Los datos fueron sometidos en forma simultánea al análisis de varianza (ANOVA de 2 vías) con la prueba post-hoc de Newman Keuls, o en el caso de grupos pareados, mediante la prueba de T.

VIII. RESULTADOS

8.1. La administración de PRL no aumentó los parámetros de estrés en el neonato

Para determinar si las inyecciones diarias de PRL eran lo suficientemente estresantes para alterar los parámetros de desarrollo en las crías, evaluamos el peso corporal y el peso relativo de las adrenales y del timo al PN15 en condiciones basales y de estrés. No se observó ningún efecto del tratamiento con VEH en estos parámetros. La falta de efecto de la PRL sobre el peso corporal y del peso relativo de las adrenales y del timo en los diferentes tratamientos sugiere que las crías no estaban estresados crónicamente debido a las inyecciones diarias ni al estrés al PN15 (**Tabla 2**).

Tabla 2. El tratamiento con PRL no afecta los parámetros de estrés en el neonato

Tratamiento	Peso corporal (g)	Adrenales (mg/g BW)	Timo (mg/g BW)
VEH BASAL	36.5 ± 0.67 (n= 7)	0.4 ± 0.04 (n=7)	3.2 ± 0.34 (n=7)
PRL BASAL	35.2 ± 1.11 (n= 7)	0.3 ± 0.03 (n=7)	3.5 ± 0.15 (n=7)
VEH ESTRÉS	36.9 ± 1.03 (n=6)	0.3 ± 0.03 (n=6)	3.3 ± 0.31 (n=6)
PRL ESTRÉS	35.7 ± 1.49 (n=6)	0.4 ± 0.02 (n=6)	3.6 ± 0.46 (n=6)

*Se muestra el peso corporal de las crías VEH y PRL en condiciones basales y de estrés al PN15 y los pesos relativos de los tejidos (adrenales y timo), los cuales no mostraron diferencias significativas entre los grupos.

8.2. Expresión de citocinas en el hipocampo al PN15

Con el objetivo de evaluar el efecto de la PRL sobre la expresión de genes de citocinas pro-inflamatorias, se analizaron los niveles de expresión de las citocinas IL-1 β , TNF- α e IL-6, por medio de RT-PCR en homogenados de hipocampo de animales sacrificados en condiciones basales o de estrés el día PN

15, provenientes de los grupos VEH o PRL. Los resultados son los siguientes: la expresión basal de IL-1 β en el hipocampo de los animales tratados con PRL presenta un aumento significativo pero por otra parte la PRL disminuye la expresión del ARNm de IL-1 β en respuesta al estrés (**Figura 5**).

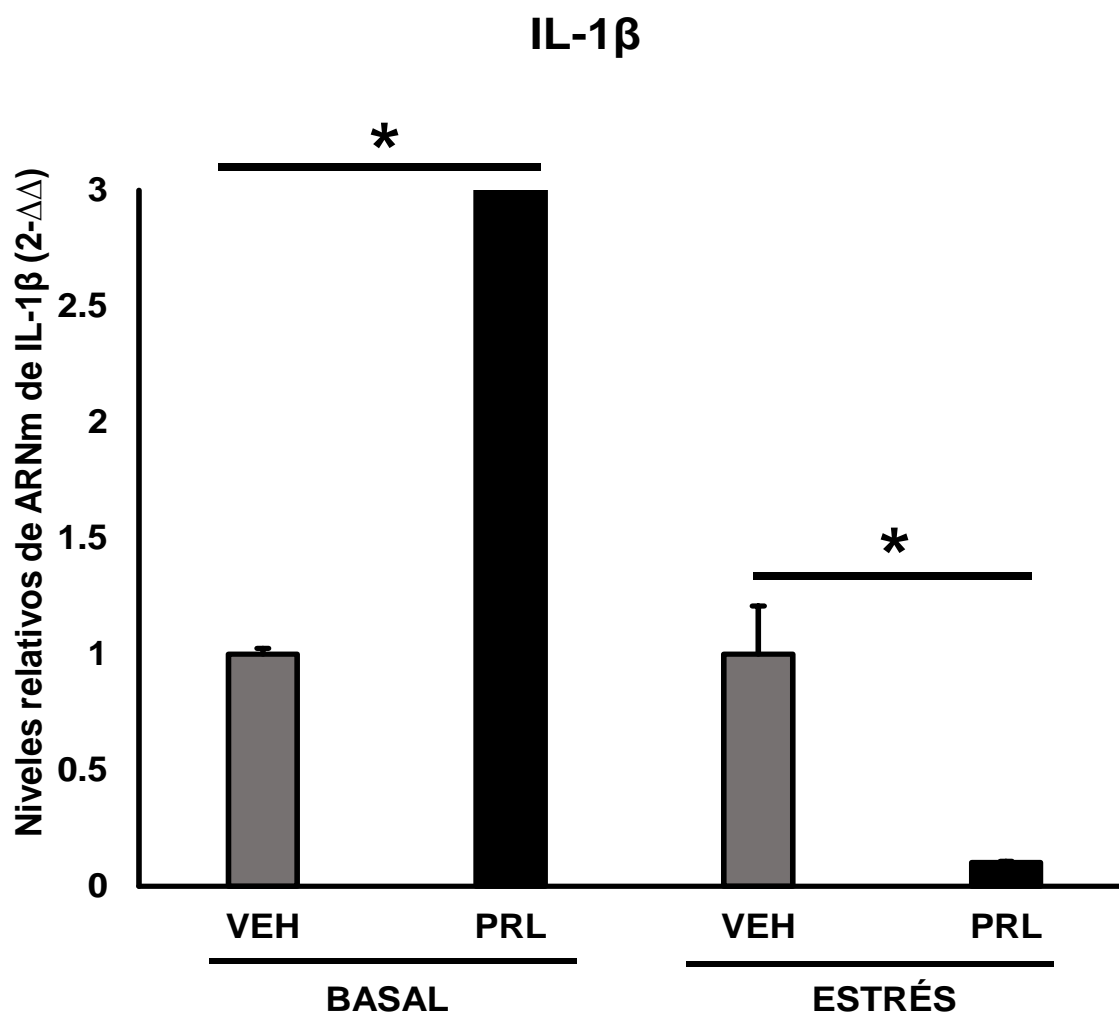


Figura 5. Niveles de expresión relativos del ARNm de IL-1 β en crías de rata macho al PN15. Homogenizados de hipocampo de crías de rata macho. Se muestran los grupos vehículo (VEH) y prolactina (PRL) en condiciones basales o de estrés, observamos un aumento significativo de los niveles de expresión del ARNm de IL-1 β en condiciones basales y por otro lado hay una disminución significativa en los niveles de expresión de IL-1 β en el tratamiento con PRL ESTRÉS comparado con el grupo VEH ESTRÉS. La expresión del ARNm de IL- β fue analizado por RT-PCR. Cada barra muestra el valor de la media. Cambio en el número de veces mayor que 2 o menor que 0.5 fueron considerados como ARNm expresado diferencialmente significativo. N=5

En la figura 6 se muestran los resultados de la expresión del gen de TNF- α en el hipocampo. Se observó que no hay cambios importantes en la expresión de TNF- α en el grupo tratado con PRL en condiciones basales con respecto al grupo VEH, pero si hay una disminución en la expresión del gen de TNF- α en respuesta al estrés en el grupo tratado con PRL.

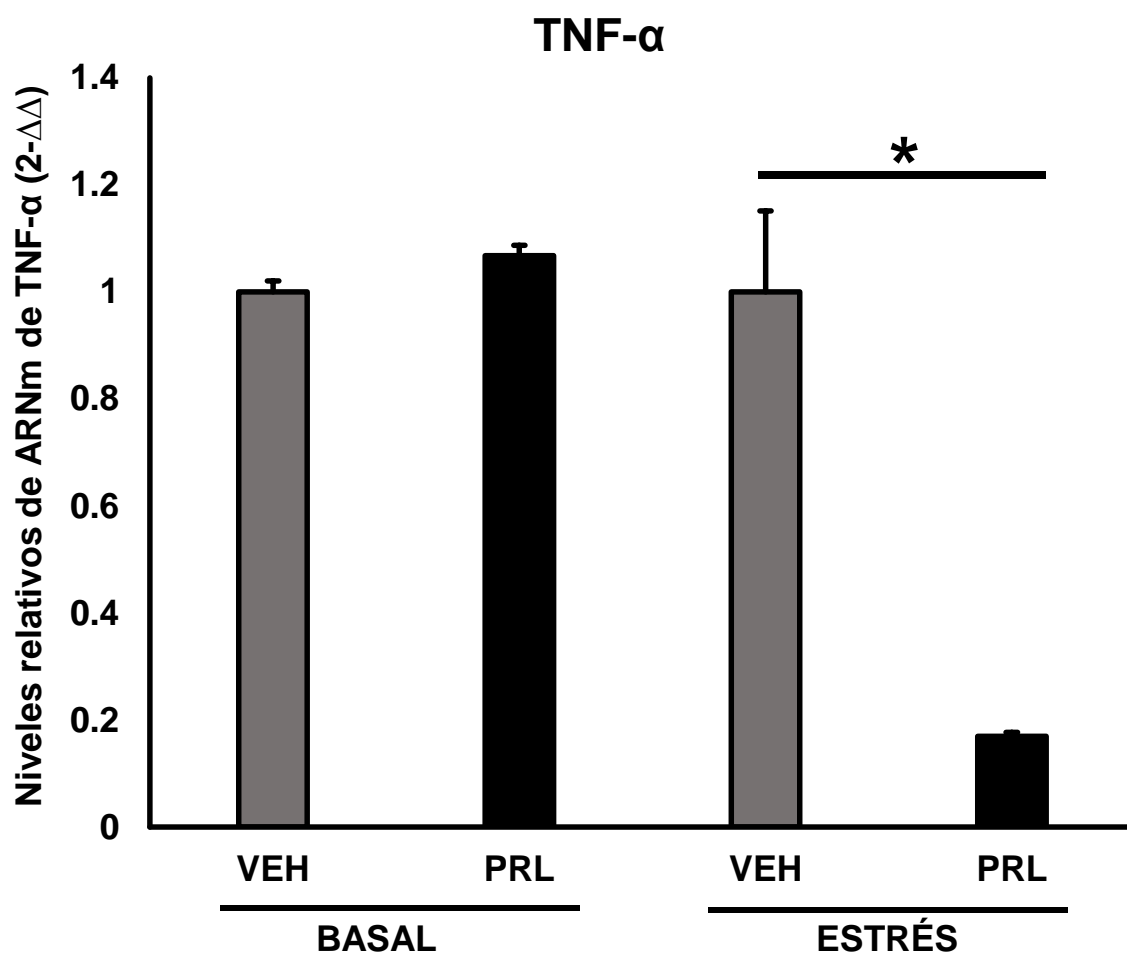


Figura 6. Niveles de expresión relativos del ARNm de TNF- α en crías de rata macho al PN15. Homogenizados de hipocampo de crías de rata macho. Se muestran los grupos vehículo (VEH) y prolactina (PRL) en condiciones basales o de estrés, observamos que la PRL no tiene ningún efecto sobre los niveles de expresión del ARNm de IL-1 β en condiciones basales, sin embargo hay una disminución significativa en los niveles de expresión de TNF- α en el tratamiento con PRL y estrés. Cada barra muestra el valor de la media de los duplicados. Cambio en el número de veces mayor que 2 o menor que 0.5 fueron considerados como ARNm expresado diferencialmente significativo. N=5

También se evaluó el efecto de la PRL sobre la expresión del gen de IL-6 al día PN15, los resultados se muestran en la figura 7. Se encontró que la PRL aumenta los niveles de expresión del gen de IL-6 en condiciones basales. Por otra parte, se observó que la PRL disminuye los niveles de expresión de IL-6 evocados por el estrés.

