



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS  
DE HIDALGO**



**FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA**

**EFFECTOS DE LA PROLACTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$  EN EL  
HIPOCAMPO DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS.**

**TESIS QUE PRESENTA:**

**DORA ANDRADE GONZÁLEZ ÁLVAREZ**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**

**Directora de tesis:**

**D en C. María de la Luz Torner Aguilar.**

**Morelia, Michoacán diciembre 2021**

**EFFECTOS DE LA PROLACTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$  EN EL  
HIPOCAMPO DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS**

**Este trabajo de tesis se realizó en el laboratorio del Centro de Investigación Biomédica de Michoacán (CIBIMI) IMSS, bajo la asesoría de la D en C María de la Luz Torner Aguilar y obtuvo financiamiento del CONACyT No. CB 14 – 243419.**

# **EFFECTOS DE LA PROLACTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$ EN EL HIPOCAMPO DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS**

## **DEDICATORIA**

Esta tesis se la dedico a todas esas personas que creyeron en mí, en mis deseos de culminar con este proyecto.

A Dios por siempre enseñarme el camino y darme luz y esperanza en cada momento de mi vida.

A mi madre Mariana Alvarez Vázquez; Por siempre estar a mi lado a lo largo de mi carrera y vida personal, apoyándome con sus consejos y regaños. por enseñarme que a pesar de los obstáculos siempre se pueden lograr los sueños. Gracias por todo tu apoyo y dedicación.

A mi padre Antonio Gonzalez López; Que hoy físicamente no está conmigo, pero siempre estarás en mi corazón y en mis pensamientos, tu mi gran ejemplo de lucha y perseverancia, ojalá pudieras estar aquí para ver este logro, sin ti esto no hubiera sido posible. Gracias por ser siempre el mejor padre del mundo.

# EFFECTOS DE LA PROLACTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$ EN EL HIPOCAMPO DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS

## AGRADECIMIENTOS

- A la facultad de Químico Farmacobiología de la UMICH por ser parte muy importante en mi formación académica.
- A la D.C María de la luz Torner Aguilar; Por confiar en mí y haberme brindado su apoyo y sus conocimientos para que este proyecto fuera posible y culminara de la mejor manera posible.
- A mi comité que está integrado por; D en C. Naima Lajud Ávila, D en C. Esperanza Meléndez Herrera, D en C. Sandra G. Sánchez Ceja, D en C. Rubén Pinta Chávez, D en C. Bertha Fenton Navarro. Por brindarme de su valioso tiempo para realizar sus observaciones y aportaciones que fueron relevantes en la realización de esta tesis.
- A mis hermanas: Por brindarme su apoyo a pesar de todas las dificultades que se han presentado durante este trayecto.
- A mis amigas; Alicia y Martha por siempre animarme a seguir luchando por mis objetivos y por hacer que mi estancia en el CIBIMI fuera más placentera y agradable.
- Al D.C. Luis Miguel Saavedra Pimentel; Por apoyarme en el inicio experimental de este trabajo, gracias por tu paciencia, conocimientos y dedicación, sobre todo gracias porque en ti encontré a una gran persona y una hermosa amistad que me llevare el resto de mi vida.

**EFFECTOS DE LA PROLACTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$  EN EL  
HIPOCAMPO DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS**

<b>INDICE</b>		<b>PAGINA</b>
<b>SECCIÓN</b>		
	ÍNDICE DE TABLAS	VI
	ÍNDICE DE FIGURAS	VI
	ABREVIATURAS	VII
I	RESUMEN	IX
	ABSTRACT	X
II	INTRODUCCIÓN	1
1.-	PROLACTINA	1
2.-	REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS Y SECRECIÓN DE PROLACTINA	2
3.-	RECEPTORES A PROLACTINA	4
4.-	ACCIONES BIOLÓGICAS DE PROLACTINA	7
4.1.-	ACCIONES DE PROLACTINA EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	9
4.2.-	PROLACTINA Y SISTEMA INMUNE	9
5.-	CITOCINAS	12
5.1.-	CITOCINAS EN LA INFLAMACIÓN	12
5.2.-	CITOCINAS COMO PARTE DE LA RESPUESTA INMUNE CEREBRAL	13
6.-	SISTEMA INMUNE CEREBRAL	14
7.-	EFFECTOS DE PROLACTINA EN EL SISTEMA INMUNE CEREBRAL	15
8.-	ESTRÉS	16
8.1.-	RESPUESTAS AL ESTRÉS	16
8.2.-	SISTEMA NERVIOSO AUTÓNOMO	17
8.3.-	ACTIVACIÓN DEL EJE HPA	17
8.4.-	MECANISMOS DE RETROALIMENTACION DEL EJE CORTICOTRÓPICO POR LA CORTICOSTERONA	20
8.5.-	ESTRÉS Y SISTEMA INMUNE	21
9.-	HIPOCAMPO	22
III	ANTECEDENTES DIRECTOS	23
IV	HIPÓTESIS	24
V	OBJETIVOS GENERALES	24
VI	OBJETIVOS PARTICULARES	24
VII	METODOLOGÍA	25
1.-	ANIMALES	25
2.-	GRUPO DE ANIMALES	25
3.-	INYECCIÓN DE PROLACTINA O BROMOCRIPTINA	26
4.-	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	27
4.1.-	EXTRACCIÓN DE RNA	28
4.2.-	SÍNTESIS DE CDNA	28
4.3.-	PCR PUNTO FINAL	28
4.4.-	qPCR	29
5.-	ANÁLISIS DE RESULTADOS	30

**EFFECTOS DE LA PROLACTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$  EN EL  
HIPOCAMPO DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS**

VIII	RESULTADOS		31
1.-	ADMINISTRACIÓN DE PROLACTINA BROMOCRIPTINA EN CONDICIONES BASALES	O	31
2.-	ADMINISTRACIÓN DE PROLACTINA BROMOCRIPTINA EN CONDICIONES DE ESTRÉS	O	32
3.-	COMPARACIÓN DEL EFECTO DE PROLACTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$ EN CONDICIONES BASALES Y DE ESTRÉS		33
4.-	COMPARACIÓN DEL EFECTO DE BROMOCRIPTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$ EN CONDICIONES BASALES Y DE ESTRÉS		34
IX	DISCUSIÓN		35
X	CONCLUSIONES		40
XI	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS		41

**EFFECTOS DE LA PROLACTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$  EN EL  
HIPOCAMPO DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS**

**INDICE DE TABLAS**

<b># TABLA</b>	<b>DESCRIPCION</b>	<b>PAGINA</b>
1	SECUENCIA DE OLIGONUCLEÓTIDOS	29

**INDICE DE FIGURAS**

<b># FIGURA</b>	<b>TITULO DE FIGURA</b>	<b>PAGINA</b>
1	REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE ISOFORMAS SOLUBLES (HUMANAS) Y DE MEMBRANA (RATA) DEL PRLR	6
2	CÉLULAS Y TEJIDOS DEL CUERPO HUMANO QUE PRODUCEN PROLACTINA	8
3	RESPUESTA DEL EJE HPA AL ESTRÉS	19
4	GRUPOS EXPERIMENTALES	26
5	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	27
6	NIVELES DE EXPRESIÓN RELATIVA DEL ARNm DE TNF- $\alpha$ EN RATAS MACHOS Y HEMBRAS AL PN15 EN CONDICIONES BASALES	31
7	NIVELES DE EXPRESIÓN RELATIVA DEL ARNm DE TNF- $\alpha$ EN RATAS MACHOS Y HEMBRAS AL PN15 EN CONDICIONES DE ESTRÉS	32
8	COMPARACIÓN DE LOS EFECTOS DE PRL SOBRE LA EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$ EN CONDICIONES BASALES Y DE ESTRÉS EN RATAS MACHOS Y HEMBRAS	33
9	COMPARACION DE LOS NIVELES DE BROMOCRIPTINA SOBRE LA EXPRESION DE TNF- $\alpha$ EN CONDICIONES BASALES Y DE ESTRÉS EN RATAS MACHO Y HEMBRAS	34

**EFFECTOS DE LA PROLACTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$  EN EL  
HIPOCAMPO DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS**

**ABREVIATURAS**

<b>ACTH:</b>	Hormona adenocorticotropina.
<b>ANOVA:</b>	Análisis de varianza.
<b>ARN:</b>	Ácido ribonucleico.
<b>ARNm:</b>	Ácido ribonucleico mensajero.
<b>AVP:</b>	Vasopresina.
<b>BRC:</b>	Bromocriptina.
<b>CDNA:</b>	DNA complementario.
<b>CRH:</b>	Hormona liberadora de corticotropina.
<b>DC:</b>	Células dendríticas.
<b>dNTPs:</b>	Desoxirribonucleótidos trifosfatos.
<b>DTT:</b>	Dithiothreitol.
<b>GABA:</b>	Ácido $\gamma$ -aminobutírico.
<b>GnRH:</b>	Hormona liberadora de gonadotropina.
<b>HPA:</b>	Eje hipotalámico-hipofisario-adrenal.
<b>IFN-<math>\alpha</math>:</b>	Interferón alfa.
<b>IgA:</b>	Inmunoglobulina A.
<b>IL- 1 <math>\beta</math>:</b>	Interleucina 1 beta.
<b>IL 1:</b>	Interleucina 1.
<b>IL-1 <math>\alpha</math>:</b>	Interleucina 1 alfa.
<b>IL-10:</b>	Interleucina 10.
<b>IL-12:</b>	Interleucina 12.
<b>IL-2:</b>	Interleucina 2.
<b>IL6:</b>	Interleucina 6.
<b>Jak2:</b>	Janus quinasa 2.
<b>MC:</b>	Mineralocorticoides..
<b>MHC-II:</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad.
<b>MLVRT:</b>	Transcriptasa inversa.
<b>NF- kappaBp65:</b>	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.
<b>NIH:</b>	Institutos de Salud Norteamericanos.
<b>NK:</b>	Natural killer (células asesinas).
<b>NOM:</b>	Norma Oficial Mexicana.
<b>NPV:</b>	Núcleos aminérgicos del tronco cerebral.
<b>OT:.</b>	Oxitocina.
<b>PIF:</b>	Factores inhibidores de la prolactina.
<b>PN14:</b>	Día posnatal 14.
<b>PN15:</b>	Día posnatal 15.
<b>PRF:</b>	Factores liberadores de prolactina.
<b>PRL:</b>	Prolactina.
<b>PRL-R:</b>	Receptor de prolactina.
<b>qPCR:</b>	Reacción de cadena de la polimerasa.
<b>RNAsa OUT:</b>	Inhibidor de ribonucleasa recombinante.

**EFFECTOS DE LA PROLACTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$  EN EL  
HIPOCAMPO DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS**

- RT-PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa.  
**SM:** Separación maternal.  
**SNA:** Sistema nervioso autónomo.  
**SNC:** Sistema nervioso central.  
**SST:** Somatostatina.  
**TGF $\alpha$ :** factor de crecimiento transformante alfa.  
**TNF- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral alfa.  
**TRH:** Hormona liberadora de tirotrópina.  
**VEH:** Vehículo.

# EFFECTOS DE LA PROLACTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$ EN EL HIPOCAMPO DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS

## RESUMEN

**Introducción:** El estrés activa el sistema neuroinmune induciendo la expresión de citocinas proinflamatorias. La prolactina es una hormona que regula la respuesta inmune periférica y también actúa como citocina, sin embargo, se desconoce su posible papel como regulador de la expresión de citocinas en el sistema nervioso.

**Objetivo:** conocer el papel de la prolactina en el sistema neuroinmune del hipocampo en respuesta al estrés. **Materiales y métodos:** se utilizaron grupos de ratas Sprague Dawley 1) control-basal; 2) control-estrés; 3) prolactina-basal; 4) prolactina- estrés; 5) bromocriptina-basal; 6) bromocriptina-estrés. Los grupos se inyectaron el día PN (posnatal) 14 y el PN15 con solución salina (Control), prolactina (2 mg/Kg), o bromocriptina (100 $\mu$ g) para inhibir la expresión y secreción de prolactina. Después de las inyecciones del PN15 los grupos de estrés se sometieron a separación maternal (3h) mientras que los grupos de condiciones basales permanecieron en el nido materno. Todos los grupos se sacrificaron 3h después de la inyección. Se extrajeron los hipocampos para aislar el RNAm (RNA mensajero) mediante el método de Trizol, este se retrotranscribió a cDNA (DNA complementario) y posteriormente se analizó la expresión de TNF- $\alpha$  (factor de necrosis tumoral alfa) por medio de qPCR (reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real). **Resultados:** Observamos que la expresión basal de TNF- $\alpha$  aumenta significativamente en machos y hembras tratados con prolactina. A la vez, la ausencia de prolactina debida a la administración de Bromocriptina no afecta la expresión de TNF- $\alpha$ . Por su parte, la exposición al estrés induce un aumento ligero de TNF- $\alpha$  en machos y este es más marcado en las hembras, sugiriendo una respuesta dimórfica. En los grupos estresados, la prolactina inhibe la expresión de TNF- $\alpha$  en machos y hembras, mientras que la bromocriptina no tiene efecto. **Conclusión:** La prolactina regula la expresión de TNF- $\alpha$ , ya que la estimula en condiciones basales, pero la inhibe en respuesta al estrés. Proponemos que la prolactina podría actuar como un regulador del Sistema Inmune Cerebral.

**Palabras clave:** citocinas, cerebro, sistema neuroinmune, estrés, TNF- $\alpha$ .

# EFFECTOS DE LA PROLACTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$ EN EL HIPOCAMPO DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS

## ABSTRACT

**Introduction:** Stress activates the Neuroimmune System by inducing the expression of pro-inflammatory cytokines. Prolactin is a hormone that regulates the peripheral immune response and also acts as a cytokine, however its possible role as a regulator of cytokine expression in the nervous system is unknown. **Objective:** to know the role of prolactin in the Neuroimmune System of the hippocampus in response to stress. **Materials and methods:** Sprague Dawley rats divided in six groups 1) control-basal; 2) control-stress; 3) prolactin-basal; 4) prolactin-stress; 5) bromocriptine-basal; 6) bromocriptine-stress. Groups were injected on day PN (postnatal) 14 and PN15 with saline (Control), prolactin (2 mg / Kg), or bromocriptine (100  $\mu$ g) to inhibit prolactin expression and secretion. After PN15 injections, the stress groups underwent maternal separation (3h) while the groups with basal conditions remained in the maternal nest. All groups were sacrificed 3h after injection. The hippocampus were extracted to isolate the mRNA using the Trizol method, this was retrotranscribed into cDNA (complementary DNA) and the expression of TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor alpha) was subsequently analyzed by qPCR (real-time polymerase chain reaction). **Results:** We observed that basal expression of TNF- $\alpha$  increases significantly in males and females treated with prolactin. At the same time the absence of prolactin due to the administration of Bromocriptine does not affect the expression of TNF- $\alpha$ . On the other hand, exposure to stress induces a slight increase in TNF- $\alpha$  in males and this is more marked in females, suggesting a dimorphic response. In stressed groups, prolactin inhibits the expression of TNF- $\alpha$  in males and females, while bromocriptine has no effect. **Conclusion:** Prolactin regulates the expression of TNF- $\alpha$ , since it stimulates it in basal conditions but inhibits it in response to stress. We propose that prolactin could act as a regulator of the Brain Immune System.

