



PAPEL DE FACTORES ENDOCRINOS COMO MELATONINA Y PROLACTINA, Y DE ADIPOQUINAS COMO LEPTINA EN LA MODULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN ASOCIADA A PROCESOS NEURODEGENERATIVOS.

José Iván Patraca Fierro

Dipòsit Legal: T 242-2016

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE FACTORES ENDOCRINOS COMO MELATONINA Y PROLACTINA, Y DE ADIPOQUINAS COMO LEPTINA EN LA MODULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN ASOCIADA A PROCESOS NEURODEGENERATIVOS.

José Iván Patraca Fierro

Dipòsit Legal: T 242-2016

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE FACTORES ENDOCRINOS COMO MELATONINA Y PROLACTINA, Y DE ADIPOQUINAS COMO LEPTINA EN LA MODULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN ASOCIADA A PROCESOS NEURODEGENERATIVOS.

José Iván Patraca Fierro

Dipòsit Legal: T 242-2016

José Iván Patraca Fierro

**PAPEL DE FACTORES ENDOCRINOS COMO MELATONINA Y
PROLACTINA, Y DE ADIPOQUINAS COMO LEPTINA EN LA
MODULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN ASOCIADA A PROCESOS
NEURODEGENERATIVOS**

TESIS DOCTORAL

Dirigida por el Dr. Jaume Folch López



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI

Departamento de Bioquímica y Biotecnología
Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud
Reus, 2015

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE FACTORES ENDOCRINOS COMO MELATONINA Y PROLACTINA, Y DE ADIPOQUINAS COMO LEPTINA EN LA MODULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN ASOCIADA A PROCESOS NEURODEGENERATIVOS.

José Iván Patraca Fierro

Dipòsit Legal: T 242-2016

Dr. Jaume Folch López, profesor adscrito al Departamento de Bioquímica y Biotecnología de la Universitat Rovira i Virgili,

CERTIFICO:

Que este trabajo, titulado "PAPEL DE FACTORES ENDOCRINOS COMO MELATONINA Y PROLACTINA, Y DE ADIPOQUINAS COMO LEPTINA EN LA MODULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN ASOCIADA A PROCESOS NEURODEGENERATIVOS", que presenta el Sr. José Iván Patraca Fierro para la obtención del título de Doctor, ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamento de Bioquímica y Biotecnología de esta Universidad.

Reus, 26 de Noviembre de 2015



El Director de la Tesis Doctoral,

Dr. Jaume Folch López
Departamento de Bioquímica y Biotecnología
Universitat Rovira i Virgili
Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud
Reus.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE FACTORES ENDOCRINOS COMO MELATONINA Y PROLACTINA, Y DE ADIPOQUINAS COMO LEPTINA EN LA MODULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN ASOCIADA A PROCESOS NEURODEGENERATIVOS.

José Iván Patraca Fierro

Dipòsit Legal: T 242-2016

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE FACTORES ENDOCRINOS COMO MELATONINA Y PROLACTINA, Y DE ADIPOQUINAS COMO LEPTINA EN LA MODULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN ASOCIADA A PROCESOS NEURODEGENERATIVOS.

José Iván Patraca Fierro

Dipòsit Legal: T 242-2016

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE FACTORES ENDOCRINOS COMO MELATONINA Y PROLACTINA, Y DE ADIPOQUINAS COMO LEPTINA EN LA MODULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN ASOCIADA A PROCESOS NEURODEGENERATIVOS.

José Iván Patraca Fierro

Dipòsit Legal: T 242-2016



Este trabajo ha sido financiado por los siguientes proyectos:

Generalitat de Catalunya 2009/SGR00853, (Beca Fi-DGR/2012)

Ministerio de Ciencia e Innovación de España SAF2011-23631

Instituto de Salud Carlos III PS09/01789

Facultad de Farmacia y Farmacognosia, Universidad de Barcelona

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE FACTORES ENDOCRINOS COMO MELATONINA Y PROLACTINA, Y DE ADIPOQUINAS COMO LEPTINA EN LA MODULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN ASOCIADA A PROCESOS NEURODEGENERATIVOS.

José Iván Patraca Fierro

Dipòsit Legal: T 242-2016

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE FACTORES ENDOCRINOS COMO MELATONINA Y PROLACTINA, Y DE ADIPOQUINAS COMO LEPTINA EN LA MODULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN ASOCIADA A PROCESOS NEURODEGENERATIVOS.

José Iván Patraca Fierro

Dipòsit Legal: T 242-2016

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE FACTORES ENDOCRINOS COMO MELATONINA Y PROLACTINA, Y DE ADIPOQUINAS COMO LEPTINA EN LA MODULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN ASOCIADA A PROCESOS NEURODEGENERATIVOS.

José Iván Patraca Fierro

Dipòsit Legal: T 242-2016

AGRADECIMIENTOS

La realización de mi investigación y la culminación de este trabajo de tesis doctoral; es un logro para mí, y poder disfrutarlo y aprender mucho, fueron mis ideales al inicio del mismo, para ello, agradezco infinitamente a muchas personas que a lo largo de este trayecto estuvieron a mi lado, brindando valores y conocimientos que me llevo, y que sin estos mismos no hubiera podido llegar hasta este punto en el que me encuentro hoy.

En primer lugar agradecer al Dr. *Jaume Folch López* por la dirección de la tesis doctoral, al Dr. *Antoni Camins* por la incorporación al grupo, el goce de las instalaciones y el apoyo ofrecido por parte de la Facultad de Farmacia y Farmacognosia de la Universidad de Barcelona, quiero destacar a los apreciados Dres. *José Luis Paternain* y *Jordi Blanco*, por su excelente dedicación, entereza y esfuerzo; por mostrarme las caras de la moneda en la investigación, dándome puntos de vistas positivos y desaciertos durante el doctorado, por último y no menos importante al Dr. *Francesc Sureda* por la colaboración de los departamentos de Bioquímica y Farmacología de esta Universidad, también, por los equipos e instalaciones prestadas durante estos años. Así mismo agradecer a los demás doctores de la URV los cuales dieron sus puntos de vista y ayudaron a la realización de este trabajo.

Al personal técnico, que sin ellos no es ni será posible el poder trabajar en conjunto y estar al tanto de los procesos de investigación. *Amparo Aguilar*, por tus consejos sobre la investigación, buenas praxis en el estabulario y también por los consejos a nivel personal, *Laia Fananas* por tu ayuda requerida y brindada durante estos años. *Celeste Di paolo* porque el compartir un pequeño espacio en el laboratorio; hicieron que se fomentara más el compañerismo e intercambio de ideas y conocimientos durante la jornada.

Mención especial por aquellas personas que tuve el placer de brindar un poco de mis pequeños conocimientos y que hicieron que mi trabajo brillara, por aportar puntos de vista y por hacerme reflexionar con las preguntas que me realizaron durante su estadía en el laboratorio. *Ángela*,

Agradecimientos

Sandra, Aleix y Sahara, me llevo gratos recuerdos de ustedes y espero seguir conservando su amistad.

Agradecimientos especiales a todos y cada uno de mis compañeros de laboratorio presentes y ausentes, que para mí fueron como una familia investigadora, siendo un placer haberlos conocido y compartido momentos dulces y amargos en el trayecto de la carrera; agradecido ampliamente por sus consejos, ayuda, apoyo y comprensión cuando más los necesité. Sinceramente, significan mucho para mí y sobre todo porque todo lo compartido estuvo y estará muy dentro de mí. Añoraré volver a vivir esos momentos pero sé que estarán ahí. Las cenas, cumpleaños, celebraciones de triunfos, penas y desahogos o reuniones sabatinas en grupo “Randoms” fue una experiencia única y maravillosa, habernos agrupado todos y cada uno de los miembros con sus cualidades hicieron que compartiera; con cada uno de ellos un sinfín de vivencias, comentarios, experiencias, alegrías y júbilo así como, momentos no tan agradables pero, estos hicieron madurar mucho la convivencia durante mi trayectoria: a *Cintia, Pablo, Simona, Andrés, Martí, Pol, José María, Gemma, Fadua, Fiona, Pía, Nohora, Erica, Laura, Anna, Teresa y hasta Victor*; SINCERAMENTE GRACIAS!

Reconocimiento de agradecimiento especial a *Nohora Martínez* que aunque digan lo que digan, ya eres mi hermana tanto de laboratorio como de vivencias; sobrepasando todas las barreras, estuviste y sé que estarás conmigo así como, lo fue desde del inicio del máster; en las buenas pero sobre todo en las malas. Eres una persona que me conoce desde hace mucho tiempo y que has aguantado todo y cada uno de mis bemoles siendo estos bueno y no tan bueno. Me alegró muchísimo tenerte como compañera de laboratorio y de grupo. Siendo tú uno de los verdaderos amigos que puedo mencionar, recuerda que te quiero mucho y no me olvides, juntos hicimos una mancuerna bastante buena de trabajo. Mi hermano y amigo el Dr. *Andrés Díaz-López*, siempre lo que dicte la hermandad, porque así lo dijimos desde el inicio de mi estancia y así fue, recuerdos especiales juntos en Cataluña.

María y Alfonso, Adhara y Alex, gracias por el apoyo brindado durante todos estos años de amistad sincera, por los viajes a Galicia...tierra celta y matriarcado, comunidad Valenciana tierra

de buenos amigos y del buen comer, por brindarme espacios para compartir con ustedes las vivencias, desesperos y demás situaciones cotidianas, ustedes hicieron más llevadero el sendero durante mi estancia aquí en Cataluña.

Agradecimientos especiales a mis padres el Sr. José Patraca y la Sra. Ma. De Jesús Fierro por forjarme el carácter y brindarme educación con cariño y esmero, por hacerme enfrentar los retos con valentía y con coraje, por enseñarme que lo que hay afuera siempre tiene un costo. A mis queridos hermanos: Ángeles, Josué y Josafat por la comunicación, los ánimos y la entereza que me inyectaban cada vez que les llamaba, por la motivación en mi carrera; por darme la bendición de ser tío de estas personitas que cada vez que pensaba en ellos me llenaba de orgullo y entereza para continuar cuando lo veía todo oscuro: Jaahziel, Eduardo, Fernanda y Valeria ¡LOS QUIERO MUCHO A TODOS!

Asimismo, agradecer a las instituciones que me brindaron su apoyo para la realización de la tesis doctoral y conocimientos adquiridos durante mi estadía: Generalitat de Catalunya, Instituto de investigación Carlos III, CIBERNED, EMBO, IISPV, IUBMB, Universidad de Barcelona (Facultad de Farmacia y Farmacognosia) y Universitat Rovira i Virgili.

¡A todos y cada uno....Muchas gracias!

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
PAPEL DE FACTORES ENDOCRINOS COMO MELATONINA Y PROLACTINA, Y DE ADIPOQUINAS COMO LEPTINA EN LA MODULACIÓN
DE LA INFLAMACIÓN ASOCIADA A PROCESOS NEURODEGENERATIVOS.