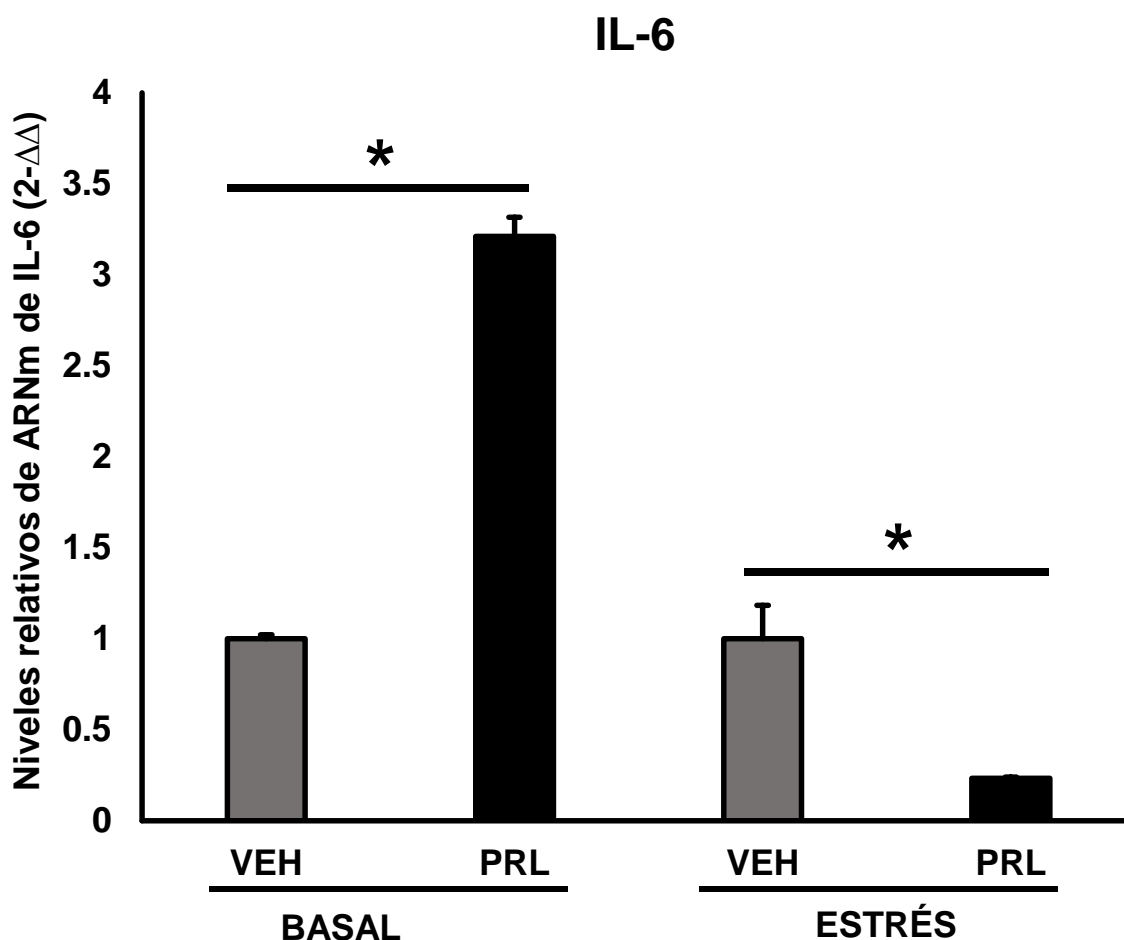


Figura 7. Niveles de expresión relativos del ARNm de IL-6 en crías de rata macho al PN15. Homogenados de hipocampo de crías de rata macho. Se muestran los grupos vehículo (VEH) y prolactina (PRL) en condiciones basales o de estrés, demostramos un aumento significativo en las crías tratadas con PRL en condiciones basales, también encontramos una disminución significativa en los animales tratados con PRL y sometidos a estrés con respecto al grupo VEH BASAL. Cada barra muestra el valor de la media de los duplicados. Cambio en el número de veces mayor que 2 o menor que 0.5 fueron considerados como ARNm expresado diferencialmente significativo. N=5

8.3. Determinación de la concentración de citocinas en la circulación sanguínea

Con el objetivo de evaluar el efecto de la PRL sobre la respuesta inmune periférica se determinaron las concentraciones circulantes de IL-1 β , TNF α e IL-6 en los grupos experimentales bajo las condiciones basales y de estrés en las crías el día PN15. Como se observa en la figura 8, el tratamiento con PRL no afecta la concentración periférica de IL-1 β ni en condiciones basales o inducidas por el estrés.

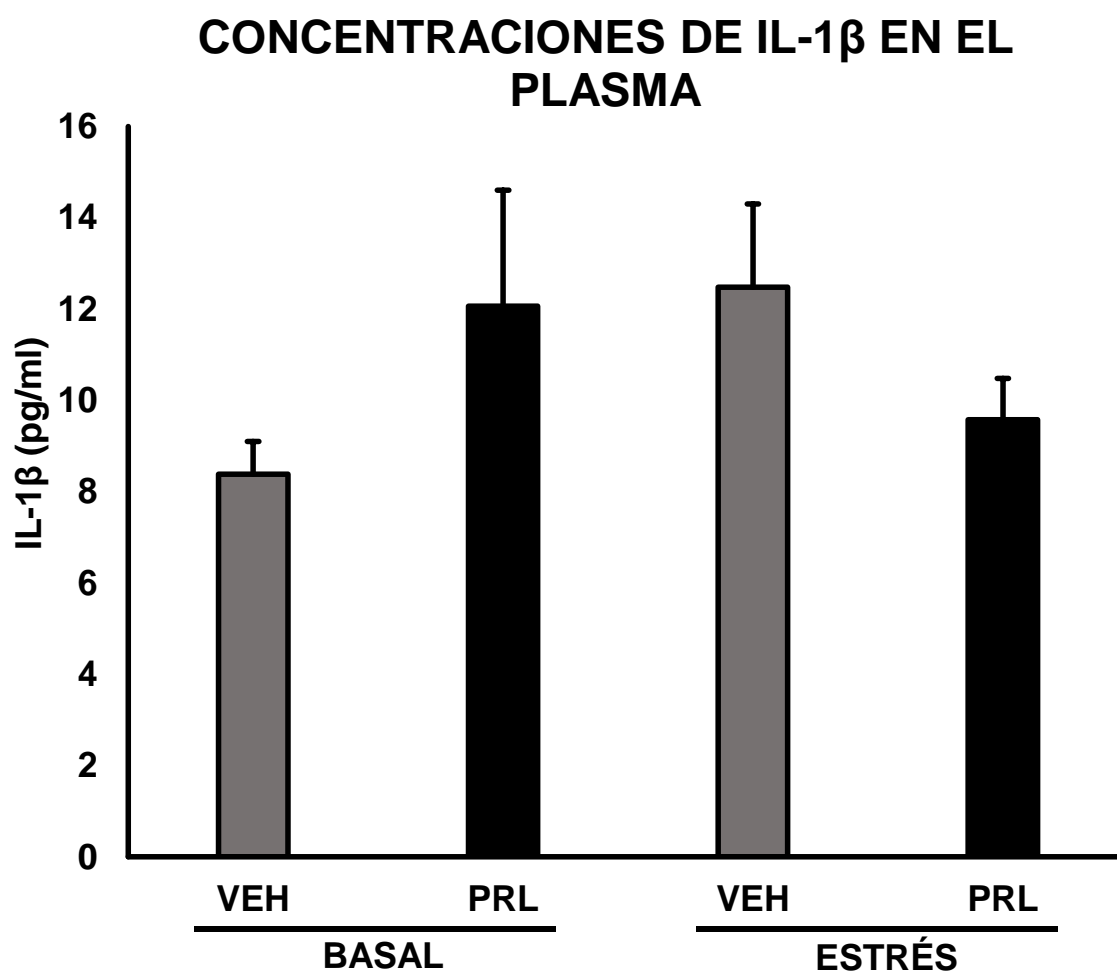


Figura 8. Concentraciones circulantes de IL-1 β al PN15. Se muestran las concentraciones de IL-1 β respectivamente, de ambos grupos vehículo (VEH) y prolactina (PRL), en condiciones basales y de estrés. No observamos diferencias significativas en los diferentes tratamientos (N=9; ANOVA $p \leq 0.01^{**}$, $P \leq *0.05$).

En cuanto a las concentraciones circulantes de TNF- α se encontró un aumento significativo en el grupo PRL ESTRÉS comparado con cualquiera de los otros grupos (Figura 9).

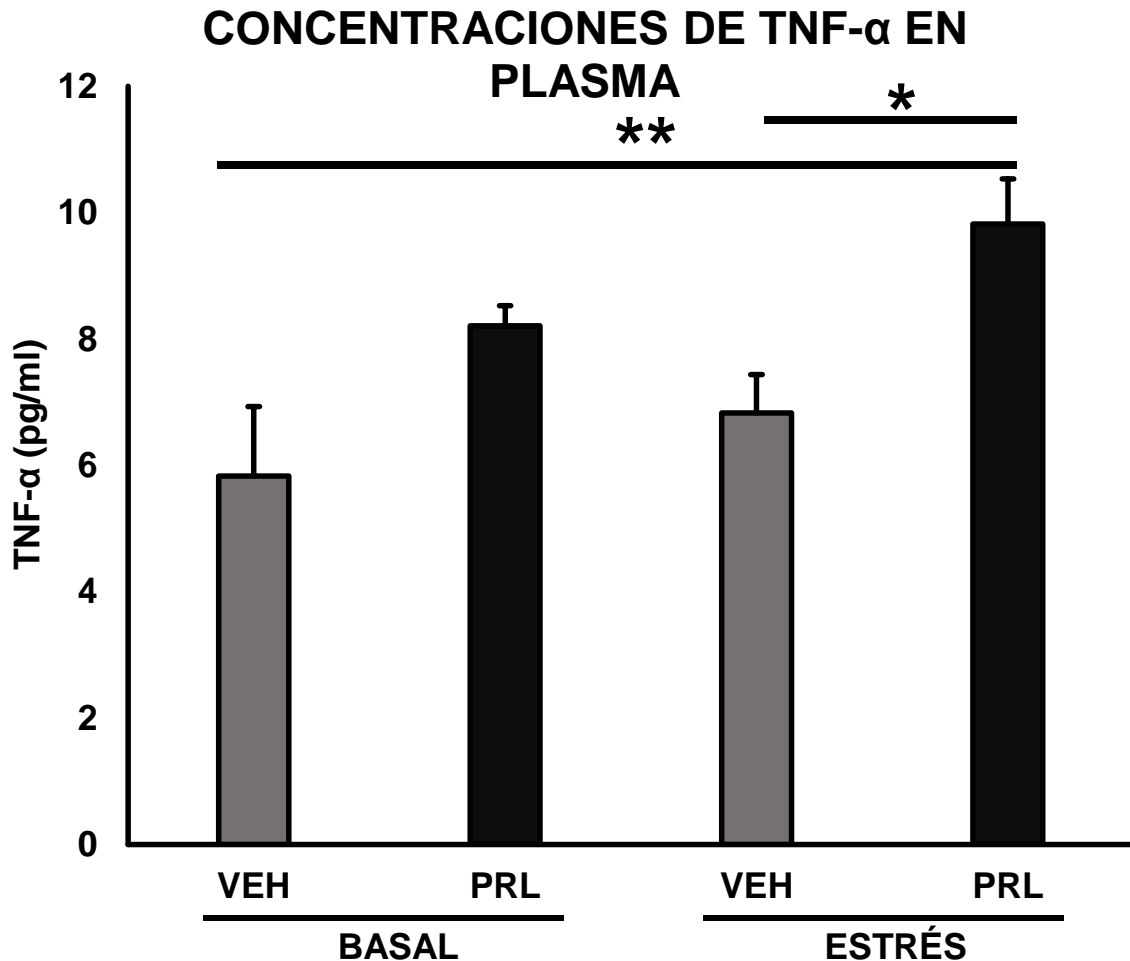


FIGURA 9. Concentraciones circulantes de TNF- α PN15. Se muestran las concentraciones de TNF- α respectivamente, de ambos grupos vehículo (VEH) y prolactina (PRL), en condiciones basales y de estrés. Observamos un aumento significativo en el grupo PRL ESTRÉS al ser comparado con los grupos VEH BASAL $p < 0.01^{**}$, y con VEH ESTRÉS $p < 0.05^*$. $n = 6$

En la gráfica 10 se muestran los resultados de la concentración circulante de la IL-6 en crías de ratas machos al día PN 15. Como se observa no se obtuvieron diferencias significativas en las concentraciones de IL-6 en la circulación periférica comparando los diferentes grupos experimentales.