**Keywords:** cytokines, brain, neuroimmune system, stress, TNF- $\alpha$ .

# EFFECTOS DE LA PROLACTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$ EN EL HIPOCAMPO DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS

## I.- INTRODUCCIÓN

### 1.- Prolactina.

La Prolactina (PRL) es una hormona polipeptídica de cadena única, es una hormona proteica helicoidal pertenece a la familia de receptores de citocinas tipo I, de la que también forma parte el de la hormona de crecimiento (Kelly, 1991). Descubierta en mamíferos alrededor de la década de 1930 por *Oscar Riddle*, fue encontrada en humanos en 1970, por *Friesen*. Es una hormona proteica de la hipófisis anterior que originalmente fue nombrada por su capacidad para promover la lactancia en respuesta al estímulo de los mamíferos jóvenes (Freeman, 2000).

La PRL es una hormona pleiotrópica con una regulación de expresión compleja que modula diversos procesos fisiológicos, como la angiogénesis, la respuesta inmune, la osmorregulación, el comportamiento reproductivo y la lactogénesis, y otros relacionados con áreas hipotalámicas específicas involucradas en el control de la lactancia (Nira y cols, 1996). Es principalmente sintetizada por células especializadas de la hipófisis anterior denominadas lactotropos. Así mismo se ha demostrado que la síntesis y secreción de esta hormona no se restringe a la hipófisis, sino que las células de otros órganos y tejidos tienen esta capacidad, entre ellas diversas células del sistema inmunológico (Nira, 1996). Es bien sabido que la dopamina de origen hipotalámico proporciona un control inhibitorio sobre la secreción de PRL, también se ha demostrado que otros factores dentro del cerebro, la glándula pituitaria y los órganos periféricos inhiben o estimulan su secreción (Freeman, 2000).

Se han reconocido más de 300 funciones ejercidas por PRL en vertebrados; y reflejan la distribución ubicua de sus receptores, así como el hecho de que la PRL se sintetiza en muchos tejidos extra pituitarios. Entre estos sitios de síntesis de PRL se encuentran las células del sistema inmune, como los macrófagos, las células asesinas naturales y los linfocitos T y B. En la fisiología del sistema inmunitario, la PRL actúa estimulando la secreción de otras citocinas y la expresión de receptores

## **EFFECTOS DE LA PROLACTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$ EN EL HIPOCAMPO DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS**

de citocinas, y también como factor de crecimiento y supervivencia (Méndez y cols, 2005).

Se ha informado que la PRL influye en ciertas funciones cerebrales, como el comportamiento materno, la alimentación y el apetito, la secreción de oxitocina y la secreción de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) en respuesta al estrés, muchos de estos efectos de la PRL pueden aumentar o exagerarse durante la lactancia, por lo tanto, puede ser un jugador clave en la coordinación de las adaptaciones neuroendocrinas y conductuales del cerebro materno (Grattan, 2001).

### **2. Regulación de la síntesis y la secreción de prolactina**

Con base en sus propiedades genéticas, estructurales, de unión y funcionales, la PRL pertenece a la familia de la prolactina / hormona del crecimiento, lactógeno placentario, grupo I de las hormonas proteicas del haz de hélices (Freeman, 2000). El lugar principal de síntesis y secreción de la PRL son las células lactotropas, también llamadas mamotropas, de la adenohipófisis que representan entre el 20 y el 50% de las células de esta glándula (Pérez, 2010). Es una hormona de 23 kDa compuesta de 199 aminoácidos que forman una cadena polipeptídica única con tres enlaces disulfuro intramoleculares, se ha identificado principalmente como un factor estimulante importante para la lactancia en el período posparto (Méndez y Cols, 2007).

En la especie humana, el gen de PRL se localiza en el cromosoma 6 (Owerbach y cols, 1981) y en la rata en el cromosoma 10 compuesto por 5 exones y 4 intrones (Cooke y cols, 1986). Su transcripción está regulada por dos regiones promotoras, la proximal que controla específicamente su expresión hipofisaria y la más externa que regula su expresión extra-hipofisaria. Su ARN mensajero (ARNm) da origen a un polipéptido de 227 aminoácidos que contiene un péptido señal de 28 aminoácidos, por lo que la proteína madura tiene un tamaño de 199 aminoácidos (Pérez, 2010).

## **EFFECTOS DE LA PROLACTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$ EN EL HIPOCAMPO DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS**

La expresión y secreción de PRL están reguladas por diferentes estímulos proporcionados por el medio ambiente y el medio interno. Los estímulos fisiológicos más importantes que elevan la secreción de PRL pituitaria son la succión, el estrés y el aumento de los niveles de esteroides ováricos, principalmente estrógenos (Freeman, 2000). Dichos estímulos son transducidos por el hipotálamo, que elabora una gran cantidad de factores liberadores de PRL (PRF) y factores inhibidores de PRL (PIF) (Pérez, 2010).

Las vías comunes finales del control central estimulante e inhibidor de la secreción de PRL son las neuronas neuroendocrinas que producen factores PIF, como la dopamina, la somatostatina y el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) o PRF, como la hormona liberadora de tirotropina (TRH), oxitocina y neurotensina (Villanueva y col, 2006).

La dopamina es el principal inhibidor de la síntesis y secreción de PRL (Kimura, 1975). Las neuronas dopaminérgicas que controlan la secreción de PRL se localizan en el núcleo arcuato del hipotálamo. A través del sistema portal del tallo hipotálamo-hipofisario las neuronas dopaminérgicas del núcleo arcuato secretan dopamina hacia las células lactotropas de la adenohipófisis. La dopamina ejerce su función inhibidora tras interaccionar con los receptores dopaminérgicos tipo 2 (D2) en la membrana de las células lactotropas (Andrews, 2005). De esta forma la PRL misma actúa en el cerebro para estimular la producción de dopamina e inhibir su propia secreción. Es común el uso de agonistas dopaminérgicos, tales como Bromocriptina, para inhibir la síntesis y secreción de PRL en pacientes con hiperprolactinemia o también para experimentación en modelos animales (Grattan, 2015).

# EFFECTOS DE LA PROLACTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$ EN EL HIPOCAMPO DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS

## 3. Receptores a prolactina

Los receptores de PRL se expresan en múltiples tejidos implicados en la regulación metabólica, incluidos el tejido adiposo, el hígado, el páncreas; se ha documentado la presencia de receptores a PRL en diferentes áreas del cerebro (Nagano y Kelly, 1994).

El receptor de PRL (PRL-R) es una proteína transmembranal. Su gen se encuentra en el cromosoma 5. A diferencia del gen de PRL que codifica para una sola proteína este codifica para tres diferentes isoformas (Blanco y col, 2012). Varias isoformas de los receptores PRL-R se producen en tipos celulares específicos durante su diferenciación, y los receptores maduran y se transportan a la membrana plasmática. Las tres isoformas principales de PRL-R descritas en ratas son la forma corta (291 aminoácidos), intermedia (393 aminoácidos) y larga (591 aminoácidos) (Bole, 1998).

Existen 3 isoformas mayoritarias de PRL-R que contiene 3 regiones definidas denominadas; región extracelular, transmembranal e intracelular.

La región extracelular de PRL-R, está compuesta por 200 aminoácidos aproximadamente y contiene dos dominios de homología de receptores de citocinas de unos 100 aminoácidos cada uno, denominados D1 (amino terminal) y D2 (próximo a la membrana). Ambos contienen nódulos de tipo fibronectina tipo II (Bole, 1998) El dominio D1 contiene dos puentes bisulfuro en el extremo amino-terminal, formados por 4 residuos de cisteína; el D2 contiene un pentapéptido denominado motivo WS, próximo a la membrana plasmática. El dominio transmembranal posee 24 aminoácidos, mientras el intracelular presenta diferentes tamaños y composiciones (Tan y col, 2010).

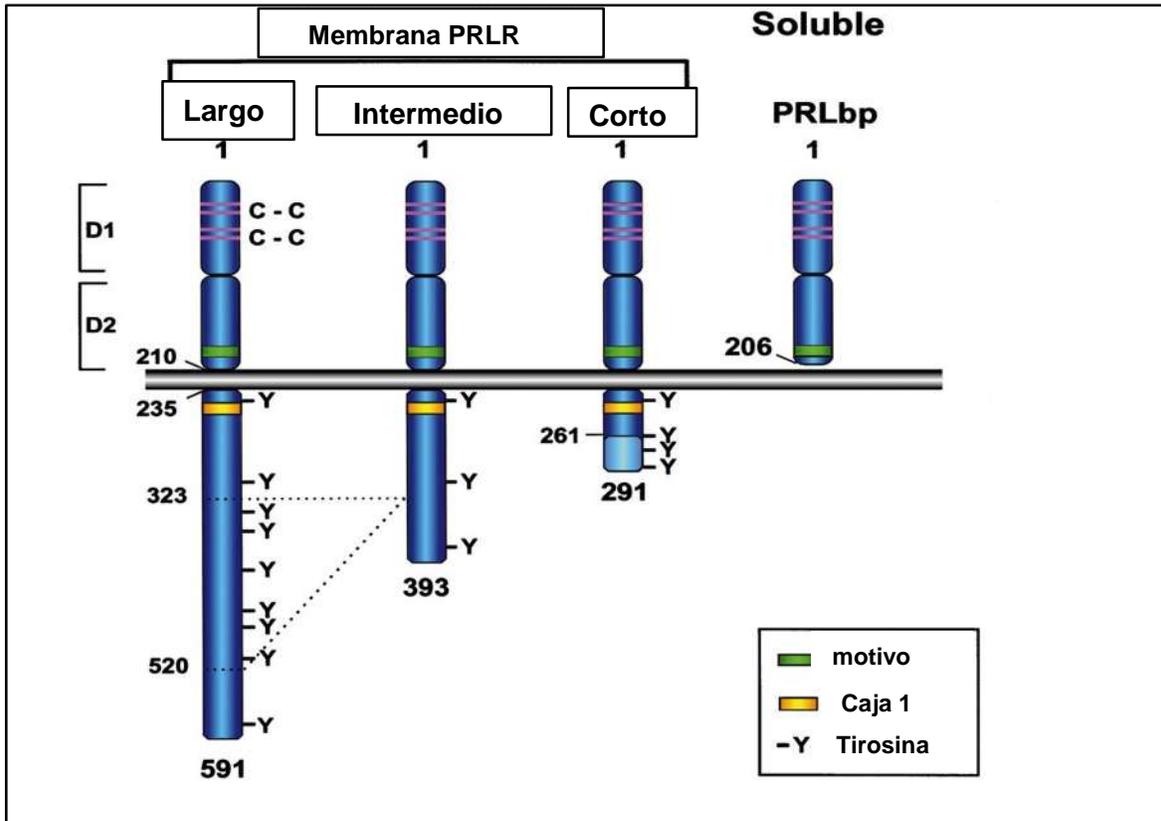
La zona intracelular de los receptores de citocinas es la más específica, aunque contiene dos regiones conservadas, denominadas Caja I y Caja II. La Caja I está localizada en la proximidad de la membrana plasmática, y tiene una secuencia rica en prolinas y aminoácidos hidrofóbicos (Binart y col, 2010).

## **EFECTOS DE LA PROLACTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$ EN EL HIPOCAMPO DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS**

En un primer paso, la PRL se une a una molécula de receptor (complejo H1:R1) por su primer dominio de unión formado por varios residuos aminoacídicos presentes en las hélices 1 y 4. A continuación, se une por su segundo dominio de interacción, formado por residuos aminoacídicos presentes en las hélices 2 y 3, a otra molécula de receptor formando el complejo hormona-receptor (H1:R2) activo (Goffin y col, 1996). Los puentes bisulfuro en el dominio D1 y el motivo WS del dominio D2 del receptor son esenciales para definir su estructura terciaria, requerida para la unión eficaz con la hormona (Bole, 1998). El receptor de PRL puede unirse y ser activado por al menos tres tipos de hormonas: la PRL, la lactògeno-placentaria y en primates también la hormona de crecimiento (Freeman, 2000).

Como todos los de la familia de citocinas tipo I, el receptor de PRL no tiene actividad enzimática, sin embargo, su activación por la hormona provoca un aumento de la fosforilación de proteínas celulares, incluida la del propio receptor en residuos de tirosina (Sinha, 1995; Goffin y cois, 1996). Esto se debe a que el receptor de prolactina une en su región intracelular a dos tipos de proteínas tirosina quinasas, Jak2, miembro de la familia de las Janus quinasas, y las proteínas tirosinas quinasas de la familia de proto-oncogenes Src. (Forsyth, 2002). La activación de estas enzimas desencadena una serie de señales intracelulares que dependiendo del contexto celular y fisiológico determinan procesos de proliferación, supervivencia o diferenciación (Blanco y cols, 2012).

**EFFECTOS DE LA PROLACTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$  EN EL  
HIPOCAMPO DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS**



**Figura 1. Representación esquemática de isoformas solubles (humanas) y de membrana (rata) del PRLR.** Los receptores se clasifican en forma corta (291 aminoácidos), intermedia (393 aminoácidos) y larga (591 aminoácidos). El subdominio D1 contiene dos pares de cisteínas unidas por enlaces disulfuro (C-C) y el subdominio D2 contiene el motivo WS (cuadro verde), dos rasgos característicos de la superfamilia de receptores de citocinas. La zona intracelular de los receptores a citocinas contiene la Caja I, la cual está localizada en la proximidad de la membrana plasmática. Además, el PRLR contiene varios residuos de tirosina susceptibles a ser fosforilados (modificado de Bole, 1998).

## EFFECTOS DE LA PROLACTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$ EN EL HIPOCAMPO DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS

### 4. Acciones biológicas de prolactina

La PRL es mejor conocida por los múltiples efectos que ejerce sobre la glándula mamaria. Es necesaria en la ramificación de los ductos y en el crecimiento y desarrollo lóbulo alveolar de la glándula mamaria durante la gestación (Freeman, 2000). En la lactogénesis la PRL estimula la captación de aminoácidos, la síntesis de caseína y lactoalbúmina, la captación de glucosa y la síntesis de lactosa, así como de los ácidos grasos de la leche (Bole y col, 1998). Sin embargo, también ejerce otros efectos importantes que han sido revisados a fondo por el grupo de *Paul Kelly*, que clasificaron las funciones en seis grandes categorías:

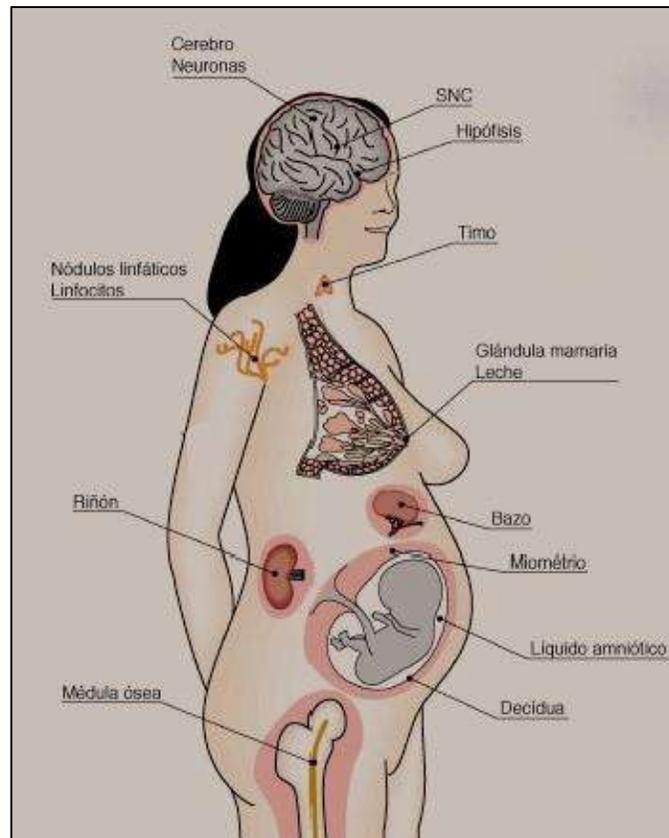
- Equilibrio de agua y electrolitos
- Crecimiento y desarrollo
- Endocrinología y metabolismo
- Cerebro y comportamiento
- Reproducción
- Regulación y protección inmunológica

En algunos mamíferos, particularmente roedores, la PRL también es importante para el mantenimiento y la actividad secretora del cuerpo lúteo. Las acciones de la prolactina sobre la función lútea dependen de las especies y la etapa del ciclo estral (Kelly y col., 1980). También afecta otras acciones relacionadas con la reproducción, como el apareamiento y los comportamientos maternos. En el área sexual se sabe del pico sostenido después del clímax, en hombres y en mujeres, por lo que la prolactina ejerce influencia en lo sexual y en lo reproductivo para el inicio del embarazo (Toro, 2014).