José Iván Patraca Fierro

Dipòsit Legal: T 242-2016

Agradecimientos

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE FACTORES ENDOCRINOS COMO MELATONINA Y PROLACTINA, Y DE ADIPOQUINAS COMO LEPTINA EN LA MODULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN ASOCIADA A PROCESOS NEURODEGENERATIVOS.

José Iván Patraca Fierro

Dipòsit Legal: T 242-2016

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE FACTORES ENDOCRINOS COMO MELATONINA Y PROLACTINA, Y DE ADIPOQUINAS COMO LEPTINA EN LA MODULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN ASOCIADA A PROCESOS NEURODEGENERATIVOS.

José Iván Patraca Fierro

Dipòsit Legal: T 242-2016

RESUMEN

Castellano

La glía es el grupo de células del sistema nervioso más abundante en el cerebro, que por mucho tiempo se le consideró sólo como un elemento de soporte neuronal sin importancia. Sin embargo en el contexto de los procesos neurodegenerativos, y de las enfermedades como Alzheimer y Parkinson, se ha puesto de manifiesto el papel relevante de la activación de los mecanismos de la inflamación. De ahí la necesidad de investigar el comportamiento y caracterización de la glía en respuesta a la pérdida de memoria y la activación tanto de señales intracelulares, de supervivencia y deterioro cognitivo. Por otro lado, en los últimos años se ha observado el potencial antiinflamatorio de factores endógenos como hormonas endocrinas, en particular melatonina, y de adipoquinas liberadas por órganos no endocrinos como leptina. Además de las funciones canónicas de estas moléculas, recientemente se han descrito otras funciones alternativas y específicas para el sistema nervioso central. Éste sería el caso de otra hormona endocrina, prolactina, de la que justamente ahora se empiezan a comprender sus funciones más allá de la lactancia y la reproducción humana.

Para estudiar específicamente la potencialidad antiinflamatoria de éstas hormonas y adipoquinas, se ha utilizado un modelo de cultivo mixto de córtex de ratón C57Bl/6J, iniciando el tratamiento al 9 día de crecimiento después de la siembra. Los cultivos se sometieron a la acción de la melatonina, leptina y prolactina y, posteriormente, se procedió a la incubación con citoquinas ($\text{IFN}\gamma$, $\text{IL-1}\beta$ y $\text{TNF}\alpha$) durante 48 horas. La atención se centró en la conexión de las moléculas de señalización activadas por el estrés oxidativo como lo son p38-MAKP e iNOS.

El resultado de este trabajo pone de manifiesto el posible efecto antiinflamatorio de la melatonina, la prolactina y la leptina, demostrado a través de la disminución en la producción de óxido nítrico y la inhibición en la expresión de iNOS, actuando específicamente sobre la vía de p38-MAKP. Lo anterior sugiere que las moléculas estudiadas pueden ser relevantes en el

Resumen

posible desarrollo tanto de nuevos fármacos, como de estrategias de prevención de enfermedades neurodegenerativas.

English

Glial cells is the group of the most abundant types of cells in the nervous system, which for a long time was considered just as an element for neuronal support and its functions were substantially overlooked. However in the context of neurodegenerative processes, such as Alzheimer's and Parkinson's disease, Glial cells have shown to have an important role in the activation of inflammatory mechanisms. Therefore, there is a need for investigating the behavior and characterization of Glial cells in response to memory loss as well as the activation of related intracellular and survival signaling, and signals for cognitive impairment. Furthermore, recently it has been observed the anti-inflammatory potential of certain endogenous factors, such as endocrine hormones like melatonin, and also of adipokines like leptin, which is released by non-endocrine organs. In addition to the canonical functions of these molecules, new alternatives and specific functions have been recently described at the level of the central nervous system. This is the case of another endocrine hormone, prolactin, which functions at the central nervous system just started to be understood beyond its role in infancy and human reproduction.

To specifically study the anti-inflammatory potential of these hormones and adipokines, a model of mixed culture of cortex of C57BL / 6J was used. initial treatment was applied at the 9th growing day after planting. The cultures were subject to action of melatonin, leptin and prolactin, followed by the incubation with cytokines (IFN γ , IL-1 β and TNF α) for 48 hours. The focus was to investigate the connections between two signaling molecules; i.e. p38-MAKP and iNOS, which are activated by oxidative stress.

A neuroprotective and / or anti-inflammatory effect of adipokines was found as a result of the inhibitory effects of melatonin, leptin and prolactin, on p38 MAPK, as well as for the ability of iNOS expression to reduce the production of nitric oxide in cell cultures. These results indicate,

on the one hand, that adipokines can regulate the cell damage caused by excessive nitric oxide through the induction of pro-inflammatory cytokines and, on the other hand, they can inhibit apoptosis triggered by the release of cytochrome C and caspase 3. Furthermore, other molecules involved in memory loss, such as CREB and $\text{NF}\kappa\beta$, are inhibited through the inhibition of JAK / STAT, which in turn delays memory loss. These findings evidence the potential application of these biomolecules in the treatment of neurological disorders and suggesting therapeutic roles in the early stages of Alzheimer's disease.

Català

La glia és el grup de cèl·lules del sistema nerviós més abundant al cervell, que per molt temps se'l va considerar només com un element de suport neuronal sense importància. No obstant això, en el context dels processos neurodegeneratius i de les malalties com Alzheimer i Parkinson, s'ha posat de manifest el paper rellevant de l'activació dels mecanismes de la inflamació. D'aquí la necessitat d'investigar el comportament i caracterització de la glia en resposta a la pèrdua de memòria i l'activació tant de senyals intracel·lulars com de supervivència i deteriorament cognitiu. D'altra banda, en els darrers anys s'ha observat el potencial antiinflamatori de factors endògens com hormones endocrines, en particular la melatonina, i d'adipoquines alliberades per òrgans no endocrins com la leptina. A més de les funcions canòniques d'aquestes molècules, recentment s'han descrit altres funcions alternatives i específiques pel sistema nerviós central. Aquest seria el cas d'una altra hormona endocrina, la prolactina, de la que justament ara es comencen a comprendre les seves funcions més enllà de la lactància i la reproducció humana.

Per estudiar específicament la potencialitat antiinflamatòria d'aquestes hormones i adipoquines, s'ha utilitzat un model de cultiu mixt de còrtex de ratolí C57BL/6J, iniciant el tractament al 9è dia de creixement després de la sembra. Els cultius es van sotmetre a l'acció de la melatonina, la leptina i la prolactina i, posteriorment, es va procedir a la incubació amb

Resumen

citoquines (IFN γ , IL-1 β i TNF α) durant 48 hores. L'atenció es va centrar en la connexió de les molècules de senyalització activades per l'estrès oxidatiu com ho són p38-MAKP i iNOS.

Es va comprovar els efectes neuroprotectors i/o antiinflamatoris de l'adipoquina leptina i de les hormones melatonina i prolactina, que tenen efectes sobre la inhibició de p38 MAPK i, especialment, l'expressió de iNOS a la baixa producció d'òxid nítric en cultius cel·lulars. Per una part això indicaria que les adipoquines regulen el dany cel·lular causat per l'excés d'òxid nítric a través de citoquines pro-inflamatòries, i per un altra, la inhibició d'apoptosi activada per l'alliberament de Citocrom C i la caspasa 3. D'altra banda es van inhibir les molècules implicades en la pèrdua de memòria com ho són CREB i NF κ B a través de la inhibició de JAK/STAT frenant així la pèrdua de memòria. Aquests resultats indiquen el seu potencial d'aplicació en el tractament de trastorns neurològics, quelcom que suggereix tractaments terapèutics en les primeres etapes de la malaltia d'Alzheimer.

ABREVIATURAS

ADN: Acido desoxirribonucleico.
AMPA: Amino- α -3 hidroxil-5-metil-4-isoxazolpropiónico.
APOE: Apolipoproteína E.
APP: Proteína precursora amiloidea.
APP695: Isoforma de proteína B-amiloide A4.
ARC: Núcleo arqueado.
ARE: Proteína poli A.
Asp: Ácido aspártico.
ATP: Adenosina trifosfato.
 β -A: β -amiloide.
BDNF: El Factor neurotrófico derivado del cerebro o BDNF.
BHE: Barrera hematoencefálica.
CD: Células dendríticas.
Complejo de Freund: Solución acuosa con plata, junto con un aceite mineral y un agente dispersante.
DD: Dominio de la muerte.
DMH: Dorsomedial.
Drp1: Proteína relacionada con dinamina 1.
EA: Enfermedad de Alzheimer.
eNOS: Endotelial óxido nítrico sintasa.
 $\text{fA}\beta$: Beta amiloide Fibrilar.
FLICE: Inhibidor de proteínas FLIP.
GABA: Ácidogamma-aminobutírico.
GFAP: Proteína ácido gliofibrilar.
GH: Hormona del crecimiento.
GLUT: Transportador de glucosa.
GLT1: Transportador de glutamato 1.
GHR: Receptor de hormona del crecimiento.
GPCR: Receptores transmembrana acoplados a proteína G.
gp130: Glucoproteína 130.
GTPasa: Guanosina trifosfatasa.
GSH: Glutación.
HPA: Human Protein Atlas.
HLA-DR: Human Leukocyte Antigen receptor.
HSP27: Proteína de choque térmico.
 H_2O_2 : Peróxido de hidrogeno.
HT1A: Receptor agonista completo de la familia de la azapirona.
IL-1 β : Interleuquina-1beta.
IFN γ : Interferón gamma.
IGF1: Factor de crecimiento similar a la insulina 1.
IMC: índice de masa corporal.
iNOS: Óxido nítrico sintasa.

