



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

REGULACIÓN DEL EJE PROLACTINA/VASOINHIBINAS EN
ASTROCITOS HIPOCAMPALES A LO LARGO DEL
DESARROLLO

Tesis para obtener el título de

BIÓLOGO

PRESENTA:
FERNANDO MACÍAS PRADO

DIRECTORES:
EDITH ARNOLD HERNÁNDEZ
GONZALO MARTÍNEZ DE LA ESCALERA LORENZO

Junio 2017



Agradecimientos

Agradezco a mi tutor el Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera quién me abrió las puertas para trabajar en su laboratorio y por transmitirme su conocimiento y darme el apoyo que permitió culminar este trabajo. A mi tutora la Dra. Edith Arnold quién gracias a su muy valiosa guía esta tesis fue realizada, gracias por enseñarme y transmitirme esta pasión por la ciencia, por tener la paciencia y el empeño siendo mi guía y amiga en todo este proceso, gracias.

Un enorme agradecimiento a la Dra. Dolores López Morales y la Biol. María Rosete Enríquez que además de ser profesoras con las que me forjé en mi carrera ayudaron con sus acertadas correcciones a la mejora de este trabajo.

Agradezco el apoyo técnico del personal del Instituto de Neurobiología de la UNAM; Dr. Fernando López Barrera, Dr. Gabriel Nava Pinto, Dra. Alejandra Castilla León, MVZ. José Martín García Servín y Elsa Nidia Hernández Ríos.

Gracias a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y en particular a la Facultad de Ciencias Biológicas por la educación y apoyo que recibí en sus instalaciones durante mi carrera. Gracias a mis profesores que me formaron e inculcaron el esfuerzo y la pasión a la biología.

A mis padres Fernando y Rocío, sin ustedes nada de esto hubiera sido posible. Gracias por sus enseñanzas, comprensión y por todo el apoyo que me han dado. A mis hermanos Nanda, Ochi y Ale, muchas gracias por su apoyo. Todos ustedes son la mejor familia que podría pensar.

A mis amigos que durante mi estancia en la universidad me acompañaron tanto en los difíciles momentos (de entrega de proyectos) como en las largas veladas de plática y diversión, se convirtieron en una pieza fundamental de mi vida académica y social; Gracias The Gang: Martín, Lili, Fernanda (Ferkú), Max, Larisa, Paco, Conie y Adri. Al “Neurovasculogial PRL team” Edith, Rodrigo y Miriam quienes gracias a su ayuda y compañía la realización de esta tesis resultó ser una excelente experiencia.

A todos los que me ayudaron a hacer posible este trabajo, gracias.

Índice

Agradecimientos	I
Dedicatoria	II
Índice	III
Lista de figuras	V
Abreviaturas	VI
Resumen	1
1. Introducción	3
1.1 La prolactina	3
1.1.2 Secreción y síntesis de la PRL	3
1.1.3 El receptor de la PRL	4
1.1.3.1 Las vías de señalización del RPRL	4
1.1.4 Acciones de la PRL en el en el sistema nervioso central	5
1.1.4.1 La PRL y la angiogénesis	7
1.2 Las vasoinhibinas	7
1.2.1 La generación de vasoinhibinas	8
1.2.2 Las acciones y las vías de señalización de las vasoinhibinas	9
1.3 El eje PRL/vasoinhibinas	10
1.3.1 El eje PRL/vasoinhibinas en el hipocampo	11
1.4 Los astrocitos	12
1.4.1 Los astrocitos y la PRL	13
1.5 La proteasas en el sistema nervioso central	13
2. Justificación	15
3. Hipótesis	16
4. Objetivos	17
4.1 General	17
4.2 Específicos	17
5. Material y métodos	18
5.1 Animales	18

5.2 Extracción de hipocampos	18
5.3 Cultivos celulares	18
5.4 Inmunocitoquímica	19
5.5 Extractos de astrocitos	20
5.6 Purificación y cuantificación de proteínas	20
5.7 RT-PCR en tiempo real	20
5.8 Ensayo in vitro de corte de la PRL	21
5.9 Western blot	22
6. Resultados	23
6.1 Estandarización del cultivo de astrocitos	23
6.2 Presencia endógena de la PRL y las vasoinhibinas en el hipocampo del ratón	25
6.3 Procesamiento proteolítico de la PRL a vasoinhibinas por extractos hipocampales del ratón	26
6.4 Presencia endógena de la PRL y las vasoinhibinas en astrocitos hipocampales del ratón	29
6.5 Procesamiento proteolítico de la PRL a vasoinhibinas por extractos de astrocitos hipocampales del ratón	30
7. Discusión	32
8. Conclusiones	37
9. Referencias	38

Lista de figuras

Figura 1. Estructura de la PRL.

Figura 2. Activación del receptor de PRL.

Figura 3. Generación de vasoinhibinas.

Figura 4. Disección del hipocampo de ratón neonato.

Figura 5. Proliferación de astrocitos de ratón E16 en cultivo.

Figura 6. Proliferación de astrocitos de ratón neonato en cultivo.

Figura 7. Caracterización inmunocitoquímica de cultivos de astrocitos hipocampales de ratones E16 y neonatos.

Figura 8. Presencia endógena de la PRL y las vasoinhibinas en el hipocampo del ratón.

Figura 9. La PRL es procesada a vasoinhibinas de 16 kDa por la catepsina D hipocampal de ratones E16, neonatos y adultos.

Figura 10. La catepsina D hipocampal corta de manera diferencial a la PRL de acuerdo a la edad.

Figura 11. El hipocampo no presenta actividad proteolítica capaz de generar vasoinhibinas en un pH neutro.

Figura 12. Presencia endógena de la PRL y las vasoinhibinas en astrocitos hipocampales del ratón.

Figura 13. La catepsina D presente en los astrocitos hipocampales genera vasoinhibinas de 16 kDa.

Figura 14. Los astrocitos hipocampales no presentan actividad proteolítica capaz de generar vasoinhibinas en un pH neutro.

Abreviaturas

μg	Microgramos
μm	Micrometros
ACTH	Hormona adrenocorticotropa
AMP	Adenosin monofosfato
AraC	Citocina D-Arabinofuranosido
ARN	Ácido ribonucleico
BHE	Barrera hematoencefálica
BMP 1	Proteína morfogenética de hueso 1
BSA	Albúmina de suero bovino
CO_2	Dióxido de carbono
COOH	Carboxilo
Cq	Ciclo de cuantificación
D2	Receptor de dopamina tipo 2
DA	Dopamina
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DIV	Día in vitro
DMEM	Dubelco's Modified Eagle Medium
E16	Embriones de 16 días de gestación
eNOS	Óxido nítrico endolelial
ERK5	Cinasa reguladora de señal 5
GFAP	Proteína Gliofibrilar Ácida
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HCl	Ácido clorhídrico
IL-1 β	Interleucina 1 β
Jak2	Tirosina cinasa Janus 2
K	Cinasa
kDa	Kilodaltón
MAP2	Proteína asociada a microtúbulos
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos

MMPs	Metaloproteasas de matriz extracelular
NaCl	Cloruro de sodio
NF-kB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
ng	Nanogramos
NH ₂	Amino
P0	Neonatos
PepA	Pepstatina A
pH	Potencial de hidrógeno
PHDA	Neuronas dopaminérgicas periventriculares hipofisiales
PKC	Proteína cinasa C
PRL	Prolactina
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
RPRL	Receptor de prolactina
SNC	Sistema nervioso central
STAT	Proteína transductora de señal y activadora de la transcripción
SVZ	Zona subventricular
TIDA	Neuronas dopaminérgicas tuberoinfundibulares
THDA	Neuronas dopaminérgicas tuberohipofisiales
TNF-alfa	Factor de necrosis tumoral alfa
UFR	Unidades de fluorescencia relativa
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular

Resumen

La prolactina (PRL) y las vasoinhibinas son dos familias de hormonas asociadas en un eje funcional. Las vasoinhibinas, nombradas así por sus efectos inhibitorios en la angiogénesis, vasopermeabilidad y vasodilatación, son sintetizadas a través del corte proteolítico de la PRL, compartiendo con esta la región N-terminal. Su peso molecular varía en un rango de 11 a 18 kDa dependiendo de los sitios de acción (corte) específicos de las proteasas involucradas en su generación, tales como la catepsina D, las metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs) y la proteína morfogenética de hueso 1 (BMP 1). La PRL y las vasoinhibinas han sido detectadas en el hipotálamo de la rata y otras regiones del sistema nervioso central (SNC), sitios dónde producen efectos opuestos entre sí. La administración intracerebroventricular de PRL en la rata causa una reducción de las respuestas neuroendócrinas de ansiedad y estrés, mientras que las vasoinhibinas inducen comportamientos asociados con la depresión y la ansiedad. En este trabajo analizamos la actividad de las enzimas proteolíticas encargadas de cortar a la PRL en vasoinhibinas, particularmente a la catepsina D y las MMP, en tres diferentes etapas del desarrollo hipocampal y la participación de los astrocitos en este proceso. Para ello, obtuvimos hipocampos de embriones de 16 días de gestación (E16), neonatos (P0) y adultos (3.5 meses) de ratones CD-1, así como astrocitos aislados de hipocampos de ratones E16 y neonatos. Las muestras fueron procesadas en una solución amortiguadora de lisis celular e incubadas con 50 ng de una preparación estándar de PRL de rata en una solución de incubación con pH 5 o 7 durante 24h a 37°C en la presencia o ausencia de un inhibidor enzimático como la pepstatina A, la cual inhibe las acciones de la catepsina D. Los niveles de PRL y vasoinhibinas fueron analizados por Western blot y densitometría. Nuestros resultados muestran que la PRL y las vasoinhibinas se expresan de manera diferencial en las distintas etapas del desarrollo. En los extractos hipocampales de embrión y neonato se observaron tres bandas de vasoinhibinas (14, 16 y 18 kDa), mientras que en los extractos de hipocampo de adulto sólo se identificaron dos bandas (14 y 18 kDa) siendo más densa la banda de la vasoinhibina de 17 kDa. La catepsina D hipocampal corta a la PRL en vasoinhibinas de 16 kDa en las tres edades analizadas, mientras que esta misma enzima también produce vasoinhibinas de 16 kDa en los astrocitos aislados. Estos resultados demuestran la presencia

de una regulación del eje PRL/vasoinhibinas mediada por la catepsina D, a lo largo del desarrollo del hipocampo en el ratón.

1. Introducción

1.1 La prolactina.

La prolactina (PRL) es una hormona polipeptídica de 23 kDa formada por una sola cadena de 199 aminoácidos con tres puentes disulfuro intramoleculares (Fig. 1) (Ignakak *et al.*, 2012). Es sintetizada y secretada principalmente por las células lactotrofas de la adenohipófisis (Kandel *et al.*, 2013), sin embargo puede producirse en tejidos y células extrahipofisarias como son el hipotálamo, la placenta, la decidua y el útero, las células epiteliales de la glándula mamaria y los linfocitos, entre otros (Freeman *et al.*, 2000). Fue identificada originalmente debido a que interviene en el desarrollo de las glándulas mamarias y promueve la lactogénesis (Pereira-Suarez *et al.*, 2015), siendo el mayor factor estimulante para la lactancia en el periodo post-parto (Ignakak *et al.*, 2012).

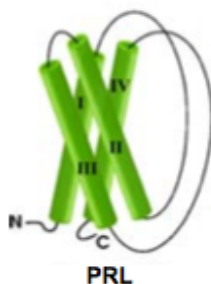


Figura 1. Estructura de la PRL. La PRL está formada por una cadena de 199 aminoácidos con tres puentes disulfuro intramoleculares. Se encuentra organizada en cuatro alfa hélices (I, II, III y IV) conectados por asas en una conformación anti-paralela (Modificado de Clapp *et al.*, 2008).

1.1.2 Secreción y síntesis de la PRL.

La secreción de la PRL es controlada por el efecto inhibitorio de la dopamina (DA), que bloquea tal secreción al unirse al receptor de dopamina tipo 2 (D2) localizado en las células lactotrofas (Schuff *et al.*, 2002). En estas células se genera un flujo de Ca^+ que estimula la producción de la PRL, y la DA inhibe tal flujo, lo cual da lugar a una hiperpolarización de las células que reduce la secreción de la PRL, además se induce la supresión de la adenilato ciclasa y la consecuente reducción del AMP cíclico, lo que provoca la reducción en la

expresión del gen de la PRL (Gregerson, 2003). Las neuronas dopaminérgicas que controlan la secreción de la PRL se encuentran localizadas en el núcleo arcuato del hipotálamo, las cuales de acuerdo a su anatomía son clasificadas en neuronas dopaminérgicas tuberoinfundibulares (TIDA), tuberohipofisiales (THDA) y periventrículo hipofisiales (PHDA). Las neuronas TIDA se originan en el núcleo arcuato dorsomedial y se proyectan a la eminencia media, las neuronas THDA y PHDA pasan la eminencia media y se proyectan a la hipófisis. Estas tres poblaciones de neuronas son reguladas de manera similar, siendo estimuladas por la PRL (Grattan, 2015).

1.1.3 El receptor de la PRL.

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

1.1.3.1 Las vías de señalización del RPRL.

La activación del RPRL involucra una dimerización por la acción de su ligando. Cada molécula de PRL contiene dos sitios de unión a su receptor (sitio 1 y 2) (Fig. 2). La unión de la PRL al sitio 1 es indispensable para la unión del sitio 2 a un segundo receptor, formando así un complejo trimérico (2 receptores, 1 hormona). Tal unión provoca cambios estructurales en el dominio extracelular, que a su vez transmite estos cambios al dominio intracelular, promoviendo la fosforilación de la tirosina cinasa Janus 2 (Jak2). Las cinasas Jak2 se transfosforilan entre ellas y también se encuentran involucradas en la fosforilación de residuos de Tirosina del RPRL (Bole-Feysot *et al.*, 1998; Freeman *et al.*, 2000; Brooks, 2012). La fosforilación del RPRL permite la unión de la proteína transdutora de señal y activadora de la transcripción (STAT). Las proteínas STAT (STAT1, STAT2 y STAT5) son las principales reguladoras en la transducción de las señales de los receptores de citosina, que al

fosforilarse forman dímeros que pueden ser translocados al núcleo celular donde regulan la expresión de numerosos genes (Ignakak *et al.*, 2012). Otra vía de señalización involucrada con la activación del RPRL es la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK). Los residuos de tirosina fosforilados sirven como sitios de anclaje de proteínas adaptadoras (Shc/Grb2/SOS) que conectan al receptor con la cascada de las Ras/Raf/MAPK (Freeman *et al.*, 2000).