En la respuesta inmune, la PRL juega un papel significativo en la regulación de las respuestas celular y humoral en condiciones fisiológicas. Se ha demostrado que son necesarios niveles bajos de PRL circulante para mantener la inmunocompetencia normal (Ben, 1996). La PRL también modula la expresión de genes cruciales para la función de los leucocitos (Cejkova, 2009).

## EFFECTOS DE LA PROLACTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$ EN EL HIPOCAMPO DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS

La PRL regula la homeostasis controlando el transporte de iones sodio, calcio y cloruro a través de las membranas epiteliales del intestino, la captación de aminoácidos por las células epiteliales de la glándula mamaria, así como de otros iones y agua en el riñón (Freman, 2000).



**Figura 2. Células y tejidos del cuerpo humano que producen prolactina.** La prolactina se sintetiza principalmente en las células lactotropas de la adenohipófisis, aunque también se produce en otras células o tejidos como el cerebro, el timo, los nódulos linfáticos, la glándula mamaria, el bazo, el miometrio, la decidua y la médula ósea. La PRL se detecta en diversos fluidos biológicos como: la leche materna, el líquido amniótico, orina, etc. (Pérez, 2005).

# **EFFECTOS DE LA PROLACTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$ EN EL HIPOCAMPO DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS**

## **4.1 Acciones de prolactina en el sistema nervioso central (SNC).**

En el SNC, algunas de las acciones de la PRL son la regulación de la conducta materna (Mann y Bridges, 2001), la modulación de algunos neuropeptidos, tales como la hormona liberadora de gonadotropina (GNRH), oxitocina, dopamina, y otros (Biggio y col, 2009; Brown y col, 2012; Kovacs y col, 2017; Maguire y col, 2009; Rivero y col, 2017; Sirzen y col, 2011). Además, en el contexto del estrés, la PRL atenúa las respuestas emocionales al estrés (Torner y Neumann, 2002), tiene efectos sobre la mielinización (Gregg y col, 2007), regula la neurogénesis (Furuta y Bridges, 2005; Shingo y col, 2003) y tiene efectos de neuroprotección (Morales, 2011; Morales y col, 2014; Tejadilla y col, 2010; Torner y col, 2009). La liberación de PRL en el SNC se ha documentado durante la lactancia y la respuesta al estrés (Torner y Neumann, 2002). Estos efectos son posibles gracias a que la PRL periférica llega al cerebro a través de sus receptores ubicados en el plexo coroideo (Walsh y col, 1987) o mediante un proceso independiente de sus receptores específicos, principalmente por el sistema vascular.

## **4.2. Prolactina y sistema inmune**

La relación entre la PRL y el sistema inmunológico se evidenció en un estudio donde se observó atrofia en el timo de ratas hipofisectomizadas (Smith, 1930). Posteriormente, se descubrió, que la administración de PRL, de hormona de crecimiento y de lactógeno placentario, en ratas hipofisectomizadas restablecía la actividad inmunológica (Nagy y Bercy, 1978). Se realizaron experimentos similares utilizando bromocriptina (agonista dopaminérgico D2) para inhibir selectivamente la secreción de PRL, y se encontraron resultados similares al trabajo anterior. Es decir, la disminución en la respuesta inmune tanto celular como humoral, que se restablece al suspender la bromocriptina (Nagy y Bercy, 1983). Además, se ha encontrado que el sistema inmunológico es capaz de regular la secreción de PRL (Matera, 1997). Las citocinas interleucina 1 (IL1), (IL6) y factor de necrosis tumoral

## **EFFECTOS DE LA PROLACTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$ EN EL HIPOCAMPO DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS**

alfa (TNF- $\alpha$ ) pueden actuar como reguladores endócrinos en la liberación de PRL hipofisiaria (Spangelo y cols, 1990).

El sistema inmune está compuesto por muchas clases de células, derivadas de un pequeño número de progenitoras de médula ósea y timo. La maduración y diferenciación de linfocitos ocurre en diversos sitios (médula ósea, timo, bazo, ganglios). La PRL ejerce acciones regulatorias en dicho sistema que incluye su participación en la proliferación y diferenciación celular, la angiogénesis y un rol protector en procesos de apoptosis e inflamación (Rimoldi, 2005). Tanto en ratones como en el ser humano la PRL aumenta la producción de anticuerpos; su deficiencia se asocia a la inmunodeficiencia humoral. La PRL actúa como un mitógeno tanto en linfocitos B como T, e incrementa la capacidad fagocítica de los macrófagos (Méndez y col, 2005).

La PRL desempeña un papel importante en la regulación de las respuestas inmunes humorales y celulares en situaciones fisiológicas y patológicas, como las enfermedades autoinmunes (De Bellis, 2005). Además de ejercer su control endocrino sobre el sistema inmune, la PRL actúa como una citocina, ya que se libera dentro del sistema inmune y regula la respuesta linfocitaria de forma paracrina y mediante mecanismos autocrinos (Dardenne, 1994). Tanto la PRL linfocitaria como la hipofisiaria están bajo el control de factores inmunes. La PRL participa activamente sobre la proliferación celular en diversos tejidos como la glándula mamaria, la próstata y el páncreas (Naylor, 2003). Adicionalmente la PRL actúa como molécula de adaptación al estrés contra mediadores inflamatorios importantes para mantener la homeostasis del sistema inmunológico y participa en el tránsito de IgA a través del epitelio celular durante el desarrollo de la glándula mamaria (Rincheval y col, 2002).

## **EFFECTOS DE LA PROLACTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$ EN EL HIPOCAMPO DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS**

En esplenocitos murinos, se ha encontrado que la PRL incrementa la viabilidad y la capacidad estimuladora de las células dendríticas (DC), sobre la regulación de la expresión de MHC-II y CD40, mientras disminuye los niveles de CD54 en DC (Yang y cols, 2006). Además, disminuye los niveles de NF-kappaBp65 y la capacidad endocítica de las DC, e incrementa la secreción de interleucina (IL) 6, 10, 12 y TNF- $\alpha$  en estas células. Esto sugiere que la PRL puede regular la respuesta inmune, ya sea fisiológica o patológica, mediante cambios en la viabilidad, fenotipo, capacidad endocítica y estimuladora de las DC, así como en la expresión de citocinas (Yang y cols, 2006).

Se ha demostrado la regulación autócrina de la señalización de PRL en el desarrollo y activación de los linfocitos T, lo que refuerza la hipótesis de un mecanismo por el cual la PRL autócrina participa en la inmunoregulación de los linfocitos modulando la expresión de moléculas coestimuladoras y citocinas (Chávez y cols, 2005). Por ejemplo, se sabe que la PRL es producida y secretada por las propias células del sistema inmunológico y actúa justo después de la primera señal de activación de una forma autócrina; en buena medida, la secreción de IL-2, IFN gamma y la expresión de las moléculas CD69 y CD154 depende parcialmente de la PRL (Takizawa, 2005).

# EFFECTOS DE LA PROLACTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$ EN EL HIPOCAMPO DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS

## 5. Citocinas

### 5.1 Citocinas en la inflamación

Las citocinas son pequeñas proteínas no estructurales, son descritas como factores que están esencialmente relacionados con el sistema inmune. Se ha demostrado su participación en todos los procesos biológicos relacionados con el crecimiento, proliferación y diferenciación celular (Dinarello, 2000). Las citocinas de actividad pro-inflamatoria son moléculas producidas, principalmente, por monocitos y macrófagos, activados tras el contacto con un agente patógeno, aunque también pueden ser sintetizadas por otras poblaciones celulares como las células endoteliales o las CD entre otras (Carrasco, 2011).

Tres son las principales citocinas proinflamatorias:

1. La IL-1 juega un rol principal en la regulación de la respuesta inmune y de la inflamación. Inicialmente se la reconoció como un producto de activación de monocitos y macrófagos, pero se vio que además participaba en la regulación de linfocitos T y en la diferenciación de linfocitos B. Hay 2 tipos de IL-1, la IL-1  $\alpha$  y la IL-1  $\beta$ . Ambas son codificadas por genes diferentes, pero poseen efectos similares ya que interaccionan con el mismo receptor (Breder, 1988).

2. La IL-6 es un importante regulador de la inflamación e inmunidad y además se la considera como un enlace entre el sistema endocrino e inmunológico. Es producida por muchos tipos celulares completamente distintos como monocitos, macrófagos, células endoteliales, células musculares y células del estroma y epitelio endometrial. Además, es producida por las glándulas endocrinas como la hipófisis y el páncreas. La IL-6 tiene cuatro acciones bien definidas: modifica otras citocinas, activa células T y diferencia células B e inhibe el crecimiento de varias líneas celulares humanas (Butterweck, 2003).

## EFFECTOS DE LA PROLACTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$ EN EL HIPOCAMPO DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS

3. TNF es una citocina con un rango de efectos muy amplio, tanto beneficiosos como dañinos. Posee la capacidad de destruir ciertas líneas celulares e inicia la cascada de citocinas proinflamatorias y otros mediadores. Hay dos tipos de TNF, por un lado, el alfa ( $\alpha$ ) que es producido por neutrófilos, linfocitos activados, macrófagos y células NK; y por otro lado la beta ( $\beta$ ), que es producido sólo por linfocitos (Carrasco, 2011).

### 5.2 Citocinas como parte de la respuesta inmune cerebral

Durante una respuesta inmune, las citocinas son liberadas por los linfocitos activados y por los macrófagos. Estas citocinas proinflamatorias producidas en la periferia actúan sobre el cerebro por dos vías principales:

1. Una vía humoral, que permite a los patrones moleculares patógenos específicos actuar sobre receptores *toll-like* en aquellas áreas del cerebro que están desprovistas de una barrera hematoencefálica funcional, las así llamadas áreas circunventriculares.
2. Una vía neural, representada por los nervios aferentes que inervan los sitios corporales de infección y daño (Dinarello, 1986).

En ambos casos, las citocinas producidas periféricamente inducen la expresión de citocinas cerebrales que son producidas por macrófagos residentes y células microgliales. Estas citocinas producidas localmente se difunden a través del parénquima cerebral y actúan sobre áreas blanco del cerebro para organizar los componentes centrales de la respuesta del huésped a la infección (Dantzer y col, 2003). La IL-1 y TNF actúan sobre el hipotálamo para producir fiebre, presumiblemente debido a que existen receptores para estas citocinas en las neuronas hipotalámicas (Dinarello y col, 1986).

## **EFFECTOS DE LA PROLACTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$ EN EL HIPOCAMPO DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS**

Algunos estudios han revelado que el cerebro produce IFN- $\alpha$  en respuesta al estrés inflamatorio, así como al no inflamatorio, lo que podría desempeñar un papel en la fisiología normal (Breder, Dinarello, Saper 1988).

Datos obtenidos de un estudio realizado en animales para investigar el papel de la IL-6 durante el estrés psicológico, del cual se sabe que influye en el comportamiento, sugirieron que esta citocina desempeña un papel importante en el control de la emocionalidad, pero no en la regulación de la temperatura corporal durante el evento estresor (Butterweck y cols, 2003).

### **6. Sistema inmune cerebral.**

El SNC recibe información del medio ambiente externo e interno y es capaz de procesar dicha información para posteriormente enviar órdenes a todo el cuerpo. Las llamadas células de la microglía los protegen frente a microorganismos ajenos y otros potenciales agentes lesivos. El sistema inmune está formado por un conjunto de células, de moléculas libres y de tejidos, organizados y encargados de defender a nuestro organismo frente a agentes extraños (Olazabal y cols, 2014).

El cerebro responde a los cambios en el estado inmune del cuerpo organizando adaptaciones fisiológicas y de comportamiento después de un desafío inmune, por ejemplo, comportamiento de enfermedad (fiebre, somnolencia, depresión, debilidad, letargo y pérdida de apetito). (Dantzer 2001).

Las estructuras cerebrales involucradas en la inducción del comportamiento de enfermedad no están bien establecidas, pero hay evidencia de la participación del hipotálamo en la regulación de la respuesta inflamatoria. Dado que el cerebro influye en todos los sistemas del cuerpo, también es un regulador clave del sistema inmune, ejerciendo una importante influencia de coordinación hacia la restauración de la homeostasis del cuerpo a través de la secreción de hormonas y la activación de ambas ramas del sistema nervioso autónomo (Freeman, 2000).

## **EFFECTOS DE LA PROLACTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$ EN EL HIPOCAMPO DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS**

Se sabe que la PRL influye en ciertas funciones cerebrales, como el comportamiento materno, la alimentación y el apetito, la secreción de oxitocina y la secreción de ACTH en respuesta al estrés. A la luz de los altos niveles circulantes de PRL durante el embarazo y la lactancia y la mayor expresión de los receptores de PRL en el hipotálamo, muchos de estos efectos de la PRL pueden aumentar o exagerarse durante la lactancia. Por lo tanto, la PRL puede ser un jugador clave en la coordinación de las adaptaciones neuroendocrinas y conductuales del cerebro materno (Freeman, 2000).

### **7. Efectos de prolactina en el sistema inmune cerebral**

Existen estudios previos que muestran los efectos de la PRL mediante modelos *in vitro* en astrocitos. En estos se demostró que PRL promueve la proliferación celular en astrocitos embrionarios (Mangoura y cols, 2000). Además, se observó que el tratamiento de astrocitos en cultivo con PRL provocó un aumento dependiente del tiempo y de la dosis en los niveles de citocinas proinflamatorias, tales como la IL-1 $\alpha$ , el factor de crecimiento transformante alfa (TGF- $\alpha$ ) y TNF- $\alpha$  (DeVito y cols, 1995). Estos hallazgos sugieren una posible acción paracrina o autocrina de la PRL sobre las citocinas para participar en procesos relacionados con la respuesta neuroinflamatoria (Anagnostou y cols, 2018).

Se han reportado algunos estudios donde se evaluó el papel de la PRL *in vivo*, sobre los astrocitos, en el contexto de daño cerebral. DeVito aplicó una lesión mediante daño mecánico, y observó que la infusión de PRL en el sitio de la herida aumentaba significativamente la proliferación de astrocitos alrededor de la lesión después de un insulto en el cerebro (DeVito y col, 1995). Posteriormente otros investigadores evaluaron la participación de PRL en otro modelo de lesión hipóxico-isquémica encontraron que los niveles de PRL y PRL-R estaban elevados en la penumbra de la lesión dentro de la corteza cerebral y que se correlacionaban en el tiempo con la progresión de la lesión. Además, la mayoría de PRL-R se localizó en astrocitos (Modersheim y col, 2007).