Abreviaturas

IP-10: Interferón inducida por gamma-10.
KOH: Hidróxido de potasio.
LIF: Leukemia inhibitory factor.
LPS: Lipopolisácarido.
LTA: Ácido lipoteicoico.
LTP: Long Time at Potentiation.
MØ: Macrófagos.
MCP: Muerte celular programada.
MCR4: Receptor de melanocortina 4.
MT1: Receptor de Melatonina 1.
NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido reducida.
NES: Síndrome de la alimentación nocturna.
NMDA: N-metil-D-aspartato.
NPY: Neuropeptido Y.
Ob-R: Receptor de leptina.
ON: Óxido nítrico.
PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos.
PER: Genes period.
PL: Lactógenos placentarios.
PS: Placas seniles.
PSEN: Presinilina.
PRL: Prolactina.
PRL-R: Receptor de prolactina.
hPRL: Prolactina humana.
RAGE: Receptor for advanced glycation end products.
ROS: Especies reactivas del oxígeno.
SCN: Sistema nervioso central.
SNP's: Single Nucleotide Polymorphism.
SOCS3: Supresor de citoquinas de señalización 3.
TCR: Receptor de linfocitos T.
TGFβ: Factor de crecimiento transformante beta.
TLRs: Receptor de tipo toll.
TNF-α: Factor de Necrosis Tumoral-alfa.
TSPO: Proteína de translocación mitocondrial.
VMH: Ventromedial.
VP: Vasopresina.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. NEUROGLIA	3
1.2. DESCRIPCIÓN DE LAS CÉLULAS CEREBRALES	4
1.2.1. Astroglía	5
1.2.2. Astrocito	5
1.2.3. Papel de los astrocitos en la neuroinflamación	6
1.3. MECANISMO DE MUERTE NEURONAL IMPLICADO EN LA NEURODEGENERACIÓN	8
1.3.1. Muerte celular	8
1.3.1.1. Tipos de muerte celular	8
1.3.1.2. Definición de apoptosis	8
1.3.2. Proteínas reguladoras de la apoptosis.	10
1.3.2.1. Caspasas	10
1.3.3. Vías de apoptosis	12
1.3.3.1. Vía extrínseca	12
1.3.3.2. Vía intrínseca	13
1.3.4. Hipótesis propuestas	15
1.4. INFLAMATORIO Y ENFERMEDAD DE ALZHEIMER	17
1.4.1. las citoquinas pro-inflamatorias en el cerebro	20
1.4.1.1. TNF α	22
1.4.1.2. Receptores de TNF α	23
1.4.1.3. IL-1 β	23
1.4.1.4. IFN γ	25
1.4.1.5. El receptor y la señalización de IFN γ	25
1.5. MOLÉCULAS NEUROPROTECTORAS	27
1.5.1. Melatonina	27
1.5.1.1. Receptores de melatonina	28
1.5.1.2. Regulación y función de la melatonina en el cerebro	28
1.5.1.3. Relación entre melatonina y leptina	30
1.5.2. La leptina	30
1.5.2.1. Receptor de leptina (Ob-R o LEPR)	35
1.5.3. Prolactina	37
1.5.3.1. Prolactina e inflamación	39
1.6. VÍAS DE ACTIVACIÓN INTRACELULAR: INFLAMACIÓN Y ENFERMEDADES NEUROLÓGICAS	40
1.6.1. Vías de la MAPK y p38	40
1.6.2. NF κ β	42
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	47

3. MATERIAL Y MÉTODOS	53
4. RESULTADOS	71
5. DISCUSIÓN	152
6. CONCLUSIONES	163
7. BIBLIOGRAFÍA	167

Lista de figuras y tablas

Figura 1	5
Figura 2	7
Figura 3	13
Figura 4	29
Figura 5	32
Figura 6	34
Figura 7	35
Figura 8	36
Figura 9	38
Figura 10	43
Figura 11	55
Tabla 1	10
Tabla 2	61
Tabla 3	63
Tabla 4	66

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE FACTORES ENDOCRINOS COMO MELATONINA Y PROLACTINA, Y DE ADIPOQUINAS COMO LEPTINA EN LA MODULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN ASOCIADA A PROCESOS NEURODEGENERATIVOS.

José Iván Patraca Fierro

Dipòsit Legal: T 242-2016

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE FACTORES ENDOCRINOS COMO MELATONINA Y PROLACTINA, Y DE ADIPOQUINAS COMO LEPTINA EN LA MODULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN ASOCIADA A PROCESOS NEURODEGENERATIVOS.

José Iván Patraca Fierro

Dipòsit Legal: T 242-2016

INTRODUCCIÓN

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE FACTORES ENDOCRINOS COMO MELATONINA Y PROLACTINA, Y DE ADIPOQUINAS COMO LEPTINA EN LA MODULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN ASOCIADA A PROCESOS NEURODEGENERATIVOS.

José Iván Patraca Fierro

Dipòsit Legal: T 242-2016

1. INTRODUCCIÓN

1.1. NEUROGLÍA.

La memoria, la conciencia, los pensamientos y la creatividad son atributos asociados al cerebro. Este órgano es el constituyente principal del sistema nervioso central; a través de sus distintas regiones integra la información de nuestro entorno para analizarla, procesarla y elaborar respuestas. Por ello, uno de los retos más apasionantes de la neurobiología actual es saber cómo funciona el cerebro humano. El poder cognitivo del cerebro es único, e implica la participación de redes de células nerviosas que incluyen a las neuronas, una de las poblaciones celulares más importantes del sistema nervioso central.

Las neuronas sólo representan una fracción de las células del cerebro humano (Nicola and Ben 2009). No obstante, lo que conocemos sobre el funcionamiento del sistema nervioso central está fundamentado en el dogma neuronal, que asume que las redes neuronales representan el único sustrato de cognición. Las neuronas tienen la habilidad de comunicarse entre sí de manera rápida y eficiente a través de señales eléctricas o químicas que se traducen en forma de potenciales de acción. Todas las células nerviosas que no producen potenciales de acción están agrupadas en lo que se conoce como glía (del griego *glía*, “unión o pegamento”). Fue el médico alemán Rudolf Virchow quien acuñó el término “neuroglia”, en 1858, para referirse al “pegamento del cerebro” que se ubicaba entre las neuronas y las mantenía unidas. Actualmente se presta mayor atención a este grupo de células nerviosas, que constituyen más de la mitad del cerebro humano (Allen y Barres, 2009). La fisiología neuronal se relaciona con la de la glía; por ello, el estudio integral del sistema nervioso central debe comprender el estudio de las interacciones neurona-glía.

La glía es el grupo de células del sistema nervioso más abundante en el cerebro. Sin embargo, durante mucho tiempo se le consideró sólo como un elemento de soporte neuronal, que no cumplía ninguna función importante. Hoy se sabe que la glía participa en la formación, operación y modulación de los circuitos sinápticos. En consecuencia, los estudios recientes

Introducción

presentan la glía como un elemento fundamental a investigar, para profundizar en el conocimiento sobre la fisiología del sistema nervioso central (Reyes-Haro, Bulavina, and Pivneva 2014).

1.2. DESCRIPCIÓN DE LAS CÉLULAS CEREBRALES

1.2.1. Astroglía

La astroglía comprende a los astrocitos, las células endodimales y la glía radial. Una característica que tienen en común es la presencia de proteína ácido gliofibrilar (GFAP), expresada en el citoesqueleto. Los astrocitos son las células gliales más abundantes presentes en el SNC y tienen funciones importantes en la organización del cerebro y mantenimiento (Sofroniew y Vinters 2010). Estas células interactúan con las neuronas y están involucradas en la secreción de neurotransmisores y la homeostasis de iones, la regulación del metabolismo de energía, la remodelación sináptica y la modulación del estrés oxidativo, procesamiento de la información, y la transmisión de la señal sináptica (Halassa y Haydon, 2010; Henneberger et al, 2010).

La palabra astrocito significa “célula en forma de estrella”. Nombre, acuñado por Michael von Lenhossek en 1891, basado en su morfología. Los astrocitos regulan la homeostasis del cerebro, al proveer energía y sustratos para la neurotransmisión, y participan activamente en la fisiología de la sinapsis tripartita (elementos pre y postsinápticos y los astrocitos adyacentes). Los astrocitos fueron subclasificados en protoplasmáticos y fibrosos por Rudolf Albert von Kölliker y William Lloyd Andriezen en 1889 y 1893, respectivamente: los astrocitos fibrosos se ubican principalmente en la sustancia blanca, y están asociados a los axones; los astrocitos protoplasmáticos, asociados a los somas neuronales y las sinapsis, presentes estos principalmente en la sustancia gris. Antiguamente se pensaba que el papel de los astrocitos se restringía a la remoción de los neurotransmisores del espacio sináptico, lo que permitía una señalización precisa. Sin embargo, estudios recientes indican que los astrocitos tienen actividad neurogénica e inclusive, participan en la formación de las sinapsis y modulan la actividad

sináptica gracias a una comunicación bidireccional con las neuronas (Perea, G. 2009). Estos descubrimientos invitan a investigar sobre el papel de la glía en el procesamiento de la información, atributo que se pensaba exclusivamente de las neuronas (ver Figura 1).

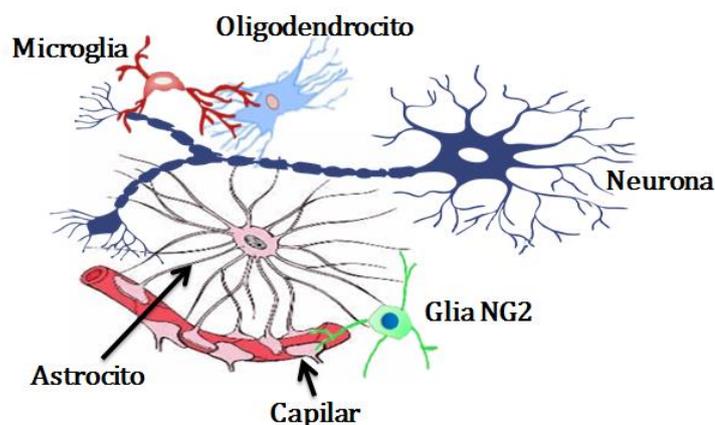


Figura 1. Muestra las células que incluyen principalmente a la microglia, oligodendrocitos, astrocitos y glia NG2. la microglia representa el sistema inmunitario del cerebro. Los oligodendrocitos producen la mielina que envuelven los axones para permitir una comunicación neuronal eficiente. Los astrocitos contactan a los vasos sanguíneos y las sinapsis, detectan la actividad neuronal y liberan gliotransmisores para modular la actividad cerebral. Adaptado de: Reyes-Haro 2014

1.2.2. Astrocito

Gliotransmisión y metabolismo

El cerebro consume el 20% de la glucosa total en sangre y oxígeno durante su actividad para restaurar gradientes iónicos después de la conducción del potencial de acción y la neurotransmisión.

La demanda metabólica es considerada alta y requiere que el flujo sanguíneo cerebral permanezca constante a pesar de las variaciones en la presión arterial (autorregulación) y las

Introducción

áreas de alta actividad neuronal tienen correspondientemente tasa metabólica alta en el suministro sanguíneo local. Los astrocitos son reguladores multi-funcionales de acoplamiento neurometabólico que controlan la absorción y liberación de neurotransmisores (Anderson C. M. 2000), influyen en la oferta local de la sangre (Zonta et al. 2003; Mulligan S. J. 2004; Al 2007) y suministran directamente a las neuronas sustratos para la fosforilación oxidativa (Pellerin et al 1998). La sinapsis tripartita es una estructura formada por elementos neuronales y gliales que constituye la base de la comunicación nerviosa y el procesamiento de la información (Perea, G. 2009). Los astrocitos participan activamente en la sinapsis tripartita, monitoreando y respondiendo a la actividad sináptica que se produce. Un solo astrocito es capaz de contactar con miles de sinapsis neuronales. En consecuencia, las sinapsis no sólo constan de las neuronas pre y postsináptica, sino de los procesos (prolongaciones celulares) astrocíticos que la envuelven.

Otro punto interesante es que los astrocitos poseen dominios funcionales que responden independientemente a distintos neurotransmisores, lo que les permite discriminar la actividad neuronal proveniente de distintas regiones del cerebro. Esta información es procesada por el astrocito, que puede modular la actividad neuronal liberando gliotransmisores como D-serina, glutamato, ácido gamma-aminobutírico (GABA), ATP o adenosina. Una función muy importante de los astrocitos está relacionada con la regulación del paso de sustancias del torrente sanguíneo al parénquima cerebral y viceversa; contribuyen así al establecimiento de la barrera hematoencefálica, a través de las terminaciones perivasculares de sus prolongaciones celulares.