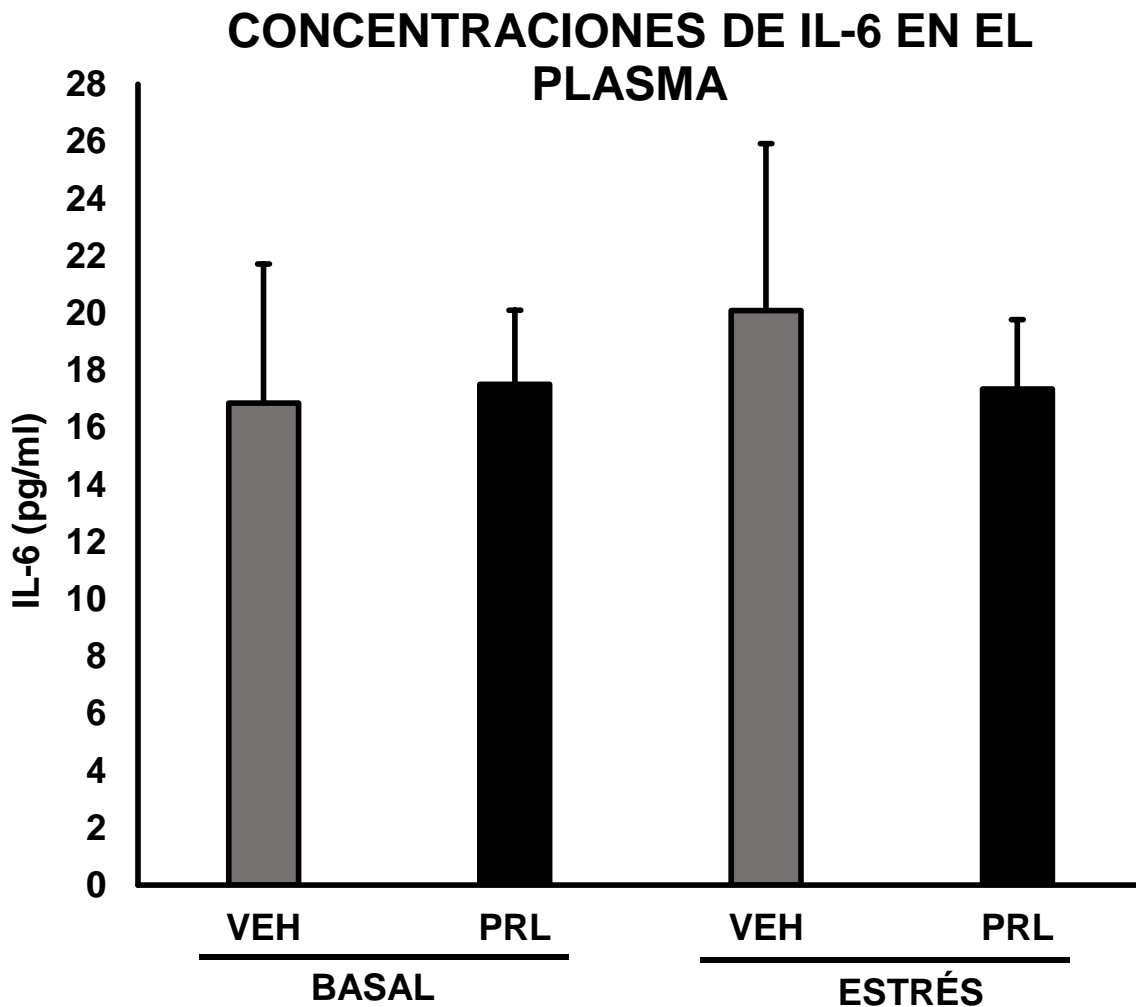
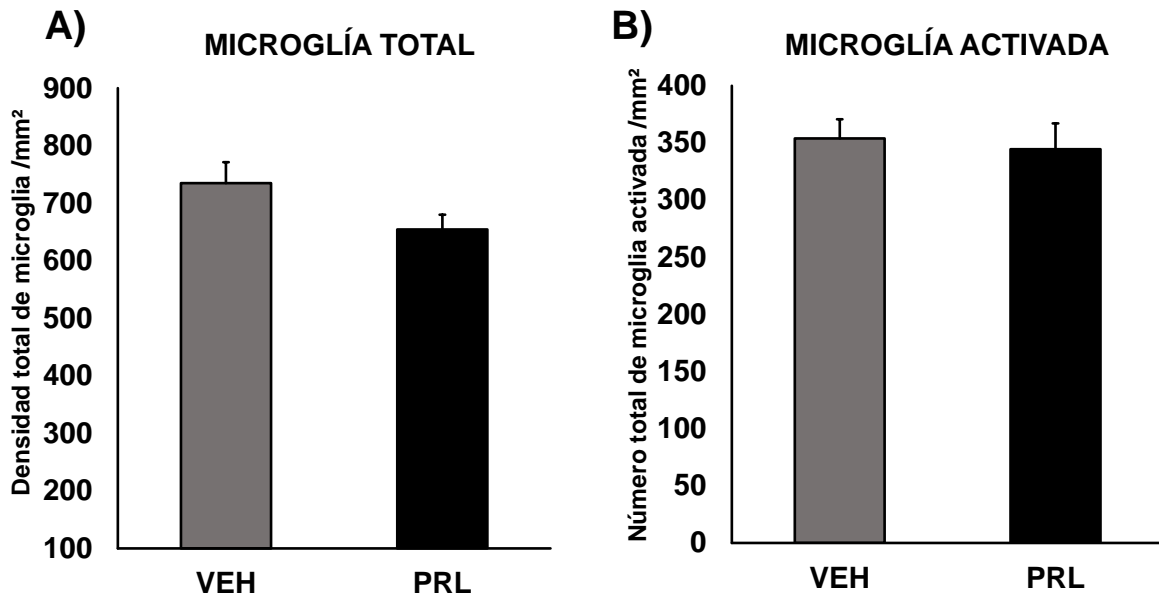


FIGURA 10. Concentraciones circulantes de IL-6 al PN15. Muestra las concentraciones circulantes de IL-6 de los diferentes grupos experimentales Vehículo (VEH) y prolactina (PRL) en condiciones basales y de estrés al PN 15. Encontramos que la PRL no afecta la concentración de la IL-6. (N=6; ANOVA $p \leq 0.01^{**}$, $P \leq 0.05$).

8.4. Análisis de las células gliales en el GD del hipocampo

Se ha documentado que la PRL tiene efectos sobre las células gliales (microglía y astrocitos) en la edad adulta pero se sabe muy poco acerca del efecto de la PRL en etapas tempranas de la vida. Por ello se evaluó el efecto de la PRL sobre las células de respuesta inmune cerebral (microglía y astrocitos) en crías de rata macho al PN15. Se inyectó PRL diariamente los días PN1 al PN14 y se

evaluaron las poblaciones de estas células así como su morfología al PN15. Para ello, se realizaron inmunotinciones para la detección y cuantificación de las células gliales en el hilus del GD del hipocampo de estos animales. Las células microgliales fueron detectadas con el anticuerpo anti-IBA1. En las figuras 11a y 11b se muestran los resultados de los análisis de las células microgliales. Se analizó la densidad total de las células microgliales (positivas a IBA1+) en los grupos experimentales VEH y PRL y se observó que la PRL no afecta la densidad celular de las microgliales. Posterior a los conteos totales se analizó la morfología de la microglía y se cuantificó la microglía en reposo (soma pequeño y ramificaciones largas y delgadas) y la microglía activada (soma de gran tamaño casi ameboide y con ramificaciones cortas y gruesas). No se observaron diferencias significativas en el número de las células con morfología ameboide (activada) en los grupos experimentales. En la figura 11c se muestran micrografías de los campos conteniendo las células microgliales en el hilus hipocampal; como mencionamos, no hay cambios en la densidad total de las células ni en el número de las células microgliales activadas en los grupos experimentales VEH y PRL.



MICROGLÍA EN EL HILUS HIPOCAMPAL

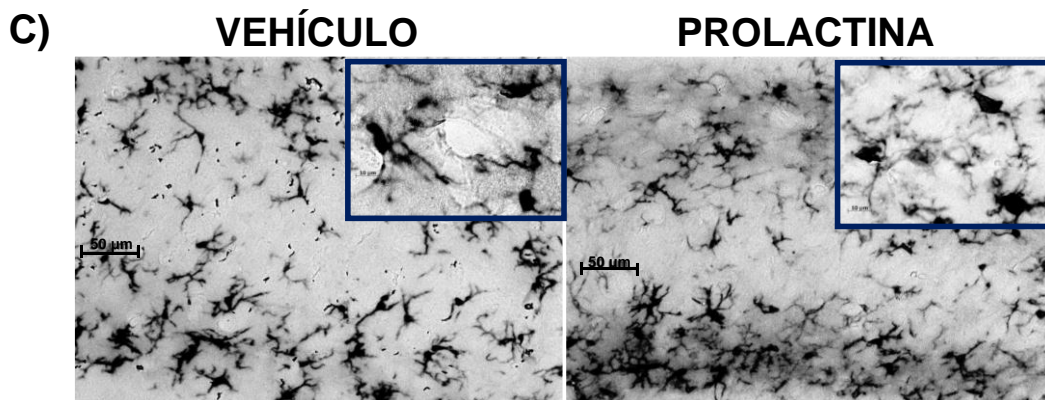
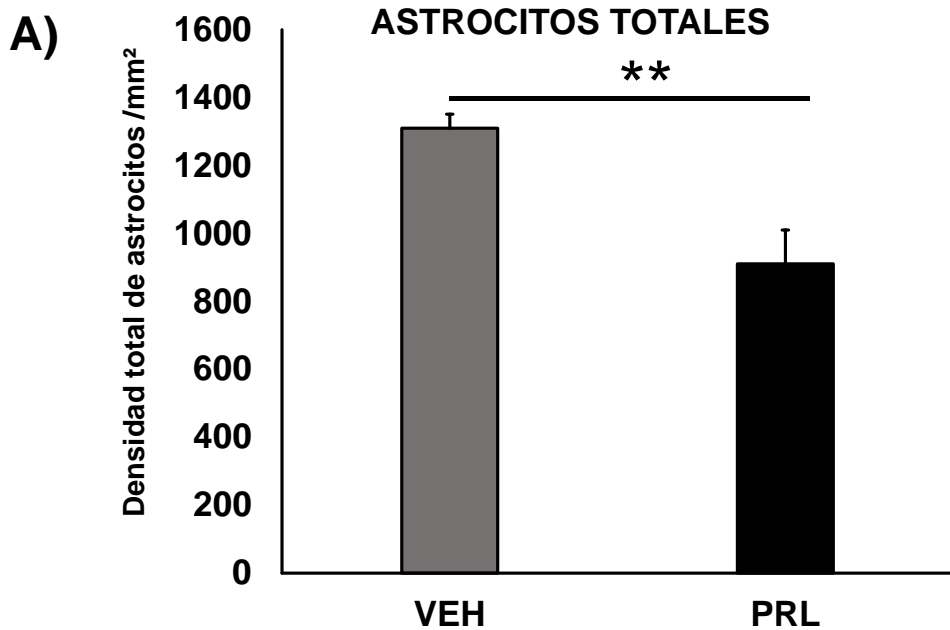