## **EFECTOS DE LA PROLACTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$ EN EL HIPOCAMPO DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS**

Existe más evidencia de la expresión de PRL-R y su ARNm en los astrocitos y células gliales de Müller de la retina de ratas, los cuales fueron detectados por inmunohistoquímica y RT PCR (Rivera y col, 2008).

### **8. Estrés**

Una de las definiciones más recientes de estrés ha sido planteada como una amenaza real o supuesta a la integridad fisiológica o psicológica de un individuo que resulta en una respuesta fisiológica y/o conductual (Bruce, 2000).

Según la definición de Chrousos y Gold (1992) “se puede definir al estrés como un estado de falta de armonía o una amenaza a la homeostasis. La respuesta adaptativa puede ser específica, o generalizada y no específica. Así, una perturbación en la homeostasis resulta en una cascada de respuestas fisiológicas y comportamentales a fin de restaurar el balance homeostático ideal”.

#### **8.1 Respuesta al estrés**

El funcionamiento del sistema fisiológico que prepara al organismo para la acción integra el sistema nervioso en su totalidad, así como también varias estructuras del organismo mediante la activación de la rama simpática del sistema nervioso autónomo y eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (HPA) detallados a continuación.

El encéfalo es el principal órgano involucrado en la respuesta de estrés. A través de un circuito neuronal que incluye al hipocampo, la amígdala y áreas de la corteza prefrontal, discrimina amenazas y determina las respuestas comportamentales y psicológicas para su afrontamiento (McEwen y Gianaros, 2010). Dichas estructuras forman parte del sistema límbico, un circuito neuronal que controla el comportamiento emocional y los impulsos de las motivaciones (Guyton y Hall, 2011).

Ante estresores psicológicos o fisiológicos, el organismo responde mediante una serie de reacciones fisiológicas coordinadas, que suponen la activación del sistema

## **EFFECTOS DE LA PROLACTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$ EN EL HIPOCAMPO DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS**

nervioso autónomo y el eje HPA. En última instancia, estos dos sistemas producen la liberación de corticosterona, noradrenalina y adrenalina por parte de las glándulas suprarrenales, permitiendo enlazar la experiencia subjetiva de la respuesta con componentes psicofisiológicos de la emoción. Su secreción prepara al organismo, adoptando un estado de alerta que facilita el proceso de adaptación a los diferentes eventos estresantes a los que se ven expuestos los individuos diariamente y facilitan el equilibrio homeostático (Kandel y cols, 2001).

### **8.2 Sistema Nervioso Autónomo.**

El Sistema nervioso autónomo o vegetativo, se caracteriza por no estar sujeto a un control consciente o voluntario por parte del individuo. Es un sistema sensitivo y motor visceral, que posee tres divisiones importantes: simpático, parasimpático y entérico (Kandel y cols, 2001).

La función global del sistema nervioso autónomo es mantener la homeostasis del organismo y efectuar las respuestas de adaptación ante cambios del medioambiente externo e interno. (Navarro, 2002). La activación del sistema simpático produce un conjunto de reacciones que se definen como respuesta de alarma. Entre ellas las más evidentes son: la dilatación pupilar, sudoración, aumento de la actividad cardiaca y presión arterial, broncodilatación y la inhibición de funciones digestivas, urinarias y genitales (Navarro, 2002).

### **8.3 Activación del eje HPA.**

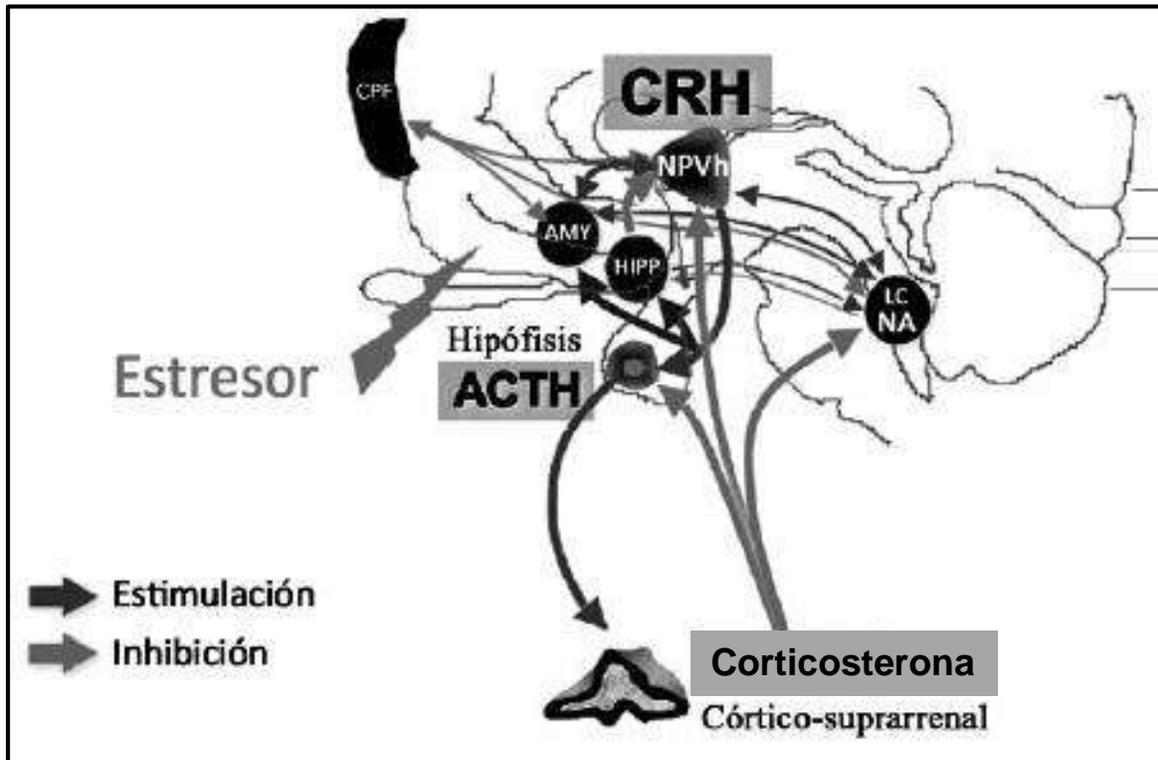
Activado el sistema nervioso autónomo, se activa paralelamente el eje hipotálamo – hipofisario – adrenal. Este sistema fisiológico es de acción más lenta que el sistema adrenomedular, pero cumple un importante rol en la respuesta del organismo (Lupien y cols, 2009). Las respuestas efectuadas por el sistema nervioso autónomo y el eje HPA, son activadas frente a casos de estrés agudo y estrés crónico, mediando el denominado síndrome general de adaptación (Zarate y cols, 2014).

## **EFFECTOS DE LA PROLACTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$ EN EL HIPOCAMPO DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS**

Los estresores ocasionan diversos procesos alostáticos a fin de que el cuerpo se adapte a las nuevas situaciones y cuente con las condiciones óptimas para enfrentarlas. El eje HPA es el principal responsable de realizar estos rápidos ajustes. Estructuras como la amígdala y el hipocampo evalúan la adversidad de los estímulos que rodean al animal y estimulan al hipotálamo. Este provoca la secreción de hormona liberadora de corticotropina (CRH) desde su núcleo paraventricular. El CRH provoca la secreción de la hormona corticotropina (ACTH) por parte de la adenohipófisis al torrente sanguíneo, que lleva a la estimulación de la corteza suprarrenal y la secreción de glucocorticoides, permitiendo ajustar el comportamiento a las demandas del ambiente (Zarate y cols. 2014).

El cortisol es el principal glucocorticoide en seres humanos y la corticosterona en roedores. Estas son hormonas esteroideas que regulan procesos metabólicos, cardiovasculares, inmunes y comportamentales (Smith y Vale, 2006). La mayoría de las células del cuerpo poseen receptores de glucocorticoides, por lo que su secreción provoca una amplia variedad de efectos en el organismo. La corticosterona eleva el nivel de glucosa en sangre, suprime la acción del sistema inmune y regula el metabolismo (Cigolani y Houssay, 2000), facilitando así la adaptación a situaciones ambientales cambiantes. Una vez superado el estresor devuelve al organismo a su estado de homeostasis, gracias a mecanismos de autorregulación negativa (detallados más adelante) (Guilliams y Edwards, 2010). Un aspecto importante del eje HPA, es su capacidad para autorregularse. La alta concentración de corticosterona en sangre, provoca una retroalimentación negativa sobre receptores ubicados en el hipotálamo y la hipófisis anterior, inhibiendo su secreción.

**EFFECTOS DE LA PROLACTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$  EN EL  
HIPOCAMPO DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS**



**Figura 3. Respuesta del eje HPA al estrés.** El núcleo paraventricular del hipotálamo (NPVH) es el integrador final de la respuesta al estrés. Las neuronas de este núcleo producen la hormona liberadora de corticotropina (CRH) que estimula la producción hipofisiaria de adrenocorticotropina (ACTH). La ACTH estimula la producción de corticosterona por las suprarrenales. En contraposición, la corticosterona inhibe su propia síntesis inhibiendo la síntesis y la liberación de ACTH y de CRH. En este sentido la corticosterona es una hormona que apaga los procesos biológicos provocados por el estrés cuando el individuo ha encontrado una buena respuesta adaptativa. CPF: cortex prefrontal. AMY: amígdala. HIPP: hipocampo. LC: locus coeruleus. NA: noradrenalina. (Tomado de Fabrice y col, 2010).

## **EFECTOS DE LA PROLACTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$ EN EL HIPOCAMPO DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS**

### **8.4 Los mecanismos de retroalimentación del eje HPA por la corticosterona.**

La corticosterona ejerce una retroalimentación negativa sobre la liberación hipotálamo-hipofisiaria de CRH y de ACTH. Se distinguen tres tipos de retroalimentación: una retroalimentación rápida (de algunos segundos a algunos minutos), que implica probablemente la presencia de receptores de la membrana (complejo receptor GABA<sub>A</sub>/benzodiazepinas-canales del cloro), esta retroalimentación rápida es proporcional al aumento de corticosterona y no dura más de diez minutos; una retroalimentación intermedia (de una a algunas horas) con disminución de la secreción de CRH y de AVP; y finalmente una retroalimentación lenta (de algunas horas a algunos días) con disminución de la síntesis de ACTH hipofisiaria, de CRH y de AVP hipotalámicas: una administración prolongada de glucocorticoides conduce a la ausencia de secreción de CRH y de ACTH y a una atrofia de la suprarrenal, consecuencia de un déficit de ACTH. Las retroalimentaciones intermedia y lenta implican dos tipos de receptores: los receptores de tipo I (antiguamente denominados mineralocorticoides [MC]), dotados de una gran afinidad por la aldosterona y los glucocorticoides, están localizados principalmente en el sistema límbico; y los receptores de tipo II (anteriormente denominados receptores de glucocorticoides [GC]), de afinidad más baja por los glucocorticoides y más baja todavía para la aldosterona, están ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central (hipófisis, NPV, núcleos aminérgicos del tronco cerebral). Los receptores del tipo I controlan la inhibición tónica de la secreción basal de glucocorticoides, mientras que los receptores de tipo II sólo están involucrados cuando los niveles circulantes de glucocorticoides aumentan, como en el estrés, con el fin de inhibir la respuesta de la ACTH y de la CRH. (Fabrice y cols, 2010).

## **EFFECTOS DE LA PROLACTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$ EN EL HIPOCAMPO DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS**

### **8.5 Estrés y sistema inmune.**

Los principales mediadores de los efectos inmunomoduladores del estrés como son los glucocorticoides, las catecolaminas, adrenalina y noradrenalina, ejercen influencia directa sobre el funcionamiento de las células inmunes al acoplarse a sus receptores específicos localizados en el citoplasma y membrana celular. También ejercen efectos indirectos al alterar la producción de citocinas como el interferón  $\gamma$ , TNF y las interleucinas 1, 2 y 6, todas necesarias para la maduración y movilización de los linfocitos y otras células inmunitarias (Glasser y cols, 2005). Los órganos linfoides primarios y secundarios, así como los siguientes tipos celulares: linfocitos T y B, neutrófilos, monocitos y macrófagos, poseen receptores tipo II-glucocorticoide para las hormonas corticoesteroides (Blanco, 2012).

Los glucocorticoides, al acoplarse a sus receptores citoplásmicos en las células del sistema inmune, se traslocan al núcleo y funcionan como factores de la transcripción para numerosas proteínas sintetizadas por linfocitos, macrófagos y otros tipos celulares del sistema inmune; entre las proteínas, cuyos genes poseen elementos de respuesta a los glucocorticoides, se encuentran las citocinas y los receptores y antígenos de superficie de las células inmunológicas (Munck y cols, 1991). Las catecolaminas adrenalina y noradrenalina modulan el funcionamiento del sistema inmune a través de sus receptores  $\beta$  localizados en todos los órganos inmunes y en los linfocitos T y B, las células asesinas naturales (NK), los monocitos y macrófagos (Felten, 2000).

## **EFFECTOS DE LA PROLACTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$ EN EL HIPOCAMPO DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS**

### **9. Hipocampo**

El hipocampo es una de las principales estructuras del encéfalo perteneciente al sistema límbico. Se encuentra ubicado dentro del lóbulo temporal medial, debajo de la superficie cortical (Cigolani y Houssay, 2000). Posee numerosas conexiones con diversas regiones de la corteza cerebral y estructuras basales del sistema límbico, tales como la amígdala y el hipotálamo. Gracias a esta interconexión, prácticamente cualquier tipo de experiencia sensitiva lo activa. Sus conexiones eferentes con otras áreas del sistema límbico, tienen la capacidad de poner en marcha reacciones conductuales que dan lugar complejos patrones de comportamiento (como el placer, la ira, la pasividad o el impulso sexual), a fin de lograr diversos propósitos (Guyton y Hall, 2011).

Entre las principales funciones del hipocampo se encuentran la inhibición de conductas y la formación de memorias complejas, principalmente aquellas relacionadas con las relaciones espaciales y contextuales (Cigolani y Houssay, 2000). Participa activamente en la regulación del estrés, teniendo un importante rol inhibitorio en la actividad del eje hipotálamo-hipofisario y la terminación de la respuesta de estrés, una vez superada la adversidad (Phillips y cols, 2006).

# EFFECTOS DE LA PROLACTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$ EN EL HIPOCAMPO DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS

## III. ANTECEDENTES DIRECTOS

Estudios previos del laboratorio mostraron que la administración crónica de prolactina en el periodo neonatal a ratas machos y hembras induce daño celular al hipocampo, observado como una disminución del número de precursores neurales (Lajud y cols, 2013). Por otra parte, en el laboratorio se demostró que el estrés neonatal también induce la expresión de citocinas proinflamatorias en el hipocampo y en la hipófisis de las crías de rata (Roque y cols, 2016). Posteriormente en nuestro laboratorio se analizó el efecto de la prolactina sobre las células del sistema inmune cerebral y la expresión de citocinas proinflamatorias en el hipocampo en ratas macho al día posnatal PN 15. La PRL se administró diariamente del día 1 al PN 14 y se observó que la PRL disminuye la densidad de astrocitos en el hipocampo, pero no afecta a la población microglial. Así mismo se observó que la PRL aumenta la expresión basal de IL-1 $\beta$  e IL-6 pero en condiciones de estrés inhibe la expresión de IL-1 $\beta$  e IL-6 y TNF- $\alpha$  en el hipocampo. Estos resultados sugieren que la PRL induce una respuesta proinflamatoria en el hipocampo en condiciones basales. Por otra parte, se observó que la PRL juega un papel inhibitorio de la respuesta neuroinmune inducida por el estrés agudo (Zinzun, 2017). Por ello la PRL parece ser un regulador del sistema neuroinmune.