1.2.3. Papel de los astrocitos en la Neuroinflamación

Las enfermedades neurodegenerativas asociadas al envejecimiento tal como la enfermedad del Alzheimer (EA) entre otras se manifiestan por el deterioro progresivo de las funciones cognitivas tales como: la memoria y el procesamiento mental (McKhann et al 1984)(Ver Figura 2).

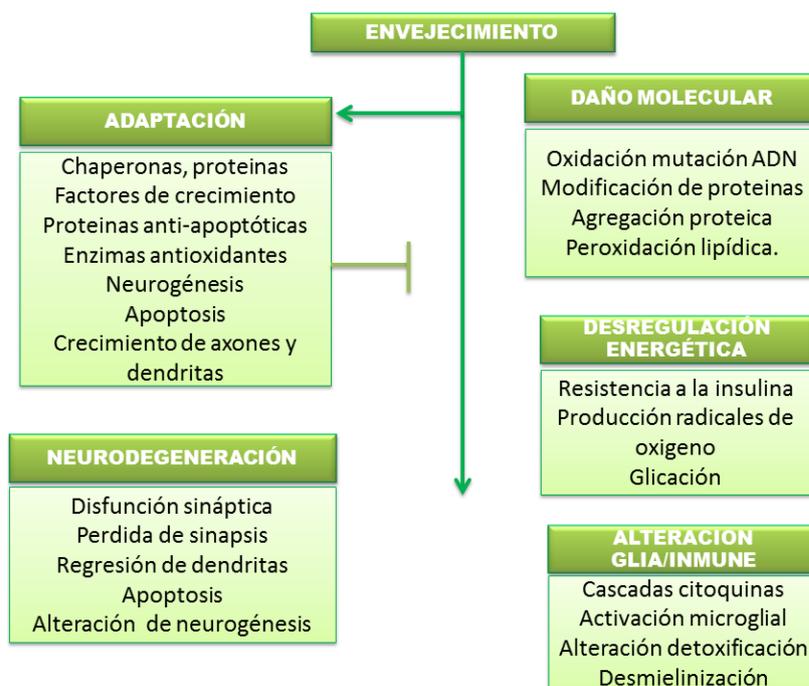


Figura 2. Cambios en el sistema nervioso central con la edad. Adaptado de Von Bernhardt, Rommy 2005

Son varios los estudios describiendo que la intensidad de astrogliosis reactiva aumenta paralelamente con la progresión de la EA (Olabarria et al 2010) y que los niveles de transportadores de glutamato en astrocitos tienden a disminuir, lo que puede aumentar la vulnerabilidad de las neuronas locales a la excitotoxicidad (Simpson et al. 2010). Los astrocitos reactivos también muestran una mayor expresión de la presenilina en la EA esporádica (Duong et al 1997), pero no se conocen con exactitud las consecuencias de dicha expresión.

Introducción

1.3. MECANISMO DE MUERTE NEURONAL IMPLICADO EN LA NEURODEGENERACIÓN

1.3.1. Muerte celular

La muerte celular es un fenómeno de gran interés para entender el desarrollo del SNC y también hoy en día se sabe que es la principal causa de muchas enfermedades neurodegenerativas. La muerte celular se puede clasificar de acuerdo a la apariencia morfológica (pudiendo ser: apoptótico, necrótico, autofágico o asociado con mitosis), de criterios enzimológicos (con y sin la participación de nucleasas o de distintas clases de proteasas, tales como caspasas, catepsinas, calpaínas y transglutaminasas), de aspectos funcionales (programado o características accidentales, fisiológicas o patológicas) o inmunológicos (inmunogénica o no inmunogénica), (Melino 2001). La muerte celular es un proceso que es esencial para el desarrollo y mantenimiento de la homeostasis de los tejidos, su función esencial es eliminar las células superfluas, dañadas, infectadas o transformadas. Esta forma se realiza la activación de un programa intrínseco que es característico por el mantenimiento de las membranas celulares intactas; permitiendo así su eliminación por fagocitosis.

1.3.1.1. Tipos de muerte celular

Los diferentes tipos de muerte celular se definen a menudo por criterios morfológicos, sin una referencia clara a los mecanismos bioquímicos precisos. *The Nomenclature Committee on Cell Death* (NCCD 2009), propone criterios unificados para la definición de la muerte celular y de sus diferentes morfologías.

1.3.1.2. Definición de apoptosis

La expresión "apoptosis" es acuñado por (Kerr et al 1972) para describir un aspecto morfológico específico de la muerte celular. La apoptosis se acompaña de redondeo de la célula, la retracción de pseudópodos, la reducción del volumen celular (picnosis), condensación de la cromatina, fragmentación nuclear (cariorrhexis), formación de ampollas en la membrana plasmática (pero el mantenimiento de su integridad hasta las etapas finales del proceso de

inmersión) y por los fagocitos residentes *in vivo*. Por lo tanto, el término 'apoptosis' debe aplicarse exclusivamente a los eventos de muerte celular. Las células que sufren apoptosis exhiben una morfología característica que incluye condensación citoplasmática y nuclear, la rotura específica de proteínas celulares, la fragmentación de la célula en cuerpos apoptóticos, y la rotura endolítica del ADN.

Los cuerpos apoptóticos son fagocitados por células vecinas. Las señales que desencadenan la apoptosis incluyen, daño celular causado por radiaciones ionizantes, procesos inflamatorios, infección vírica y/o bacteriana o señales extracelulares. En el programa de suicidio celular interviene la transcripción de genes específicos y su traducción, lo cual permite suprimir tal suicidio inhibiendo tanto la transcripción como la traducción. Estos hechos demuestran que la muerte celular programada o apoptosis está mediada por mecanismos celulares intrínsecos.

Vale la pena señalar que no es correcto suponer que la muerte celular programada "(MCP) y apoptosis" son sinónimos (Baehrecke 2002; Roach, HI. and Clarke 2000). Es importante recalcar que la apoptosis implica una programación de la célula que promueve una cascada dependiente de energía de cambios morfológicos y bioquímicos en el interior de la célula que conducen a su muerte y eliminación en un contexto determinado (Tabla 1.).

Introducción

Tabla 1. Diferencias entre muerte celular por necrosis y apoptosis o suicidio celular:

Muerte celular por necrosis	Apoptosis o suicidio celular
<ul style="list-style-type: none">- Las células y sus orgánulos se hinchan porque se altera la capacidad de la membrana plasmática para controlar el paso de los iones y de agua.- Las células se rompen y su contenido se vierte al espacio intercelular.- Se origina inflamación de los tejidos adyacentes.	<ul style="list-style-type: none">- Reducen su tamaño.- Las mitocondrias se abren y dejan salir el citocromo c.- Surgen en la superficie celular; especies de vejigas.- Se degrada la cromatina (ADN y proteínas) de sus núcleos.- Se rompen en fragmentos rodeados de membrana, denominados cuerpos apoptóticos.- La fosfatidilserina, fosfolípido que se encuentra en la cara interna de la membrana, se expone en la superficie.- La fosfatidilserina se une a receptores de las células fagocíticas (macrófagos y células dendríticas) que fagocitan los cuerpos apoptóticos.- Las células fagocíticas segregan citoquinas que inhiben la inflamación.

Adaptado de: (Cascales Angosto 2003)

1.3.2. Proteínas reguladoras de la apoptosis:

1.3.2.1. Caspasas

La mayor parte de los estímulos encaminados a la apoptosis convergen en la mitocondria, provocando una permeabilización de su membrana externa. Con la permeabilización se liberan una serie de proteínas que activan las caspasas (Hengartner M. 2000; Amarante et al 1999; Susin et al 1999). Estas inducen la mayoría de los acontecimientos proteolíticos de la apoptosis y son consideradas como responsables finales de la muerte celular.

Las caspasas (*Cysteine Aspartyl-Specific Proteases*) son una familia de cisteína-proteasas que se encuentran como moléculas precursoras inactivas (procaspasas), y cuando reciben la señal apoptogénica son proteolizadas, dando lugar a dos subunidades que constituyen la enzima

activa o caspasa (Green et al 1998). Actualmente se han identificado 14 caspasas en mamíferos. Todas ellas presentan una secuencia conservada de 5 aminoácidos (QACR(N/Q)G) en el sitio activo. Las procaspasas constan de un prodominio N-terminal y dos subunidades, una de 20 kDa (p20) y otra de 10 kDa (p10). La activación proteolítica ocurre secuencialmente en sitios específicos de corte detrás de un residuo de ácido aspártico (Asp). Inicialmente, las procaspasas sufren una proteólisis entre las dos subunidades, y posteriormente el prodominio es eliminado de la subunidad de 20 kDa. Estudios de cristalografía han revelado que tras la proteólisis de la procaspasa, ésta obtiene su forma funcional mediante la asociación de dos subunidades de 20 kDa y dos subunidades de 10 kDa, formando un tetrámero con dos sitios catalíticos activos (Wilson 1994; Rotonda et al. 1996). Hasta el momento, se conocen 14 miembros de esta familia de proteínas (Stegh et al. 2002).

La familia de las caspasas incluye a las caspasas procesadoras de citoquinas e involucradas en inflamación, y a las caspasas involucradas en apoptosis (Green et al 1998). La primera caspasa descrita en mamíferos se denominó ICE (Interleukin-1 β -Converting Enzyme) o caspasa 1. Ésta es precisamente uno de los miembros de la familia al que no se le ha relacionado con apoptosis sino con la inflamación, ya que es responsable de la proteólisis y activación de la citoquina proinflamatoria IL-1 β (Li et al. 2010; Cerretti et al. 1992). Las caspasa 1 y 11 funcionan principalmente en el procesamiento de citoquinas, mientras que las caspasas 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10 y 12 participan en la regulación y ejecución de la apoptosis (Green et al 1998; Amarante et al 1999). Las caspasas son divididas en dos grupos: caspasas iniciadoras con un predominio largo (2, 9, 10 y 16) y caspasas efectoras con un prodomino corto (3, 6 y 7) que actúan sobre las endonucleasas y son las responsables directas de la fragmentación del ADN (Li et al 2001; Zamzami et al 1996).

La cadena de degradación proteica tiene sucesivos clivajes dependientes de la ubicación del ácido aspártico que se repite en la estructura de la enzima. Actualmente hay dos vías alternativas para activar las caspasas. Una es iniciada por señales externas que activan un receptor de muerte en la superficie celular (vía extrínseca). La otra es disparada por cambios en la integridad mitocondrial (vía intrínseca) (Hengartner M. 2000; Thorburn A. 2004).