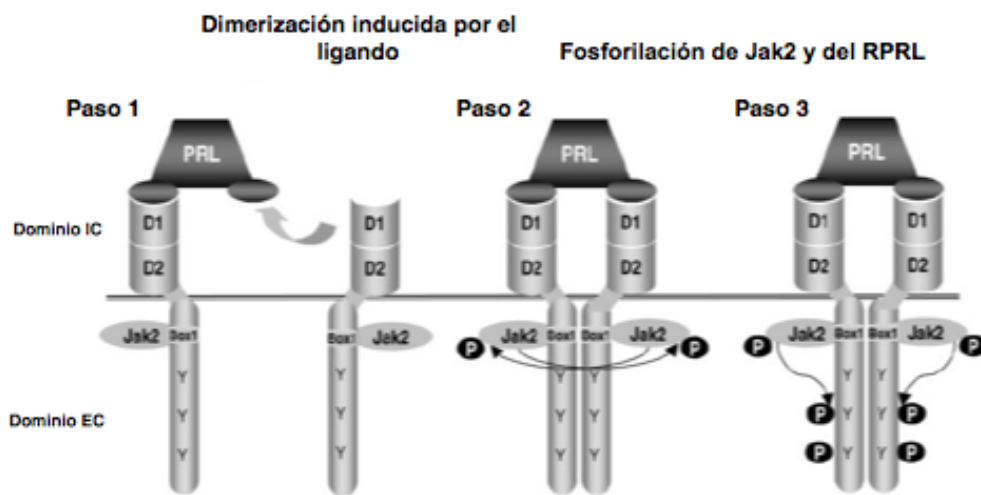


Figura 2. Activación del receptor de PRL. El sitio de unión 1 se une al receptor permitiendo la unión del sitio 2 a un segundo receptor (Paso 1). Ocurre un cambio conformacional que induce la transfosforilación de Jak2 (Paso 2) y a su vez fosforilan (P) los residuos de tirosina (Y) del RPRL (Paso 3) (Modificado de Freeman *et al.*, 2000).

1.1.4 Acciones de la PRL en el Sistema Nervioso Central (SNC).

Además de sus acciones clásicas, la PRL afecta a un amplio espectro de funciones dentro de la homeostasis del organismo, conociéndose hasta ahora alrededor de 300 acciones diferentes (Freeman *et al.*, 2000). Dicha hormona es capaz de modular a una gran variedad de tipos celulares, ejerciendo acciones sobre la reproducción, la osmoregulación y el metabolismo, y la regulación tanto del sistema inmune como del sistema nervioso (Torner, 2016).

La PRL tiene efectos moduladores sobre un amplio número de procesos en el cerebro. La presencia de su receptor (isoformas larga y corta) ha sido reportada en estructuras cerebrales como el núcleo lateral septal, el núcleo paraventricular del tálamo, los plexos coroideos, el núcleo medial de la amígdala, la zona subventricular y el hipotálamo, entre

otras (Brown *et al.*, 2010; Torner *et al.*, 2009). Algunos estudios han sugerido un papel de la PRL en la regulación de funciones neuronales, de excitabilidad y neurotransmisión. Se conoce que es capaz de generar pequeñas corrientes en las neuronas vía canales de Ca^{2+} , así como de modular algunos canales de K^+ (Patil *et al.*, 2014).

La PRL es liberada al flujo sanguíneo en respuesta estímulos que generan estrés (Torner y Neumann, 2000) y contribuye a su reducción a través de la inhibición en la actividad del eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal, la PRL es capaz de regular la secreción de de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) a través de la reducción de impulsos nerviosos en el núcleo paraventricular del hipotálamo, además, en animales sometidos a un estímulo estresante de manera crónica se reportó una correlación inversa entre los niveles de expresión del RPRL y los índices de ansiedad (Torner *et al.*, 2001). La hiperprolactinemia inducida experimentalmente causa efectos antidepresivos en animales sometidos a nado forzado (Torner y Neumann, 2000) e incluso dicho estrés puede causar la expresión del RPRL (isoforma larga) en las células de los plexos coroideos.

La PRL también es capaz de regular la neurogénesis en estructuras como el hipocampo, la zona subventricular (SVZ) y el bulbo olfatorio, dónde ha sido encontrado el RPRL (Torner, 2016). Su presencia se ha correlacionado con un incremento en la neurogénesis en tratamientos antidepresivos y en hembras gestantes (Larsen y Grattan, 2012; Walker *et al.*, 2012). Por otro lado, la PRL presenta un efecto neuroprotector bajo condiciones de estrés y daño tisular (Tejadilla *et al.*, 2010; Torner *et al.*, 2009). Ha sido identificada como un regulador de la proliferación de las células neurales (Torner *et al.*, 2009) ayudando a la regeneración y migración de células madre que dan origen a neuronas, oligodendrocitos y astrocitos (Pathipati *et al.*, 2011). Las acciones de la PRL en el SNC se encuentran mediadas por la activación de la cinasa reguladora de señal 5 (ERK5) que está expresada en los nichos neurogénicos del cerebro (Wang *et al.*, 2013). También estimula los niveles de expresión de la nestina y de la proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP2), por lo que la PRL estimula la síntesis de proteínas del citoesqueleto, lo que podría contribuir a la diferenciación celular (Havránek *et al.*, 2014).

En la glía, la PRL promueve la capacidad de mielinización de los oligodendrocitos (Gregg *et al.*, 2007), estimula la mitogénesis, la proliferación y la diferenciación de los astrocitos (Mangoura *et al.*, 2000) y regula la expresión de citocinas en la microglía, por lo que posee un papel regulador en la neuroinflamación (Mödersheim *et al.*, 2007).

1.1.4.1 La PRL y la angiogénesis.

El sistema vascular es el responsable del transporte de un vasto número de moléculas que controlan cientos de funciones en el organismo, lo que lo convierte en uno de los mayores reguladores de la homeostasis. La angiogénesis es la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes, proceso que es crítico en la organogénesis y el correcto desarrollo del embrión (Yang y Friedl, 2015). En el adulto, dicho proceso está relacionado con la función del aparato reproductor femenino, la reparación de tejidos y con patologías como el cáncer, las retinopatías, la artritis, la obesidad, la aterosclerosis, el asma y la psoriasis (Clapp *et al.*, 2009). La PRL es capaz de estimular la proliferación de células endoteliales a través de la activación de la STAT5 (Yang y Friedl, 2015). Induce la producción del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) en células del endotelio mamario, por la vía de señalización de Jak2-MAP KK (Goldhar *et al.*, 2005). También estimula la expresión del factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) en células de la decidua y del VEGF en macrófagos (Clapp *et al.*, 2008).

La regulación de la angiogénesis por parte de la PRL resulta también en la inducción de efectos opuestos a los ya mencionados. La regulación de la inhibición y activación de dicho proceso por una misma hormona es posible a través de un corte proteolítico específico el cual controla los estadios pro y anti-angiogénicos (Clapp *et al.*, 2006). Con el corte proteolítico de la PRL se da lugar a una familia de moléculas caracterizadas por tener efectos antiangiogénicos denominadas vaso-inhibinas (Clapp *et al.*, 2015).

1.2 Las vaso-inhibinas.

Las vaso-inhibinas, antiguamente llamadas "PRL 16k", son una familia de péptidos derivados de la PRL a través de un corte proteolítico del que resultan moléculas con tamaños de entre 11 y 18 kDa, que comparten todas la región NH₂-terminal de la PRL y poseen propiedades anti-angiogénicas (Triebel *et al.*, 2015). La actividad biológica de las vaso-inhibinas se le atribuye a la región NH₂-terminal debido a que los fragmentos COOH-terminal carecen de las propiedades ya mencionadas (Clapp *et al.*, 2006).

Las vaso-inhibinas fueron detectadas por primera vez en células de la pituitaria, sin embargo, hasta el momento también se conoce que pueden ser producidas en la próstata, la glándula

mamaria, los condrocitos, el riñón, el hígado, la retina y el miocardio (Bernard *et al.*, 2015; Triebel *et al.*, 2015).

1.2.1 La generación de vasoinhibinas.

La producción de vasoinhibinas ocurre a través del corte proteolítico de la PRL por la acción de diferentes enzimas endógenas como la catepsina D, las metaloproteasas de matriz extracelular y la proteína morfogenética de hueso 1 (BMP-1) (Fig. 3).

La catepsina D es una endoproteinasa aspartática que se distribuye en vesículas intracelulares como lisosomas, fagosomas y endosomas (Cruz-Soto *et al.*, 2009). Dentro de sus principales funciones se encuentran la degradación metabólica de proteínas intracelulares, la activación y la degradación de hormonas polipeptídicas y de factores de crecimiento, la activación de precursores enzimáticos, el procesamiento de antígenos cerebrales, la regulación de la apoptosis y de la angiogénesis (Benes *et al.*, 2008).

La catepsina D es catalíticamente más activa a un pH ácido, se ha demostrado que genera vasoinhibinas a pH menores a 5.5 (Clapp *et al.*, 2008). De los primeros reportes que se hicieron en relación al corte proteolítico de la PRL por la catepsina D fue el de Baldocchi *et al.* (1993), quienes realizaron ensayos *in vitro* incubando PRL de rata a un pH ácido con

catepsina D y con explantes de tejido mamario, encontrando que se generaban fragmentos NH₂-terminal de 16kDa. Piwnica *et al.* (2004) reportaron que la PRL humana también era cortada por la catepsina D en extractos de células mamarias, produciendo vasoinhibinas de 15kDa, 16.5kDa y 17kDa. De la misma forma Lkhider *et al.* (2004) encontraron que dicha proteasa es liberada por las células epiteliales de la glándula mamaria, y corta la PRL en vasoinhibinas. En la adenohipófisis también se encontró la actividad de corte de la PRL por la catepsina D,

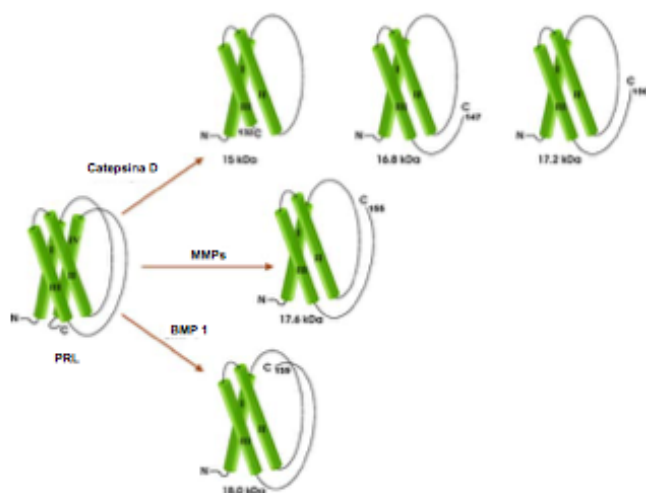


Figura 3. Generación de vasoinhibinas. El procesamiento proteolítico de la prolactina por proteasas como la catepsina D, las metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs) y la proteína morfogenética de hueso 1 (BMP 1) genera fragmentos NH₂-terminal de diferentes tamaños, con actividad antiangiogénica (Modificado de Clapp *et al.*, 2008).

pruebas *in vitro* de corte de PRL a pH 5 con extractos adenohipofisiales demostraron la capacidad de la catepsina D para la generación de vasoinhibinas en dicho tejido (Cruz-Soto *et al.*, 2009).

Las metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs) son un grupo de enzimas proteolíticas que como lo indica su nombre tienen un papel preponderante en la degradación y remodelaje de dicha matriz (Birkedal-Hansen *et al.*, 1993). La familia de las MMPs está compuesta por 28 miembros, las cuales regulan un gran número de procesos biológicos como la reparación de heridas, la angiogénesis, la apoptosis, la organomorfogénesis y la ovulación (Mittal *et al.*, 2016). Macotela *et al.* (2006) encontraron la producción de vasoinhibinas en ensayos *in vitro* de corte de la PRL con extractos de condrocitos de rata y MMPs purificadas, a un pH neutro (pH 6.5, 7, o 7.5). Las vasoinhibinas generadas resultaron ser de 17kDa, 16kDa, 14kDa y 12kDa, siendo partícipes de tal generación las: MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9 y MMP-13.

Por último, la proteína morfogenética de hueso 1 (BMP-1), es una metaloproteasa que tiene roles en la formación de la matriz extracelular y en la activación de factores de crecimiento. Ge *et al.* (2007) describen en sus estudios la capacidad de dicha proteína para cortar la PRL y generar fragmentos anti-angiogénicos de 17kDa .

1.2.2 Las acciones y vías de señalización de las vasoinhibinas.

Contrario a su precursor, las vasoinhibinas se caracterizan por tener efectos inhibitorios sobre la función vascular, interfieren con la actividad de factores de crecimiento vasoactivos como el VEGF, el bFGF, la interleucina (IL-1 β), la bradiquinina y la acetilcolina (Clapp *et al.*, 2015); estimulan la apoptosis de células endoteliales, promoviendo así la regresión de los vasos sanguíneos en la córnea, la retina y el corazón (Clapp *et al.*, 2006). Además, son capaces de bloquear la vasodilatación, la vasopermeabilidad y favorecen acciones pro-inflamatorias (Clapp *et al.*, 2009).

El receptor de las vasoinhibinas aún no ha sido identificado, se conoce que las células endoteliales poseen sitios de unión a vasoinhibinas, saturables y de alta afinidad los cuales son diferentes al RPRL (Clapp *et al.*, 2008). Las vasoinhibinas actúan inhibiendo la activación de la vía de señalización de las MAPK al nivel de Ras y la proteína cinasa G (Clapp *et al.*, 2009) y bloquean la actividad de la síntesis de la óxido nítrico endotelial (eNOS) inhibiendo la vasodilatación (Clapp *et al.*, 2006). Inhiben las transiciones del ciclo celular G₀-G₁ y G₂-M

reduciendo la expresión de la ciclina D-1 y B-1, también aumentan la expresión de los inhibidores de ciclo celular p21cip1 y p27kip1 (Clapp *et al.*, 2008). Inducen la apoptosis promoviendo la activación de NF-kB y las caspasas 8 y 9 que a su vez estimulan a la caspasa 3 y provocan la fragmentación de ADN (Clapp *et al.*, 2015).

El estudio de las vasoinhibinas en el SNC no ha sido hecho a profundidad, habiendo muy pocos estudios sobre el tema. Ferraris *et al.* (2011) encontraron que las vasoinhibinas poseían efectos anti-proliferativos y pro-apoptóticos en las células de la pituitaria. De la misma forma, los estudios de Zamorano *et al.*, 2014 demostraron que la inyección de vasoinhibinas recombinantes en los ventrículos laterales, provoca que estas causen efectos angiogénicos y depresivos, sin embargo aún se desconoce el mecanismo por el cual actúan. Además de su presencia y producción en la adenohipófisis, se desconoce si existe producción de vasoinhibinas en otras estructuras del SNC y cuáles son sus acciones sobre las células de tal sistema

1.3 El eje PRL/vasoinhibinas.

La generación de vasoinhibinas se encuentra bajo una regulación fisiológica que depende de la PRL circulante y la secretada en el tejido. Dadas las acciones complementarias que tienen la PRL y las vasoinhibinas se ha propuesto que dichas hormonas se encuentran organizadas en un eje, que está integrado por el hipotálamo, la adenohipófisis y el tejido blanco (Triebel *et al.*, 2015). Dicho eje se forma debido a las características que tienen ambas hormonas en su regulación y síntesis, las vasoinhibinas son hormonas efectoras cuya regulación fisiológica cambia de acuerdo a diferentes etapas y por la secreción de PRL que provoca que sus concentraciones sean recíprocas. Además las vasoinhibinas no se originan de un gen independiente, puesto que son el resultado de una modificación postraduccional de la PRL, comparte con esta un mismo ARN mensajero (Clapp *et al.*, 2009). Por lo tanto son los niveles y la síntesis de la PRL aunado a la actividad de corte de enzimas como la catepsina D, MMP o BMP-1 lo que determina la concentración de vasoinhibinas.

Las acciones del eje PRL/Vi han sido detectadas en diferentes tejidos, en la retina una desregulación en la producción de vasoinhibinas retino-oculares se encuentra ligada a retinopatías vasoproliferativas; en el corazón altas concentraciones de PRL conllevan a mayores niveles de vasoinhibinas dentro del miocardio ventricular encontrándose relacionados con la miocardiopatía periparto; en la glándula mamaria la catepsina D controla

la producción de vasoinhibinas que participan en su involución; en la placenta y tejido amniótico un exceso en la síntesis de vasoinhibinas puede generar preclampsia y anormalidades en el crecimiento fetal (Triebel *et al.*, 2015).