FIGURA 11. Análisis de la densidad y número de las células microgliales en el hilus hipocampal de las crías de rata macho al PN15. En el panel A) se muestra la densidad celular total de las células microgliales IBA1+ en el hilus del hipocampo del grupo Vehículo (VEH) y prolactina (PRL). No observamos cambios significativos en la densidad total de células microgliales (N=9; ANOVA $p \leq 0.01^{**}$, $P \leq *0.05$). En el panel B) se muestra el promedio total de las células microgliales activadas de acuerdo a su morfología ya sea (microglía en reposo o activada) en los dos grupos experimentales y en el panel C) se muestran microfotografías (Magnificadas a 40X, inserto a 100X) en donde se pueden apreciar los cambios morfológicos de la microglía en respuesta a los tratamientos a los que fue sometido cada grupo experimental.

Para la detección de los astrocitos se utilizó el anticuerpo contra GFAP (proteína ácida fibrilar glial). En la figura 14 se muestran los resultados de la densidad (núm.

de células /mm²) de las células GFAP+ en los dos grupos VEH y PRL. Se observó una disminución significativa de los astrocitos en el grupo PRL comparado con el grupo VEH.



ASTROCITOS EN EL HILUS HIPOCAMPAL

B)

VEHÍCULO

PROLACTINA

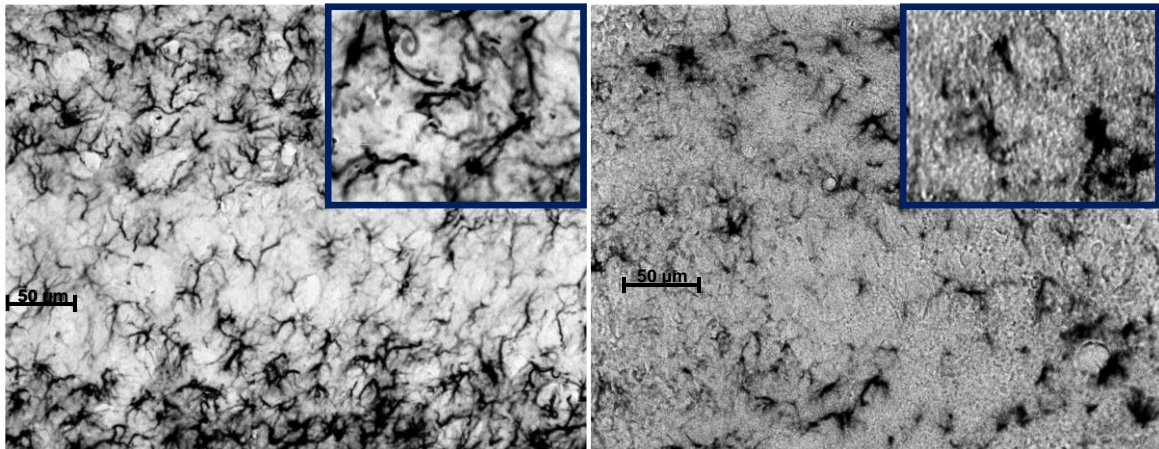


FIGURA 11. Análisis de la densidad de las células astrogliales en el hilus hipocampal de las crías de rata macho al PN15. En el panel A) se muestra la densidad celular total de las células astrogliales GFAP+ en el hilus del hipocampo del grupo Vehículo (VEH) y prolactina (PRL). Encontramos una disminución significativa de la densidad celular astrogliar en el grupo tratado con PRL con respecto al grupo VEH. (N=9;

ANOVA $p \leq 0.01^{**}$, $P \leq 0.05$). En el panel B) se muestran micrografías (Magnificadas a 40X, inserto a 100X).

IX. DISCUSIÓN

La PRL ejerce diferentes acciones dentro del cerebro: regula la neurogénesis y modula las funciones neuroendocrinas en el adulto. Sin embargo, los efectos de la PRL durante la vida postnatal temprana son poco conocidos, exceptuando que la PRL administrada neonatalmente disminuye la neurogénesis del hipocampo (Lajud et al., 2013). Dado que la PRL tiene efectos sobre el sistema inmune, esta podría afectar también la respuesta inmune cerebral. Si bien, no se conocen los efectos de la PRL sobre el sistema neuroinmune, el objetivo de este trabajo fue analizar el efecto de la administración neonatal de PRL sobre las células del sistema neuroinmune (microglía y astrocitos) y la expresión de citocinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 β , IL-6 en el hipocampo así como en la respuesta periférica de estas citocinas al día posnatal 15.

Para determinar si las inyecciones diarias de PRL podrían alterar algunos parámetros de desarrollo tales como algunos órganos involucrados en la respuesta al estrés en las crías, evaluamos el peso corporal y el peso relativo de las adrenales y del timo al PN5 en condiciones basales y de estrés. El PN15 se sacrificaron las crías en condiciones basales y de estrés, antes de sacrificarlas se obtuvo el peso corporal y posterior al sacrificio se extrajeron los tejidos que están relacionados con el estrés (adrenales y timo); con respecto a estos resultados no se observó ningún efecto del tratamiento con PRL en estos parámetros (**Tabla 2**). Estos resultados indican que al no haber diferencias por el tratamiento con la PRL sobre el peso corporal y en el peso relativo de las adrenales y el timo las crías no estaban estresadas crónicamente debido a las inyecciones diarias ni al estrés agudo inducido al día PN15. Estos resultados están de acuerdo con resultados anteriores del grupo de trabajo, ya que previamente se reportó que las inyecciones diarias del día PN1 al 14 de PRL en condiciones basales no afectó estos parámetros (peso de adrenales y timo) relacionados con el estrés, ni tampoco el peso corporal de las crías al día PN15 (Lajud et al., 2013). Por otra parte, se ha

demostrado que la SM diaria induce un aumento en el peso corporal de neonatos el día PN15, aunque no tiene efectos en los tejidos relacionados con el estrés (adrenales y timo) (Roque et al., 2015).

Con el objetivo de evaluar el efecto de la PRL neonatal sobre la expresión de los genes de las citocinas proinflamatorias (IL-1 β , TNF- α e IL-6) en el hipocampo, las crías de rata macho se sacrificaron el PN 15 en condiciones basales o de estrés. Encontramos que la PRL aumenta la expresión de IL-1 β en condiciones basales, con respecto al control (grupo VEH), y por otra parte, la PRL disminuye la expresión del gen de IL-1 β evocada por el estrés (**Figura 13**). No existen reportes sobre el efecto de la PRL sobre la expresión de IL-1 β en el sistema neuroinmune, pero si en otros tejidos y en la circulación. Por ejemplo, se observó que la PRL inhibe la secreción de IL-1 β de explantes de tejido corioamniótico en cultivo (Zaga-Clavellina et al., 2014). En células de epitelio mamario bovino, la PRL aumenta la expresión de IL-1 β (Gutiérrez-Barroso et al., 2008). Por otro lado, la separación maternal (estrés crónico) aumenta la expresión de IL-1 β en condiciones basales y al exponerlos a un estresor agudo se incrementa más la expresión de esta citocina. En este trabajo se observó que la PRL induce un aumento en la expresión basal de IL-1 β mientras que en respuesta al estrés inhibe su expresión. Estos estudios y el del presente trabajo confirman el papel de la PRL como molécula inmunomoduladora y reguladora de la expresión de IL-1 β en diversos tejidos.

En varios trabajos se ha reportado que la expresión de TNF- α puede ser afectada por LPS, choques eléctricos u hormonas del estrés, en distintas zonas cerebrales utilizando animales en la etapa adulta (Babri et al., 2014; Blandino et al., 2009; Deak et al., 2005). En este trabajo no se encontraron cambios significativos en la expresión del gen de TNF- α en el hipocampo en condiciones basales, pero si hay una disminución importante con el grupo PRL ESTRÉS comparado con el grupo VEH ESTRÉS (**Figura 13**). Esto contrasta con los estudios de DeVito et al., (1995), quien encontró un aumento en la expresión de TNF- α en cultivos de astrocitos incubados con PRL. Otros estudios mostraron que la exposición a PRL aumenta la liberación de TNF- α de monocitos CD14 (+) de pacientes con artritis

reumatoide la cual puede ser abolida por el gen silenciado del RPRL o por un tratamiento con el inhibidor de MAPK (Tang et al., 2014). Estudios anteriores demostraron que la SM (estrés crónico) induce un aumento significativo en la expresión del ARNm de TNF- α en condiciones basales, sin embargo al exponerlos a un estresor agudo no hay cambios en esta citocina (Roque et al., 2015). En este trabajo no se encontraron cambios importantes en la expresión del gen de TNF- α en condiciones basales, sin embargo la PRL abole la expresión de TNF- α después de la exposición a un estresor agudo. Por lo anterior, se sugiere que la PRL inhibe la expresión de TNF- α en respuesta al estrés.

La PRL induce un aumento significativo en la expresión del gen de IL-6 en el hipocampo en condiciones basales pero disminuye su expresión inducida por el estrés (**Figura 13**). Estudios previos han demostrado que esta hormona incrementa la expresión del gen de IL-6 en cultivos primarios de células del timo (Tseng et al., 1997).

También se sabe que la PRL inhibe los niveles de expresión del gen de IL-6 en células deciduales (Deb et al., 1999). En este caso se observó tanto el efecto estimulador como el inhibitorio de la PRL sobre la expresión de citocinas dependiendo de las condiciones. En conjunto los resultados sugieren que la PRL promueve un estado proinflamatorio en condiciones basales; dado que aumenta la expresión de IL-6 e IL-1 β , sin embargo durante la respuesta al estrés esta hormona inhibe la expresión de estas citocinas proinflamatorias y de TNF- α en el hipocampo. Estos efectos podrían deberse a que la PRL bloquea la expresión del receptor activador del factor nuclear κ B (NF- κ B) (Ledesma-Colunga et al., 2017).

En cuanto a la concentración de citocinas circulantes se observó que la PRL no influye sobre las concentraciones de IL-1 β , TNF- α e IL-6 en condiciones basales; por otra parte, se encontró que la PRL induce un aumento sobre la concentración plasmática de TNF- α evocada por el estrés (**Figura 13**).