Introducción

1.3.3. Vías de apoptosis

1.3.3.1. Vía extrínseca

Las células de los mamíferos expresan receptores localizados en su membrana plasmática. La unión de ligandos a estos receptores desencadena la activación de las caspasas y reacciones en cadena que finalizan con la muerte celular. Algunos de estos receptores son el Fas, el receptor-1 del factor de necrosis tumoral (TNF-R1) y el DR3 (23). Los receptores de muerte de la familia del receptor de TNF (TNFR) incluyen TNFR1, Fas (CD95), DR3/WSL y los receptores del ligando inductor de apoptosis relacionado con el TNF (TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)/Apo-2L (TRAIL-R1/DR4, TRAIL-R2/DR5). Los miembros de esta familia están caracterizados por presentar de dos a cinco copias de un dominio extracelular rico en cisteína. Los receptores de muerte también poseen un dominio intracelular en el C-terminal del receptor denominado dominio de muerte (death domain, DD). Cuando un ligando se une a estos receptores se puede producir la muerte por apoptosis de la célula que los posee. El miembro de los receptores de muerte más estudiado y relevante es el CD95 o Fas. La oligomerización, más probablemente la trimerización, del CD95 tras la unión de su ligando, FasL, es requerida para la transducción de la señal apoptótica. La fijación del Fas ligando a su receptor (Fas) provoca el reclutamiento citoplasmático del adaptador FADD (del inglés Fas-associated death domain protein), al cual fija la procaspasa 8. (Ver Figura 3) Este complejo se realiza por interacciones homofílicas entre secuencias polipeptídicas designadas como dominios efectores de muerte (DED, del inglés *death effector domain*), que están presentes en ambas proteínas. La asociación Fas/FADD y procaspasa 8 forma un complejo denominado Complejo de señalización de muerte (DISC, por sus iniciales en inglés *Death Inducing Signalling Complex*). La procaspasa 8 es activada en el DISC por una proteólisis y actúa sobre las procaspasas 3, 6 y 7 que coordinan la muerte celular. Algo muy similar sucede con el receptor TNF-R1 (22, 23). La inhibición de esta ruta es realizada por proteínas que contienen dos DED y que se unen al complejo CD95-FADD. Esto inhibe el reclutamiento y la activación de la caspasa-8, antiguamente conocida como FLICE, de ahí el nombre de proteínas inhibidoras de FLICE (FLICE-inhibitory proteins, FLIP)(Thome et al. 1997; Bertin et al. 1997; Yeh et al 2000).



Figura 3. Vía extrínseca de la apoptosis celular. Adaptado de Gross y Yin 1999

1.3.3.2. Vía intrínseca

Durante décadas se consideró a la mitocondria como un organelo encargado exclusivamente de oxidar sustratos, produciendo agua en un proceso acoplado a la fosforilación en la producción de ATP. En la actualidad se sabe que en la mitocondria existe un proceso latente de transporte cuya activación se presenta bajo ciertas condiciones y se traduce en la permeabilización de la membrana mitocondrial a iones que incluyen el calcio (Verhagen et al 2000). El poro se abre cuando hay un exceso de calcio y fosfato, lo que despolariza la mitocondria y desacopla la

Introducción

cadena respiratoria. El poro de permeabilidad transicional mitocondrial (PTPm), favorece la cascada de caspasas y favorece la muerte celular al liberar factores inductores de apoptosis como el citocromo c, factores de fragmentación del núcleo y proteínas como SMAC/DIABLO que neutralizan los inhibidores endógenos de la apoptosis (AIF, por sus iniciales en inglés *Apoptosis Inducing Factor*). Recientemente se ha identificado un inhibidor de las IAPs de mamíferos, denominado Smac (second mitochondria-derived activator of caspases) (G. Wu et al.) o DIABLO (direct IAP-binding protein with low pI) (Verhagen AM, 2000). Smac/DIABLO se une a los miembros de la familia de las IAPs y neutraliza su actividad antiapoptótica. La liberación al citosol celular de Smac/DIABLO induce apoptosis, presumiblemente siguiendo las mismas rutas de salida que el citocromo C. Por tanto, si una célula está comprometida a sufrir apoptosis y libera el contenido mitocondrial al citosol, entonces Smac/DIABLO secuestra las proteínas IAPs y desencadena toda una cascada de ruptura y señalización intracelular inhibiendo el retorno al ciclo celular normal. La proteína de translocación mitocondrial (TSPO) de 18 KDa, interactúa con VDAC para desempeñar un papel en la apoptosis. En este contexto, TSPO parece participar en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelular. Esta generación de ROS induce la activación de la vía mitocondrial de la apoptosis. ROS son conocidos por ser capaces de liberación de citocromo C (Orrenius et al 2007; Veenman et al 2008). Por tanto, la mitocondria secuestra un potente cóctel de proteínas proapoptóticas. (Li P et al 1997).

Evidencias recientes indican que la caspasa 2 puede estar directamente involucrada en la liberación de citocromo C desde la mitocondria hacia el citoplasma en las células apoptóticas (Orrenius et al 2007). Esta caspasa es la más conservada y fue la primera clonada en humanos. Se activa tempranamente en respuesta a stress genotóxico, pudiendo funcionar como modulador de la señalización apoptótico mitocondrial. Recientemente se han demostrado que la activación de la caspasa 2 ocurre dentro de un complejo multiproteico, con proteínas inducidas por el gen supresor tumoral p53, PIDD (del inglés p53-induced protein with death domain), las proteínas adaptadoras de muerte RAIDD y otras proteínas (Tinel A 2004). La más prominente entre ellas es el citocromo C. Varios trabajos han revelado que, el citocromo C, además de su implicación en la fosforilación oxidativa mitocondrial, es uno de los componentes requeridos

para la activación de la caspasa-9 en el citosol (Li P et al 1997). Este paso es considerado clave y de no retorno en el inicio del proceso apoptótico: inicialmente se da la permeabilización de la membrana externa y por consiguiente la liberación de citocromo C, una vez en el citoplasma, el citocromo C, junto a la molécula adaptadora Apaf-1 participa en la formación del complejo del apoptosoma, lo que resulta en el reclutamiento y procesamiento de la procaspasa 9 hacia su forma activa (caspasa 9), en presencia de ATP. Subsecuentemente la caspasa 9 rompe y activa las procaspasas 3 y 7 (caspasas efectoras) que son las responsables del clivaje de varias proteínas que llevan a las características bioquímicas y morfológicas de la apoptosis (Gogvadze V 2006; Amarante et al 1999).

1.3.4. Hipótesis propuestas

Hipótesis de la cascada amiloide

Sugiere que el proceso neurodegenerativo observado en los cerebros con EA vendría dado principalmente como consecuencia de los eventos citotóxicos desencadenados por la formación, agregación y depósito de los péptidos amiloides (β -A) (Hardly et al 1992; Castello et al 2013). Esta hipótesis ha sido muy apoyada por parte de los investigadores debido a los hallazgos genéticos en estudios de biología molecular, abriendo nuevas líneas de investigación en la búsqueda de fármacos para el tratamiento de la EA, tales como, inhibidores de la β y γ -secretasa o potenciadores de la α -secretasa (Huang et al 2002).

Según esta hipótesis, el inicio de la EA seguiría el siguiente proceso: la proteína precursora del amiloide (APP) provocaría un exceso en la producción de péptido β -A y/o un defecto de su eliminación (Huang et al 2002; Hardly et al 1992). La proteína β -A se obtiene a partir del catabolismo de la APP, una proteína de la membrana plasmática con un solo dominio (una parte intracelular y otra extracelular) que se encuentra en diferentes tipos de células, entre ellas neuronas, astrocitos, oligodendrocitos y células gliales (Haass et al 2012; Mucke et al 2012). Está codificada por un gen localizado en el cromosoma 21, que al expresarse da lugar a 8 isoformas, de las cuales APP695 es la más abundante en el cerebro. Esta proteína es escindida

Introducción

por las enzimas α , β y γ -secretasas, y un complejo de proteínas que contienen el gen de la presenilina (PSEN1) (Haass et al 2012). En una situación fisiológica, siguiendo la vía no amiloidogénica, la APP es catabolizada por la α -secretasa, produciendo un fragmento (s)APP α que permanece en el espacio extracelular, y un fragmento carboxi-terminal de 83 aminoácidos (C83), que queda anclado en la membrana plasmática. (s)APP α regula la excitabilidad neuronal, mejora la plasticidad sináptica, el aprendizaje y la memoria, y aumenta la resistencia de las neuronas al estrés oxidativo y metabólico (Hardly et al 1992; Mucke et al 2012). Sin embargo, en una situación neuropatológica, la APP se metaboliza por la vía amiloidogénica, en la que BACE (β -secretasa 1) fragmenta APP por el extremo N-terminal y la γ -secretasa lo hace por el extremo C-terminal, obteniendo los fragmentos (s)APP β y β -A 40/42, que quedan en el espacio extracelular, y un fragmento C-terminal de 99 aminoácidos (C99), que puede ser transportado hacia el interior de la célula y translocado al núcleo, donde podría inducir la expresión de genes que promueven la muerte neuronal por apoptosis (Hardly et al 1992; Haass et al 2012).

La APP regula la supervivencia neuronal, la protección frente a estímulos externos tóxicos, el crecimiento de neuritas, la plasticidad sináptica y la adhesión celular, pero cuando se transforma en los péptidos β -A 40/42 interfiere en las sinapsis, disminuye la plasticidad neuronal, altera el metabolismo energético y el de la glucosa, induce estrés oxidativo y disfunción mitocondrial, y perturba la homeostasis del calcio celular (Haass et al 2012).

La escisión diferencial por la γ -secretasa

La actividad γ -secretasa produce diferentes péptidos β -A. β -A 40 es la especie predominante, mientras que β -A 42 es el principal componente de las placas seniles. El péptido β -A 42 es a la vez más propenso a la agregación y neurotóxico que β -A 40 y se ha propuesto la hipótesis que representa a la especie patógena β -A. De esta manera, β -A 42 se oligomeriza y acumula en forma de placas seniles en el sistema límbico y la corteza asociativa, ejerciendo así efectos tóxicos en las sinapsis neuronales. En una segunda etapa, habría una respuesta glial, activación de los astrocitos y la microglía circundante, que liberaría citocinas o componentes del sistema del complemento dando lugar a respuestas inflamatorias. Asimismo, se instaura un estrés

oxidativo en la neurona y se produce una alteración en la homeostasis del ion calcio, lo que provoca la hiperactivación de las proteínas cinasas y la inactivación de las fosfatasa. Por esta razón, la proteína tau se encuentra hiperfosforilada y forma los ovillos neurofibrilares, los cuales se acumulan en las sinapsis y en los cuerpos neuronales ocasionando la muerte neuronal por apoptosis y un déficit de neurotransmisores. Toda esta cascada de procesos concluye en la demencia.

Así, tanto las proteínas β -A (principalmente la β -42) y tau han sido los principales objetivos para terapias modificadoras de la EA (Huang et al 2002). Desde este punto de vista, la EA podría ser prevenida o tratada eficazmente por la disminución de la producción de β -A 42 y la fosforilación de la proteína tau, además de la prevención de la agregación o mal plegamiento de estas proteínas, neutralizar o eliminar las formas agregadas o mal plegadas tóxicas de estas proteínas, o una combinación de estas modalidades (Huang et al 2002; Castello et al 2013)

Actualmente se están proponiendo hipótesis alternativas, como la de la alteración de la actividad mitocondrial, la hipótesis de la neuroinflamación y la hipótesis sobre el papel del metabolismo, concretamente el colesterol y la insulina (Castello-Soriano et al 2014; De Felice et al 2014). Finalmente, se ha propuesto la hipótesis dendrítica de la EA (Cochran et al 2014). Todo ello confirma la complejidad de esta enfermedad, a lo que se suma que el mecanismo de muerte neuronal por apoptosis aún no se conoce del todo.