1.3.1 El eje PRL/vasoinhibinas en el hipocampo.

El hipocampo es una estructura cerebral que pertenece al sistema límbico y tiene un importante papel en la memoria y el aprendizaje. Es una estructura pareada con dos mitades en espejo a la izquierda y derecha del encéfalo (Shepherd, 1998), posee una forma muy característica la cual (en el humano) se asemeja a la de un caballito de mar, razón por la cual que fue denominado de esa manera (Deshmuch y Knierim, 2012).

Se han reportado acciones neuroprotectoras y neurogénicas de la PRL en el hipocampo. El efecto antidepresivo de la PRL se produce a partir de su efecto neurogénico (Torner, 2016), que genera a su vez una mejora en el ánimo. Walker *et al.* (2012) encontraron que la administración de la PRL a un cultivo de células neurales precursoras o directamente sobre el giro dentado, incrementaba de manera significativa el número de progenitores, además el déficit de la PRL causaba una deficiencia en el desarrollo de la memoria y el aprendizaje, situación que se veía mejorada con la administración de PRL recombinante. De la misma forma las investigaciones de Mak y Weiss (2010) demostraron que inyecciones intracerebroventriculares de PRL en ratones macho adultos incrementaba considerablemente la proliferación celular en el giro dentado. Otros reportes demostraron que la PRL ejerce efectos protectores sobre la neurogénesis adulta en el giro dentado bajo condiciones de estrés crónico, probablemente de manera directa a través de su receptor, sin embargo no se encontró un aumento en la proliferación celular (Torner *et al.*, 2009). Por otro lado, Lajud *et al.* (2013) encontraron efectos de la PRL contrarios a los reportados en adultos sobre la neurogénesis, ya que altas dosis administradas en neonatos produjeron una reducción en la proliferación celular, lo que indica que la PRL podría también estar implicada en el desarrollo de estadios patológicos.

Respecto a las acciones neuroprotectoras de la PRL en el hipocampo existen trabajos que relacionan los altos niveles de la PRL durante el periodo lactante con un aumento sobre la arquitectura dendrítica, la plasticidad neuronal y con un decrecimiento en la muerte celular, existiendo una protección contra un daño tisular generado por el ácido kaínico (Morales, 2011). Una administración diaria de PRL bloquea la muerte celular y la neurodegeneración en

la áreas CA1, CA2 y CA3 del hipocampo (Morales *et al.*, 2014; Reyes-Mendoza y Morales, 2016; Tejadilla *et al.*, 2010).

La presencia y acciones de las vasoinhibinas en el hipocampo aún no han sido reportadas, por lo que es importante su estudio para conocer un posible efecto regulador dadas las acciones de la PRL en dicha estructura.

1.4 Los astrocitos.

Los astrocitos son células gliales especializadas que en los mamíferos son las más numerosas del cerebro (Molofsky *et al.*, 2015), superando por más de cinco veces al número de neuronas existentes (Sofroniew y Vinters, 2010). Son fundamentales para la homeostasis del SNC ejerciendo un importante rol en la organización estructural y de soporte del tejido nervioso, forman parte del control de la migración axonal, la regulación sináptica y de los nutrientes (Verkhatsky y Papura, 2016). Los astrocitos son elementos cruciales de la unidad neurovascular, forman un revestimiento alrededor de los vasos sanguíneos conocido como *glia limitans*, que junto con los pericitos y las células endoteliales funcionan como barrera para la entrada de moléculas, iones y células al cerebro, a dicha estructura se le conoce como barrera hematoencefálica (BHE). Los astrocitos regulan la entrega de nutrientes de los capilares a las neuronas, el flujo sanguíneo y la permeabilidad de dicha barrera (Molofsky *et al.*, 2015). La interacción entre los tres tipos celulares que forman la barrera es crucial para su correcto funcionamiento.

De acuerdo a la edad los astrocitos ejercen diferentes funciones, en etapas embrionarias se conoce que funcionan como progenitores neurales y sirven como soporte para la migración (Rakic, 2007), además secretan MMPs y moléculas de señalización para regular el crecimiento dendrítico y axonal (Molofsky *et al.*, 2015). Los astrocitos postnatales participan de manera activa en la formación de sinápsis, conexiones vasculares y en su estabilización (Pfrieger, 2009). Mientras que en la etapa adulta, promueven la supervivencia neuronal en el contexto de la neuroinflamación (Saijo *et al.*, 2009), además de participar en la plasticidad sináptica en regiones como el hipotálamo o el hipocampo (Araque y Navarrete, 2010). También actúan ante el daño tisular, respondiendo ante alguna infección o trauma, sucesos en los que se “activan” lo que resulta en una proliferación e hipertrofia, en un proceso conocido como astrogliosis (Robel *et al.*, 2011). Respecto a la angiogénesis, se ha probado

que los astrocitos son capaces de inducirla a través de la activación de la vías Jagged1 y Notch1 (Zhai *et al.*, 2015),

1.4.1 Los astrocitos y la PRL.

La PRL actúa como un mitógeno para diversos tipos celulares, entre ellos las células de la glía. En los astrocitos se ha probado que la PRL es capaz de estimular su proliferación, DeVito *et al.* (1993) fueron los primeros en demostrar el efecto de la PRL sobre la proliferación de los astrocitos *in vitro*, el cual está regulado por vías de señalización que involucran la activación de la proteína cinasa C (PKC). Además, en ensayos *in vitro* se demostró la presencia del RPRL en dichas células, considerando un posible papel en la respuesta inmune (Modersheim *et al.*, 2007). Mangoura *et al.* (2000) demostraron que la PRL activa vías de señalización mitogénicas que involucran la activación de la fosfolipasa C y activando también vías de señalización que promueven la diferenciación como la vía de las Jak/STAT, en cultivos de astrocitos embrionales de 15 días de gestación. DeVito *et al.* (1995) en ensayos *in vivo* encontraron que la PRL promueve la astrogliosis en sitios con daño tisular, además de que aumenta la expresión de citocinas inflamatorias como TNF-alfa y la interleucina-1- β , lo que también sugiere un papel de la PRL en la regulación de la respuesta inmune de los astrocitos. Estudios más recientes han sugerido un importante papel de la PRL en la recuperación de tejidos tras un daño, Modersheim *et al.* (2007) realizaron estudios *in vivo* que confirmaron una alta correlación de los niveles de PRL circulante con la proliferación de los astrocitos teniendo también un efecto protector. Todos estos resultados indican un importante papel de la PRL en la modulación de la respuesta al daño tisular de los astrocitos así como en su diferenciación y proliferación durante el neurodesarrollo. En contraparte, no se conoce nada sobre las posibles acciones de las vaso-inhibinas en los astrocitos.

1.5 Las proteasas en el sistema nervioso central.

A lo largo del ciclo de vida de los individuos ocurren fenómenos de crecimiento, reordenamiento, maduración y envejecimiento de los tejidos, en la regulación de dichos eventos es requerida la participación de señalizaciones hormonales, factores de crecimiento y de enzimas. En el desarrollo del SNC las enzimas proteolíticas controlan la remodelación del tejido, la migración y la plasticidad celular, a la vez que se encuentran involucradas en procesos de reparación por daño tisular (Wright y Harding, 2005).

Las MMPs se encuentran ampliamente expresadas en el tejido nervioso debido a que están involucradas en el remodelado de la matriz extracelular, participando en la migración celular y la formación de procesos axonales y dendríticos, además su expresión está regulada diferencialmente a lo largo del desarrollo, presentándose niveles más altos durante estadios embrionarios y neonatales (Sekine-Aizawa *et al.*, 2001). En el cerebro se ha reportado la presencia de las MMP-2, -9, -11, -12, -13, -14, -15, y -24, siendo las más frecuentes las MMP-2 y -9 que actúan en la formación de circuitos neuronales en respuesta a la actividad neural o daño tisular (Fujioka *et al.*, 2012).

La catepsina D se encuentra presente de manera general y diferencial en gran parte de los tejidos del organismo, en el SNC participa en procesos de apoptosis y fagocitosis, también posee una capacidad proteolítica selectiva la cual es indispensable en el control del ciclo celular, la migración y la diferenciación del tejido, actuando principalmente durante la angiogénesis y el crecimiento neuronal (Khalkhali-Ellis y Hendrix, 2014). Su expresión también se ha visto relacionada con la edad, ya que participa en procesos de envejecimiento (Stoka *et al.*, 2016). Debido al importante papel que los astrocitos desempeñan en la regulación de la homeostasis del cerebro, estos poseen un rol crítico sobre la respuesta del tejido nervioso. Los astrocitos son también células secretoras de proteasas, las cuales ayudan en la migración celular y el control de la formación de las conexiones sinápticas. En respuesta a diversos estímulos estos pueden ser secretores de enzimas proteolíticas como la catepsina D (Hah *et al.*, 2012) o las MMPs como la MMP-2 y -9 (Hsieh y Yang, 2014; Yang *et al.*, 2015).

2. Justificación

El eje PRL/Vasoinhibinas posee acciones sobre diversos tejidos del organismo, regulando tanto funciones fisiológicas como patológicas. Estas acciones han sido descritas principalmente en el sistema vascular, donde la PRL y las vasoinhibinas poseen efectos contrarios promoviendo o inhibiendo la angiogénesis, respectivamente. La función del SNC depende de una estrecha coordinación entre el tejido neural y el vascular, que ha llevado a acuñar el concepto de unidad neurovascular. Más aún, en el SNC también se ejercen acciones opuestas entre la PRL y las vasoinhibinas (mientras que la primera es ansiolítica, las segundas son ansiogénicas), sin embargo aún se desconocen cuáles son los mecanismos celulares y moleculares que subyace a las acciones de este eje funcional en el SNC. Las acciones resultantes del eje PRL/vasoinhibinas dependen de la concentración de PRL y de la actividad de las enzimas proteolíticas que producen a las vasoinhibinas. Debido a que la expresión de dichas enzimas cambia durante el desarrollo, se propuso investigar particularmente en los astrocitos, células que regulan el sistema neurovascular, la presencia de los distintos elementos que conforman el eje PRL/vasoinhibinas en tres diferentes etapas del desarrollo, como un primer acercamiento para dilucidar la regulación que dicho eje ejerce en la fisiología neural.

3. Hipótesis

El eje PRL/vasoinhibinas está presente en astrocitos del hipocampo, y es regulado de forma diferencial a lo largo del desarrollo del ratón.

4. Objetivos

4.1 General

Investigar en astrocitos hipocampales obtenidos de diferentes etapas del desarrollo del ratón (embrión, neonato y adulto) la expresión del gen de la PRL, la proporción entre la PRL y las vasoinhibinas endógenas, así como la actividad enzimática responsable de la conversión de la primera en las segundas.

4.2 Específicos

1. Estandarizar en ratones CD-1 la disección del hipocampo y el cultivo de astrocitos en embriones de 16 días de gestación (E16), neonatos y adultos de 3.5 meses.
2. Determinar la expresión endógena del gen de la PRL en el hipocampo y astrocitos en las etapas del desarrollo mencionadas.
3. Establecer la proporción endógena entre la PRL y las vasoinhibinas en el hipocampo y astrocitos durante las etapas del desarrollo mencionadas.
4. Comprobar la actividad y la naturaleza enzimática del corte de la PRL a vasoinhibinas en extractos hipocampales y de astrocitos aislados a través de las diferentes etapas del desarrollo.

5. Material y Métodos

5.1 Animales

Fueron utilizados ratones albinos CD-1 de 16 días de gestación (E16), neonatos (P0) y machos adultos de 3.5 meses de edad, obtenidos del bioterio del Instituto de Neurobiología de la UNAM campus Juriquilla, Querétaro. Todos los protocolos experimentales con animales fueron aprobados por el Comité de Ética en Investigación del Instituto de Neurobiología.

5.2 Extracción de hipocampos

Embriones de ratón E16 obtenidos de una ratona gestante sacrificada por asfixia con CO₂, fueron sumergidos en una solución de disección constituida por Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS; 14175-095, GIBCO) y 1% de Penicilina/Estreptomicina (GIBCO). Se abrió el cráneo y se extrajo el cerebro colocándolo en la solución de disección, donde las meninges fueron retiradas. Una vez separados los hemisferios y la materia blanca, quedó expuesto el hipocampo que fue disecado y congelado a -80°C. Por otra parte los ratones neonatos, fueron anestesiados por hipotermia y decapitados, se abrió el cráneo y se extrajo el cerebro, siguiendo el mismo procedimiento que en los ratones embriones para obtener el hipocampo (Fig. 4). Los ratones adultos de 3.5 meses de edad fueron sacrificados por asfixia con CO₂ y decapitados, se disecó el hipocampo como se describió anteriormente.

5.3 Cultivos celulares

Los cultivos primarios de astrocitos fueron obtenidos a partir del hipocampo de ratones CD-1, de edades E16 y neonatos. Debido a la imposibilidad de obtener astrocitos adultos en cultivo estos fueron excluidos de los experimentos subsecuentes. Los hipocampos se incubaron en tripsina al 0.25% (Gibco; 27250-018) en HBSS por 20 minutos a 37°C. Posteriormente el tejido fue centrifugado a 4,000 rpm durante cinco minutos, se aspiró el sobrenadante y el precipitado fue re-suspendido en 10 mL de medio de mantenimiento de astrocitos (Medio DMEM (Dubelco's Modified Eagle Medium; DML10) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS; GIBCO) y 1% de Penicilina/Estreptomicina. El re-suspendido fue colocado en botellas de cultivo celular previamente recubiertas con poli-D-lisina (1µg/mL; SIGMA, P6407) e incubadas a 37°C. El medio de cultivo fue renovado cada tres días. Una vez que los

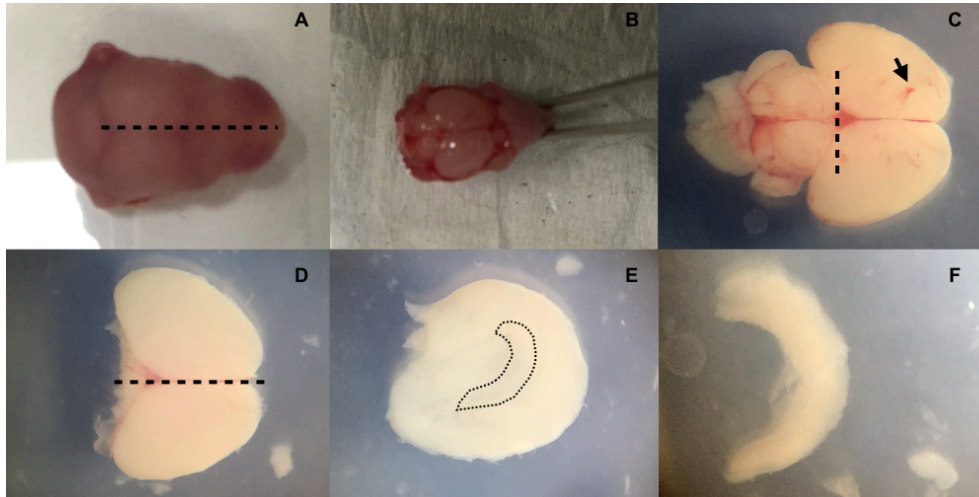


Figura 4. Disección del hipocampo de ratón neonato. A. Ratón neonato decapitado. B. La piel y el cráneo son retirados dejando expuesto el cerebro. C. Cerebro completo, la flecha negra indica una arteria meningea. D. El cerebro después de retirar el cerebelo y las meninges. E. Hemisferio derecho sin meninges y materia blanca, la línea punteada indica la ubicación del hipocampo. F. Hipocampo separado de la corteza. Para todas las imágenes, izquierda: parte posterior, derecha: parte anterior. Las líneas punteadas indican el lugar de incisión.

astrocitos alcanzaron una confluencia del 100%, para retirar la microglía las botellas de cultivos se agitaron a 240 rpm durante 6 horas a 37°C, al término de la agitación se agregó medio fresco suplementado con β -Citocina D-Arabinofuranosido (AraC; C1768-1G, SIGMA) 10 μ M, un agente antimitótico que evita la proliferación y promueve la muerte de la microglia. El medio se cambió 5 días después de la administración del Ara C. Para todos los casos las células fueron utilizadas dos días después del cambio de medio. En los procedimientos descritos a continuación los astrocitos fueron sembrados a una densidad de 50,000 células/cm².