Se ha documentado el rol de la PRL como agente proinflamatorio en las enfermedades autoinmunes y frecuentemente se ha descrito la presencia de hiperprolactinemia (HPRL) en varias enfermedades autoinmunes tales como lupus

eritematoso sistémico (LES), artritis reumatoide (AR), esclerosis múltiple (EM) (Chikanza 1999; Allen et al., 1999; Orbach & Shoenfeld 2007; Cejkova et al., 2009). Markianos et al., (2010) encontraron niveles altos de PRL tanto en suero como en el líquido cefalorraquídeo (LCR) en pacientes mujeres con EM. También se han encontrado niveles altos de PRL en suero en pacientes mujeres y hombres con esclerosis sistémico ES (Kucharz et al., 1996; Straub et al.,). Por otra parte, se ha demostrado un aumento en los niveles de IL-6 en suero de pacientes con LES con afectación del sistema nervioso central (LES-SNC) (Jara et al., 1998). También se han encontrado efectos inhibitorios de la PRL sobre algunas enfermedades autoinmunes como EM durante la lactancia (Gregg et al., 2007). En pacientes con prolactinomas y concentraciones altas de PRL se observó que las concentraciones de interleucinas 1, 3, 6, TNF- α , estaban dentro del rango normal (Clodi et al., 1992). Esto está de acuerdo con los resultados de este trabajo, donde no hay cambio en las concentraciones de estas citocinas debido a la PRL. Finalmente, esto también podría deberse a que un posible aumento de concentración de las citocinas por la estimulación de células del sistema inmune no sea apreciable en la circulación general.

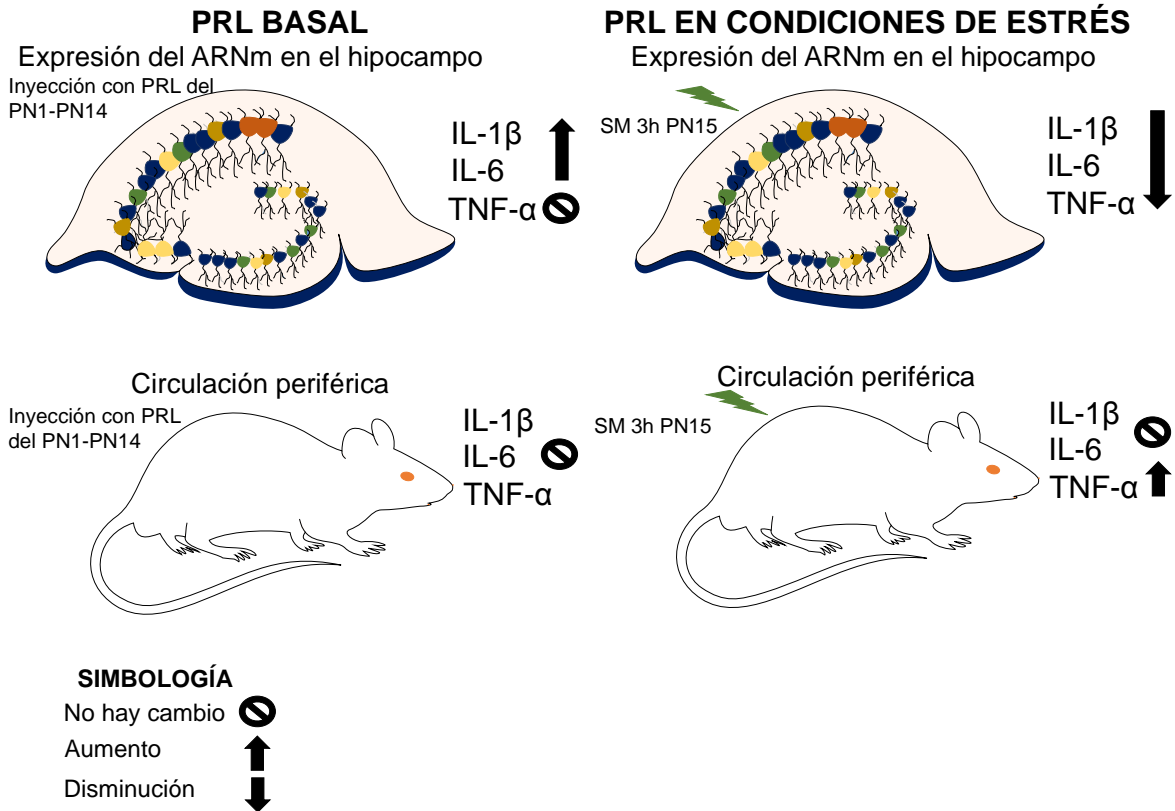


FIGURA 13. Diferencias en la expresión de citocinas en el hipocampo y en la secreción de citocinas a la circulación en crías tratadas con PRL y en condiciones de estrés al PN15. En estado basal (sin molestar) la PRL aumenta la expresión de citocinas IL-1 β e IL-6, pero no tiene efectos sobre la expresión de TNF- α en el hipocampo y no altera la secreción a nivel sistémico de estas citocinas. En condiciones de estrés la PRL inhibe la expresión de citocinas IL-1 β , TNF- α e IL-6 en el hipocampo, a nivel sistémico la PRL inducida por el estrés aumenta la secreción de TNF- α .

Las células microgliales son las células encargadas en gran parte de la respuesta inmune cerebral. Benedetto en el 2001 observó que la microglía infectada con *Toxoplasma gondii* al ser tratada con PRL y TNF- α indujo la muerte intracelular de este parásito y la consecuente liberación de citocinas como IL-1 β , IL-3 e IL-6. Otros estudios han mostrado un papel para la PRL sobre la microglía activada en lesiones provocadas por isquemia focal que contribuye a regular la respuesta neuroinflamatoria después de la lesión, ya que se observó un aumento en la inmunoreactividad a PRL en las células microgliales con una morfología ameboidea con procesos cortos (Mödersheim et al., 2007). Sin embargo, no se observó tinción para el RPRL en estas células reactivas, lo que sugiere que estas

son una fuente en lugar de una célula blanco de PRL. A la fecha, no hay estudios que confirmen este hallazgo. En este estudio se evaluó el efecto de la PRL sobre la densidad y morfología de las células microgliales en el hilus hipocampal de las crías y no se encontraron cambios significativos en la densidad ni en la morfología de las células microgliales (**Figura 14**). Esto está de acuerdo con el estudio de Mödersheim (2007) en donde no se encuentran receptores a PRL en las células microgliales. La falta de cambio en la activación microglial por PRL que se observas aunado a los reportes descritos, sugiere que se requiere probablemente de un estímulo mayor para observar algún posible papel de la PRL sobre estas células.

Existen numerosos estudios que han demostrado el rol de la PRL sobre los astrocitos. Muchos de estos estudios demuestran que la PRL tiene efectos mitogénicos sobre este tipo celular, de acuerdo con informes que muestran la proliferación de astrocitos después del tratamiento con PRL *in vitro* y en el hipotálamo lesionado (DeVito et al., 1992,1993, 1995b; Mangoura et al., 2000). Por otra parte, estudios con cultivos de astrocitos al ser tratados con PRL mostraron que expresan más el gen del RPRL. DeVito et al. (1995a, b) mostraron que el tratamiento con PRL aumentó la expresión de factores inmunorreguladores como las citocinas por astrocitos incluyendo el factor de necrosis tumoral (TNF- α) tanto *in vitro* como después del tratamiento del hipotálamo lesionado. En nuestro estudio, se inyectó PRL a crías de rata macho del día PN1 al PN14 y se encontró que esta hormona disminuye la densidad por área de los astrocitos en el hilus hipocampal con respecto al grupo VEH (**Figura 14**). Estudios anteriores de nuestro laboratorio utilizando Fluorojade B no revelaron efectos significativos del tratamiento con PRL sobre la muerte celular en el giro dentado del hipocampo (Lajud et al., 2013). Estos hallazgos junto con nuestros resultados sugieren que la PRL disminuye la proliferación de astrocitos en lugar de inducir la muerte celular. Esto está de acuerdo con estudios recientes realizados en animales hiperprolactinémicos, los cuales mostraron una reducción de la expresión de GFAP en la retina al ser expuestos a daño por exposición a la luz brillante, por lo que la PRL parece limitar la gliosis que acompaña al daño retinal (Arnold et al.,

2014). Estos autores además observaron que ratones deficientes para el receptor de PRL presentaban niveles bajos de los factores tróficos bFGF, GDNF, and BDNF en la retina, sugiriendo que la PRL actúa como un factor trófico en este tejido. Por todo lo anterior, es claro que la PRL tiene efectos tróficos sobre los astrocitos y actúa como un regulador de las interacciones entre células gliales y neuronas.

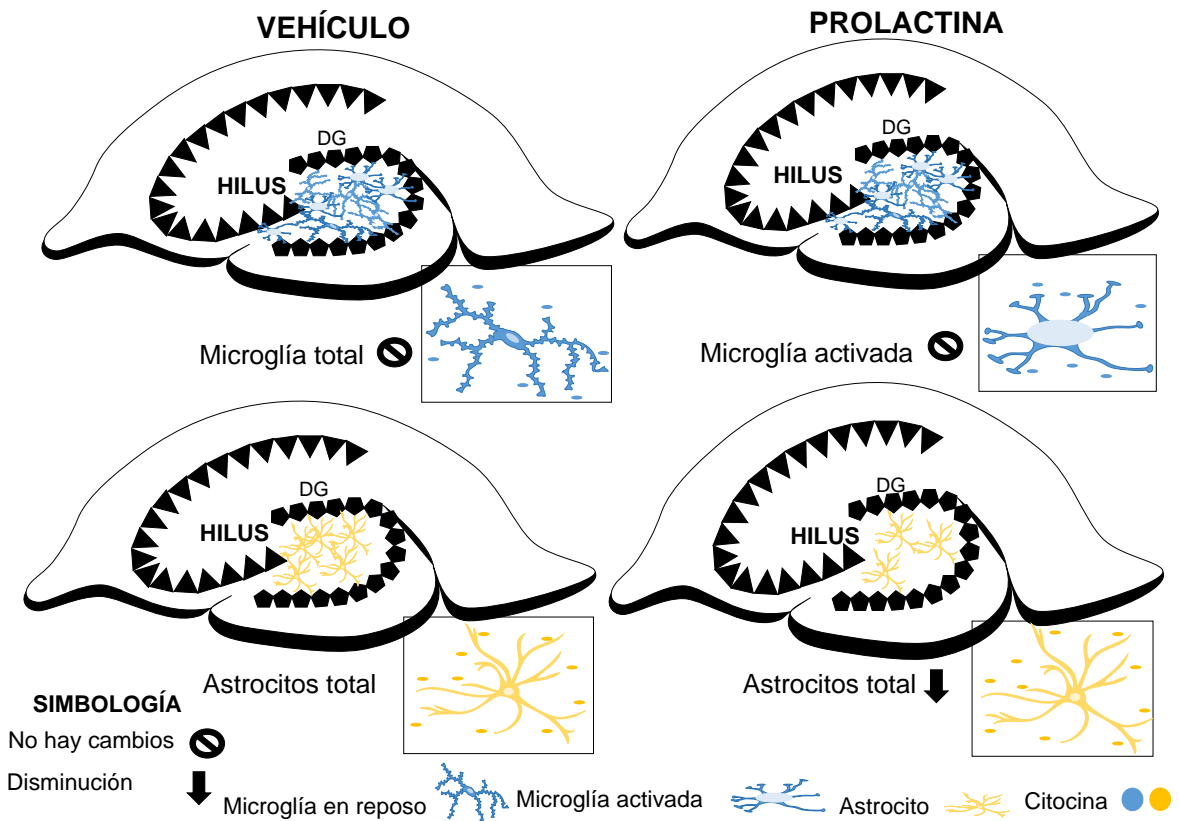


FIGURA 14. La PRL no altera la población de células microgliales pero si induce cambios en la población de células astrogiales en el hilus hipocampal en crías de rata macho al PN15. Se ilustra la densidad total de las células microgliales así como el número total de microglía activada, la PRL no induce cambios significativos en las células microgliales en el hilus hipocampal. Sin embargo la PRL disminuye la densidad total de astrocitos en el hilus hipocampal en crías de rata macho al PN15.