1.4. INFLAMACIÓN Y ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

La inflamación cerebral es una característica patológica de la EA. Sin embargo, las características inflamatorias tales como: hinchazón, calor y dolor no están presentes en el cerebro, y por lo tanto nos referimos a la inflamación aguda (Akiyama et al.). Un rasgo característico de los tejidos inflamados es la presencia de un mayor número de monocitos, así como los macrófagos tisulares derivados de monocitos, es decir, células de microglía en el SCN (Akiyama et al.; Mitchell R 2003). La inflamación se produce claramente en regiones patológicamente vulnerables en el cerebro con EA, con una mayor expresión de proteínas de fase aguda y

Introducción

citoquinas proinflamatorias que son apenas evidente en el cerebro normal (Griffin and Mrak 2002).

La microglía, astrocitos y neuronas son responsables de la reacción inflamatoria. Las células activadas producen mediadores inflamatorios tales como citoquinas proinflamatorias, quimiocinas, proteínas inflamatorias de macrófagos, proteínas quimio-atrayente de monocitos, prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos, factores de coagulación, las especies reactivas de oxígeno (radicales y otros), óxido nítrico, factores de complemento, proteasas, la proteasa inhibidores, pentraxinas, y la proteína C reactiva (Tuppo y Arias 2005; Rubio-Perez et al 2012). Los ovillos neurofibrilares y la β -A desencadenan una reacción inflamatoria crónica para que la microglía activa pueda aclarar estos desechos. β -A es un péptido de 42 aminoácidos producido por la escisión proteolítica selectiva transmembrana de proteínas precursoras amiloide (APP) por β - y α -secretasa. Estas placas contienen neuritas distróficas, microglía activada y astrocitos reactivos (Lucin y Wyss-Coray 2009; Guerreiro et al. 2013).

Las fibrillas amiloides y los mediadores inflamatorios secretados por las células de la microglia y astrocitos contribuyen a la distrofia neuronal (Liu y Bian 2010; Fleisher-Berkovich et al. 2010). Los mediadores inflamatorios y una serie de condiciones de estrés, a su vez, aumentan la producción de APP y el procesamiento amiloidogénico de APP para inducir β -A 42. Estas circunstancias también inhiben la formación de la fracción de APP soluble que tiene un efecto protector neuronal (Sastre et al 2008; Ojala et al. 2009). Crónicamente la glia activada puede, además, matar neuronas adyacentes mediante la liberación de productos altamente tóxicos tales como productos intermedios de oxígeno reactivo, el óxido nítrico (ON), enzimas proteolíticas, factores complementarios, o aminoácidos excitatorios (Ralay Ranaivo et al. 2006). Igualmente, la astrogliosis reactiva es una característica bien conocida de la EA, pero su acción como tal no se conoce bien. La astrogliosis reactiva tiende a ser relativo a través de los años; de tal manera que los astrocitos reactivos están íntimamente asociados con las PS o depósitos difusos de amiloide y rodeados con capas densas como si formaran cicatrices en miniatura alrededor de ellos. Los astrocitos reactivos pueden contener cantidades sustanciales de las diferentes formas

de β -A, incluyendo la isoforma 1-42 (β -A 42), así como las formas truncadas (Nagele et al. 2004; Braak et al 2000).

Por otra parte, β -A induce la expresión de citoquinas proinflamatorias en las células gliales en un círculo vicioso (Abbas et al. 2002; Boche, Perry; Nicoll 2013) y la activación de la cascada del complemento (Benzing et al. 1999; von Bernhardi et al 2010) y la inducción de sistemas de enzimas inflamatorias tales como: el óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y la enzima ciclooxigenasa (COX2). Existen líneas de evidencia que sugieren que todos estos factores pueden contribuir a la disfunción neuronal y muerte celular (Wang et al. 2010; Klein et al. 2010) dando a su vez, las características histopatológicas de la EA que incluyen una gran cantidad extracelular de placas seniles compuestas por placas β -A y ovillos neurofibrilares intracelulares, que son inclusiones de proteína tau hiperfosforilada en regiones selectivas del cerebro (Koistinaho et al 2004).

Por otra parte, los astrocitos procedentes de pacientes con demencia muestran significativamente una disminución de la complejidad en comparación con los astrocitos del cerebro sano. En el modelo animal 3xTg-AD, que se asemeja mucho a la patología Alzheimer en humanos, los astrocitos rodean la neurona con placas amiloides (Rodríguez et al 2009; Olabarria et al 2010). Los astrocitos también desempeñan un papel protector importante en la EA. Mientras Las células microgliales son la fuerza impulsora en la formación de las placas seniles (PS), los astrocitos son cruciales en la degradación de la placa como lo demuestra la reconstrucción tridimensional ultraestructural de placas clásicas de humano en diferentes etapas de desarrollo neuronal. Esto se observó en los péptidos β -A porque son preferentemente interiorizados por astrocitos y se degradan por procesos hipertróficos, lo que impide la formación de los depósitos de β -A extracelular. El mecanismo exacto por el cual astrocitos reconocen y degradan β -A no se conoce a ciencia cierta, pero la ApoE, que se expresa casi exclusivamente en astrocitos, se ha propuesto ser la responsable de esta acción celular. Esta última es esencial para que los astrocitos se atraigan químicamente, internalicen y degraden depósitos β -A en las secciones del cerebro. Al igual los astrocitos también ejercen efectos protectores en EA mediante la inhibición de microglia activada.

Introducción

En otro estudio (Csuka et al. 1999) la Inducción de TGF- β 1 por β -A en los astrocitos, puede suprimir iNOS y la actividad en la microglía activada. Sin embargo, la incapacidad de los astrocitos para degradar correctamente β -A es resultado de la acumulación neuronal de β -A. Además, los astrocitos se activan por β -A acumulada y producen mediadores inflamatorios, tales como IL-1 β y TNF- α , que pueden inducir daño neuronal. Por otra parte, la β -A inducida TNF- α aumenta la liberación del glutamato dependiente de calcio, lo que puede llevar a la muerte neuronal en EA. El estrés oxidativo también se ha ligado a la toxicidad por β -A por la estimulación en la producción de ROS y la disminución en los niveles de GSH en astrocitos. Además, β -A altera el metabolismo de la glucosa en los astrocitos, que conduce a la alteración de la viabilidad neuronal (Allaman et al 2010). Dicho esto, el deterioro en la transmisión glutamatérgica asociado con la excitotoxicidad causada por β -A, se encuentra implicado en la progresión de la EA. El transportador de glutamato, GLT1, que es preferentemente localizado en los astrocitos, es el principal mediador de glutamato (Wegrzynowicz et al 2011). En resumen, los astrocitos reactivos pueden degradar depósitos extracelulares de β -A 42 (Wyss-Coray et al. 2003) y que esta función se atenúa en astrocitos de ratón ApoE -/- (Koistinaho et al 2004), lo que sugiere que los astrocitos reactivos podrían desempeñar un papel importante en la progresión y la gravedad de EA.

1.4.1. Citoquinas pro-inflamatorias en el cerebro.

La evidencia experimental y clínica ha demostrado el aumento de la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias tales como TNF α , IFN γ , IL-1 β , IL-6, IL-18, y la activación de sus receptores afines en el cerebro EA (Sastre et al 2006b; Benzing et al. 1999).

La unión a la superficie de la célula microglial con A β induce la expresión de genes pro-inflamatorios y da como resultado la elevación de citoquinas pro-inflamatorias tales como TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-18, que conducen a la hiperfosforilación de tau y la pérdida neuronal (von Bernhardi et al 2010). Además, los estudios muestran que los niveles transcripcionales para los genes de marcadores pro-inflamatorios tales como TNF e IL-1 β estuvieron elevados en la EA, específicamente en respuesta a tau (Wang et al. 2010). Como se indicó anteriormente, la

inflamación crónica podría ser la consecuencia de la patología EA que exagera aún más los efectos perjudiciales ejercidos por β -A y tau. Sin embargo, esta interpretación se ha cuestionado y nuevos datos asumen que la neuroinflamación también puede ser una causa de la EA por el aumento de la β -A y la fosforilación de tau en el cerebro (Wang et al. 2010). En apoyo de esto, un estudio previo ha puesto de manifiesto que los ratones transgénicos inyectados con LPS, inducen la neuroinflamación provocando así una deposición intracelular de β -A (Lee et al. 2008; Sheng et al 2003) y la fosforilación de tau en el cerebro. Sin embargo, estudios previos indicaron que los efectos sinérgicos también pueden ocurrir entre las citoquinas pro-inflamatorias y β -A, tales como, el IFN γ en sinergia con β -A causando mayor liberación de especies como: TNF α y nitrógeno reactivo que es tóxico para las neuronas y para la glía. Por tanto, la expresión temprana de citoquinas pro-inflamatorias en el cerebro por las células neuronales, los astrocitos y células endoteliales, probablemente juega un papel importante en el desarrollo de la enfermedad. De esa misma manera, los microvasos cerebrales en la EA liberan niveles significativamente más altos de citoquinas pro-inflamatorias, incluyendo el TNF α , IL-1 β , IL-6 que en microvasos de los controles de la misma edad (Grammas 2001). La microvasculatura cerebral; participa en un ciclo destructivo de eventos en los que la inflamación precede a la deposición de β -A y a su vez β -A promueve la liberación de mediadores inflamatorios.

En este aspecto, la exposición de las células endoteliales del cerebro a β -A inicia una serie de respuestas pro-inflamatorias. Esto es apoyado por investigaciones que expusieron células endoteliales de cerebro humano cultivadas con β -A 1-40, observando la regulación la expresión de genes pro-inflamatorios como IL-1 β y IL-6, lo cual fue confirmado por análisis de RT-PCR cuantitativa (Vukic et al. 2009). Estos resultados también sugieren que la microcirculación cerebral contribuye con citoquinas proinflamatorias en el cerebro con EA y puede estar implicada en la patogénesis de la lesión neuronal y la muerte en este trastorno. Además, varios estudios (Holmes et al. 2009; Hugh et al 2007) sugieren que la inflamación sostenida causada por las citoquinas pro-inflamatorias puede contribuir al deterioro cognitivo en pacientes con

Introducción

EA. De hecho, (Capuron y Miller 2011) han propuesto diversas opiniones recientes sobre las vías para el transporte de las citoquinas pro-inflamatorias al cerebro en la circulación sistémica.

Igualmente, también podría ser que β -A través de la BHE de la periferia en el cerebro, esté mediada por RAGE (Takuma et al. 2009). Y la unión de β -A con el RAGE en microglia permite a la microglia someterse a la activación sostenida y la respuesta inflamatoria, lo que resulta en un aumento de citoquinas proinflamatorias. Basándose en estos hallazgos, se puede prever que en el cerebro, las citoquinas pro-inflamatorias pueden ser consideradas como un biomarcador de EA. Esto es apoyado por los datos en modelos de ratones triple transgénicos de EA. Donde el aumento de los niveles circulantes de citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 β con un anticuerpo neutralizante redujo drásticamente la actividad de varias quinasas y los niveles de tau fosforilada (p-tau), así como, también redujo la carga de oligómeros y β -A fibrilar (fA β). Por lo tanto, parece que cualquier respuesta inflamatoria significativa dentro del tejido cerebral se asocia con disfunción de citoquinas pro-inflamatorias, elevando el uso potencial de citoquinas pro-inflamatoria medida como un marcador sustituto para una respuesta inflamatoria local en la EA.