5.4 Inmunocitoquímica

Los astrocitos sembrados en cubre-objetos de vidrio colocados en pozos de placas de cultivo fueron fijados con paraformaldehído al 4% (SIGMA, P6148) en el día 6 *in vitro* (DIV6) y permeabilizados con tritón X-100 (BioRad, 161-0407) al 0.1% en PBS. Se realizó un bloqueo utilizando suero normal de cabra (NGS) al 10% seguido de la incubación con un anticuerpo primario policlonal anti-GFAP (1:1000; EMD Milipore, AB5804) toda la noche a 4°C. Fue utilizado el anticuerpo secundario policlonal anti-conejo (1:5000) fluorescente Alexa Fluor 555. Los cubreobjetos se montaron sobre porta-objetos y el sellado se realizó utilizando 10 μ L de vectashield con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI; Vector Laboratories, 150078555)

para el marcaje de los núcleos. Las imágenes fueron obtenidas utilizando el microscopio confocal LSM 510 (Zeiss) y analizadas con el programa Aim Imagen Examiner (Carl Zeiss microimaging).

5.5 Extractos de astrocitos

Los astrocitos fueron resembrados en placas de cultivo y después de alcanzar el 100% de confluencia se realizaron tratamientos con Ara C 10 μ M para eliminar la microglia sobreviviente. Las células fueron cosechadas y re-suspendidas en 100 μ L de solución de lisis celular para extracción de proteínas (Tris HCl 1M (4103-02, J.T. Baker) pH 7.5, EGTA 0.2M (E-4378, Sigma) pH 7.5, EDTA 0.2M (3002E, Research Organics) pH 7.5, 1% Nonidet PAO 1% (Igepal, CA-630), Ortovanadato de sodio 0.1M (Na₃VO₄, S6508, Sigma), Fluoruro de sodio 0.05M (NaF, S7920, Sigma), Pirofosfato de sodio 5mM (221362, Sigma), Sacarosa 0.26M (4072-05, J.T. Baker)) o en 350 μ L de solución de lisis celular para extracción de ARN (RLT, Kit RNeasy Mini, 74106, Qiagen).

5.6 Purificación y cuantificación de proteínas

Los hipocampos de ratones de las tres edades utilizadas fueron disgregados con un homogeneizador de pistola en solución de lisis celular para extracción de proteínas y posteriormente sonicados a una amplitud del 50% por 5 segundos, por último se procedió a centrifugar (13,200 rpm) por 5 minutos a 4°C. Los extractos de astrocitos se mantuvieron en agitación por 30 minutos y fueron centrifugados a 13,200 rpm por 5 minutos a 4°C. Para todos los casos, se recuperó el sobrenadante y se determinó la concentración de proteínas totales utilizando el ensayo de Bradford (Protein Assay; 500-0006, Bio-Rad) y una curva estándar de albúmina de suero bovino (BSA; Sigma, A4503).

5.7 RT-PCR en tiempo real

Los hipocampos de las tres edades y los astrocitos aislados fueron almacenados a -70°C. Se extrajo y cuantificó el ARN total utilizando el kit comercial RNeasy Mini (74106, Qiagen). 1 μ g fue utilizado para la transcripción reversa utilizando la enzima transcriptasa reversa Superscript III RT (200 U/ μ L) incubando 10 minutos a 25°C, 2 horas a 37°C y 5 minutos a 85°C. 5 μ L fueron usados para la amplificación del ADN complementario por la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR), 15 segundos a 95°C, 30

segundos a la temperatura de alineamiento específica de los primers y 30 segundos a 72°C, por 38 ciclos. Los productos de la PCR fueron detectados y cuantificados utilizando el kit SYBR Green qPCR MasterMix (Thermo Scientific, K0223) en un volumen final de 10µL conteniendo 0.5µM de cada iniciador. La amplificación fue llevada a cabo en un termociclador PCR CFX96 (BioRad). Fueron utilizados iniciadores específicos para el gen de la PRL de ratón (sentido 5' GTT TGA CCG TGT GGT CAT AC 3', y antisentido 5' GGC TTG TTC CTT GTC TTC AG 3' Tm 62°C). Como control de carga se midió la expresión del gen constitutivo ipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (HPRT) ((sentido 5' GTA ATG ATC AGT CAA CGG GGG AC 3', y antisentido 5' CCA GCA AGC TTG CAA CCT TAA CCA 3' Tm 60.2°C). Como control positivo se utilizó hipófisis de ratón.

5.8 Ensayo in Vitro de corte de PRL

La actividad de las enzimas que cortan PRL a vasoinhibinas fue evaluada incubando 50 ng de PRL de rata en 13 µL de solución de incubación pH 7 (Tris base 0.05M (H5135, Promega), NaCl 0.15M (1.064041000, MERCK), CaCl₂ 0.01M (1332, J.T. Baker)) con extractos de hipocampo o astrocitos hipocampales de ratón, llevando a un volumen final de 19 µL. Para la incubación a pH5, 50 ng de PRL de rata, 13µL de solución de Citrato-Fosfatos pH 5 (Ácido cítrico (C-8532, Sigma), Fosfato de sodio bibásico anhidro (3828-05, J.T. Baker)) con NaCl 0.15 M (1.064041000, MERCK) se mezclaron con extractos de hipocampo o astrocitos hipocampales de ratón. En ensayos independientes, un inhibidor de la catepsina D, la pepstatina A a una concentración de 1.4 µM (SLBG8180V, Sigma) fue pre-incubada con los extractos de hipocampo o astrocitos hipocampales por 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se agregaron 50 ng de PRL de rata, 13 µL de la solución de incubación pH 5 y se llevó a un volumen final de 20 µL. En todos los casos la mezcla se incubó a 650 rpm por 24 horas a 37°C (Termomixer confort, Eppendorf) y después de la incubación fue reducida agregando solución de Laemmli (SDS 10% (Sodio Dodecil Sulfato; 161-0302, Bio-Rad), Glicerol 20% (G-6279, Sigma), Azul de Bromofenol 0.5% (161-0404, Bio-Rad), Tris HCl 0.5M (4103-02, J.T. Baker) pH 6.8) más β-Mercapto-Etanol (1:20; 1610710, Bio-Rad) y se hirvió por 5 minutos.

5.9 Western Blot

Para determinar la presencia de PRL y vasoinhibinas en extractos de hipocampos, de astrocitos aislados o del procesamiento proteolítico *in vitro*, fueron utilizados 40µg de proteína total o el volumen total de cada reacción de corte, los cuales se procesaron en geles de poliacrilamida al 15% bajo condiciones reductoras y fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (9004-70-0, Bio-Rad). Posteriormente las membranas fueron incubadas toda la noche a 4°C con el anticuerpo policlonal anti-PRL de ratón (Proporcionada por el Dr. Talamantes, dilución 1:500) o el anticuerpo monoclonal anti-PRL de rata (INN1, dilución 1:500; National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD) el cual detecta la región NH₂-terminal de la PRL, según fuera el caso. Los complejos antígeno-anticuerpo fueron detectados mediante anticuerpos secundarios conjugados a la enzima peroxidasa (SuperSignal West Pico, Thermo Scientific, 34087).

6. Resultados

6.1 Estandarización del cultivo de astrocitos

Para la realización del cultivo de astrocitos fue necesario utilizar entre 10 y 15 ratones por cultivo, dado que así se obtuvo la cantidad de tejido suficiente que permitiera obtener un número de células adecuado para la formación de una monocapa. Después de 24 horas del sembrado fue posible distinguir astrocitos pegados en el fondo de la botella de las dos edades (Fig. 5A y 6A), aunque en los cultivos de E16 se observó mayor cantidad de precursores neurales acompañados de otras formas celulares como la microglía o células precursoras de oligodendrocitos (OPCs). Durante cinco días los astrocitos proliferan exponencialmente y al cabo de este tiempo, cubren totalmente la base de la botella de cultivo por lo que alcanzan una confluencia del 100% (Fig. 5D y 6D). También fue posible distinguir células de la microglía presentes en toda la botella, particularmente en los cultivos de neonatos dónde tales células tuvieron una mayor presencia (Fig. 6D). Dado que al alcanzar la confluencia los astrocitos dejan de proliferar debido a una inhibición del crecimiento por contacto, en ambos casos la agitación por seis horas y el tratamiento con AraC 10 μ M logró eliminar casi totalmente la microglía (Fig. 5E y 6E).

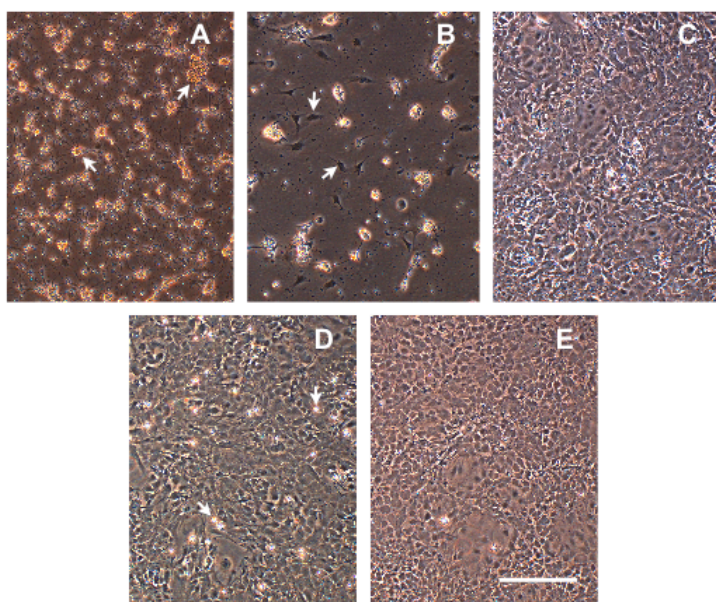


Figura 5. Proliferación de astrocitos de ratón E16 en cultivo. A. DIV1, primeros astrocitos pegados en la botella, hay una alta presencia de neuronas y OPCs (flechas blancas). B. DIV2, comienza la proliferación de astrocitos (flechas blancas). C. DIV3, se forma una monocapa de astrocitos en diversas áreas de la botella de cultivo. D DIV5, se alcanza una confluencia del 100%, la microglía se encuentra presente en todo el cultivo (flechas blancas). E. DIV11, cultivo de astrocitos después de cinco días de tratamiento con 10 μ M de AraC, el cual resulta en una considerable reducción de la microglía. Fotografías en campo claro (4x aumento) en un microscopio invertido. Imágenes tomadas con el programa Q-Capture Pro 7 (2010). La barra de escala representa 250 μ m. DIV: Día *in vitro*.

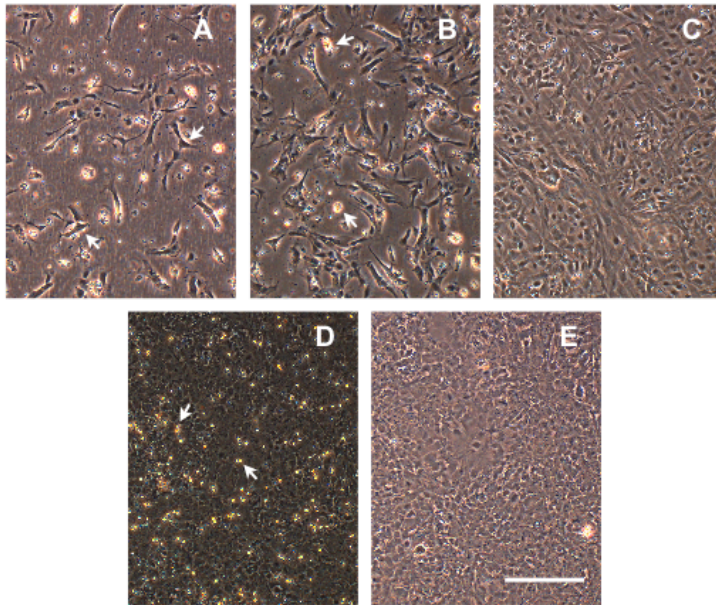


Figura 6. Proliferación de astrocitos de ratón neonato en cultivo. A. DIV1, primeros astrocitos pegados en la botella (flechas negras). B. DIV2, comienza la proliferación de astrocitos, hay presencia de microglía y OPCs (flechas negras). C. DIV3, se forma una monocapa de astrocitos en diversas áreas de la botella de cultivo. D. DIV5, la monocapa alcanza una confluencia del 100%, la microglía se encuentra presente en todo el cultivo (flechas negras). E. DIV11, cultivo de astrocitos después de cinco días de tratamiento con 10 μ M de AraC, el cual resulta en una considerable reducción de microglía. Fotografías en campo claro (4x aumento) en un microscopio invertido. Imágenes tomadas con el programa Q-Capture Pro 7 (2010) La barra de escala representa 250 μ m. DIV: Día *in vitro*.

En el análisis por inmunocitoquímica las células de las dos edades estudiadas resultaron ser positivas para la proteína gliofibrilar ácida (GFAP) la cual es un marcador específico de los astrocitos. Aunado a esto la mayor cantidad de los núcleos teñidos correspondieron con la señal positiva a la GFAP, por lo que se confirmó la obtención de cultivos de astrocitos de alta pureza (Fig. 7B y D).