X. CONCLUSIÓN

Los resultados sugieren que la PRL induce una respuesta proinflamatoria en el hipocampo pero no se refleja en la circulación en condiciones basales. Por otra parte, la PRL también juega un papel inhibitorio de la respuesta neuroinmune inducida por el estrés agudo. En contraste, la PRL promueve un aumento de los niveles de TNF- α en la circulación bajo condiciones de estrés. La PRL disminuye la densidad total de los astrocitos en el hilus hipocampal.

XI. REFERENCIAS

1. Aloisi F. (2001) Immune function of microglia. *Glia* 36: 164-79.
2. Allen, S. H., Sharp, G. C., Wang, G., Conley, C., Takeda, Y., Conroy, S. E., Walker, S. (1996). Prolactin levels and antinuclear antibody profiles in women tested for connective tissue disease. *Lupus*, 5: (30)–7.
3. Alliot, F., Godin, I., & Pessac, B. (1999). Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Dev Brain Res*, 117(2), 145–152.
4. Amaral, D. G, Witter, M. P. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience*; 31(3):571-91.
5. Andriezen, W. L. (1893).The neuroglia elements in the human brain. *Br Med J*. 2.(1700):227-30.
6. Arnold, E., Thebault, S., Baeza-cruz, G., Arredondo Zamarripa, D., Adán, N., Quintanar-Stéphano, A., Condés-Lara, M., Rojas-Piloni, G., Binart, N., Martínez de la escalera, G., Clapp, C. (2014). The hormone prolactin is a novel, endogenous trophic factor able to regulate reactive glia and to limit retinal degeneration. *J neurosci*. 34(5): 1868-1878.
7. Ashwell, K. W., Holländer, H., Streit, W., & Stone, J. (1989). The appearance and distribution of microglia in the developing retina of the rat. *Vis Neurosci*. 2(5): 437–448.
8. Azzimondi, G., Bassein, L., Nonino, F., Fiorani, L., Vignatelli, L., Re, G. (1995). Fever in acute stroke worsens prognosis. A prospective study. *Stroke*. 26(11)2040–3.
9. Barone, F. C., Arvin, B, White, R. F., Miller, A., Webb, C. L., Willette, R. N., Lysko, P. G., Feuerstein, G. Z. (1997). Tumor necrosis factor-alpha. A mediator of focal ischemic brain injury. *Stroke*. 28:1233–44.
10. Barón, M., & Gallego, A. (1972). The relation of the microglia with the pericytes in the cat cerebral cortex. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*. 128(1):42–57. Brue, T.,
11. Bautista, E., & Dueñas, Z. (2012). Maternal separation during breastfeeding induces changes in the number of cells immunolabeled to GFAP. *Psychology & Neuroscience*, 5, 207-213.
12. Bazan, J. F. (1989). A novel family of growth factor receptors: a common binding domain in the growth hormone, prolactin, erythropoietin and IL-6 receptors, and the p75 IL-2 receptor beta-chain. *Biochem Biophys Res Commun*; 164(2):788-795.

13. Bole-Feysot, C., Goffin, V., Ederly, M., Binart, N., Kelly, P. A. (1998). Prolactin PRL and its receptor: actions signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev.* 19(3):225-268.
14. Bush, T. G., Puvanachandra, N., Horner, C. H., Polito, A., Ostefeld, T., Svendsen, C. N, Mucke, L., Johnson, M. H., Sofroniew, M. V. (1999). Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron.* 23(2):297-308.
15. Buttini, M., Sauter, A., Boddeke, H. W. (1994). Induction of interleukin-1 beta mRNA after focal cerebral ischaemia in the rat. *Brain Res Mol Brain Res.* 23(1-2):126-34.
16. Buttini, M., Appel, K., Sauter, A., Gebicke-Haerter, P. J., Boddeke, H. W. (1996). Expression of tumor necrosis factor alpha after focal cerebral ischaemia in the rat. *Neuroscience.* 71(1):1-16.
17. Caruso, E., Marange, I., Hoffmann, T., Evrin, M., Gunz, G., Benkirane, M., Jaquet. (1992). Immunoradiometric analysis of circulating human glycosylated and nonglycosylated prolactin forms: spontaneous and stimulated secretions. *J Clin Endocrinol Metab.* 75(5):1338-1344.
18. Castillo, J., Rodriguez, I. (2004). Biochemical changes and inflammatory response as markers for brain ischaemia: molecular markers of diagnostic utility and prognosis in human clinical practice. *Cerebrovasc Dis.* 17 Suppl 1:7-18.
19. Chaboub, L. S., & Deneen, B. (2012). Developmental origins of astrocyte heterogeneity: the final frontier of CNS development. *Dev Neurosci.* 34(5): 379-388.
20. Chan, W. Y., Kohsaka, S., Rezaie, P. (2007). The origin and cell lineage of microglia-New concepts. *Brain Res Rev.* 53(2):344-354.
21. Chesnokova, V., Melmed S. (2002). Minireview: neuro-immuno-endocrine modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (hpa) axis by gp130 signaling molecules. *Endocrinology.* (5):1571-1574.
22. Chicurel, M. E, Harris, K. M, (1992). Three-dimensional analysis of the structure and composition of CA3 branched dendritic spines and their synaptic relationships with mossy fiber boutons in the rat hippocampus. *J Comp Neurol;* 325(2):169-82.
23. Chikanza, I. C. (1999). Prolactin and neuroimmunomodulation: in vitro and in vivo observations. *Ann N Y Acad Sci.* 876:119-30.

24. Chung, I. Y., Norris, J. G., Benveniste, E. N. (1991) Differential tumor necrosis factor alpha expression by astrocytes from experimental allergic encephalomyelitis-susceptible and -resistant rat strains. *J Exp Med* 173(4):801-811.
25. Cejkova, P., Fojtikova, M., Cerna, M. (2009). Immunomodulatory role of prolactin in diabetes development. *Autoimmun Rev.* 9(1):23-7.
26. Cuadros, M. A., Martin, C., Coltey, P., Almendros, A., Navascués, J. (1993). First appearance, distribution and origin of macrophages in the early development of the avian central nervous system. *J Comp Neurol.* 330(1) 113-129.
27. Cuenca-López, M. D., Brea, D., Segura, T., Galindo, M. F., Antón-Martínez, D., Agulla, J., Jordán, J. (2010). Inflammation as a therapeutic agent in cerebral infarction: celular inflammatory response and inflammatory mediators. *Rev Neurol.* 50 (6):349-359.
28. Clodi, M., Svoboda, T., Kotzmann, H., Deyssig, R., Woloszczuk, W., Zielinski, C. C, Luger A. (1992). Effect of elevated serum prolactin concentrations on cytokine production and natural killer cell activity. *Neuroendocrinology.* 56(6):775-9.
29. Dardenne, M., de Moraes Mdo, C., Kelly, P. A., Gagnerault, M. C. (1994). Prolactin receptor expression in human hematopoietic tissues analyzed by flow cytometry. *Endocrinology.*134(5)2108-2114.
30. Deb, S., Tessier, C., Prigent-Tessier, A., Barkai, U., Ferguson-Gottschall, S., Srivastava, R. K, Faliszek, J., Gibori, G. (1999).The expression of interleukin-6 (IL-6), IL-6 receptor, and gp130-kilodalton glycoprotein in the rat decidua and a decidual cell line: regulation by 17beta-estradiol and prolactin. *Endocrinology.* 140(10):4442-50.
31. DeVito, W. J., Okulicz, W. C., Stone, S., Avakian, C. (1992). Prolactin-stimulated mitogenesis of cultured astrocytes. *Endocrinology.* 130(5)2549-2556.
32. DeVito, W. J., Avakian, C., Stone, S., Okulicz, W. C., (1993). Prolactin-stimulated mitogenesis of cultured astrocytes is mediated by a protein kinase C-dependent mechanism. *J Neurochem.* 60(3)832–842.
33. DeVito, W. J., Avakian, C., Stone, S., Okulicz, W. C., Tang, K. T., Shamgochian, M. (1995). Prolactin induced expression of interleukin-1 alpha, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-alpha in cultured astrocytes. *J Cell Biochem.* 57(2)290-298.

34. Devito, W. J., Stone, S., Shamgochian, M. (1995). Prolactin induced expression of glial fibrillary acidic protein and tumor necrosis factor-alpha at a wound site in the rat brain. *Mol cell endocrinol.* 108(1-2):125-130.
35. Devito, W. J., Avakian, C., Stone, S., Okulicz, W. C., Tang, K. T., Shamgochian, M. (1995b). Prolactin induced expression of interleukin-1 alpha, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-alpha in cultured astrocytes. *J Cell Biochem.* 57(2):290-298.
36. DeVito, W. J., Stone, S., Shamgochian, M. (1995b). Prolactin induced expression of glial fibrillary acidic protein and tumor necrosis factor alpha at a wound site in the rat brain. *Mol Cell Endocrinol.* 108(1-2)125-130.
37. Díaz, S., Serón-Ferrém, M., Cárdenas, H., Schiappacasse, V., Brandeis, A., and Croxatto, H. B. (1989). Circadian variation of basal plasma prolactin, prolactin response to suckling, and length of amenorrhea in nursing women. *J Clin Endocrinol Metab* 68(5)946-955.
38. Diz-Chaves, Y, Pernía, O., Carrero, P., Garcia-Segura, LM. (2012). Prenatal stress causes alterations in the morphology of microglia and the inflammatory response of the hippocampus of adult female mice. *J Neuroinflammation.* 20;9:71.
39. DiMattia, G. E., Gellersen, B., Bohnet, H. G., Friesen, H. G. (1988). A human B-lymphoblastoid cell line produces prolactin. *Endocrinology.* 122(6):2508-2517.
40. Draca, S. (1995) Prolactin as an immunoreactive agent. *Immunol Cell Biol.* 73(6)481-483.
41. Arnold, E., Thebault, S., Baeza-Cruz, G., Arredondo Zamarripa, D., Adán, N., Quintanar-Stéphano, A., Condés-Lara, M., Rojas-Piloni, G., Binart, N., Martínez de la Escalera, G., Clapp C. (2014).The Hormone Prolactin Is a Novel, Endogenous Trophic Factor Able to Regulate Reactive Glia and to Limit Retinal Degeneration. *J Neurosci.* 34(5):1868 -1878.
42. Emanuele, N. V., Metcalfe, L., Wallock, L., Tentler, J., Hagen, TC., Beer, CT., Martinson, D., Gout, PW., Kirsteins, L., Lawrence, A. M. (1987). Extrahypothalamic brain prolactin: characterization and evidence for independence from pituitary prolactin. *Brain res.* 421(1-2)255-262.
43. Ekdahl, C. T., Claasen, J. H., Bonde, S., Kokaia, Z., Lindvall, O. (2003). Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(23)13632-7.