1.4.1.1. TNF α

El factor de necrosis tumoral es un polipéptido de 157 aminoácidos, producido por el sistema inmunitario que interviene principalmente en la lucha contra las células y de defensa del huésped, remodelación, inflamación, curación de heridas y puede también inducir choque séptico y caquexia. La producción exagerada lleva a enfermedades inflamatorias crónicas. Son producidos por los monocitos activados o por los linfocitos T respectivamente, células esenciales en el sistema de defensa inmunitario. Los dos factores de necrosis tumoral destruyen los tumores provocando su necrosis. También intervienen en la fase inflamatoria en caso de infección por lo que se utilizan anti-TNF para aliviar las inflamaciones. Pertenece a una familia de ligandos que activan a una familia correspondiente de receptores que inician señales para la proliferación celular y apoptosis, y que están en casi todas las células.

1.4.1.2. Receptores de TNF α

Hay dos receptores transmembrana afines para TNF- α , denominado receptor de TNF 1 (TNFR1) (también conocido como TNFRSF1A / p55, CD120a) y TNFR2 (TNFRSF1B/p75, CD120b). Sus efectos biológicos se expresa y se regulan diferencialmente. La señalización a través de los receptores de TNF provocan respuestas celulares distintas, incluyendo la proliferación celular, la migración celular y la apoptosis mediada a través de la activación de varias cascadas de transducción de señal desencadenantes, que implican NF κ B, quinasa c-Jun N-terminal (JNK), p38, y las vías: ceramida-esfingomielinasa (Montgomery et al. 2013). En el contexto de la EA, la supresión del gen TNFR1 en ratones transgénicos APP; reduce la deposición de PS y mejora los déficits cognitivos de la actividad del promotor bajo la regulación de BACE1. Por otra parte, se ha descrito que los altos niveles de TNF α intratecales se correlacionaron significativamente a la apoptosis intracerebral y la degradación neuronal (Llano et al 2012). Así mismo, la incubación de células neuronales humanas con TNF α condujo a la producción de Bcl-2. Estos datos indican la complejidad de la vía de señalización de TNF, y que es necesaria más investigación y para entender mejor los papeles específicos del TNF α en el contexto de la EA.

1.4.1.3. IL-1 β

IL-1 es miembro de la familia de las citoquinas y se considera una de las principales citoquinas proinflamatorias en el cerebro. Desempeña un papel clave en el progreso de la EA. IL-1 β se sintetiza y se libera por astrocitos y microglia activados en proformas pro-IL-1 β , en el citoplasma en respuesta a diversos estímulos. Con el fin de generar una forma madura y bioactiva, pro-IL-1 β debe ser escindido por la proteasa de caspasa-1, que se activa por complejos multiproteicos citosólicos denominadas inflamomas.

Estudios previos han identificado que la sobre-expresión de la citoquina IL- 1 β liberada por astrocitos y microglia circundantes, producen placas β -A en el cerebro con EA y en modelos animales con EA en relación con los controles de la misma edad (Boutajangout-Wisniewski 2013; Hunter et al. 2012) de modo que la producción de IL-1 β también depende de la activación

Introducción

de MAPK y rutas de señalización de NF κ B. Recientemente, los estudios demostraron claramente que IL-1 β contribuyó al procesamiento de APP *in vitro*.

Posteriormente, muchos investigadores confirmaron que la sobreexpresión de IL-1 β estimulaba la fosforilación de tau y la formación de ovillos fibrilares a través de la activación de p38-MAPK y la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3), que afectan a la plasticidad sináptica, inhibiendo LTP y posteriormente la memoria y aprendizaje. Por lo tanto, el bloqueo o neutralización de IL-1 β en un modelo de ratón EA podría proteger gran parte de los déficits cognitivos (Kitazawa et al. 2011).

Así mismo, IL-1 β es conocido por ser capaz de inducir la expresión del ARNm de APP- β en las células endoteliales, lo que sugiere que la IL-1 β aumenta en pacientes con EA y podría estar vinculada a la formación de β -A. Posteriormente, se descubrió que la IL-1 β era un factor que contribuye el inicio de la formación de neuritas distróficas con depósitos difusos β -A. Del mismo modo, en la exposición de cultivos primarios de neuronas corticales de rata a S100 β , esta promueve la formación de neuritas distróficas y la expresión del ARNm en APP- β (Xia et al. 1998). En ese caso, IL-1 β podría promover la formación de β -A y la degeneración neuronal a través de S100 β presente en astrocitos reactivos. Además, el aumento de la IL-1 β en pacientes con EA podría promover un aumento en la actividad de p38-MAPK, lo que podría conducir a la hiperfosforilación de Tau (Sheng et al. 2000).

Se ha demostrado también, que IL-1 β bloquea la señalización GSK-3 β disminuyendo la fosforilación de tau y promoviendo la neurogénesis a través de la vía Wnt/ β -catenina. Sin embargo, recientemente se ha sugerido que la IL-1 β podría promover la eliminación de A β y así la conexión sináptica. Además, fA β ha sido reportado para activar microglía, dando lugar a aumento de la síntesis y liberación de productos de secreción neurotóxicos, citoquinas pro-inflamatorias tales como IL-1 β y ROS (Rubio-Perez and Morillas-Ruiz 2012). Sobre la base de estos resultados, es interesante que los depósitos de β -A puedan ser tanto una causa como una consecuencia de la expresión de IL-1 β en pacientes con EA. Por lo tanto, IL-1 β puede jugar un papel complejo en la patogénesis de la EA.

1.4.1.4. IFN γ

Los interferones tienen una variedad de efectos bien descritos como los de antiviral, antitumoral y la actividad inmunomoduladora. Hay varios tipos de interferones (IFN α , - β , - ω , - ϵ , - κ) y son producidos por la mayoría de las células, mientras que NK, NKT y las células T son las fuentes primarias de interferones de tipo II (IFN γ). Siendo así, los Tipo I y tipo II forman componentes del receptor de interferón (IFNAR1/2 y IFNG1/2, respectivamente) se expresan en la mayoría de las células nucleadas, lo que sugiere que ambos tienen el potencial de actividad generalizada (Hall y Rosen 2010). En este trabajo se hizo mayor énfasis en el IFN γ por la importancia que lleva entre la interacción y cambios en los astrocitos en cultivos de glia mixtos. De ahí que, IFN γ es una citoquina importante, pues se sabe que influyen en la expresión de β -A, actúan también a través del MHC de transactivador Clase II, el regulador maestro de la expresión de genes MHC II (O'Keefe et al 1999).

El Factor Estimulante de Colonias M-CSF basal es inducido por IFN γ (Sunhee et al 1993). Sin embargo, la relevancia de estos hallazgos en el cerebro humano adulto está todavía por determinar. IFN γ no sólo afecta a la respuesta inmune mediante la inducción de la expresión de proteínas de la superficie celular, también produce cambios en el sistema glial, produciendo citoquina y quimiocinas. En suma, la proteína-10 (IP-10; CXCL10) es producida por una variedad de células en el cerebro en respuesta a IFN γ . Las funciones de las quimiocinas están presentes en el tráfico selectivo de leucocitos, la migración de la glía y la proliferación de diversos tipos de células (de Haas et al. 2007). La función de IP-10 estimulada por IFN γ es de unirse al receptor de la proteína G acoplado a CXCR3 dando lugar a la inflamación celular.

1.4.1.5. Receptor y señalización de IFN γ

El receptor de interferón-gamma es un heterodímero de dos cadenas: IFNGR1 y IFNGR2 (Bach et al 1997; Pestka et al 1997). En las células no estimuladas, estas subunidades no están pre asociados uno con el otro, sino más bien se asocian a través de sus dominios intracelulares específicos con formas inactivas de la familia Janus quinasas (JAK1 y JAK2). JAK1 y JAK2 asociada constitutivamente con IFNGR1 y IFNGR2, respectivamente. La unión de IFN- γ a IFNGR1

Introducción

induce la rápida dimerización de las cadenas de IFNGR1, formando de este modo un sitio que es reconocido por el dominio extracelular de IFNGR2. El conjunto del complejo receptor completo inducida por el ligando, contiene dos subunidades IFNGR1 y dos IFNGR2, que ponen en estrecha yuxtaposición los dominios intracelulares de estas proteínas junto con las quinasas JAK1 y JAK2 inactivos que se asocian.

En este complejo, JAK1 y JAK2 se activan uno al otro y luego fosforilan IFNGR1, formando de este modo un conjunto de sitios emparejados de STATs acoplados sobre el receptor ligado. Dos moléculas STATs luego asocian con los sitios de acoplamiento emparejados, se ponen en estrecha proximidad con receptores activados asociado JAK quinasas, y se activan por fosforilación de las STATs. Las moléculas de STATs fosforilados en tirosina se disocian de su atadura del receptor y forman complejos homodiméricos. Las STATs activadas se translocan al núcleo y después se unen a una secuencia específica en el promotor de la región de genes de IFN γ , induciendo efectos de transcripción sobre el gen. Del mismo modo, IFN de tipo I actúa a través del receptor heterodimérico tipo I de IFN (IFNAR) que se expresa en células gliales. La dimerización de IFNAR1 y IFNAR2 conduce a la fosforilación de TYK2 y JAK1 con la posterior activación de los miembros de STAT y la transcripción de genes de IFN. Igualmente, la inhibición de JAK2 juega un papel importante en el tratamiento de pacientes con el trastorno auto-inflamatorios, que se ha sido investigado *in vitro*, con una reducción en la transcripción de IFN γ en los linfocitos (Hall y Rosen 2010).

En cuanto a, la regulación negativa de IFN implica dos procesos principales:

- 1.- La inducción de los reguladores negativos SOCS1, SOCS3 y USP18. Estos mediadores son inducidos por IFN de tipo I como parte de un bucle de retroalimentación negativa. SOCS 1/3 compiten con STAT, mientras que USP18 desplaza JAK1, actuando sobre el receptor de IFN.
- 2.- Los microRNAs son inducidos y proporcionan regulación de la transcripción de genes (Ivashkiv y Donlin 2014).

La regulación cruzada entre los IFN tipo I y las citoquinas pro-inflamatorias impulsan la patogénesis de las enfermedades inflamatorias. De esta manera (Banchereau et al 2004),

propusieron que un desequilibrio entre estas dos citoquinas, conduce a la acción excesiva e incontrolada de TNF o IFN de tipo I, que resulta en fenotipos distintos de enfermedad autoinmune.