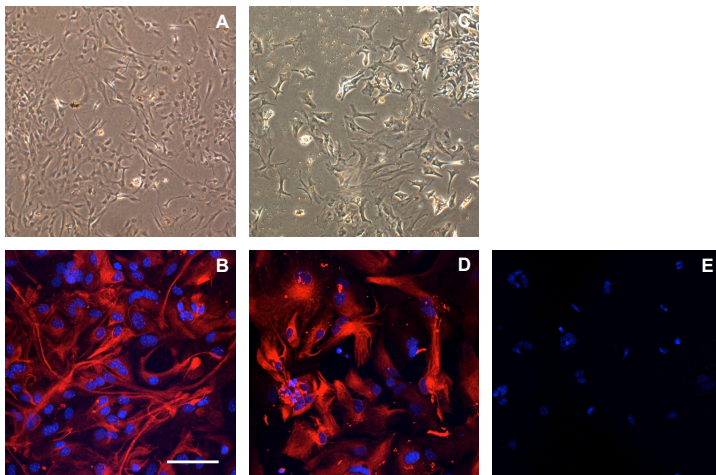
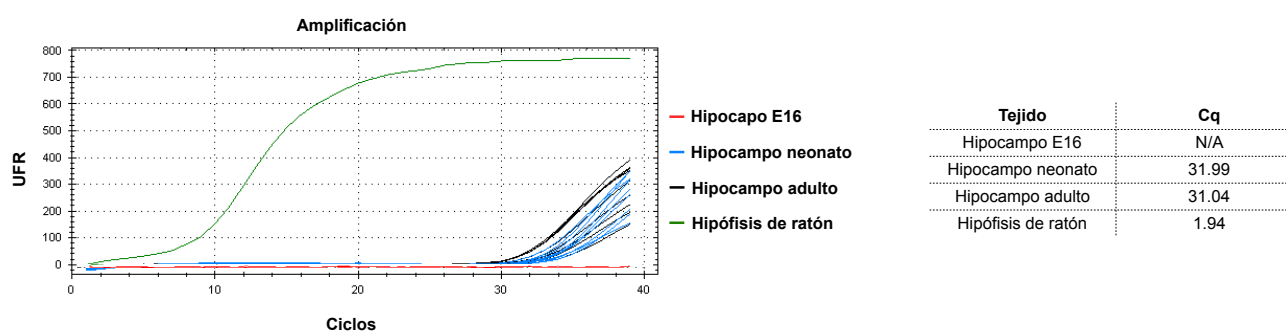


Figura 7. Caracterización inmunocitoquímica de cultivos de astrocitos hipocámpales de ratones E16 y neonatos. A. Astrocitos hipocámpales de ratones E16 vistos en campo claro, DIV6. B. Astrocitos hipocámpales de ratones E16 marcados con el anticuerpo policlonal anti-GFAP, DIV6. C. Astrocitos hipocámpales de ratones neonatos vistos en campo claro, DIV6. D. Astrocitos hipocámpales de ratones neonatos marcados con el anticuerpo policlonal anti-GFAP, DIV6. E. Control negativo. En azul se presentan los núcleos teñidos con DAPI. Imágenes tomadas en Z-stack 600 μ m (20x aumento) en un microscopio confocal LSM 510 con el programa Aim Imagen Examiner La barra de escala representa 50 μ m. DIV: Día *in vitro*.

6.2 Presencia endógena de la PRL y las vasoinhibinas en el hipocampo del ratón.

El análisis de la expresión del gen de la PRL se evaluó por PCR en tiempo real observándose una curva de amplificación del gen en las muestras de hipocampos de la etapa neonata y adulta, pero no en los hipocampos de ratones E16 (Fig. 8A). La expresión de la PRL resultó ser considerablemente menor en el hipocampo que en la hipófisis, como lo mostraron sus niveles de Cq. Al analizar la presencia de la PRL y las vasoinhibinas en extractos de hipocampo por Western blot, se encontró la presencia de bandas inmunoreactivas que corresponden a la PRL, así mismo se detectaron bandas de 14, 16, 17 y 18 kDa correspondientes a las vasoinhibinas. En la resolución de los extractos hipocampales de embriones y neonatos se observaron tres bandas de vasoinhibinas (14, 16 y 18 kDa), mientras que en los extractos de hipocampo de adulto sólo se identificaron dos bandas (14 y 18 kDa) siendo más densa la banda de la vasoinhibina de 17 kDa (Fig. 8B). Estos resultados indican que tanto la PRL como las vasoinhibinas están presentes en el hipocampo del ratón de diferentes edades y sugieren que puede estar presente la maquinaria

A



B

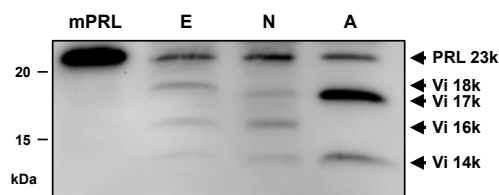


Figura 8. Presencia endógena de la PRL y las vasoinhibinas en el hipocampo del ratón. A. Análisis por PCR en tiempo real de la expresión del ARN mensajero de la PRL en el hipocampo de ratones E16, neonatos y adultos, comparados con su expresión en la hipófisis. En la tabla se presentan los valores de Cq obtenidos. (URF: Unidades de fluorescencia relativa) B. Análisis por Western blot de la expresión endógena de PRL y Vi en 40 µg de extractos hipocampales de ratones E16 (E), neonatos (N) y adultos (A). La dos hormonas se presentan de manera diferencial entre las tres edades estudiadas. mPRL: Estándar de PRL de ratón, 50 ng. Anticuerpo policlonal anti-PRL de ratón, 1:500 (Donado por Dr. Talamantes).

enzimática necesaria para el procesamiento de la PRL a vasoinhinas que actúa de manera diferencial entre las distintas edades.

6.3 Procesamiento proteolítico de la PRL a vasoinhinas por extractos hipocampales del ratón.

La incubación de 50 ng de PRL de rata con concentraciones crecientes de proteína (3 a 12 μ g) de los extractos hipocampales de las diferentes edades en una solución amortiguadora a pH 5 resultó en la producción de vasoinhinas de 16 kDa, sin que se observaran diferencias

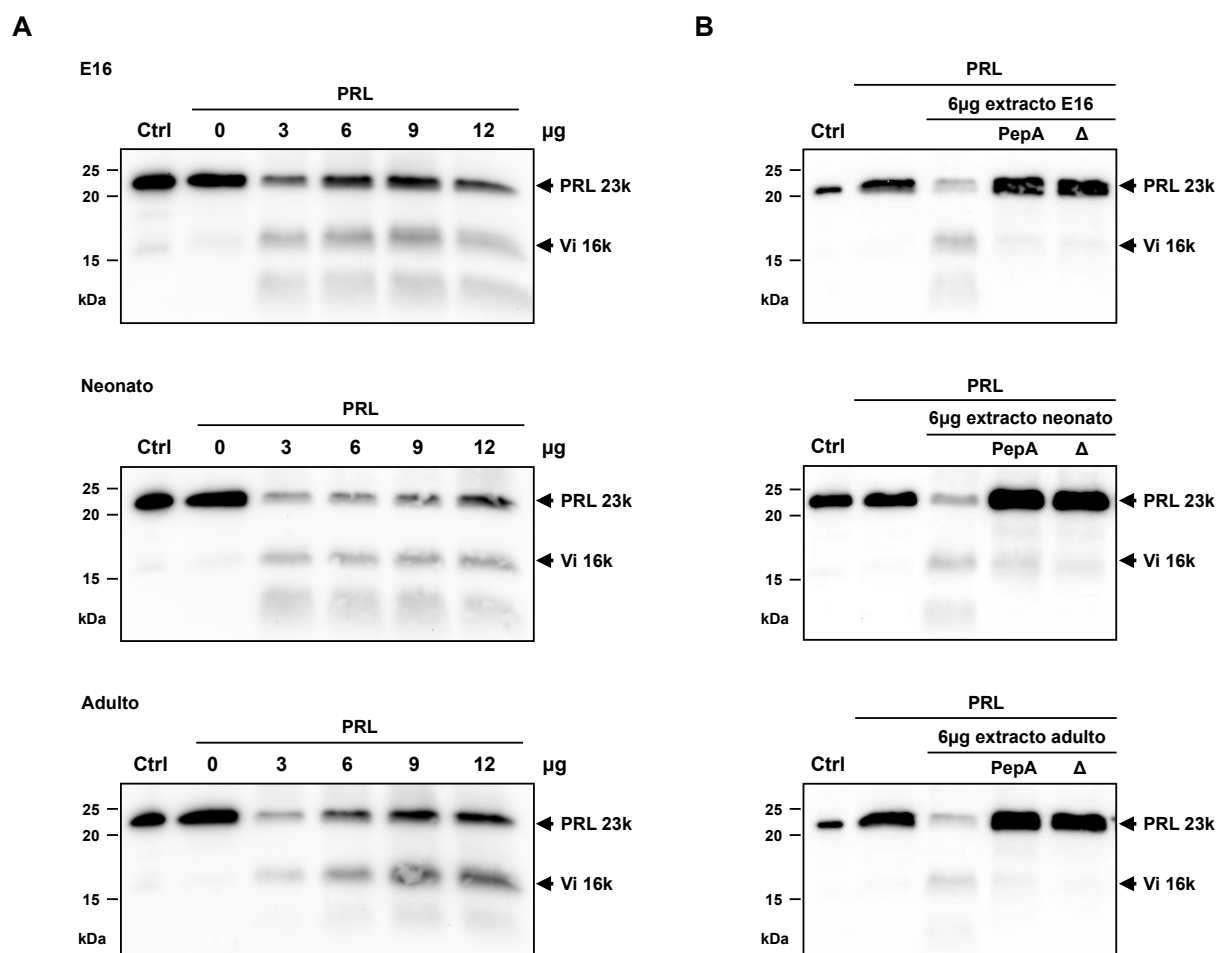


Figura 9. La PRL es procesada a vasoinhinas de 16kDa por la catepsina D hipocampal de ratones E16, neonatos y adultos. A. Análisis por western blot de los productos generados por la incubación de 50 ng de PRL de rata con concentraciones crecientes de extractos de hipocampo del ratón (3 μ g a 12 μ g) en un pH 5. En las tres edades se producen Vi de 16 kDa. B. La incubación con pepstatina A 1.5 μ M (PepA) bloquea la actividad enzimática de la catepsina D inhibiendo el corte proteolítico de 50ng de PRL de rata incubados con 6 μ g de extracto hipocampal a pH 5. La PepA inhibe el corte proteolítico de la PRL en las tres edades estudiadas. Ctrl: estándar de PRL, 50 ng sin incubar. Anticuerpo monoclonal anti-PRL de rata N-terminal, 1:500, INN1 (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD).

notables en la densidad de las bandas (Fig. 9A). Se determinó que las bandas observadas correspondían a vasoinhibinas, ya que fueron detectadas utilizando un anticuerpo monoclonal (INN-1) que detecta sólo la región NH₂-terminal de la PRL. La pre-incubación de los extractos hipocampales con pepstatina A, un inhibidor de la catepsina D, ocasionó la inhibición casi total del corte proteolítico de la PRL a pH 5 en las tres edades estudiadas. Además, no se observó la proteólisis de la PRL incubada a pH 5 en ausencia del extracto hipocampal, porque es en el hipocampo de ratón donde están presentes enzimas, como la catepsina D, capaces de generar vasoinhibinas. El corte de la PRL a vasoinhibinas fue

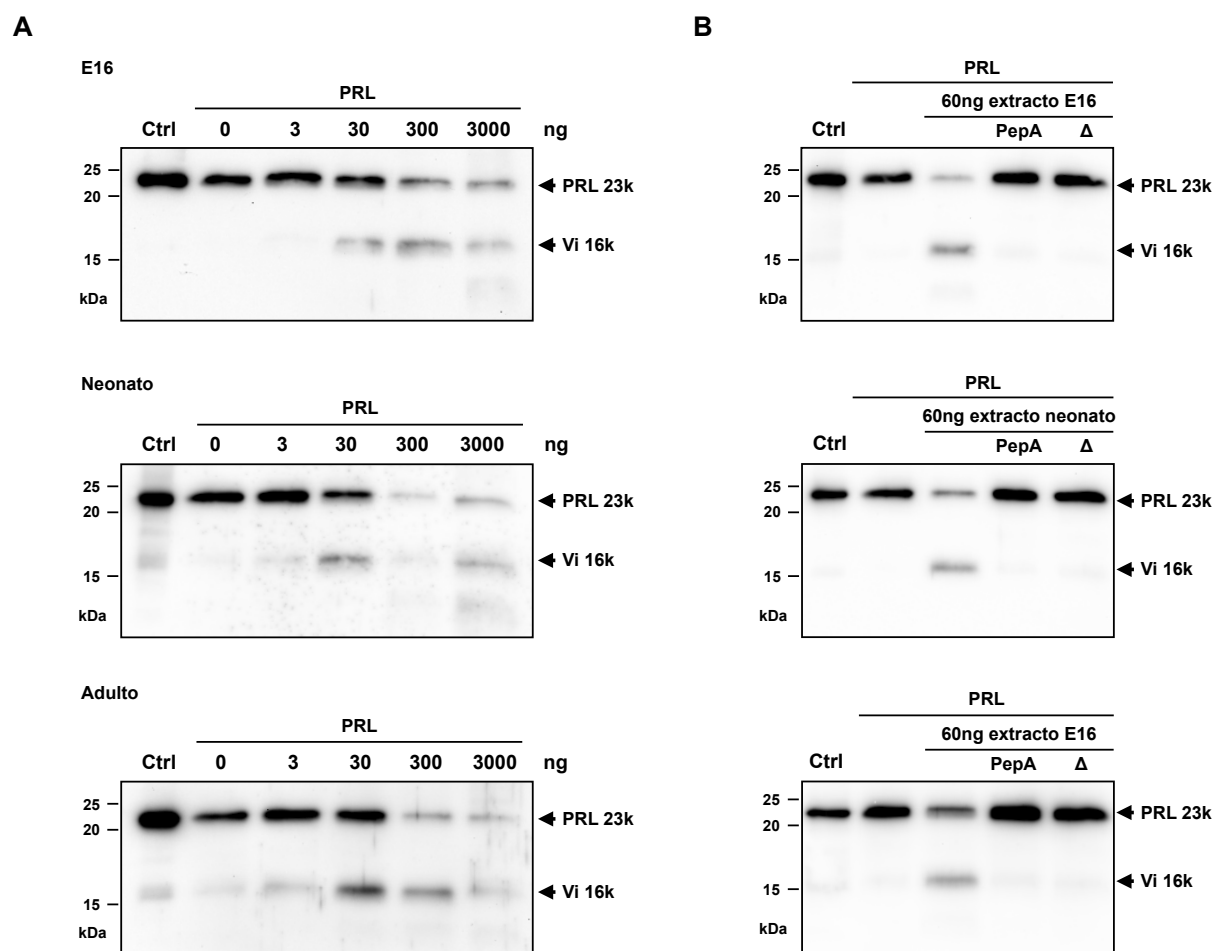


Figura 10. La catepsina D hipocampal corta de manera diferencial a la PRL de acuerdo a la edad. A. Análisis por western blot de los productos generados por la incubación de 50 ng de PRL de rata con concentraciones crecientes de extractos de hipocampo del ratón (3 ng a 3 µg) en un pH 5. El procesamiento de PRL a Vi es mayor en neonatos que en las otras edades. B. La incubación con pepstatina A 1.5 µM (PepA) bloquea la actividad enzimática de la catepsina D inhibiendo el corte proteolítico de 50 ng de PRL de rata incubados con 60 ng de extracto hipocampal a pH 5. La PepA inhibe el corte proteolítico de la PRL en las tres edades estudiadas. Ctrl: estándar de PRL, 50 ng sin incubar. Anticuerpo monoclonal anti-PRL de rata N-terminal, 1:500, INN1 (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD).

bloqueo completamente mediante la inactivación por calor de los extractos hipocampales (Fig. 9B).

Al observar que en aún la menor concentración proteica de extractos hipocampales empleada se presentó la misma proporción de corte de la PRL en las tres edades de ratón estudiadas, decidimos analizar la producción de vasoinhibinas utilizando concentraciones menores de los extractos hipocampales, en un rango de 3 ng a 3 µg. Bajo estas condiciones se encontró que los extractos hipocampales del ratón neonato poseen una mayor capacidad proteolítica a pH 5, en comparación con las incubaciones con extractos de embrión y adulto, ya que desde 30 ng de proteína se observa una mayor densidad de la banda de vasoinhibinas generada, lo cual indica su mayor concentración (Fig. 10A). De manera similar, la pre-incubación con pepsatina A bloqueó el corte proteolítico de la PRL, indicando que la catepsina D del hipocampo de los ratones es la responsable su corte. Así mismo, el corte de la PRL a vasoinhibinas fue bloqueado completamente mediante la inactivación por calor de los extractos hipocampales (Fig. 10B) Estos resultados indican que existen en el hipocampo proteasas como la catepsina D capaces de cortar a la PRL y generar vasoinhibinas de 16 kDa en ambientes ácidos.