# **EFFECTOS DE LA PROLACTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$ EN EL HIPOCAMPO DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS**

## **IV. HIPOTESIS**

La prolactina regula la función del sistema neuroinmune del hipocampo en ratas neonatas machos y hembras.

## **V. OBJETIVOS GENERALES:**

Confirmar el papel de la prolactina en el sistema neuroinmune del hipocampo en ratas machos y hembras en la etapa neonatal

Evaluar el efecto de la PRL sobre la expresión del TNF- $\alpha$  en el hipocampo de ratas machos y hembras en la etapa neonatal mediante la administración aguda de PRL, bajo condiciones basales y de estrés.

## **VI. OBJETIVOS PARTICULARES:**

- Estudiar si la administración de prolactina estimula la producción de la citocina pro inflamatoria TNF- $\alpha$  en condiciones basales y estimuladas por el estrés.
- Estudiar si la inhibición de la síntesis de prolactina disminuye la producción de la citocina pro inflamatoria TNF- $\alpha$  en condiciones basales y estimuladas por el estrés.

# EFFECTOS DE LA PROLACTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$ EN EL HIPOCAMPO DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS

## VII. METODOLOGIA

Los procedimientos se realizaron tomando en cuenta las medidas adecuadas para reducir al mínimo el dolor o sufrimiento de los animales. Las manipulaciones experimentales y procedimientos de estrés se apegaron estrictamente a las convenciones internacionales para el manejo de animales de laboratorio, tales como las publicadas por los Institutos de Salud Norteamericanos (NIH). Así mismo nos apegamos a las normas y reglamentos del IMSS, así como a los de la Ley General de Salud de México y la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. El trabajo forma parte de un protocolo de investigación aprobado por el Comité de Ética en Investigación y el Comité de investigación de la Comisión Nacional de Investigación Científica del IMSS, con número de registro: R-2015-785-103.

### 1. Animales

Los animales que se emplearon en el presente estudio fueron crías de ratas macho y hembras, de la cepa Sprague Dawley, mantenidas bajo ciclo de luz - oscuridad (12:12), temperatura (22- 26 °C) Humedad 50 – 60% acceso de agua y alimento *ad libitum*. Se utilizaron 3 camadas por grupo, cada camada se ajustó a 10 crías, constituidas de 5 machos y 5 hembras. El día del nacimiento se tomó en cuenta como el día 0, contándose a partir de este los días posnatales.

### 2. Grupos de animales

Las camadas se dividieron en los siguientes grupos de acuerdo a las condiciones (basal, estrés), y sus respectivos tratamientos (vehículo, prolactina y bromocriptina).

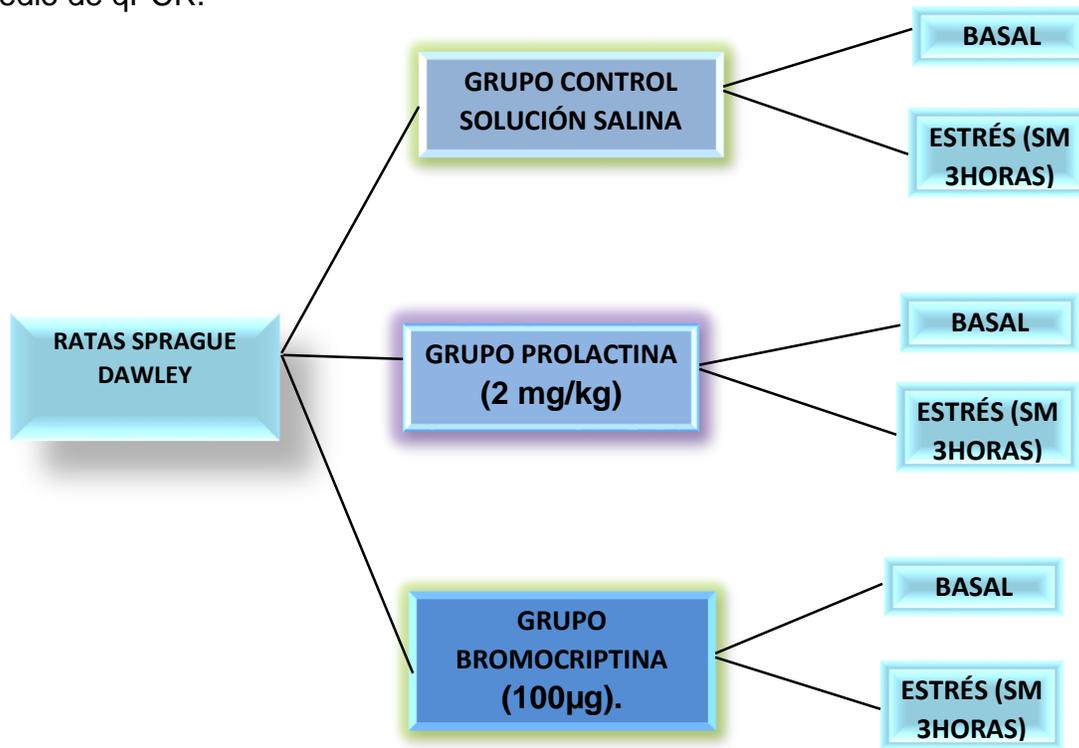
1. Vehículo – basal (machos n = 8, hembras n = 6)
2. Vehículo – estrés (machos n = 8, hembras n = 8)
3. Prolactina – basal (machos n = 4, hembras n = 8)
4. Prolactina – estrés (machos n = 8, hembras n = 7)
5. Bromocriptina – basal (machos n = 6, hembras n = 9)
6. Bromocriptina – estrés (machos n = 9, hembras n = 5)

## EFFECTOS DE LA PROLACTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$ EN EL HIPOCAMPO DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS

Estos grupos se dividieron posteriormente en subgrupos de machos y hembras, con los tratamientos respectivos, para resultando en 12 grupos finales.

### 3. Inyección de prolactina o bromocriptina

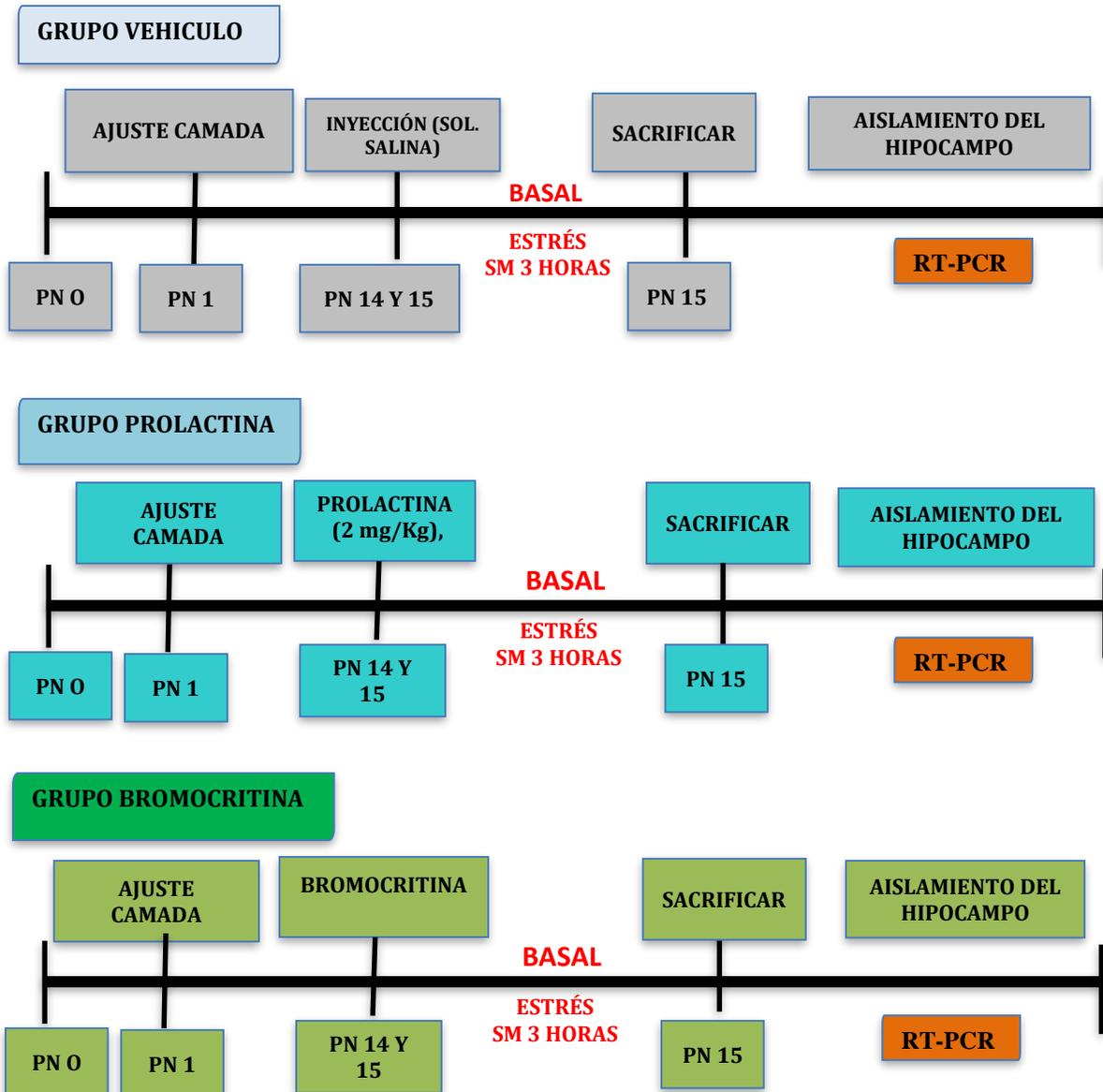
Los grupos se inyectaron el día PN14 y el PN15 con solución salina (Control), PRL (2 mg / Kg / 100  $\mu$ l), o bromocriptina (100 $\mu$ g / 100  $\mu$ l). Después de las inyecciones del PN15 los grupos de estrés se sometieron a separación maternal (3h). Todos los grupos se sacrificaron 3h después de la inyección, esto es con la finalidad de dar tiempo a que se sintetice el RNAm en cantidad suficiente para poder detectarlo. Se extrajeron los hipocampos para aislar el RNAm y analizar la expresión de TNF- $\alpha$  por medio de qPCR.



**Figura 4. Grupos experimentales.** Se utilizaron camadas de ratas Sprague Dawley machos y hembras, al PN14. Los grupos se dividieron de acuerdo al tratamiento en 1) control-basal; 2) control-estrés; 3) prolactina-basal; 4) prolactina-estrés; 5) bromocriptina-basal; 6) bromocriptina-estrés. Cada grupo se subdividió en 2, de acuerdo al sexo de los animales.

# EFFECTOS DE LA PROLACTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$ EN EL HIPOCAMPO DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS

## 4. Estrategia experimental



**Figura 5. Estrategia experimental.** El día del nacimiento fue considerado el día posnatal (PN) 0. Al (PN) 1 se ajustaron las camadas a 10 crías 5 hembras y 5 machos, tanto al grupo control y los de estrés se les inyectó, solución salina en el día PN14 y PN15, los grupos control se sacrificaron el día PN15 después de la inyección y los grupos de estrés, se inició la SM durante 3 horas y se sacrificaron, se extrajo el hipocampo y se procesó.

## **EFFECTOS DE LA PROLACTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$ EN EL HIPOCAMPO DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS**

### **4.1. Extracción de RNA.**

La extracción de las muestras de hipocampo se llevó a cabo con el método de trizol de acuerdo al protocolo descrito por el fabricante. El producto obtenido se analizó en un espectrofotómetro a (260/280nm). Para analizar la pureza e integridad.

### **4.2.- Síntesis de CDNA.**

Para la síntesis de CDNA se utilizó 1 $\mu$ g de la muestra de RNA, 1 $\mu$ l de oligo DT (12-18, 500ug/ul invitrogen), 1 $\mu$ l dNTP mix 10Mm (invitrogen) y agua libre de RNAsa para un volumen final de 20  $\mu$ l se mezcló en calor a 65°C por 5 minutos, enfriando rápidamente en hielo, posteriormente se agregó 4 $\mu$ l de 5x First Strand Buffer, 2 $\mu$ l de DTT 0.1M, 0.5  $\mu$ l RNAsa OUT (inh ribonucleasa) 40 unidades/ul, 1 $\mu$ l de M-MLVRT y se incubo por 50 minutos a 37°C y se inactivo por calor a 70°C por 15 minutos. Por último, se cuantifico en un espectrofotómetro el cDNA para determinar la cantidad y pureza.

### **4.3.- PCR punto final.**

Las secuencias de oligonucleótidos se validaron por medio de la técnica de PCR punto final, utilizando lo siguiente; 2 $\mu$ l de buffer PCR 10x, 2 $\mu$ l dNTPs 2mM, 0.6 $\mu$ l de cloruro de magnesio 50mM, 1 $\mu$ l de oligo directo, 1 $\mu$ l de oligo reverso, 1 $\mu$ l de Taq polimerasa (1u/ $\mu$ l), 1 $\mu$ l de CDNA, H2O llevando a un volumen final de 20 $\mu$ l. las muestras de los diferentes oligos se colocaron en un termociclador de gradiente de temperaturas, en donde la temperatura de desnaturalización fue de 94°C durante 5 minutos, seguidos de 35 ciclos con 15 segundos de desnaturalización a 94°C, 30 segundos de alineamiento a 62°C para TNF- $\alpha$  y para ACTINA como gen endógeno, y 30 segundos de elongación a 72°C, y por último una elongación final de 7 minutos a 72°C, manteniendo a una temperatura de 4°C. Para verificar que el producto de amplificación correspondiera al tamaño esperado se realizó un gel de agarosa al 1.5%.

**EFFECTOS DE LA PROLACTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$  EN EL  
HIPOCAMPO DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS**

**4.4.- qPCR**

En esta técnica se utilizaron 5  $\mu$ l (250ng) de cDNA, 5  $\mu$ l de Veriquest Fast Syber Green Master Mix (USB Affymetrix Inc.), 0.9  $\mu$ l de oligo directo (10 pM/  $\mu$ l Q.Valaner), 0.9  $\mu$ l de oligo inverso (10 pM/  $\mu$ l Q.Valaner) y 0.2  $\mu$ l de agua grado biología molecular, para obtener un volumen final de 10  $\mu$ l por reacción. Se utilizó un termociclador para tiempo real (Biorad). La temperatura inicial de desnaturalización fue de 95°C durante 5 min, seguidos de 35 ciclos con 15 s de desnaturalización a 94°C; 30 s de alineamiento a 62°C para  $\beta$ -actina y TNF- $\alpha$ ; y 30 s de extensión a 72°C. Se normalizaron los datos y se analizaron por el método delta-delta CT.

Gen	Secuencia 5'-3'	Tm	Producto de amplificación
$\beta$ -actina	Directo GTCCACCCGCGAGTACAACCTTCT	62°C	215pb
	Reverso TCCTTCTGACCCATACCCACCATC		
TNF- $\alpha$	Directo TGGCGTGTTTCATCCGTTCTCTACC	62°C	219pb
	Reverso CCCGCAATCCAGGCCACTACTT		

**Tabla 1. Secuencia de oligonucleótidos.** Secuencia de  $\beta$ -actina y TNF- $\alpha$  con sus respectivas temperaturas y productos de amplificación.