44. Fahie-Wilson, M. N, John, R., Ellis, A. R. (2005). Macroprolactin; high molecular mass forms of circulating prolactin. *Ann Clin Biochem.* 42(Pt):175-192.
45. Ferrara, N., Clapp, C., Weiner, R. (1991). The 16K fragment of prolactin specifically inhibits basal or fibroblast growth factor stimulated growth of capillary endothelial cells. *Endocrinology.* 129(2)896-900.
46. Freeman, M., Kanycska, B., Lerant, A., Nagy, G. (2000). Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev.* 80(4)1523-1631.
47. Markianos, M., Koutsis, G., Evangelopoulos, M. E., Mandellos, D., Sfagos, C. (2010). Serum and cerebrospinal fluid prolactin levels in male and female patients with clinically isolated syndrome or relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neuroendocrinol.* 22(6)503-8.
48. Frotscher, M., Seress, L., Schwerdtfeger, W. K., Buhl, E. (1991). The mossy cells of the fascia dentate: a comparative study of their fine structure and synaptic connections in rodents and primates. *J Comp Neurol.* 312(1)145-63.
49. Gala RR. (1991). Prolactin and growth hormone in the regulation of the immune system. *Proc Soc Exp Biol Med.* 198(1)513-527.
50. Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M. F., Conway, S. J., Ng, L. G., Stanley, E. R., Samokhvalov, I. M., Merad, M. (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science.* 330(6005): 841-845.
51. Goffin, V., Bouchard, B., Ormandy, C. J., Weimann, E., Ferrag, F., Touraine, P., Bole-Feysot, C., Maaskant, R. A., Clement-Lacroix, P., Ederly, M., Binart, N., Kelly, P. A. (1998). Prolactin: a hormone at the crossroads of neuroimmunoendocrinology. *Ann N Y Acad Sci.* 840:498-509.
52. Gregg, C., Shikar, V., Larsen, P., Chojnacki, A., Yong, V. W., Weiss, S. (2007). White matter plasticity and enhanced remyelination in the maternal CSN. *Neurosci* 27(8):1812-23.
53. Gutiérrez-Barroso, A., Anaya-López, J. L., Lara-Zárate, L., Loeza-Lara, P. D., López-Meza, J. E., Ochoa-Zarzosa, A. (2008). Prolactin stimulates the internalization of *Staphylococcus aureus* and modulates the expression of inflammatory response genes in bovine mammary epithelial cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 121(1-2):113-22.
54. Glass, C. K., Saijo, K., Winner, B., Marchetto, M. C., Gage, F. H. (2010). Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell.* 140(6)918-34.
55. Handa, R. J., Weiser, M. J. (2013). Gonadal steroid hormones and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Front Neuroendocrinol.* 35(2):197-220.
56. Haqqani, A. S., Nesic, M., Preston, E., Baumann, E., Kelly, J., Stanimirovic, D. (2005). Characterization of &vascular protein expression patterns in cerebral

ischemia/reperfusion using laser capture microdissection and icat-nanolc-
ms/ms. *FASEB J.*;19(13):1809-21.

57. Harlan, R. E., Shivers, B. D., Fox, S. R., Kaplove, K. A., Schachter, B. S., Pfaff, S. W. (1989). Distribution and partial characterization of immunoreactive prolactin in the rat brain. *neuroendocrinology* 49(1)7-22.
58. Herbomel, P., Thisse, B., Thisse, C. (2001). Zebrafish early macrophages colonize cephalic mesenchyme and developing brain, retina and epidermis through aM-CSF receptor-dependent invasive process. *Dev Biol.* 238(2):274-288.
59. Herrmann, O., Tarabin, V., Suzuki, S., Attigah, N., Coserea, I., Schneider, A., Vogel, J., Prinz, S., Schwab, S., Monyer, H., Brombacher, F., Schwaninger, M. (2003). Regulation of body temperature and neuroprotection by endogenous interleukin-6 in cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 23(4)406-15.
60. Hewett, J. A. (2009). Determinants of regional and local diversity within the astroglial lineage of the normal central nervous system. *J. Neurochem.* 110(6): 1717-1736.
61. Hickey, W. F. (2001). Basic principles of immunological surveillance of the normal central nervous system. *Glia*; 36(2):118-24.
62. Hochstim, C., Deneen, B., Lukaszewicz, A., Zhou, Q., Anderson, D. J. (2008). Identification of positionally distinct astrocyte subtypes whose identities are specified by a homeodomain code. *Cell* 133(3):510-22.
63. Holmes, M. C. (2001). Early life stress can programme our health. *J Neuroendocrinol.* 13(2)111-2.
64. Ishizuka, N., Weber, J., Amaral, D. G. (1990). Organization of intrahippocampal projections originating from CA3 pyramidal cells in the rat. *J Comp Neurol.* 295(4)580-623.
65. Jack, C. S., Arbour, N., Manusow, J., Montgrain, V., Blain, M., McCrea, E., Shapiro, A., Antel, J. P. (2005). TLR signaling tailors innate immune responses in human microglia and astrocytes. *J Immunol.* 175(7) 4320-30.
66. Jara, L. J., Irigoyen, L., Ortiz, M. J., Zazueta, B., Bravo, G., Espinoza, LR. (1998). Prolactin and interleukin-6 in neuropsychiatric lupus erythematosus. *8 Clin Rheumatol.* 17(2):110-4.
67. Joels, M., Baram, T. Z., (2009). The neuro-symphony of stress. *Nat Rev Neurosci.* 10(6) 459-66.
68. Khalaf-Nazzal, R., Francis, F. (2013). Hippocampal development - old and new findings. *Neuroscience.* 248:225-42.
69. Kierdorf, K., Erny, D., Goldmann, T., Sander, V., Schulz, C., Perdiguero, E. G., Wieghofer, P., Heinrich, A., Riemke, P., Hölscher, C., Müller, D. N., Luckow, B., Broucker, T., Debowski, K., Fritz, G., Opdenakker, G., Diefenbach, A., Biber, K., Heikenwalder, M., Geissmann, F., Rosenbauer, F., Prinz, M. (2013). Microglia

- emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways. *Nat Neurosci.* (3):273-80.
70. Kim, S. M., Ganguli, S., Frank, L. M. (2012). Spatial information outflow from the hippocampal circuit: distributed spatial coding and phase precession in the subiculum. *J Neurosci.* 32(34):11539-58.
71. Kriegstein, A. R., Noctor, S. C. (2004). Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex. *Trends Neurosci.* 27(7):392-9.
72. Kucharz, E. J., Jarczyk, R., Jonderko, G., Rubisz-Brezezinska, J., Brzezinska Wcislo, L. (1996). High serum level of prolactin in patients with systemic sclerosis. *Clin Rheumatol.* 15(3):314.
73. Laurberg, S., Sorensen, K. E. (1981). Associational and commissural collaterals of neurons in the hippocampal formation (hilus fasciae dentate and subfield CA3. *Brain Res.* 212(2):287-300.
74. Lajud, N., Zapien, R. G., Roque, A., Tinajero, E., Valdez, J. J., Clapp, C., Torner, L. (2013). Prolactin administration during early postnatal life decreases hippocampal and olfactory bulb neurogenesis and results in depressive-like behavior in adulthood. *Hormones and behavior.* 64(5):781-9.
75. Lavenex, P., Suzuki, W. A., Amaral, D. G. (2004). Perirhinal and parahippocampal cortices of the macaque monkey: Intrinsic projections and interconnections. *J Comp Neurol.* 472(3):371-94.
76. Leaños, A., Pascoe, D., Fraga, A., Blanco-Favela, F. (1998). Anti-prolactin autoantibodies in systemic lupus erythematosus patients with associated hyperprolactinemia. *Lupus.* 7(6):398-403.
77. Lewis, P. D. (1968). The fate of the subependymal cell in the adult rat brain, with anote on the origin of microglia. *Brain* 91(4):721-36.
78. Liu, T., Clark, R. K., McDonnell, P. C., Young, P. R., White, R. F., Barone, F. C., Feuerstein, G. Z. (1994). Tumor necrosis factor-alpha expression in ischemic neurons. *Stroke.* 25(7):1481-8.
79. Luo, X., Ikeda, Y., Parker, K. L. (1994). A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *cell* 77(4):481-90.
80. Lund S, Christensen KV, Hedtjörn M, Mortensen AL, Hagberg H, Falsig J, Hasseldam, H., Schratzenholz, A., Pörzgen, P., Leist, M. (2006). The dynamics of the LPS triggered inflammatory response of murine microglia under different culture and in vivo conditions. *J Neuroimmunol.* 180(1-2):71-87.
81. Malatesta, P., Hartfuss, E., Götz, M. (2000). Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development.* 127(24):5253-63.

82. Malatesta, P., Hack, M. A., Hartfuss, E., Kettenmann, H., Klinkert, W., Kirchhoff, F., Götz, M. (2003). Neuronal or glial progeny regional differences in radial glia fate. *Neuron*. 37(5):751-64.
83. Mangoura, D., Pelletiere, C., Leung, S., Sakellaridis, N., Wang, D. X. (2000). Prolactin concurrently activates Src-PLD and JAK/Stat signaling pathways to induce proliferation while promoting differentiation in embryonic astrocytes. *Int J Dev Neurosci*. 18(17):693-704.
84. Ledesma-Colunga, M. G., Adán, N., Ortiz, G., Solís-Gutiérrez, M., López-Barrera, F., Martínez de la Escalera G., Clapp, C. (2017). Prolactin blocks the expression of receptor activator of nuclear factor κ B ligand and reduces osteoclastogenesis and bone loss in murine inflammatory arthritis. *Arthritis Res Ther*. 19(1):93.
85. Maslar, I. A., Riddick, D. H. (1979). Prolactin production by human endometrium during the normal menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol*. 135(6)751-4.
86. Méndez, I., Cariño, C., Díaz, L. (2005). Prolactin in the immunological system: synthesis and biological effects. *Rev Invest Clin*. 57(3)447-56.
87. Miller, F. D., Gauthier, A. S. (2007). Timing is everything: making neurons versus glia in the developing cortex. *Neuron*. 54(3)357-69.
88. Mödersheim, T. A., Gorba, T., Pathipati, P., Kokay, I. C., Grattan, D.R., Williams, C. E., Scheepens, A. (2007). Prolactin is involved in glial responses following a focal injury to the juvenile rat brain. *Neuroscience*, 145(3):963-73.
89. Molofsky, A. V., Deneen, B. (2015). Astrocyte development: a Guide for the Perplexed. *Glia*. 63(8)1320-9.
90. Monier, A., Adle-Biassette, H., Delezoide, A.-L., Evrard, P., Gressens, P., and Verney, C. (2007). Entry and distribution of microglial cells in human embryonic and fetal cerebral cortex. *J Neuropathol Exp Neurol*. 66(5)372-82.
91. Montgomery, D. W. (2001). Prolactin production by immune cells. *Lupus*. 10(10)665-75.
92. Molofsky, A. V., Krennick, R., Ullian, E., Tsai, H. H., Deneen, B., Richardson, W. D., Barres, B. A., Rowitch, D. H. (2012). Astrocytes and disease: a neurodevelopmental perspective. *Genes Dev*. 26(9)891-907.
93. Morales, A., Bass, N. E., Verhulst, S. J., (1995). Serum prolactin levels and neonatal seizures. *Epilepsia*. 36(4):349-54.
94. Mori, S., Leblond, C. P. (1969). Identification of microglia in light and electron microscopy. *J. Comp. Neurol*. 135(1)57-80.