Por otra parte, al incubar a la PRL con los extractos hipocampales de ratón en condiciones de pH fisiológico (pH 7), no se observó la generación de bandas de vasoinhibinas en ninguna de las tres edades analizadas (Fig. 11). Este resultado indica que en el hipocampo, bajo condiciones fisiológicas, no se encuentran presentes o activas enzimas que sean capaces de cortar a la PRL en vasoinhibinas.

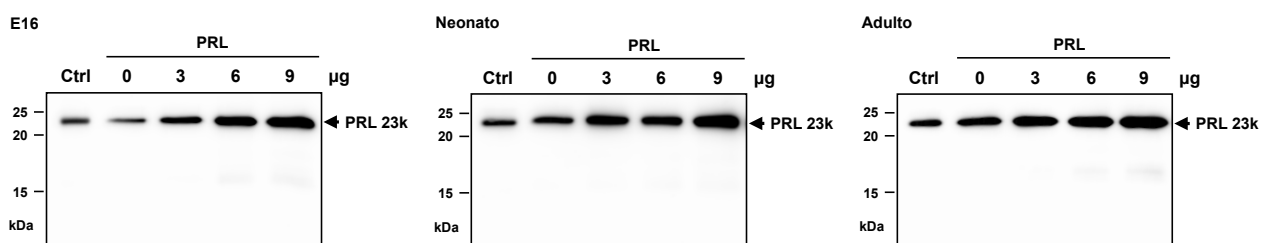


Figura 11. El hipocampo no presenta actividad proteolítica capaz de generar vasoinhibinas en un pH neutro. Análisis por western blot de los productos generados por la incubación de 50 ng de PRL de rata con concentraciones crecientes de extractos de hipocampo del ratón (3 µg a 12 µg) en un pH 7. Las enzimas proteolíticas que generan Vi en un pH neutro no se encuentran activas en ninguna de las edades estudiadas. Ctrl: estándar de PRL, 50 ng sin incubar. Anticuerpo monoclonal anti-PRL de rata N-terminal, 1:500, INN1 (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD).

6.4 Presencia endógena de la PRL y las vasoinhibinas en astrocitos hipocampales del ratón. En el hipocampo están presentes diferentes tipos celulares en los que pudiera llevarse a cabo el corte proteolítico de la PRL. Dado que se conoce que los astrocitos expresan diversas enzimas proteolíticas, procedimos a analizar si estas células son las responsables de la generación de vasoinhibinas en el hipocampo. El análisis por PCR en tiempo real y Western blot demostró que los astrocitos hipocampales de ratones E16 y neonatos no sintetizan a la PRL (Fig. 12A y B), por lo que no estarían generando vasoinhibinas de manera endógena, y entonces la PRL tendría que provenir de otros tipos celulares para ejercer sus acciones en los astrocitos o para ser procesadas a vasoinhibinas.

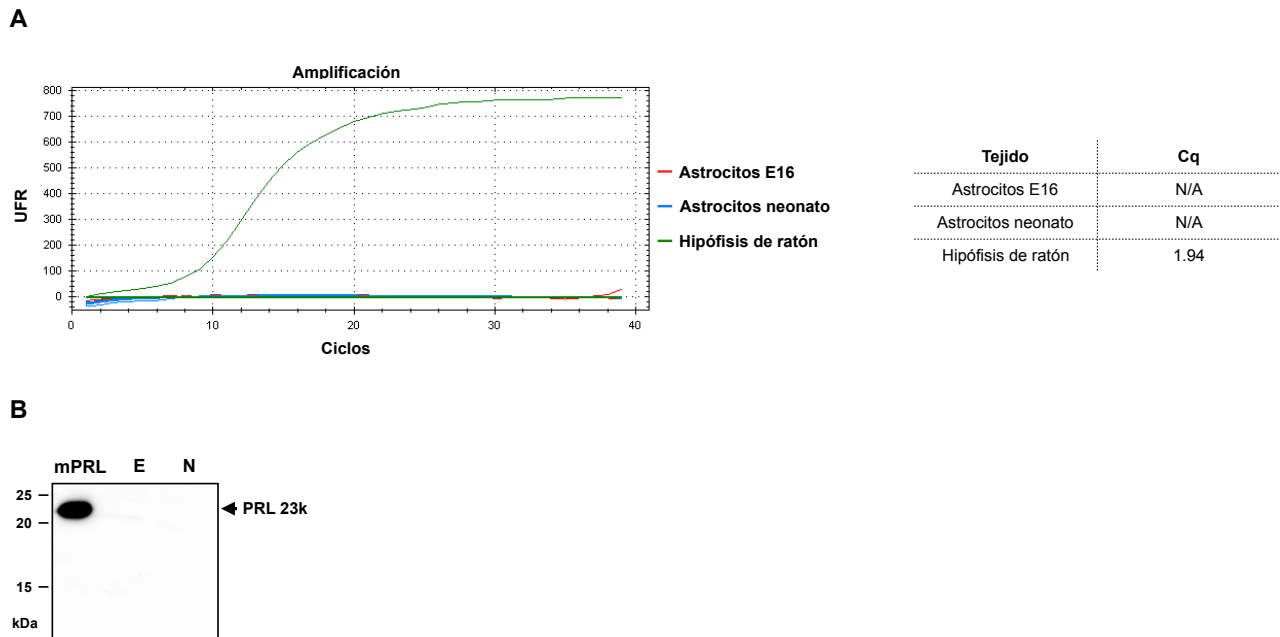


Figura 12. Presencia endógena de la PRL y las vasoinhibinas en astrocitos hipocampales del ratón. A. Análisis por PCR en tiempo real de la expresión del ARN mensajero de la PRL en astrocitos hipocampales de ratones E16 y neonatos, comparado con su expresión en la hipófisis. En la tabla se muestran los valores del Cq obtenidos. (URF: Unidades de fluorescencia relativa). B. Análisis por western blot de la expresión endógena de PRL y Vi en 40 µg de extractos de astrocitos E16 (E) y neonatos (N). No se encontró expresión de la PRL o su mensajero en ninguna de las edades estudiadas. mPRL: Estándar de PRL de ratón, 50 ng. Anticuerpo policlonal anti-PRL de ratón, 1:500 (Donado por Dr. Talamantes).

6.5 Procesamiento proteolítico de la PRL a vasoinhibinas por extractos de astrocitos hipocampales del ratón.

La incubación de 50 ng de PRL de rata con concentraciones crecientes (2 ng a 2µg) de proteína de los extractos de astrocitos hipocampales de ratones E16 y neonatos en una solución amortiguadora a pH 5, resultó en la generación de vasoinhibinas de 16 kDa. Los astrocitos neonatales exhibieron una mayor capacidad proteolítica, sin embargo, gran parte de la PRL o los productos generados resultaron ser degradados (Fig. 13A). Debido a esto, se decidió extender las concentraciones utilizadas de los extractos, quedando en un rango de 20 ng a 320 ng para los embriones y de 5 ng a 40 ng para los neonatos. En estas condiciones se encontró que, en efecto, los astrocitos neonatales poseen una mayor actividad proteolítica, debido a que desde 20 ng de extracto es posible ver una mayor banda de vasoinhibinas que sólo fue igualada en embriones al incubar 80 ng del extracto (Fig. 13B), Debido a que los fragmentos observados fueron detectados utilizando el anticuerpo monoclonal (INN-1) que detecta sólo la región NH₂-terminal de la PRL, se determinó que estos fragmentos correspondían a vasoinhibinas.

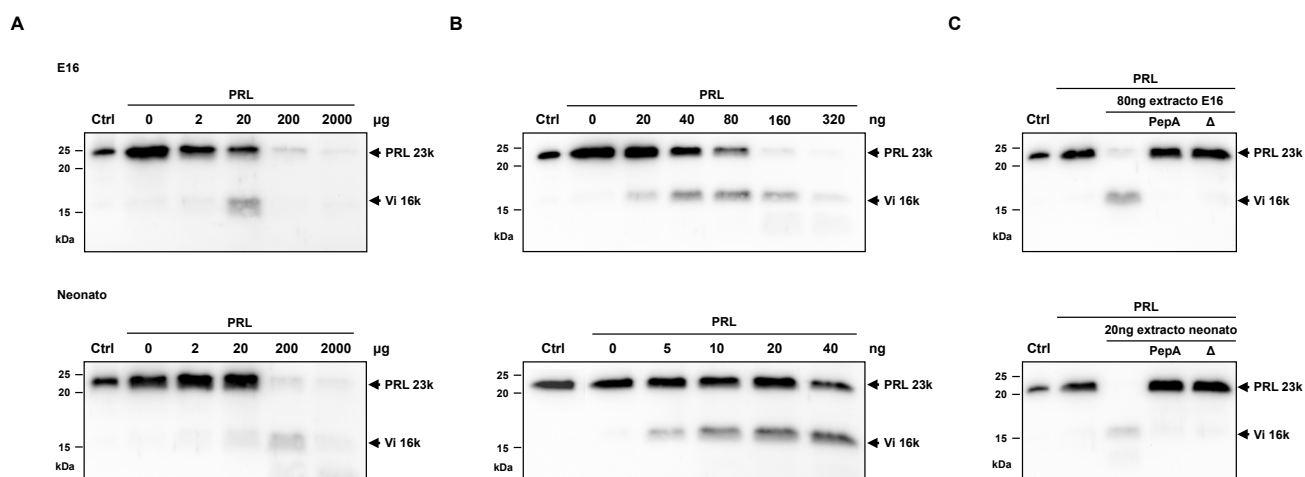


Figura 13. La catepsina D presente en los astrocitos hipocampales genera vasoinhibinas de 16 kDa. A. Análisis por western blot de los productos generados por la incubación de 50 ng de PRL de rata con concentraciones crecientes de extractos de astrocitos hipocampales del ratón (2 ng a 2 µg) en un pH 5. Desde 2 ng de proteína es posible observar un corte de la PRL produciendo Vi de 16 kDa. B. El extracto de neonato resultó tener una mayor actividad proteolítica respecto al embrional exhibiendo una diferencia en el procesamiento desde 20 ng de proteína, como se observa en la curva de concentraciones crecientes (20 ng a 320 ng para la etapa embrional y 5 ng a 40 ng para la etapa neonatal). C. La incubación con pepstatina A 1.5 µM (PepA) bloquea la actividad enzimática de la catepsina D inhibiendo el corte proteolítico de 50 ng de PRL de rata incubados con 80 o 20 ng de extractos de astrocitos hipocampales E16 y neonatos respectivamente. Ctrl: estándar de PRL, 50 ng sin incubar. Anticuerpo monoclonal anti-PRL de rata N-terminal, 1:500, INN1 (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD).

De la misma forma que en los extractos hipocampales, en las dos edades de astrocitos estudiadas la pre-incubación con pepstatina A bloqueó el corte de la PRL a vasoinhibinas, indicando que la catepsina D es la responsable del corte. También la inactivación por calor de las enzimas resultó en un bloqueo del procesamiento proteolítico (Fig. 13C). Estos resultados indican que en ratones E16 y neonatos, los astrocitos hipocampales poseen enzimas capaces de procesar a la PRL en Vi de 16 kDa en un pH ácido, siendo la catepsina D la enzima responsable de tal corte y ocurriendo una diferencia en su actividad, la cual es mayor en los neonatos.

Por otro lado, la incubación de 50ng de PRL de rata con extractos de astrocitos de ratones E16 y neonatos a pH 7 no produjo Vi con ninguna de las concentraciones probadas (Fig. 14), concordando con lo encontrado utilizando extractos hipocampales. Por lo que los astrocitos en condiciones fisiológicas tienen activas enzimas que procesen a la PRL en vasoinhibinas.

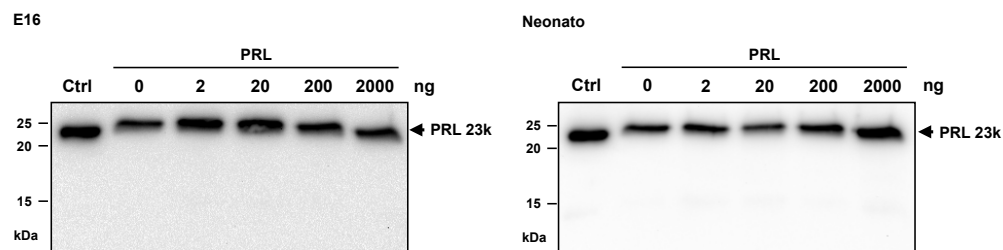


Figura 13. Los astrocitos hipocampales no presentan actividad proteolítica capaz de generar vasoinhibinas en un pH neutro. Análisis por western blot de los productos generados por la incubación de 50 ng de PRL de rata con concentraciones crecientes de extractos de astrocitos hipocampales de ratones E16 y neonatos (2 ng a 2 μ g) en un pH 7. Las enzimas proteolíticas que generan Vi en un pH neutro no se encuentran activas en ninguna de las edades estudiadas. Ctrl: estándar de PRL, 50 ng sin incubar. Anticuerpo monoclonal anti-PRL de rata N-terminal, 1:500, INN1 (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, Bethesda, MD).

7. Discusión

La PRL posee un potente efecto modulador en diversas regiones del cerebro sobre las que actúa como neuropéptido y hormona neuroendócrina (Grattan y Kokay, 2008). Algunas áreas del SNC como el hipotálamo, la amígdala, el núcleo septal lateral y los plexos coroideos presentan una alta inmunoreactividad a la PRL y su receptor (Brown *et al.*, 2010), lo que sugiere la interacción y presencia de esta hormona en la regulación de la función neuronal. En el SNC la síntesis de la PRL ha sido confirmada en el hipotálamo mediante el análisis con PCR en tiempo real e hibridación *in situ*, demostrando la expresión de su ARN mensajero en tal estructura (Torner *et al.*, 2004). Sin embargo, la producción *de novo* de PRL en otras partes del cerebro ha sido ampliamente debatida, ya que muchos autores consideran que la PRL llega al cerebro a través del líquido cefalorraquídeo en los plexos coroideos, atravesando la barrera hemato-líquido cefalorraquídeo y esparciéndose por el encéfalo (Grattan *et al.*, 2002). Por el contrario, recientemente se reportó que la PRL no ingresa al cerebro a través de dicha vía (Brown *et al.*, 2016), por lo que el mecanismo sigue sin estar completamente identificado. En el cerebro de ovinos, embriones y adultos, fue encontrada por hibridación *in situ* y Western blot la expresión de la PRL y su mensajero en el hipotálamo, el bulbo olfatorio y la amígdala (Roselli *et al.*, 2008). De la misma forma, la presencia del mensajero de PRL fue confirmada en el núcleo paraventricular, el septum lateral y el cerebelo de aves (Chaiseha *et al.*, 2011). Por su parte, se reportó la expresión del ARN mensajero de la PRL en hipocampos de ratones hembras usando técnicas de microarreglos (Jakob *et al.*, 2014). En concordancia con este hallazgo, nuestros resultados mostraron que el ARN mensajero de la PRL se expresa en el hipocampo de ratones neonatos y adultos, pero no así en el hipocampo de ratones E16. Así mismo los resultados obtenidos por Western blot confirmaron la presencia de la PRL en esta estructura. En embriones no se encontró la expresión del gen de la PRL por PCR en tiempo real, pero si la presencia de la proteína por Western blot, estos resultados podrían indicar que durante la gestación la PRL producida por la madre pudiera estar entrando al cerebro de la cría desde la circulación. Por otra parte, si bien los resultados podrían sugerir que la PRL es producida dentro del hipocampo en la etapa neonata y adulta, no se puede descartar la entrada desde la circulación a través de la barrera hematoencefálica y que esto puede contribuir a su presencia en el hipocampo. Hasta el

momento se desconoce el tipo celular responsable de la producción de la PRL en el hipocampo, nuestros resultados mostraron que los astrocitos hipocampales en el ratón embrión y neonato no la sintetizan, quedando por investigar si otros tipos celulares como las neuronas, oligodendrocitos o la microglia son las productoras de la PRL en el hipocampo.