## **EFFECTOS DE LA PROLACTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$ EN EL HIPOCAMPO DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS**

### **5. Análisis de resultados**

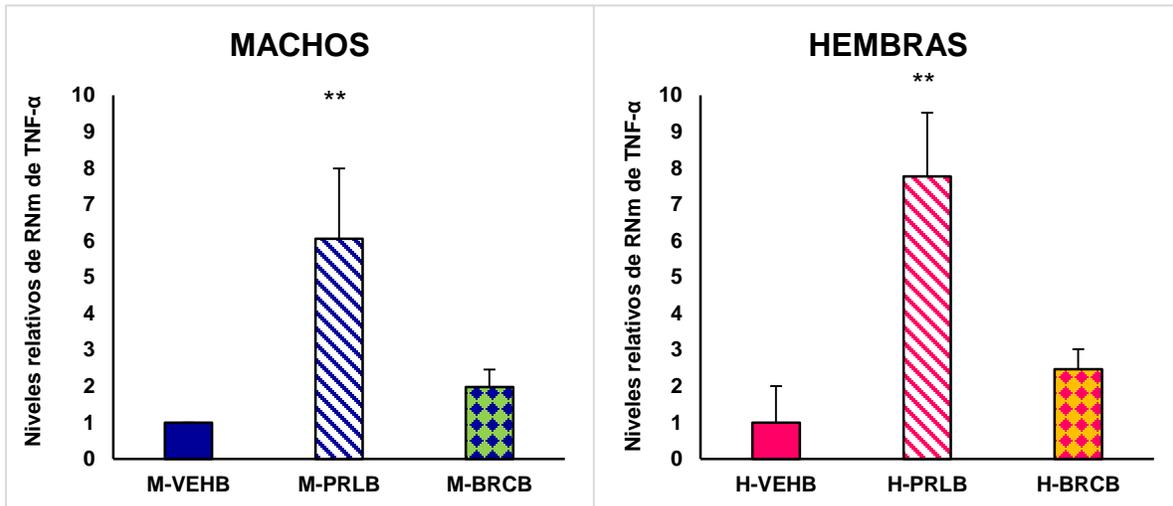
Se obtuvo el valor de la media y S.E.M. de los grupos analizados. Los resultados fueron analizados utilizando el programa estadístico de GB-Stat 6.0, de Dynamic Microsystems, Silver Springs, MD, USA. Los datos fueron sometidos en forma simultánea al análisis de varianza (ANOVA) de una vía donde el factor fue el tratamiento. Otros datos fueron analizados mediante un ANOVA de dos vías, con factores A: tratamiento y B: estrés. Se empleó la prueba post-hoc de Newman Keuls.

# EFFECTOS DE LA PROLACTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$ EN EL HIPOCAMPO DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS

## VIII. RESULTADOS.

### 1. Administración de PRL o Bromocriptina en condiciones basales

Nuestros resultados mostraron que la administración aguda de PRL provoca un aumento significativo en la expresión de TNF $\alpha$  en condiciones basales en el hipocampo de ratas machos (mayor a 5 veces  $p < 0.05$ ) y hembras (mayor a 6 veces  $p < 0.01$ ). Por otro lado, la administración de Bromocriptina y, por ende, la disminución de PRL circulante, no causo diferencias significativas en los niveles de expresión de TNF- $\alpha$  (ANOVA machos  $F_{[2,17]} = 5.92$ ,  $p < 0.05$ , ANOVA hembras  $F_{[2,22]} = 9.78$ ,  $p < 0.01$ ). Figura 6

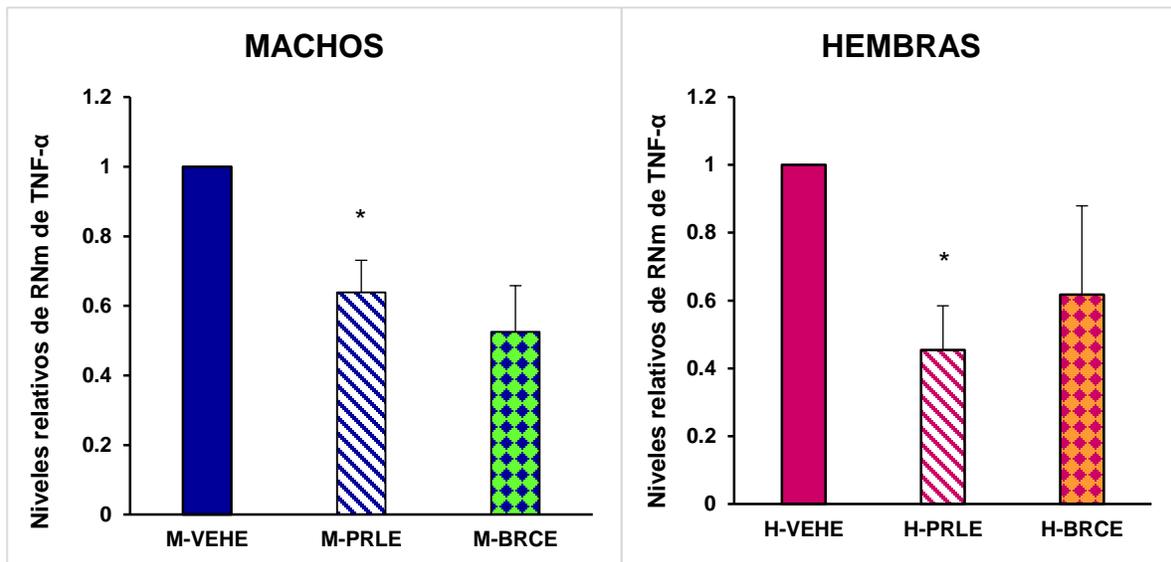


**Figura 6. Niveles de expresión relativa del ARNm de TNF- $\alpha$  en ratas machos y hembras al PN15 en condiciones basales.** Se muestran los grupos vehículo (VEH), prolactina (PRL) y Bromocriptina (BRC) en condiciones basales (B) de ratas machos (M) y hembras (H). Observamos que la PRL tiene efecto significativo sobre los niveles de expresión del ARNm de TNF- $\alpha$  en condiciones basales. Cada barra muestra el valor de la media y S.E.M. de los grupos. \*\* =  $p < 0.01$  comparado con el grupo VEHB respectivo. Machos  $n = 6 - 8$  y hembras  $n = 6 - 9$ .

## EFFECTOS DE LA PROLACTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$ EN EL HIPOCAMPO DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS

### 2. Administración de PRL o Bromocriptina en condiciones de estrés

En condiciones de estrés se puede observar que la administración de la PRL también influye significativamente sobre la expresión de TNF- $\alpha$  tanto en machos como en hembras. Bromocriptina de igual manera se observa una expresión mínima pero no significativa. (ANOVA machos  $F_{[2,24]} = 3.69$ ,  $p < 0.05$ , ANOVA hembras  $F_{[2,19]} = 4.43$ ,  $p < 0.05$ ). Figura 7

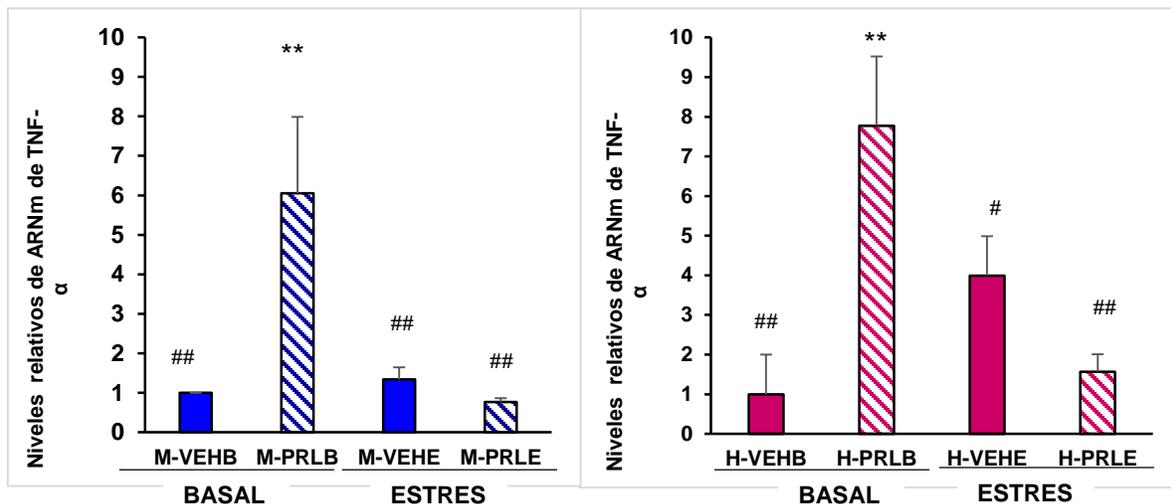


**Figura 7. Niveles de expresión relativa del ARNm de TNF- $\alpha$  en ratas machos y hembras al PN15 en condiciones de estrés.** Se muestran los grupos vehículo (VEH), prolactina (PRL) y Bromocriptina (BRC) en condiciones de estrés (E) de ratas machos (M) y hembras (H). Cada barra muestra el valor de la media y S.E.M. de los grupos. \* =  $p < 0.05$  comparado con el grupo VEHE respectivo. Machos  $n = 8 - 9$  y hembras  $n = 5 - 8$ .

## EFFECTOS DE LA PROLACTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$ EN EL HIPOCAMPO DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS

### 3. Comparación del efecto de PRL sobre la expresión de TNF- $\alpha$ en condiciones basales y de estrés

Analizando los datos en conjunto, se observa que la exposición al estrés no induce la expresión de TNF- $\alpha$  en el hipocampo de ratas macho, pero si la estimula en ratas hembra, 3 horas después de la exposición. Por su parte, la PRL estimula la expresión de TNF- $\alpha$  en condiciones basales, pero no lo hace bajo condiciones de estrés en el grupo de ratas machos (ANOVA de dos vías, Factor tratamiento  $F_{[1,24]} = 15.1$ ,  $p < 0.001$ ; Factor estrés  $F_{[1,24]} = 18.5$ ,  $p < 0.001$ , interacción AxB:  $F_{[1,27]} = 23.8$ ,  $p < 0.0001$ ). En el grupo de las hembras la administración de PRL también estimula la expresión de TNF- $\alpha$  en condiciones basales, pero atenúa su aumento en respuesta a la exposición al estrés (ANOVA de dos vías, Factor tratamiento  $F_{[1,25]} = 3.58$ ,  $p = 0.069$ ; Factor estrés  $F_{[1,25]} = 1.96$ ,  $p = 0.17$ , interacción AxB:  $F_{[1,28]} = 16.0$ ,  $p < 0.001$ ) Figura 8

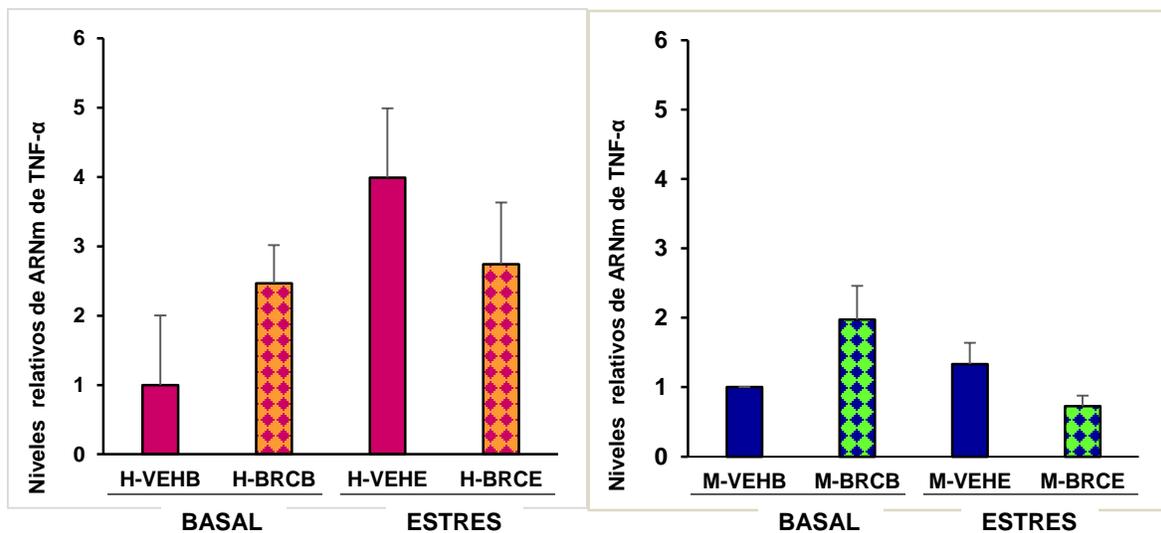


**Figura 8. Comparación de los efectos de PRL sobre la expresión de TNF- $\alpha$  en condiciones basales y de estrés en ratas machos y hembras.** ANOVA de dos vías; \*\*  $p < 0.01$ , comparado contra el grupo vehículo basal respectivo. #  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$  comparado contra el grupo PRL B respectivo. Cada barra muestra el valor de la media y S.E.M. de los grupos. Machos  $n = 6 - 8$  y hembras  $n = 6 - 9$ .

## EFFECTOS DE LA PROLACTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$ EN EL HIPOCAMPO DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS

### 4. Comparación del efecto de bromocriptina sobre la expresión de TNF- $\alpha$ en condiciones basales y de estrés

Por otra parte, la Bromocriptina no aumenta significativamente la expresión de TNF- $\alpha$  en condiciones basales, ni en condiciones de estrés en los grupos de ratas macho (ANOVA de dos vías, Factor tratamiento  $F_{[1,26]} = 2.60$ ,  $p=0.118$ ; Factor estrés  $F_{[1,26]} = 2.60$ ,  $p=0.118$ , interacción AxB:  $F_{[1,29]} = 0.26$ ,  $p=0.61$ ). En los grupos de ratas hembra la Bromocriptina tampoco tiene efecto sobre la expresión de TNF- $\alpha$  en condiciones basales, pero parece disminuir su expresión bajo condiciones de estrés (ANOVA de dos vías, Factor tratamiento  $F_{[1,24]} = 0.02$ ,  $p=0.887$ ; Factor estrés  $F_{[1,24]} = 4.51$ ,  $p<0.05$ , interacción AxB:  $F_{[1,27]} = 3.12$ ,  $p=0.089$ ). Figura 9.



**Figura 9. Comparación de los niveles de bromocriptina sobre la expresión de TNF- $\alpha$  en condiciones basales y de estrés en ratas macho y hembras.** ANOVA de dos vías; \*  $p<0.05$ , comparado contra el grupo vehículo basal respectivo. Cada barra muestra el valor de la media y S.E.M. de los grupos. \* =  $p<0.05$  comparado con el grupo VEHB respectivo. Machos  $n = 6 - 9$  y hembras  $n = 5 - 9$ .

## **EFFECTOS DE LA PROLACTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$ EN EL HIPOCAMPO DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS**

### **DISCUSIÓN:**

Resultados previos de nuestro laboratorio han sugerido que la PRL parece ser un regulador del sistema neuroinmune, ya que la PRL induce una respuesta proinflamatoria en el hipocampo en condiciones basales, pero tiene un papel inhibitorio de la respuesta neuroinmune inducida por el estrés. En el presente trabajo extendimos estas observaciones en grupos de hembras y modificamos la administración de PRL para realizarla de forma aguda. Esto con el fin de confirmar el papel de la PRL sobre el sistema neuroinmune.