95. Muroyama, Y., Fujiwara, Y., Orkin, S. H., Rowitch, D. H. (2005). Specification of astrocytes by bHLH protein SCL in a restricted region of the neural tube. *Nature* 438(7066):360-3.
96. Naylor, M. J., Lockfeer, J. A., Horseman, N. D., Ormandy, C. J. (2003). Prolactin regulates mammary epithelial cell proliferation via autocrine/ paracrine mechanism. *Endocrine*. 20(1-2):111-4.
97. Nicoll, C. S., Mayer, G. L., Russell, S. M. (1986). Structural features of prolactin and growth hormones that can be related to their biological properties. *Endocrinology Rev.* 7(2):169-203.
98. Noctor, S. C., Martínez-Cerdeño, V., Ivic, L., Kriegstein, A. R. (2004). Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat Neurosci.* 7(2):136-44.
99. Noctor, S. C., Martínez-Cerdeño, V., and Kriegstein, A. R. (2008). Distinct behaviors of neural stem and progenitor cells underlie cortical neurogenesis. *J Comp Neurol.* 508(1):28-44.
100. Ogata, K., Kosaka, T. (2002). Structural and quantitative analysis of astrocytes in the mouse hippocampus. *Neuroscience.* 113(1):221-33.
101. Orbach, H., Shoenfeld, Y. Hyperprolactinemia and autoimmune diseases. *Autoimmun Rev.* 6(8):537-42.
102. Rezaie, P., Patel, K., Male, D. K. (1999). Microglia in the human fetal spinal cord-patterns of distribution, morphology and phenotype. *Brain Res Dev Brain Res.* 115(1):71-81.
103. Rock, R. B., Gekker, G., Hu, S., Sheng, W. S., Cheeran, M., Lokensgard, J. R., Peterson P. K. (2004). Role of microglia in central nervous system infections. *Clin Microbiol Rev.* 17(4): 942-964.
104. Rigato, C., Buckinx, R., Le-Corronc, H., Rigo, J. M., and Legendre, P. (2011). Pattern of invasion of the embryonic mouse spinal cord by microglial cells at the time of the onset of functional neuronal networks. *Glia* 59(4):675-95.
105. Santos, A. M., Calvente, R., Tassi, M., Carrasco, M.-C., Martín-Oliva, D., Marín-Teva, J. L., et al. (2008). Embryonic and postnatal development of microglial cells in the mouse retina. *J Comp Neurol.* 506(2):224-39.
106. Sauvageot, C. M., Stiles, C. D. (2002). Molecular mechanisms controlling cortical gliogenesis. *Curr Opin Neurobiol.* 12(3):244-49.

107. Schulz, C., Gomez Perdiguero, E., Chorro, L., Szabo-Rogers, H., Cagnard, N., Kierdorf, K., Prinz, M., Wu, B., Jacobsen, S. E., Pollard, J. W., Frampton, J., Liu, K. J., Geissmann, F. (2012). A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science* 336(6077):86-90.
108. Seroogy, K., Tsuruo, Y., Hokfelt, T., Walsh, J., Fahrenkrug, J., Emson, P. C., Goldstein, M. (1988). Further analysis of presence of peptides in dopamine neurons. Cholecystokinin, peptide histidine-isoleucine/vasoactive intestinal polypeptide and substance P in rat supramammillary region and mesencephalon. *Exp Brain Res.* 72(3):523-534.
109. Siaud, P., Manzoni, O., Balmefrezol, M., Barbanel, G., Assenmacher, I., Alonso, G. (1989). The organization of prolactin-like immunoreactive neurons in the rat central nervous system. light- and electronmicroscopic immunocytochemical studies. *cell tissue res* 255(1):107-115.
110. Silver, J., Miller, J. H. (2004). Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci.* 5(2):146-56.
111. Simard, A. R., Soulet, D., Gowing, G., Julien, J. P., Rivest, S., (2006). Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease. *Neuron.* 49(4):489-502.
112. Sofroniew, M. V. (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci.* 32(12):638-47.
113. Sofroniew, M. V., Vinters, H. V., (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 119(1):7-35.
114. Skoff, R. P. (1990). Gliogenesis in rat optic nerve: astrocytes are generated in a single wave before oligodendrocytes. *Dev Biol.* 139(1):149-168.
115. Sorokin, S. P., Hoyt, R. F., Blunt, D. G., McNelly, N. A. (1992). Macrophage development: II. Early ontogeny of macrophage populations in brain, liver, and lungs of rat embryos as revealed by a lectin marker. *Anat Rec.* 232(4):527-550.
116. Smith, C. J., Emsley, H. C., Gavin, C. M., Georgiou, R. F., Vail, A., Barberan, E. M., del Zoppo, G. J., Hallenbeck, J. M., Rothwell, N. J., Hopkins, S. J., Tyrrell, P. J. (2004). Peak plasma interleukin-6 and other peripheral markers of inflammation in the first week of ischaemic stroke correlate with brain infarct volume, stroke severity and long-term outcome. *BMC Neurol.* 15;4:2.
117. Sriram, K., O'Callaghan, J. P. (2007). Divergent roles for tumor necrosis factor-alpha in the brain. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2(2):140-53.

118. Suzuki, W., Amaral, D. G: (2003). Perirhinal and parahippocampal cortices of the macaque monkey: cytoarchitectonic and chemoarchitectonic organization. *J Comp Neurol.* 463(1):67-91.
119. Suzumura, A. (2009). Neurotoxicity by microglia: mechanisms and potential therapeutic strategy. *Fukuoka Igaku Zasshi.*100(7):243-7.
120. Straub, R. H., Zeuner, M., Lock, G., Scholmerich, J., Lang, B. (1997). High prolactin and low dehydroepiandrosterone sulphate serum levels in patients with severe systemic sclerosis. *Br J Rheumatol.* 36(4):426-32.
121. Swinnen, N., Smolders, S., Avila, A., Notelaers, K., Paesen, R., Ameloot, M., Brône, B., Legendre, P., Rigo, J. M. (2013). Complex invasion pattern of the cerebral cortex by microglial cells during development of the mouse embryo. *Glia.* 61(2):150-63.
122. Tang, C., Li, Y., Lin, X., Ye, J., Li, W., He, Z., Li, F., Cai, X. (2014). Prolactin increases tumor necrosis factor alpha expression in peripheral CD14 monocytes of patients with rheumatoid arthritis. *Cell Immunol.* 290(1):164-8.
123. Thompson, S. A. (1982). Localization of immunoreactive prolactin in ependyma and circumventricular organs of rat brain. *Cell Tissue Res.* 225(1):79-93.
124. Tejadilla, D., Cerbón, M., Morales, T. (2010). Prolactin reduces the damaging effects of excitotoxicity in the dorsal hippocampus of the female rat independently of ovarian hormones. *Neuroscience.* 169(3):1178-85.
125. Torner, L., Neuman, I.D. (2002). The brain prolactin system: involvement in stress response adaptations in lactation. *Stress.* 5(4):249-57.
126. Torner, L., Karg, S., Blume, A., Kandasamy, M., Kuhn, H. G., Winkler, J., Aigner, L., Neumann, I. D. (2009). Prolactin prevents chronic stress-induced decrease of adult hippocampal neurogenesis and promotes neuronal fate. *The J Neurosci,* 29 (6):1826-1833.
127. Troung, A. T., Duez, C., Belayew, A., Renard, A., Pictet, R., Bell, G. I, Martial, J. A. (1984). Isolation and characterization of the human prolactin gene. *EMBO J.* 3(2):429-437.
128. Tsai, H. H., Li, H., Fuentealba, L. C., Molofsky, A. V., Taveira-Marques, R., Zhuang, H., Tenney, A., Murnen, A. T., Fancy, S. P., Merkle, F., Kessar, N., Alvarez-Buylla, A., Richardson, W. D., Rowitch, D. H. (2012). Regional astrocyte Allocation regulates CNS synaptogenesis and repair. *Science* 337(6092):358-362.

129. Van Coppenolle, F., Skryma, R., Ouadid-Ahidouch, H., Slomianny, C., Roudbaraki, M., Delcourt, P., Dewailly, E., Humez, S., Crepin, A., Gourdou, I., Djiane, J., Bonnal, J. L., Mauroy, B., Prevarskaya, N. (2004). Prolactin stimulates cell proliferation through a long form of prolactin receptor and k⁺ channel activation. *Biochem J.* 377(Pt 3): 569-78.
130. Verney, C., Monier, A., Fallet-Bianco, C., and Gressens, P. (2010). Early microglial colonization of the human forebrain and possible involvement in periventricular white-matter injury of preterm infants. *J Anat.* 217(4): 436-48.
131. Vezzani, A., Ravizza, T., Balosso, S., Aronica, E. (2008). Glia as a source of cytokines: implications for neural excitability and survival. *Epilepsia.* 49(2):24-32.
132. Vezzani A, Granata T. (2005). Brain Inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence. *Epilepsia.* 46(11):1724-43.
133. Vila, N., Castillo, J., Dávalos, A., Chamorro A., Esteve, A., Planas, A. M., Chamorro, A. (2003). Proinflammatory cytokines and early neurological worsening in ischemic stroke. *Stroke.* 34(3):671-5.
134. Wang, X., Yue, T. L., Barone, F. C., White, R. F., Gagnon, R. C., Feuerstein, G. Z. (1994). Concomitant cortical expression of TNF-alpha and IL-1 beta mRNAs follows early response gene expression in transient focal ischemia. *Mol Chem Neuropathol.* 23(2-3):103-14.
135. Witter, M. P., Wouterlood, F. G., Naber, P. A., Van Haeften, T. (2000). Anatomical organization of the parahippocampal-hippocampal network. *Ann NY Acad Sci.* 911:1-24.
136. Witter, M. P., Amaral, D. G. (1991). Entorhinal cortex of the monkey: V projections to the dentate gyrus, hippocampus, and subicular complex. *J Comp Neurol.* 307(3):437-59.
137. Yamasaki, Y., Matsuura, N., Shozuhara, H., Onodera, H., Itoyama, Y., Kogure, K. (1995). Interleukin-1 as a pathogenetic mediator of ischemic brain damage in rats. *Stroke.* 26(4):676-80.
138. Yang, Y., Higashimori, H., Morel, L. (2013). Developmental maturation of astrocytes and pathogenesis of neurodevelopmental disorders. *J. Neurodev. Disord.* 5(11):22.
139. Yu-Lee, L. Y., Luo, G., Book, M. L., Morris, S. M. (1998). Lactogenic hormone signal transduction. *Biol Reprod.* 58(2):295-301.
140. Zaga-Clavellina, V. Parra-Covarrubias, A. Ramirez-Peredo, J. Vega-Sanchez, R. Vadillo-Ortega, F. (2014). The potential role of prolactin as a

- modulator of the secretion of proinflammatory mediators in chorioamniotic membranes in term human gestation. *Am J Obstet Gynecol.* 211(1):48.e1-6.
141. Zhang, Y., Barres, B. A. (2010). Astrocyte heterogeneity: an underappreciated topic in neurobiology. *Curr Opin Neurobiol.* 20(5):588-594.
142. Zhang, S. J., Ye, J., Couey, J. J., Witter, M., Moser, E. I., Moser, M. B. (2013). Functional connectivity of the entorhinal-hippocampal space circuit. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* Dec 23; 369(1635):20120516.
143. Zhao, S., Chai, X., Frotscher, M. (2007). Balance between neurogenesis and gliogenesis in the adult hippocampus: role for reelin. *Dev Neurosci.* 29(1-2):84-90.