En tejidos extrahipofisarios la presencia endógena de las vaso inhibinas ha sido reportada en la retina, cartílago, cuerpo lúteo, glándulas mamarias y suero sanguíneo, en el tejido nervioso se han encontrado en el hipotálamo (Clapp *et al.*, 2015), sin embargo su presencia en el hipocampo no había sido reportada. En este trabajo se tiene la primera evidencia de la presencia de vaso inhibinas en el hipocampo. Se encontraron fragmentos de PRL de peso molecular aparente de 14, 16, 17 y 18 kDa de los cuales se observa una proporción diferencial entre las tres edades analizadas, presentándose en mayor concentración en el hipocampo adulto. La presencia de vaso inhibinas de diferente peso molecular en el hipocampo sugiere que en dicha estructura se encuentra activa la maquinaria proteolítica necesaria para el procesamiento de la PRL en Vi y que además dicha maquinaria actúa distintivamente entre las tres edades estudiadas, probablemente por una diferencia en la activación o expresión de diferentes proteasas. Dada la ubicuidad de la catepsina D y las MMPs, estas podrían actuar cortando a la PRL presente en el hipocampo y generando las vaso inhibinas encontradas.

El ensayo de corte de la PRL demostró que los extractos hipocampales (E16, neonatos y adultos) y de astrocitos (E16 y neonatos) poseen enzimas que la procesan y generan vaso inhibinas de 16 kDa. Debido a que la incubación con pepstatina A logró inhibir el procesamiento proteolítico, se propone que es la catepsina D la responsable del corte. La catepsina D es una enzima sintetizada en el retículo endoplasmático como un precursor inactivo, el cual es llevado a endosomas dónde se activa en presencia de pH ácidos (Benes *et al.*, 2008). Cruz-Soto *et al.* (2009) demostraron la actividad proteolítica de la catepsina D en extractos hipofisarios de rata, ellos sugieren que el procesamiento de la PRL se lleva a cabo en compartimentos intracelulares de naturaleza ácida, como los gránulos secretores de los lactotrofos. Por otro lado, Lkhider *et al.* (2004) reportaron una posible actividad de la catepsina D de los acinos mamarios en un pH fisiológico, argumentando que el pH óptimo para la actividad de la enzima podría variar de acuerdo al substrato y la influencia de diferentes interacciones moleculares y activadores fisiológicos. Nuestros resultados demostraron que la actividad de la catepsina D en el hipocampo y los astrocitos sucede en

un pH 5. Durante el desarrollo del cerebro ocurren procesos de remodelaje del tejido con el fin de permitir la migración celular y el crecimiento de vasos sanguíneos, la catepsina D se encuentra involucrada en estos mecanismos regulando procesos como la muerte celular programada (Zuzarte-Luis *et al.*, 2007), estos cambios en el tejido dan lugar a una acidificación del microambiente que permite la acción de dicha proteasa. Por lo que las vasoinhibinas encontradas en el hipocampo de embriones y neonatos podrían participar en la regulación del crecimiento y modelaje tisular en etapas tempranas del desarrollo. En el cerebro, durante la edad adulta, la catepsina D es secretada como un activador del proceso de envejecimiento (Stoka *et al.*, 2016) y es probable que a esto se deba su actividad en esta etapa. En este sentido nuestros resultados mostraron vasoinhibinas endógenas presentes en el hipocampo adulto que no coinciden con los fragmentos de 16 kDa generados a partir del corte con catepsina, esto sugiere que diferentes interacciones celulares y moleculares en conjunto o aparte de la catepsina D podrían estar actuando en el procesamiento de PRL a vasoinhibinas en el hipocampo adulto.

Por otra parte, se ha demostrado que los astrocitos poseen una alta actividad proteolítica, se ha reportado que estas células producen grandes cantidades de catepsina D (Dowell *et al.*, 2009; Lafon-Cazal *et al.*, 2003). Esto se confirmó por nuestros resultados dado que fueron necesarias bajas concentraciones de proteína (80 y 20 ng) para el procesamiento proteolítico de la PRL a vasoinhibinas sin llegar a su degradación. En el neonato los astrocitos son responsables del control de la formación de las conexiones sinápticas y vasculares a través de la secreción de una gran cantidad de proteasas, entre las que se incluye a la catepsina D (Molofsky *et al.*, 2015). Concordando que esto, la mayor actividad proteolítica de esta enzima fue encontrada en los astrocitos neonatales dada por la secreción de proteasas exhibida en esta etapa.

La catepsina D es una enzima que participa principalmente en eventos patológicos, posee funciones sobre la apoptosis y fagocitosis (Khalkhali-Ellis y Hendrix, 2014) activándose en procesos de hiperglucemia, hipoxia-isquemia o inflamación que permiten la formación de un ambiente adecuado para su acción (Hsieh *et al.*, 2013; Hsieh *et al.*, 2014; Ranasinghe *et al.*, 2009). La actividad proteolítica de la catepsina D encontrada en el tejido hipocampal y los astrocitos aislados, demuestra su participación en la regulación del eje PRL/Vi. Sin embargo, debido a las condiciones de pH requeridas para su activación es probable que actúe sólo en momentos específicos del desarrollo fisiológico o durante la progresión de patologías.

La incubación de la PRL con los extractos hipocampales y de astrocitos en un pH neutro no resultó en su procesamiento proteolítico en ninguna de las edades estudiadas. Al contrario de Macotella *et al.* (2006) quienes demostraron que la PRL era procesada a vasoinhibinas por las MMPs presentes en cultivos de condrocitos, las cuales actúan en un pH fisiológico. En el tejido nervioso las MMPs se expresan ampliamente debido a su papel en el remodelado de la matriz extracelular y el movimiento celular, axonal y dendrítico (Sekine-Aizawa *et al.*, 2001), sin embargo la ausencia de productos del corte proteolítico en este pH sugiere que estas proteasas no se encuentran activas para producir vasoinhibinas. Las MMPs son sintetizadas como pro-enzimas que se activan en respuesta a factores de crecimiento, citocinas, oncogenes, iones y hormonas, ocurriendo un corte proteolítico (Reinhard *et al.*, 2015). Por lo que es posible que necesiten de una señalización específica en los astrocitos hipocampales para, dado el caso, generar vasoinhibinas.

El estudio del eje PRL/vaso-inhibinas en el SNC se encuentra en etapas tempranas y actualmente se desconoce si en este tejido ocurre una regulación similar a la encontrada en la retina o las glándulas mamarias. Dada la presencia tanto de PRL como de vaso-inhibinas en el hipocampo es posible pensar que tal regulación se está llevando a cabo de manera continua en el ciclo de vida del ratón, y particularmente los astrocitos participan en esta regulación secretando proteasas que generan vaso-inhibinas. La actividad proteolítica de la catepsina D se encuentra limitada por su naturaleza lisosomal, por lo que no es posible explicar con sus acciones la presencia de todas las vaso-inhibinas endógenas encontradas en el hipocampo de las tres edades. Esto podría ser explicado con la acción de otras enzimas presentes en el hipocampo cuya expresión podría verse regulada por señalizaciones celulares en respuesta a estímulos de hormonas, factores de crecimiento, neurotransmisores y citocinas (Sofroniew y Vinters, 2010), siendo necesaria la interacción entre los diferentes tipos celulares que conforman el tejido. En los astrocitos la presencia de factores inflamatorios o agentes oxidantes pueden provocar un incremento en la secreción de enzimas proteolíticas (Hah *et al.*, 2012; Hsieh y Yang, 2014; Limb *et al.*, 2002), por lo que en el caso de la producción de vaso-inhibinas ésta tendría ser catalizada por la activación específica de tales factores. Por otro lado, otras células del SNC como la microglía, los oligodendrocitos, las neuronas o incluso las células endoteliales de la microvasculatura cerebral, podrían también estar participando en la regulación del eje PRL/vaso-inhibinas, tanto en la síntesis de la primera como en el corte proteolítico de la segundas.

En el SNC se lleva a cabo la regulación enzimática necesaria para la presencia del eje PRL/vasoinhibinas, sin embargo aún se desconoce cuáles son los componentes de este sistema que participan en tal evento y también qué acciones tiene el eje sobre estos. Por ello la investigación del papel de las diferentes células neurales en la regulación del eje PRL/vasoinhibinas podría ayudar a comprender la participación de este en la fisiología y patología del sistema.

8. Conclusiones

- La PRL es producida en el hipocampo de los ratones E16, neonatos y adultos, sin embargo los astrocitos no son los responsables de esta síntesis.
- Diferentes vasoinhibinas fueron encontradas en todas las etapas estudiadas, lo que implica que algunas células presentes en este tejido secretan enzimas para su producción.
- La incubación de PRL con extractos hipocampales y de astrocitos en un pH ácido produjo vasoinhibinas de 16 kDa NH₂-terminal, producidos por la catepsina D en todas las edades analizadas. Tanto el hipocampo completo como los astrocitos aislados de neonatos resultaron tener la mayor capacidad proteolítica.
- La incubación de PRL con extractos hipocampales y de astrocitos en un pH neutro no produjo vasoinhibinas en ninguno de los casos estudiados.

9. Referencias

1. Araque, A., y Navarrete, M. (2010). Glial cells in neuronal network function. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 365, 2375-2381.
2. Baldocchi, R.A., Tan, L., King, D.S. y Nicoll, C.S. (1993). Mass spectrometric analysis of the fragments produced by cleavage and reduction of rat prolactin: evidence that the cleaving enzyme is cathepsin D. *Endocrinology*, 133(2), 935-938.
3. Benes, P., Vetvicka, V. y Fusek, M. (2008). Cathepsin D - Many Functions of one Aspartatic Protease. *Critical Review in Oncology and Hematology*, 68(1), 2-28.
4. Bernard V., Young, J., Chanson, P. y Binart, N. (2015). New insights in prolactin: Pathological implications. *Endocrinology*, 11, 265-275.
5. Birkedal-Hansen, H., Moore, W.G.I., Bodden, M.K., Windsor, L.J., Birkedal-Hansen, B., DeCarlo, A. y Engler, J.A. (1993). Matrix Metalloproteinases: A Review. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 4(2), 197-250.
6. Bole-Feysot, C., Goffin, V., Edery, M., Binart, N. y Kelly, P.A. (1998) Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocrinology Reviews*, 19, 225–268.
7. Brooks, C.L. (2012). Molecular Mechanisms of Prolactin and Its Receptor. *The Endocrine Society*, 33(4), 504-525.
8. Brown, R.S.E., Kokay, I.C., Herbison, A.E. y Grattan, D.R. (2010). Distribution of prolactin-responsive neurons in the mouse forebrain. *The Journal of Comparative Neurology*, 518, 92-102.
9. Brown, R.S.E., Wyatt, A.K. Herbison, R.E., Knowles, P.J., Ladyman, S.R., Binart, N., Banks, W.A. y Grattan, D.R. (2016). Prolactin transport into mouse brain is independent of prolactin receptor. *The FASEB Journal*, 30, 1002-1010.
10. Chaiseha, Y., Ngernsoungnern, P., Sartsoongnoen, N., Prakobsaeng, N., E, M. y Halawani, E. (2011). Presence of prolactin mRNA in extra-pituitary brain areas in the domestic turkey. *Acta Histochemica*, 114, 116– 121.

11. Clapp, C., Aranda, J., González, C., Jeziorski, M.C., y Martínez de la Escalera, G. (2006). Vasoinhibins: endogenous regulators of angiogenesis and vascular function. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 17(8), 301-307.
12. Clapp, C., Thebault, S., Jeziorski, M.C., y Martínez de la Escalera, G. (2009). Peptide Hormone Regulation of Angiogenesis. *Physiological Reviews*, 89, 1177-1215.
13. Clapp, C., Thebault, S., Macotela, Y., Moreno-Carranza, B., Triebel, J. y Martínez de la Escalera, G. (2015). Regulation of Blood Vessels by Prolactin and Vasoinhibins. *Recent Advances in Prolactin Research*, Advances in Experimental Medicine and Biology, Capítulo 4, 846.
14. Clapp, C., Thebault, S. y Martínez de la Escalera, G. (2008). Role of Prolactin and Vasoinhibins in the Regulation of Vascular Function in Mammary Gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 13, 55–67.
15. Cruz-Zoto, M.E., Cosío, G., Jeziorski, M., Vargas-Barroso, V., Aguilar, M.B., Cárabez, A., Berger, P., Saftig, P., Arnold, E., Thebault, S., Martínez de la Escalera, G., y Clapp, C. (2009). Cathepsin D is the Primary Protease for the Generation of Adenohypophyseal Vasoinhibins: Cleavage Occurs within the Prolactin Secretory Granules. 150(12), 5446-5454.
16. Deshmukh, S.S. y Knierim, J.J. (2012) Hippocampus. *WIREs Cognitive Science*, 3, 231-251.
17. 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. *Journal of Neurochemistry*, 60(3), 835-842.
18. DeVito, W.J., Avakian, C., Stone, S., Okulicz, W.C., Tang, K. y Shamgochiam, M. (1995). Prolactin induced Expression of Interleukin-1 Alpha, Tumor Necrosis Factor-Alpha, and Transforming-Growth Factor-Alpha in Cultured Astrocytes. *Journal of Cellular Biochemistry*, 57, 290-298.
19. Dowell, J.A., Johnson, J.A. y Li, L. (2009). Identification of Astrocyte Secreted Proteins with a Combination of Shotgun Proteomics and Bioinformatics. *Journal of Proteomedical Research*, 8(8), 4135–4143.
20. Ferraris, J., Radl, D.B., Zárata, D., Jaita, G., Eijo, G., Zaldivar, V., Clapp, C., Seilicovich, A. y Pisera, D. (2011). N-Terminal Prolactin-Derived Fragments, Vasoinhibins, Are

- Proapoptotic and Antiproliferative in the Anterior Pituitary. *PLoS ONE*, 6(7): e21806. doi: 10.1371/journal.pone.0021806.
21. Freeman M.E., Kaniscka, B., Lerant, A., y Nagy, G. (2000). Prolactin: Structure, Function and Regulation of Secretion. *Physiological Reviews*, 80(4), 1523-1631.
 22. Fujioka, H., Dairyo, Y., Yasunaga, K. y Emoto, K. (2012). Neural Functions of Matrix Metalloproteinases: Plasticity, Neurogenesis, and Disease. *Biochemistry Research International*, vol. 2012, Article ID 789083, 8 pages, 2012. doi:10.1155/2012/789083.
 23. Ge, G., Fernández, C.A., Moses, M.A., y Greenspan, D.S. (2007). Bone morphogenetic protein 1 processes prolactin to a 17-kDa antiangiogenic factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(24), 10010-10015.
 24. Goldhar, A.S., Vonderhaar, B.K., Trott, J.F. y Hovey, R.C. (2005). Prolactin-induced expression of vascular endothelial growth factor via Egr-1. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 232(1-2), 9-19.
 25. Grattan, D.R. (2002). Behavioural significance of prolactin signalling in the central nervous system during pregnancy and lactation. *Reproduction*, 123, 497–506.
 26. Grattan, D.R. (2015). The hypothalamo-prolactin axis. *Endocrinology*, 226(2), T101-T122.
 27. Grattan, D.R. y Kokay, I.C. (2008). Prolactin: A Pleiotropic Neuroendocrine Hormone. *Journal of Neuroendocrinology*, 20, 752-763.
 28. Gregerson, K.A. (2003). Functional Expression of the Dopamine-Activated K⁺ Current in Lactotrophs During the Estrous Cycle in Female Rats. *Endocrine*, 20(1), 67-74.
 29. Gregg, C., Shikar, V., Larsen, P., Mak, G., Chojnacki, A., Wee Yong, V., y Weiss S. (2007). White Matter Plasticity and Enhanced Remyelination in the Maternal CNS. *The Journal of Neuroscience*, 27(8), 1812-1823.
 30. Hah, Y., Noh, H.S., Ha, J.H. Ahn, J.S., Hahm, J.R., Cho, H.Y., y Kim, D.R. (2012). Cathepsin D inhibits oxidative stress-induced cell death via activation of autophagy in cancer cells. *Cancer Letters*, 323, 208–214.
 31. Havránek, T., Bačová, Z., Štrbák, V., Lešťanová, Z. y Bakoš, J. (2014). Prolactin Increases Expression of Cytoskeletal Proteins in SK-N-SH Cells. *Folia Biologica (Praha)*, 60, 281-285.
 32. Hsieh, H., Chi, P., Lin, C., Yang, C. y Yang C.M. (2014). Up-regulation of ROS-Dependent Matrix Metalloproteinase-9 from High-Glucose-Challenged Astrocytes Contributes to the Neuronal Apoptosis. *Molecular Neurobiology*, 50, 520–533.