En el estudio anterior del laboratorio la PRL se administró diariamente durante los días PN 1 al PN14, lo que equivale a inducir un estado de hiperprolactinemia en los animales. En el presente trabajo administramos la PRL de forma aguda ya que solamente se les aplicó a los animales 2 dosis, los días PN14 Y PN15 para ver sus efectos sobre la expresión de citocinas en el hipocampo. Se ha reportado que la hiperprolactinemia pudiera ejercer un efecto diferente al efecto que se observa cuando la PRL se secreta de forma aguda (Torner, 2016). Se ha informado que, en pacientes con enfermedades autoinmunes, la presencia de hiperprolactinemia comúnmente modifica el desarrollo y la perpetuación de la enfermedad (Borba, 2018). Por ello era importante confirmar los efectos de PRL observados de forma crónica, realizando el estudio con su administración de forma aguda.

La administración crónica de PRL ha demostrado su eficacia para resaltar los efectos fisiológicos de la hormona en el compartimento cerebral, tales como la regulación de la neurogénesis hipocampal a distintas edades (Torner y cols, 2009; Lajud y cols, 2013) o estudios iniciales sobre la regulación del sistema neuroinmune (Zinzun, 2017). Sin embargo, también se utiliza comúnmente la administración aguda, en la cual se administra la hormona entre 2 y 3 veces previo a la experimentación con el objetivo de activar al sistema cerebral de PRL, ya que esta hormona induce la expresión de sus propios receptores (Kirk y cols, 2017). En nuestro caso, decidimos administrar tanto la PRL como la Bromocriptina, 24h antes

## **EFFECTOS DE LA PROLACTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$ EN EL HIPOCAMPO DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS**

y nuevamente el día del experimento. Se utilizaron las dosis reportadas y validadas previamente por otros autores (Tejadilla y Morales, 2010; Kirk y cols, 2017).

Por otra parte, el trabajo de laboratorio que dio pie a la hipótesis se realizó solamente con ratas macho, por lo que este estudio se efectuó no solo en ratas macho sino también en ratas hembra. Las enfermedades autoinmunes son más prevalentes en mujeres que en hombres y se les considera la cuarta causa de discapacidad en las mujeres. Esto es debido a la presencia de receptores a hormonas sexuales en las células inmunes, tales como estrógenos, progesterona, andrógenos y PRL. La presencia de estos receptores puede influenciar la función del sistema inmune y afectar de manera potencial el riesgo y la progresión de enfermedades autoinmunes (Ortona y cols, 2016). Es importante hacer notar que no se modificó la edad de los animales de estudio en los que se hicieron las observaciones PN15. Esto con el fin de realizar las respectivas comparaciones con el trabajo anterior.

El reporte anterior realizado en este laboratorio consistió en la administración diaria de PRL a ratas macho durante los días PN1 al PN14. Los análisis al PN15 de los homogenados de hipocampo no mostraron ningún efecto de la PRL crónica sobre la expresión del ARNm de TNF- $\alpha$  en condiciones basales. Por otro lado, en este trabajo se administró PRL en el hipocampo de forma aguda a ratas macho y hembra. En condiciones basales se observó un aumento significativo en la expresión del ARNm de TNF- $\alpha$  y en ambos sexos, a diferencia de la administración crónica de PRL, la cual no tuvo efecto. Se ha observado que las hormonas sexuales tienen diferentes efectos sobre el sistema inmune dependiendo no solo de la concentración sino también del tipo de célula diana y del subtipo de receptor expresado en un tipo de célula dado. En este sentido, se sabe que la PRL aumenta la producción de anticuerpos, regula el desarrollo de células T CD4 + y desencadena la producción de citocinas proinflamatorias (Ortona 2016). Por otra parte, reportes de DeVito (1995) mostraron que el tratamiento de astrocitos en cultivo con PRL provocó un

## EFFECTOS DE LA PROLACTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$ EN EL HIPOCAMPO DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS

aumento dependiente del tiempo y de la dosis en los niveles de citocinas proinflamatorias, en particular TNF- $\alpha$ .

En nuestro estudio observamos también que la PRL induce un aumento significativo en la expresión basal de TNF- $\alpha$  en el hipocampo de ratas machos y hembra; estos hallazgos confirman los reportes iniciales en el sistema nervioso y los extienden a modelos *in vivo*. Se ha sugerido que el hipocampo constituye un área blanco de la PRL dentro del compartimento cerebral, pues se ha reportado una serie de efectos de esta hormona en esta estructura, tales como neurogénesis y neuroprotección (Carretero y cols.,2018). Por lo anterior sugerimos que la PRL tiene acciones en el hipocampo y posiblemente en otras áreas cerebrales para estimular la síntesis de citocinas y de esta manera participar en procesos relacionados con la respuesta neuroinflamatoria, tal como se ha propuesto recientemente (Anagnostou y cols, 2018).

Estudios de nuestro laboratorio mostraron que la exposición al estrés induce un aumento en la expresión de citocinas proinflamatorias en el hipocampo de ratas macho (Roque y cols, 2016). En ese estudio se mostró un aumento significativo de TNF- $\alpha$  en el hipocampo de ratas macho después de la exposición al estrés. En nuestro trabajo observamos que el estrés en machos no induce un aumento en la expresión de TNF- $\alpha$ , pero en hembras si aumenta la expresión. Esto pudiera deberse a la administración de solución salina en los grupos vehículos de ambas ratas machos y hembra. Si bien la inyección peritoneal no se considera un estresor fuerte esto pudo haber inducido un aumento en la expresión de TNF- $\alpha$  de manera que no se observa una mayor expresión por la separación maternal en los machos. Sin embargo, en las hembras si se observa un aumento en la expresión de dicha citocina lo que sugiere un dimorfismo sexual en la respuesta neuroinmune al estrés.

Por otra parte, los análisis en condiciones de estrés de la administración crónica de PRL mostraron una disminución en la expresión de TNF- $\alpha$  debida al tratamiento, es decir que los niveles elevados de PRL inhiben la expresión de esta citocina en condiciones de estrés. Asimismo, nuestros estudios utilizando la administración

## **EFFECTOS DE LA PROLACTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$ EN EL HIPOCAMPO DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS**

aguda de PRL confirmaron su efecto sobre esta citocina, ya que en condiciones de estrés se puede observar que la PRL inhibe la expresión de TNF- $\alpha$  en machos y hembras de forma significativa. Esto sugiere que la PRL pudiera jugar un papel importante en la respuesta neuroinmune al estrés, de tal forma que bajo condiciones de estrés la PRL podría estar contribuyendo a disminuir la respuesta inflamatoria cerebral. Este efecto podría ser complementario a la inhibición de la respuesta neuroendocrina al estrés por PRL (Torner y Neumann, 2002). Se ha demostrado que en ratas hembras virgen, la prolactina exógena inhibe las respuestas del eje HPA a factores estresantes y este efecto es más importante durante la lactancia. En nuestro estudio la inhibición de la expresión de TNF- $\alpha$  por PRL en condiciones de estrés la observamos tanto en ratas machos como en hembras juveniles. Es de esperar que esta respuesta también se observe en animales adultos y en forma particular durante el embarazo y la lactancia. Se requieren de estudios que confirmen el papel de la PRL en el sistema neuroinmune en estos estados fisiológicos.

Si bien no hay otros estudios que confirmen el efecto inhibitorio de la PRL sobre la expresión de citocinas en condiciones de estrés si existe un reporte similar en otro tejido. En un estudio realizado en el útero en placenta humana, se utilizó un lipopolisacárido (LPS) para simular un escenario inflamatorio, en el cual se pudo observar que la PRL redujo significativamente tanto la expresión como la secreción de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 inducida por LPS. El mecanismo de acción aparente fue que la PRL evitó la regulación positiva mediada por LPS de la expresión de receptores TLR-4 y la fosforilación del factor de transcripción NF $\kappa$ B en células de placenta en cultivo. Los autores del estudio hipotetizaron que esta hormona juega un papel importante en la prevención de una reacción inmune exacerbada a la infección y / o inflamación en la parte fetal de la placenta. Sus estudios constituyen la primera evidencia de un mecanismo de actividad antiinflamatoria de PRL en la placenta humana (Olmos, 2019). De forma similar nuestros estudios constituyen las primeras evidencias sobre un efecto antiinflamatorio de la PRL en el compartimento cerebral

## **EFFECTOS DE LA PROLACTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$ EN EL HIPOCAMPO DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS**

bajo condiciones de estrés. Se requieren más estudios para confirmar estos efectos y para investigar su mecanismo de acción a nivel cerebral.

Se sabe que las citocinas inflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-2, entre otras, inhiben la expresión de PRL decidual (Jikihara y Handwerger, 1995). Por otra parte, la PRL puede comportarse como una citocina con actividades inmunomoduladoras específicas de tejido. Por ejemplo, se demostró que el tratamiento con PRL induce la liberación de IL -1 $\beta$ , interferón gamma y TNF - $\alpha$  por macrófagos peritoneales murinos in vitro (Sodhi y Tripathi, 2008). Asimismo, se ha descrito un asa autócrina de regulación de citocinas por PRL en monocitos en cultivo (Pereira Suarez y cols, 2014). Estos resultados también concuerdan con nuestro estudio donde observamos que la PRL tiene una actividad inmunomoduladora en el compartimento cerebral y en particular en el hipocampo.

La bromocriptina es un alcaloide del cornezuelo de centeno que se une al receptor de dopamina e inhibe la síntesis central de PRL (McMurray, 2001). En nuestro estudio utilizamos Bromocriptina con el objetivo de inhibir la síntesis de la PRL de forma transitoria. Observamos que la BRC no indujo ningún efecto sobre la expresión de TNF- $\alpha$  tanto bajo condiciones basales o de estrés. Esto sugiere que la ausencia de PRL endógena no influye en la expresión de TNF- $\alpha$  en el hipocampo. En contraste la presencia de PRL si influye en la expresión de esta citocina dependiendo del contexto fisiológico del organismo.

## **EFFECTOS DE LA PROLACTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$ EN EL HIPOCAMPO DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS**

### **Conclusión**

En este estudio administramos la PRL de forma aguda en ratas machos y hembra juveniles en condiciones basales y de estrés, para analizar sus efectos sobre la expresión de TNF- $\alpha$  en el hipocampo. Observamos que la PRL en condiciones basales tiene efectos proinflamatorios indicados por un aumento significativo en la expresión de TNF- $\alpha$  en machos y hembras. Por otra parte, confirmamos que esta hormona tiene un papel adaptativo al estrés ya que PRL atenúa la expresión de TNF- $\alpha$  bajo condiciones de estrés. Por ello proponemos que la PRL podría actuar como un regulador del sistema inmune cerebral.

## **EFFECTOS DE LA PROLACTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$ EN EL HIPOCAMPO DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS**

### **BIBLIOGRAFIA**

1. Anagnostou Ilektra y cols., (2018). Glial cells as mediators of protective actions of prolactin (PRL) in the CNS. Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México. 265, 106-110.
2. Andrews ZB (2005). Regulación neuroendocrina de la secreción de prolactina al final del embarazo: facilitando la transición a la lactancia. *Revista de Neuroendocrinología*, 17; 466-473.
3. Biggio G, Cristina Mostallino M, Follesa P, Concas A, Sanna E. (2009). GABA (A) receptor function and gene expression during pregnancy and postpartum. *Int. Rev. Neurobiol.* 85; 73–94.
4. Binart N, Barchelot A, Bouilly J. (2010) Impact of prolactin receptor isoforms on reproduction. *Trends Endocrinol Metab*; 21:362-368.
5. Blanco Favela, Legorreta Haquet, Yunuen, Huerta Villalobos, Chávez-Rueda, Montoya Díaz, Chávez Sánchez, Zenteno Galindo (2012). Role of prolactin in the immune response *Bol Med Hosp Infant Mex* 69(5): 329-336.
6. Bole-Feysot, C., Goffin, V., Edery, M., Binart, N., & Kelly, P. A. (1998). Prolactin (PRL) and Its Receptor: Actions, Signal Transduction Pathways and Phenotypes Observed in PRL Receptor Knockout Mice. *Endocrine Reviews*, 19(3), 225–268
7. Borba VV, Zandman-Goddard, Shoenfeld Y. (2018). Prolactin and autoimmunity. *Frontiers in immunology*. 9-73.
8. Breder CD, Dinarello CA, Saper CB. (1988) Interleukin-1 immunoreactive innervation of the human hypothalamus. *Science*; 240:321-4
9. Brown, R.S., Piet, R., Herbison, A.E., Grattan, D.R. (2012). Differential actions of prolactin on electrical activity and intracellular signal transduction in hypothalamic neurons. *Endocrinology* 153, 2375–2384.

**EFFECTOS DE LA PROLACTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$  EN EL  
HIPOCAMPO DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS**

10. Butterweck V, Prinz S, Schwaninger M. (2003). The role of interleukin-6 in stress-induced hyperthermia and emotional behaviour in mice. *Behav Brain Res*; 144:49-56.
11. Carrasco Otero (2011). Citoquinas: De fieles aliadas a temibles enemigas, *Real academia de ciencias veterinarias de andalucía oriental* vol. 24
12. Carretero J. y cols., (2018). Sistema de prolactina en el hipocampo. *Universidad de salamanca*. 375,198-199.
13. Cejkova, P., Fojtikova, M., & Cerna, M. (2009). Immunomodulatory role of prolactin in diabetes development. *Autoimmunity Reviews*, 9(1), 23–27.
14. Chávez-Rueda K, Hernández J, Zenteno E, Leños-Miranda A, Legorreta-Haquet MV, Blanco-Favela F (2005). Identification of prolactin as a novel immunomodulator on the expression of co-stimulatory molecules and cytokine secretions on T and B human lymphocytes. *Clin Immunol*;116:182-191.
15. Chrousos, G.P. & Gold, P.W. (1992). The Concepts of Stress and Stress System Disorders. *Journal American Medical Association*. (267, 9): 1244-1252.
16. Cigolani, H. y Houssay, B. (2000). *Fisiología Humana*, 7ª Edición. Buenos Aires El Ateneo.
17. Cooke NE, Szpirer C, Levan G (1986). The related genes encoding growth hormone and prolactin have been dispersed to chromosomes 10 and 17 in the rat. *Endocrinology*, 119: 2451-2454.
18. Dantzer R (2001). Cytokine induced sickness behavior; mechanisms and implications. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 933, 222-234.
19. Dantzer R, Wollman EE. (2003). Relationship between the brain and the immune system. *J Soc Bio*; 197:81-8.
20. Dardenne M. y col (1994). Prolactin Receptors Expression in Human Hematopoietic Tissues Analyzed by Flow Cytofluorometry. *The Endocrine Society*, 134 (5); 2108-2114.

**EFFECTOS DE LA PROLACTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$  EN EL  
HIPOCAMPO DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS**

21. De Bellis A., Bizzarro A., Pivonello R., Lombardi G., & Bellastella A (2005). Prolactin and Autoimmunity. *Pituitary*, 8(1); 25–30.
22. De vito J. W. Stone S. Y Shamgochian M. (1995). Factor de necrosis tumoral alfa en el sitio de una herida en el cerebro de rata. *Endocrinología molecular y celular* 108, 125-130.
23. Dinarello CA (2000). Proinflammatory cytokines. *Chest*, 118(2), 503-508..
24. Dinarello CA, Cannon JG, Wolff SM. (1986). Tumor necrosis factor is an endogenous pyrogen and inducer production of interleukin-1. *J Exp Med*; 163:1433-50
25. Fabrice Duval MD, Félix González MD y Hassen Rabia MD. (2010). Neurobiología del estrés. *Revista Chilena de neuro-psiquiatria*; 48 (4): 307-318.
26. Felten DL. (2000) Neural influence on immune responses: underlying suppositions and basic principles of neural immune signaling. *Prog Brain Res*; 122: 381-9.
27. Forsyth IA, Wallis M (2002) Growth hormone and prolactin—molecular and functional evolution. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 7:291–312
28. Freeman ME., Kanyicska B., Lerant A., Nagy G (2000). Prolactin: Structure, Function, and Regulation of Secretion. *Physiological Reviews*, 80(4):1523-631.
29. Friesen H, Guyda H, Jarclly J (1970). biosíntesis of human growth hormone and prolactin. *J. Clin Endocrino*, 31, 611-624.
30. Furuta, M., Bridges, R.S., (2005). Gestation-induced cell proliferation in the rat brain. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 156, 61–66.
31. Glaser R, Kiecolt-Glaser JK. (2005). Stress-induced immune dysfunction: implications for health. *Nature Rev Immunol*; 5: 243-51

**EFFECTOS DE LA PROLACTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$  EN EL  
HIPOCAMPO DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS**

32. Goffin V, Kinet S, Ferrag F, Binart N, Martial ja, Kelly PA (1996). Antagonistic properties of human prolactin analogues that show paradoxical agonistic activity in the Nb2 bioassay. *J Biol Chem* 271: 16573–16579.
33. Goffin V, Shiverick KT, Kelly PA, Martial JA. (1996). Sequence-Function Relationships Within the Expanding Family of Prolactin, Growth Hormone, Placental Lactogen, and Related Proteins in Mammals. *Endoc. Rev.* 17
34. Grattan, DR. (2001). Chapter 11 The actions of prolactin in the brain during pregnancy and lactation. *The Maternal Brain*, 153–171.
35. Grattan, DR. (2015). 60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: The hypothalamo-prolactin axis. *Journal of Endocrinology*, 226(2), T101–T122.
36. Gregg, C., Shikar, V., Larsen, P., Mak, G., Chojnacki, A., Yong, V.W., Weiss, S., (2007). White matter plasticity and enhanced remyelination in the maternal CNS. *J. Neurosci.* 27, 1812–1823.
37. Guilliams, T. G. y Edwards, L. (2010). "Chronic Stress and the HPA Axis: Clinical Assessment and Therapeutic Considerations". *The Standard. A Review of Natural & Nutraceutical Therapies for Clinical Practice* 9(2), 1–12.
38. Guyton, C. y Hall, J. (2011). *Tratado de Fisiología Médica*. 12ª Edición. Elsevier, 2011.
39. J. Martín Pérez (2005), fisiología de la prolactina, *Fisiología Humana*. 3ª ed. Madrid: McGraw-Hill, cap.70,872-879
40. Jaime toro (2014). El potencial de la prolactina. *Revista mexicana de medicina de la reproducción* (175,176)
41. Jikijara H, Handwerger S, Frank GR, Brar AK, Cedars Mi. (1995). Interleucina 1 beta y endometrio. *Biología de la reproducción*. 52, 184-191.
42. Kandel, E., Schwartz, J.H. y Jessell, T.M. (2001). *Principios de Neurociencia*. McGraw-Hill/ Interamericana de España S.A.U., Madrid.
43. Kelly PA, Djiane J, Postal-Vinay MC, Edery M (1991). The prolactin/growth hormone receptor family. *Endocr Rev* 12:235–251

**EFFECTOS DE LA PROLACTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$  EN EL  
HIPOCAMPO DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS**

44. Kimura H. MacLeod R (1975): Dopamine receptors and the regulation of prolactin secretion. Abstract 87. Programs of the 57th. Annual Meeting of the Endocrine Society. New York.
45. Kirk SE, Xie TY, Steyn FJ, Grattan DR, Bunn SJ (2017). Restraint stress increases prolactin-mediated phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 5 in the hypothalamus and adrenal cortex in the male mouse. *J Neuroendocrinol.* Jun;29(6). doi: 10.1111/jne.12477.
46. Kovács, Z., Lakatos, R.K., Barna, J., Dobolyi, Á., (2017). Absence epileptic activity in wistar albino glaxo rijswijk rat mothers. *Brain Res.* 1657, 368–376.
47. Lajud N y cols., (2013). Prolactin administration during early postnatal life decreases hippocampal and olfactory bulb neurogenesis and results in depressive-like behavior in adulthood. *División de neurociencias.* 64, 781-789.
48. Lupiens, S.J. McEwen, B.S. Gunnar, M.R & Heim, C. (2009). Effects of stress throughout the lifespan on the brain. *Behaviour and cognition. Nature reviews. Neuroscience,* 10(6), 434-445.
49. Maguire, J., Ferando, I., Simonsen, C., Mody, I., (2009). Excitability changes related to GABA<sub>A</sub> receptor plasticity during pregnancy. *J. Neurosci.* 29, 9592–9601.
50. Mangoura D. Pelletiere C. Leung S. Sakellaridis (2000). Tiempo las vías de señalización src-PLD Y JACK/STAT para inducir la proliferación mientras promueve la diferenciación en los astrocitos embrionarios. *Revista internacional de neurociencias del desarrollo.* 18(7), 693-704.
51. Mann E, Bridges S (2001). regulación hormonal lactogénica del comportamiento materno. *Progresos en la investigación del cerebro,* 133, 251-262.
52. Matera L. (1997). Action of pituitary and lymphocyte prolactin. *Neuroimmunomodulation;*4:171-180.
53. McEwen, B. S. y Gianaros, P. J. (2010). Central role of the brain in stress and adaptation: Links to socioeconomic status, health, and disease. *Annals*

**EFFECTOS DE LA PROLACTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$  EN EL  
HIPOCAMPO DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS**

- of the New York Academy of Sciences, 1186 (The Biology of Disadvantage), 190–222. <http://doi.org/10.1111/j.17496632.2009.05331.x>.
54. McEwen, Bruce S.T (2000). The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Research*, (886,1-2), 172-189.
  55. McMurray, RW (2001). Prolactina en el lupus eritematoso sistémico murino. *Lupus*, 10 (10), 742–747
  56. Méndez I, Cariño C, Díaz L (2005), Prolactin in the immunological system: synthesis and biological effects. *Rev Invest Clin*, 57:447-456.
  57. Méndez I, González L, Martínez I (2007) “La Prolactina: Una Hormona que también es Citocina”, *Revista de la Escuela de Medicina “Dr. José Sierra Flores”* 4-11.
  58. Modersheim TAE y cols., (2007). La prolactina participa en la respuesta glial después de una lesión focal en el cerebro de la rata juvenil. Instituto Liggins, universidad de Auckland. 145(3), 963-973.
  59. Morales T (2011). Recent findings on neuroprotection against excitotoxicity in the hippocampus of female rats. *J. Neuroendocrinol.* 23, 994–1001.
  60. Morales T, Lorenson M, Walker A, 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.
  61. Munck A, Guyre PM. (1991) Glucocorticoids and immune function. En: Ader R, Felten DL, Cohen N (Eds.). *Psychoneuroimmunology*. 2a Ed. Nueva York: Academic Press; pp. 447-74.
  62. Nagano M, Kelly PA (1994). Tissue distribution and regulation of rat prolactin receptor gene expression. Quantitative analysis by polymerase chain reaction
  63. Nagy E, Berczi I, Wren GE, Asa SL, Kovacs K (1983). Immunomodulation by bromocriptine. *Immunopharmacology*;6:231-243.

**EFFECTOS DE LA PROLACTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$  EN EL  
HIPOCAMPO DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS**

64. Nagy E, Berczi I. (1978) Immunodeficiency in hypophysectomized rats. *Acta Endocrinol (Copenh)*;89:530-537
65. Navarro X. (2002). "Fisiología del sistema nervioso autónomo". *Revista de Neurología* 35(6), 553–562.
66. Naylor MJ, Lockfeer JA, Horseman ND, Ormandy CJ (2003). Prolactin regulates mammary epithelial cell proliferation via autocrine/paracrine mechanism. *Endocrine* ; 20: 111–4.
67. Nira Ben J, Mrshon JL, Allen DL, Steinmetz RW (1996). Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocr Rev*; 17; 639-669.
68. Olazabal Olarreaga, IM.; Gil Alberdi, L.; Arias Navalón, JA (2014). El sistema inmune y su función en el SNC, universidad Alfonso x el sabio, facultad de ciencias de la salud, febrero
69. Olmos O, Flores E, Mancilla H. Vega S. Diaz L. Zaga C. (2019). Células inmunes innatas y respuestas dependientes del receptor tipo Toll en la interfaz materno-fetal. *International journal of molecular sciences*. 20(15), 3654.
70. Ortona E, Pierdominici M. Maselli A, Veronica C, Aloisi F, Shoenfeld Y (2016). Sex based differences in autoimmune diseases. *Annali dell'istituto superiore di sanita*, 52(2), 205-212.
71. Oscar riddle y cols (1933) The preparation, identification and assay of prolactin, a hormone of the anterior pituitary. From the Carnegie institution of Washington, station for Experimental Evolution: 191
72. Owerbach D, Rutter WJ, Cooke NE, Martial JA, Shows TB (1981). The prolactin gene is located on chromosome 6 in humans. *Science*, 212: 815-816.
73. PE Smith (1930). Hipofisectomía y terapia de reemplazo en la rata, *American Journal of Anatomy* 45(2), 205-273.
74. Pereira S. y cols, (2014). Prolactina en la respuesta inflamatoria. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 846, 243-264.

**EFFECTOS DE LA PROLACTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$  EN EL  
HIPOCAMPO DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS**

75. Pérez M (2010). Fisiología de la prolactina, Instituto de Investigaciones Biomédicas A. Sols, CSIC/UAM Arturo Duperier 4, 28029 Madrid
76. Phillips, L. J., McGorry, P. D., Garner, B., Thompson, K. N., Pantelis, C., Wood, S. J. y Berger, G. (2006). "Stress, the hippocampus and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: Implications for the development of psychotic disorders". Australian and New Zealand Journal of Psychiatry, 40(March), 725–741. <http://doi.org/10.1111/j.14401614.2006.01877.x>.
77. Rimoldi D. (2005), bioquímica y patología clínica, prolactina e inmunidad vol 69, buenos aires argentina, 52-53
78. Rincheval-Arnold A, Belair L, Cencic A, Djiane J. (2002) Up-regulation of polymeric immunoglobulin receptor mRNA in mammary epithelial cells by IFN-gamma. Mol Cell Endocrinol; 194: 95-105.
79. Rivera JC, Clapp C, Thebahulth S, Arnold E, Garcia C. vasoinhibins (2008): novel inhibitors of ocular angiogenesis. Am J Physiol Endocrinol Metab. 295, 772-778.
80. Rivero-Segura, N.A., Flores-Soto, E., García de la Cadena, S., Coronado-Mares, I., Gomez-Verjan, J.C., Ferreira, D.G., Cabrera-Reyes, E.A., Lopes, L.V., Massieu, L., Cerbón, M., (2017). Prolactin-induced neuroprotection against glutamate excitotoxicity is mediated by the reduction of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> overload and NF- $\kappa$ B activation. PLoS ONE 12 (5), e0176910.
81. Roque A. (2016). Prolactin administration during early postnatal life decreases hippocampal and olfactory bulb neurogenesis and results in depressive-like behavior in adulthood. División de neurociencias, Centro de Investigación Biomédicas de Michoacán. 55, 39-48.
82. Shingo, T., Gregg, C., Enwere, E., Fujikawa, H., Hassam, R., Geary, C., Cross, J.C., Weiss, S., (2003). Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin. Science 299, 117–120.
83. Sinha YN. (1995). Structural Variants of Prolactin: Occurrence and Physiological Significance. Endoc. Rev. 16 (3): 354-369.

**EFFECTOS DE LA PROLACTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$  EN EL  
HIPOCAMPO DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS**

84. Sirzen-Zelenskaya, A., Gonzalez-Iglesias, A.E., Boutet de Monvel, J., Bertram, R., Freeman, M.E., Gerber, U., Egli, M., (2011). Prolactin induces a hyperpolarising current in rat paraventricular oxytocinergic neurones. *J. Neuroendocrinol.* 23, 883–893.
85. Smith, S. M., y Vale, W. W. (2006). "The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress". *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 8(4), 383–95. <http://doi.org/10.1038/nrendo.2011.222>
86. Sodhi A, Tripathi A. (2008). Produccion de citocinas inducida por prolactina en macrófagos invitro. *Int inmunol* 20(3), 327-336.
87. Spangelo BL, Macleod RM (1990);. The role immunopeptides in the regulation of anterior pituitary hormone release. *Trends Endocrinol Metab* 1:408-412.
88. Takizawa K, Kitani S, Takeuchi F, Yamamoto K (2005). Enhanced expression of CD69 and CD25 antigen on human peripheral blood mononuclear cells by prolactin. *Endocr J*;52:635-641.
89. Tan D, Walker A. (2010) Short form 1b human prolactin receptor down-regulates expression of the long form. *J Mol Endocrinol*; 44:187-194
90. Tejadilla, D., Cerbón, M., Morales, T., (2010). Prolactin reduces the damaging effects of excitotoxicity in the dorsal hippocampus of the female rat independently of ovarian hormones. *Neuroscience* 169, 1178–1185.
91. Tejadilla, M Cerbón, T Morales (2010). Prolactin reduces the damaging effects of excitotoxicity in the dorsal hippocampus of the female rat independently of ovarian hormones. *Neuroscience*. Sep 1;169(3):1178-85. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.05.074. Epub 2010 Jun 4.
92. Torner L, Karg S, Blume A, Kandasamy M, Kuhn HG, Winkler J, Aigner L, Neumann ID. (2009) prolactin prevents chronic stress-induced decrease of adult hippocampal neurogenesis and promotes neuronal fate. *J. Neuroscience*. 29(6): 1826-1833.
93. Torner L. (2016). Action of prolactin in the brain: physiological adaptations to stress and neurogenesis to psychopathology. *J. Neuroscience*. 30, 7-25.

**EFFECTOS DE LA PROLACTINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$  EN EL  
HIPOCAMPO DE RATAS MACHOS Y HEMBRAS**

94. Torner, L., Neumann, I.D., (2002). The brain prolactin system: involvement in stress response adaptations in lactation. *Stress* 5, 249–257.
95. Villanueva Solís J, Arena Cornejo P. (2006) The relevant aspects of hyperprolactinemia in the fields of physiology. *Rev Med Hered*; 17:234-245
96. Walsh, R.J., Slaby, F.J., Posner, B.I., (1987). A receptor-mediated mechanism for the transport of prolactin from blood to cerebrospinal fluid. *Endocrinology* 120,1846–1850.
97. Yang L, Hu Y, Li X, Zhao J, Hou Y (2006). Prolactin modulates the functions of murine spleen CD11c-positive dendritic cells. *Int Immunopharmacol*;6:1478-1486.
98. Zárate S., Cardenas F., Acevedo C., Sarmiento M. y León L. (2014). “Efectos del estrés sobre los procesos de plasticidad y neurogenesis: una revisión”. *Universitas Psychologica* 13(3), 1181-1197.
99. Zinzun I. (2017). Efectos de la prolactina sobre la activación microglial y la expresión de citocinas en crías de rata macho. Universidad michoacana De San Nicolás De Hidalgo.