33. Hsieh, H., Lin, C., Hsiao, L. y Yang, C.M. (2013). High Glucose Induces Reactive Oxygen Species-Dependent Matrix Metalloproteinase-9 Expression and Cell Migration in Brain Astrocytes. *Molecular Neurobiology*, 48, 601–614.
34. Hsieh, H. y Yang, C.M. (2014). The role of matrix metalloproteinase-9 in pro-inflammatory factors-induced brain inflammation and neurodegenerative diseases. *Inflammation & Cell Signaling*, 1, e124. doi: 10.14800/ics.124.
35. Ignakak, A., Kasztelnik, M., Sliwa, T., Korbut, R.A., Rajda, K. y Guzik, T.J. (2012). Prolactin-Not Only Lactotrophin a “New” View of the “Old” Hormone. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 63(5), 435-443.
36. Jakob, S., Schraut, K., Schmitt, G., Scholz, C., Ortega, G., Steinbusch, H.W., Lesch, K., L.A. van den Hove, D. (2014). Differential Effects of Prenatal Stress in Female 5-Htt-Deficient Mice: Towards Molecular Mechanisms of Resilience. *Developmental Neuroscience*, 36, 454–464.
37. Khalkhali-Ellis, Z. y Hendrix, M.J.C. (2014). Two Faces of Cathepsin D: Physiological Guardian Angel and Pathological Demon. *Biology and Medicine*, 6(2), 206-214.
38. Kandel E.R., Schwartz, J.H., Jessell, T.M., Siegelbaum, S.A., y Hudspeth, A.J. (2013). Principles of Neural Science. 5ta edición. Ed. McGraw-Hill. eBook. Págs, 1073.
39. Lafon-Cazal, M., Adjali, O., Galéotti, M., Poncet, J., Jouin, P., Homburger, V., Bockaert, J. y Marin, P. (2003). Proteomic Analysis of Astrocytic Secretion in the Mouse. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(27), 24438–24448.
40. Lajud, N., Gonzalez-Zapien, R., Roque, A., Tinajero, E., Valdez, J.J., Clapp, C. y 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, 781-789.
41. Larsen C.M., y Grattan, D.R., (2012). Prolactin, neurogenesis, and maternal behaviors. *Brain, Behavior and Immunity*, 26: 201-109.
42. Limb, G.A., Daniels, J.T., Pleass, R., Charteris, D.G., Luthert, P.J. y Khaw, P.T. (2002). Differential Expression of Matrix Metalloproteinases 2 and 9 by Glial Müller Cells Response to Soluble and Extracellular Matrix-Bound Tumor Necrosis Factor-alpha. *American Journal of Pathology*, 160(5), 1847-1855.

43. Lkhider, M., Castino, R., Bouguyon, E., Isodoro, C. y Ollivier-Bousquet, M. (2004). Cathepsin D released by lactating rat mammary epithelial cells is involved in prolactin cleavage under physiological conditions. *Journal of Cell Science*, 117, 5155-5164.
44. Macotela, Y., Aguilar, M.B., Guzmán-Morales J., Rivera, J.C., Zermeño, C., López-Barrera, F., Nava, G., Lavalle, C., Martínez de la Escalera, G., y Clapp, C. (2006). Matrix Metalloproteases from chondrocytes generate an antiangiogenic 16 kDa prolactin. *Journal of Cell Science*, 119(9), 1790-1800.
45. Mak, G.K. y Weiss, S. (2010). Paternal recognition of adult offspring mediated by newly generated CNS neurons. *Nature Neuroscience*, 13(6), 753-760.
46. Mangoura, D., Pelletiere, C., Leung, S., Sakellaridis, N., y Xin Wang, D. (2000). Prolactin concurrently activates Src-PLD and Jak/Stat signaling pathways to induce proliferation while promoting differentiation in embryonic astrocytes. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 18, 693-704.
47. Mittal, R., Patel, A.P., Debs, L.H., Nguyen, D., Patel, K., Grati, M., Mittal, J., Yan, D., Chapagain, P. y Liu, X.Z. (2016). Intricate Functions of Matrix Metalloproteinases in Physiological and Pathological conditions. *Journal of Cell Physiology*, 10.1002/jcp.25430.
48. Mödersheim, T.A.E., Gorba, T., Pathipati, P., Kokay, I.C., Grattan, D.R., Williams, C.E., y Sheepens, A. (2007). Prolactin is involved in glial responses following a focal injury to the juvenile rat brain. *Neuroscience*, 145, 963-973.
49. Molofsky, A.V., Krennick, R., Ullian, E., Tsai, H., Deneen, B. Richardson, W.B., Barres, B.A., y Rowitch, D.H. (2015). Astrocytes and disease: a neurodevelopmental perspective. *Genes and Development*, 26, 891–907.
50. Morales, T. (2011). Recent Findings on Neuroprotection Against Excitotoxicity in the Hippocampus of Female Rats. *Journal of Neuroendocrinology*, 23, 994-1001.
51. Morales, T., Lorenson, M., Walker, A.M. y Ramos, E. (2014). Both Prolactin (PRL) and a Molecular Mimic of Phosphorylated PRL, S179D-Prl, Protect the Hippocampus of Female Rats Against Excitotoxicity. *Neuroscience*, 258, 211-217.
52. Patil, M.J., Henry, M.A. y Akopian, A.N. (2014). Prolactin receptor in regulation of neuronal excitability and channels. *Channels*, 8(3), 193-202.
53. Pathipati, P., Gorba, T., Scheepens, A., Goffin, V., Sun, Y., y Fraser, M. (2011). Growth Hormone and Prolactin Regulate Human Neural Stem Cell Regenerate Activity. *Neuroscience*, 190, 409-427.

54. Pereira-Suarez A.L., López-Rincón, G., Martínez-Neri, P.A., y Estrada-Chavez, C. (2015). Prolactin in Inflammatory Response. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 846, 243-264.
55. Pfrieger, F.W. (2009). Rol of glial cells in the formation and maintenance of synapses. *Brain Research Reviews*, 63, 39-46.
56. Piwnica, D., Touraine, P., Struman, I., Tabruyn, S., Bolbach, G., Clapp, C., Martial, J.A., Kelly, P.A., y Goffin, V. (2004). Cathepsin D Processes Human Prolactin into Multiple 16K-Like N-Terminal Fragments: Study of their Antiangiogenic Properties and Physiological Relevance. *Molecular Endocrinology*, 18(10), 2522-2542.
57. Raik, P. (2007). The radial edifice of cortical architecture: From neuronal silhouettes to genetic engineering. *Brain Research Reviews*, 55(2), 204–219.
58. Ranasinghe, H. S., Williams, C. E., Christophidis, L. J., Mitchell, M. D., Fraser, M.Y Scheepens, A. (2009). Proteolytic Activity During Cortical Development is Distinct From that Involved in Hypoxic Ischemic Injury. *Neuroscience*, 158, 732–744.
59. Reinhard, S.M., Razak, K. y Ethell, I.M. (2015). A delicate balance: role ofMMP-9 in brain development and pathophysiology of neurodevelopmental disorders. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9, 280.
60. Reyes-Mendoza, J. y Morales, T. Post-Treatment with Prolactin Protects Hippocampal CA1 Neurons of the Ovariectomized Female Rat Against Kainic Acid-Induced Neurodegeneration. *Neuroscience*, 328, 58-68.
61. Robel S., Berninger, B. y Götz, M. (2011). The stem cell potential of glia: lessons from reactive gliosis. *Neuroscience*, 12, 88-104.
62. Roselli, C.E., Bocklandt, S., Stadelman, H.L., Wadsworth, T., Vilain, E. y Stormshak, F. (2008). Prolactin Expression in the Sheep Brain. *Neuroendocrinology*, 87, 206–215.
63. Saijo, K., Winner, B., Carson, C.T., Collier, J.G., Boyer, L., Rosenfeld, M.G., Gage, F.H., y Glass, C.K. (2009). A Nurr1/CoREST transrepression pathway attenuates neurotoxic inflammation in activated microglia and astrocytes. *Cell*, 137(1), 47-59.
64. Schuff, K.G., Hentges, S.T., Kelly, M.A., Binart, N., Kelly, P.A., Iuvone, P.M., Asa, S.L. y Low, M.J. (2002). Lack of prolactin receptor signaling in mice result in lactotroph proliferation and prolactinomas by dopamine-dependent and independent mechanisms. *The Journal of Clinical Investigation*, 110(7), 973-981.

65. Sekine-Aizawa, Y., Hama, E., Watanabe, K., Tsubuki, S., Kanai-Azuma, M., Kanai, Y., Arai, H., Aizawa, H., Iwata, N. y Saido, T.C. (2001). Matrix metalloproteinase (MMP) system in brain: identification and characterization of brain-specific MMP highly expressed in cerebellum. *European Journal of Neuroscience*, 13, 935-948.
66. Shepherd, G.M. (1998). The Synaptic Organization of the Brain. *Oxford University Press, Cuarta Edición, Capítulo 11*, New York, 417-458.
67. Sofroniew, M.V. y Vinters, H.V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathological*, 119, 7–35.
68. Stoka, V., Turk, V. y Turk, B. (2016). Lysosomal cathepsins and their regulation in aging and neurodegeneration. *Ageing Research Reviews*, 32, 22–37.
69. Tejadilla, D., Cerbón, M., y Morales, T. (2010). Prolactin Reduces the Damaging Effects of Exitotoxicity in the Dorsal Hippocampus of the Female Rat Independently of ovarian hormones. *Neuroscience*, 169, 1178-1185.
70. Torner, L. (2016). Actions of Prolactin in the Brain: From Physiological Adaptations to Stress and Neurogenesis to Psychopathology. *Frontiers in Endocrinology*, 7(25), 1-6.
71. Torner, L., Karg, S., Blume, A., Kandasamy, M., Kuhn, H.G., Winkler, J., Aigner, L., y Neumann, I.A. (2009). Prolactin Prevents Chronic Stress-Induced Decrease of Adult Hippocampal Neurogenesis and Promotes Neural Fate. *The Journal of Neuroscience*, 29(6), 1826-1833.
72. Torner, L., Rodriguez, M., Nava, G., Aranda, J., Clapp, C. y Neumann, I.D. (2004). In vivo relelase and gene upregulation of brain prolactin in response to physiological stimuli. *European Journal of Neuroscience*, 19, 1601-1608.
73. Torner, L. y Neumann, I.D. (2000). The Brain Prolactin System: Involvement in Stress Response Adaptations in Lactation. *Stress*, 5(4), 249-257.
74. Torner, I. Toschi, N., Pohlinger, A., Landgraf, R. y Neumann, I.D. (2001). Anxiolytic and anti-stress effects of brain prolactin: Improved efficacy of antisense targeting of the prolactin receptor by molecular modeling. *The Journal of Neuroscience*, 21(9):3207–3214.
75. Triebel, J., Bertsch, T., Bollheimer, C., Rios-Barrera, D., Pearce, C.F., Hüfner, M., Martínez de la Escalera, G. y Clapp, C. (2015). Principles of the prolactin/vasoinhibin axis. *American Journal of Physiology Regulation and Integral Comparative Physioly*, 309, R1193–R1203.

76. Verkhratsky, A. y Parpura, V. (2016). Astrogliopathology in neurological, neurodevelopmental and psychiatric disorders. *Neurobiology of Disease*, 85, 254-261.
77. Walker, T.L., Vukovik, J., Koudijs, M.M., Blackmore, D.G., Mackay, E.W., Sykes, A.M., Overall, R.W., Hamlin, A.S., y Bartlett, P.F. (2012). Prolactin Estimulates Precursor Cells in the Adult Mouse Hippocampus. *PLoS One*, 7(9), e44371.
78. Wang, W., Pan, Y.-W., Wietecha, T., Zou, J., Abel, G. M., Kuo, C. T. y Xia, Z. (2013). Extracellular Signal-regulated Kinase 5 (ERK5) Mediates Prolactin-stimulated Adult Neurogenesis in the Subventricular Zone and Olfactory Bulb. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(4), 2623–2631.
79. Wright, J.W. y Harding, J.W. (2005). Proteases and Neuronal Plasticity. Proteases in the Brain, *Springer*. Capítulo 10, 235.
80. Yang, X. y Friedl, A. (2015). A Positive Feedback Loop Between Prolactin and STAT5 Promotes Angiogenesis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 846, 265-280.
81. Yang, C., Hsieh, H., Yu, P., Lin, C. y Liu, S. (2015). IL-1 β Induces MMP-9-Dependent Brain Astrocytic Migration via Transactivation of PDGF Receptor/NADPH Oxidase 2-Derived Reactive Oxygen Species Signals. *Molecular Neurobiology*, 52, 303–317.
82. Zamorano M., Ledesma-Colunga, M.G., Adán, N., Vera-Massieu, C., Lemini, M., Méndez, I., Moreno-Carranza, B., Neumann, I.D., Thebault, S., Martínez de la Escalera, G., Torner L., y Clapp, C. (2014). Prolactin-derived vasoinhibins anxiety and depression-related behaviors. *Psychoneuroendocrinology*, 44, 123-132.
83. Zhai, X., Liang, P., Li, Y., Li, L., Zhou, Y., Wu, X., Deng, J. y Jiang, L. (2015). Astrocytes Regulate Angiogenesis Through the Jagged1-Mediated Notch1 Pathway After Status Epilepticus. *Molecular Neurobiology*, 53(9), 5893-5901.
84. Zuzarte, L., V., Montero, J.A., Kawakami, Y., Izpisua-Belmonte, J.C. y Hurle, J.M. (2007). Lysosomal cathepsins in embryonic programmed cell death. *Developmental Biology*, 301, 205–217.