1.5. MOLÉCULAS NEUROPROTECTORAS

1.5.1. Melatonina

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) es una neurohormona producida principalmente por la glándula pineal. Regula el ciclo sueño-vigilia, y se utiliza para controlar los trastornos del sueño y del ritmo circadiano, aunque también se ha demostrado tener acciones moduladoras sobre el sistema inmune y la respuesta antioxidante (Tan et al. 2007). Como ya se ha mencionado, la glándula pineal es la principal fuente de secreción de esta hormona pero también es secretada por sitios como la retina, el intestino, la médula ósea y la glándula harderiana, entre otros. La secreción de melatonina por la glándula pineal sigue un ritmo diario (ritmo circadiano) con concentraciones muy bajas durante el día (10-12 pg/ml) mientras que por la noche se estimula la síntesis por lo que los niveles en plasma se elevan (80-150 pg/ml) alcanzando los valores máximos entre medianoche y las 3 de la madrugada. El proceso de secreción de la melatonina está controlado por el ciclo de luz y oscuridad.

La melatonina actúa como resultado de la unión a receptores de alta afinidad (MT1 y MT2) expresados en células inmunocompetentes, promoviendo los efectos anti-inflamatorios (Nair et al. 2011). La melatonina y sus metabolitos están implicados en la modulación del estrés oxidativo (Ritzenthaler et al. 2013) en el accidente cerebrovascular agudo humano. Actúa mediante la prevención del aumento de la actividad iNOS y eNOS, y también por la disminución de la liberación de glutamato previniendo la excitotoxicidad (KOH 2008). Estos dos últimos efectos están mediados por la activación de receptores de melatonina MT2 (Chern et al. 2012). Además, debido a su perfil neuroprotector, la melatonina es potencialmente útil para enfermedades neurodegenerativas (Pandi-Perumal et al. 2013), aunque los ensayos clínicos aun no son concluyentes.

Introducción

1.5.1.1. Receptores de melatonina

En los mamíferos, las funciones fisiológicas de melatonina están mediadas a través de dos subtipos de receptores alta afinidad de membrana, es decir, MT1 (o Mel1A o MTNR1A) y MT2 (o Mel1B o MTNR1B), cuya activación puede conducir a la diferencia de las respuestas celulares. Ambos subtipos son miembros de los receptores de siete dominios transmembrana acoplados a proteína G (GPCR) (Ekmekcioglu 2006; Jockers et al. 2008). El receptor MT1 media su acción inhibitoria aguda en SCN directamente a la neurona, mientras que el receptor MT2 media la fase efecto de desplazamiento sobre la actividad neuronal en SCN, como se muestra en ratones transgénicos con alteración dirigida del receptor MT1 (Dubocovich et al. 1998; Jin et al. 2003; Pfeiffer et al. 2012). Anteriormente, se estudió la distribución de MT1 en el hipotálamo humano *postmortem* por inmunocitoquímica (Wu et al. 2006). MT2 se encontró presente en el hipocampo y en la corteza humana (Brunner et al. 2006; Savaskan et al. 2005) mediante el uso de anticuerpos desarrollados (Angeloni et al. 2000). Hasta el momento no se disponía de información sobre la distribución de MT2 en el hipotálamo humano.

1.5.1.2 Regulación y función de la melatonina en el cerebro

Los posibles efectos neuroprotectores de la melatonina pueden residir en un gran número de funciones fisiológicas, incluyendo su propiedades antioxidantes, sus interacciones con vías de señalización intracelular, y la regulación de la supervivencia celular o genes apoptóticos, y la función mitocondrial (Barbeito et al. 2004; Carpentieri et al. 2012; Verkhatsky et al. 2010). Pocos estudios se han realizado con cultivos primarios de células gliales mixtas a fin de evaluar las propiedades de la melatonina y la neuroinflamación. Se ha comprobado que la liberación de melatonina es un proceso de fototransducción que se estimula en oscuridad: el ojo envía señales nerviosas a través del tracto retinohipotalámico, hace escala por el núcleo supraquiasmático, sale por la médula al ganglio cervical superior, y de allí a la glándula pineal (donde finalmente se produce melatonina). Por tanto, la glándula pineal es un transductor neuroendocrino. (Ver figura 4).

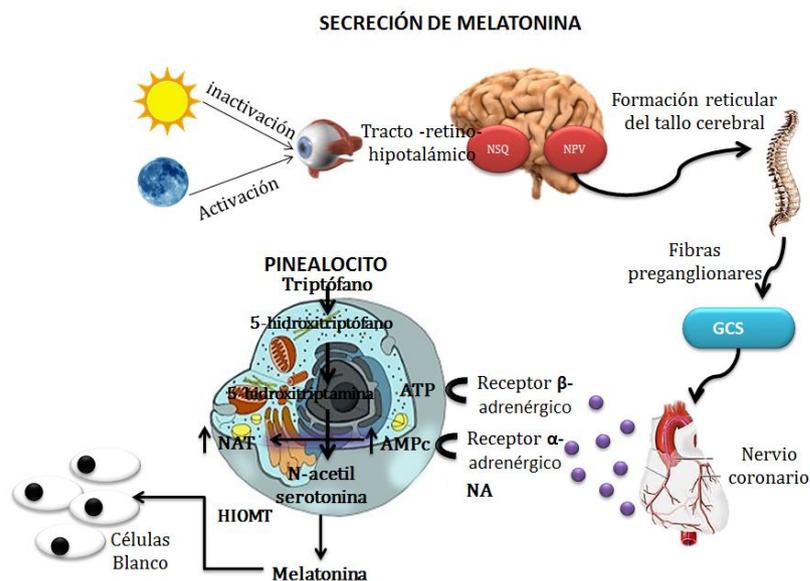


Figura 4. La síntesis de melatonina se produce durante la escotofase y se reduce de forma importante durante la fotofase. Adaptado de Reyes-Prieto, Velázquez-Paniagua y Prieto-Gómez 2009

Aunque los astrocitos y microglía son dos tipos de células gliales distintas en el sistema nervioso central, son diferentes en la morfología y propiedades funcionales, metabólicas con receptores MT1 y MT2 y son consideradas como células inmunes activas pero, en algunos casos, comparten las respuestas inmunes innatas comunes como la de ser captadores de melatonina como antioxidante en respuesta a procesos inflamatorios liberadores de ON (Jeong et al. 2012; Verkhatsky A. 2010). Por otra parte, los astrocitos ejercen funciones importantes en el cerebro, entre ellas la síntesis de factores neurotróficos, la homeostasis de iones, y la regulación de la concentración del glutamato extracelular (Verkhatsky 2007; Bhat et al. 2002). Además las células gliales juegan un papel crucial en la normalidad el funcionamiento del SNC en conjunto con melatonina ya que mejoran la conductividad sináptica y ejercen el papel de neurotransmisión entre glia y neuronas (Verkhatsky 2007).

Introducción

1.5.1.3. Relación entre melatonina y leptina

Existe evidencia científica validada de la relación entre hormonas y sus efectos antiinflamatorios y metabólicos, sin embargo, en el estudio de la melatonina se conoce que disminuye con el envejecimiento en los seres humanos y en roedores, mientras los niveles de grasa visceral, insulina y leptina aumentan (Rasmussen et al. 1999). En el mismo estudio, la corticosterona y T4 no se alteraron significativamente en el tratamiento con melatonina en el envejecimiento. Por otra parte, mientras que la testosterona en plasma, IGF-I y T3 se redujo en la mediana edad, estos cambios no fueron afectados por el tratamiento con melatonina.

La melatonina disminuye la adiposidad visceral, los niveles de leptina e insulina en sangre, sin alterar la ingesta de alimentos (Wolden-Hanson et al. 2000). Por ello, estos datos fueron tomados en conjunto y practicándose una pinealectomía en ratones C57Bl/6, para ver el aumento de la leptina, los hallazgos sugirieron, que la melatonina ejerce un efecto inhibitorio sobre la liberación de leptina en el tejido adiposo (Canpolat et al. 2001). De igual manera, se ha investigado el síndrome de comer por la noche (NES) en pacientes con trastornos de insomnio y deficiencia de receptores MT1 y esto puede proporcionar datos sobre el vínculo entre la grasa corporal, la leptina y la melatonina. Los pacientes con NES son típicamente obesos, y tienen anorexia matutina, hiperfagia por la noche e insomnio. Los análisis del perfil neuroendocrino de estos pacientes, ha revelado mayor nivel de cortisol, así como disminución de la melatonina nocturna circulante en sangre y aumento en los niveles de leptina en plasma (Birketvedt et al. 1999). Los base molecular de estas alteraciones conductuales y hormonales queda por determinar aun.

1.5.2. Leptina

Desde el descubrimiento de la leptina como un importante adipoquina anoréxica que actúa sobre el hipotálamo para reducir la ingesta de alimentos, la mayoría de los investigadores se han centrado en las funciones neuronales de la leptina en SNC. Los niveles séricos de leptina en personas con peso normal oscilan en el rango de 3-18 ng/ml, existiendo niveles más elevados en la mujer que el hombre; aunque en individuos con un índice de masa corporal (IMC) superior a

30 se pueden encontrar valores de 30 ng/ml o incluso superiores. Tiene una vida media similar en individuos obesos y no obesos, de cerca de 25 minutos en el caso de la endógena y de 90 minutos aproximadamente en el caso de la leptina exógena (Loffreda et al. 1998).

La leptina es una proteína de 16 kDa producida principalmente por el tejido adiposo en la periferia. La leptina cruza la barrera hematoencefálica (BHE) por un sistema de transporte saturable para producir acciones proinflamatorias neurotróficas y neuromoduladores. Es secretada por los adipocitos de tal forma que la leptinemia es reflejo de las reservas grasas del cuerpo estableciendo entonces un circuito de retroalimentación negativa donde la leptina circulante inhibe en el núcleo arqueado del hipotálamo la producción de NPY. De igual modo, Participa en la regulación del balance energético, procesos inflamatorios, la regulación inmune, la formación sináptica, la condensación de la memoria, y las actividades neurotróficas (Folch et al. 2015).

Las neuronas neuropeptidérgicas del núcleo arqueado señalizan al núcleo paraventricular y al área hipotalámica lateral donde se encuentran los centros reguladores del apetito y allí provocan la producción de péptidos estimulantes del apetito y la vigilia como la orexina o el propio NPY que a su vez señalizan sobre los centros del tronco encefálico, (entre ellos el complejo vagal que es otro importante centro de producción de sustancias orexigénicas) y sobre los núcleos colinérgicos del pros encéfalo basal y la corteza, produciendo la sensación de hambre.

En las últimas dos décadas, el sistema de transporte de leptina a través de la BHE juega un papel crucial en muchas formas de la obesidad y la resistencia a la leptina, siguiendo el papel clásico de (Banks y Kastin 1996). Este sistema de transporte puede ser regulado por muchos factores fisiológicos o patológicos, incluyendo la obesidad inducida por la dieta (Levin et al. 2004), lesiones cerebrales, tratamiento con leptina, triglicéridos, los agentes de α 1-adrenérgicos y la glucosa e insulina. Los cambios dinámicos de transporte de leptina indican que la BHE está implicada incluso en formas genéticas de la obesidad y la resistencia a la leptina. Modelo propuesto en esta investigación.

Introducción

La leptina también se transporta a través de la barrera hematoencefálica por un sistema de alta capacidad de transporte (Kastin y Pan 2000; Folch et al. 2015; Zlokovic et al. 2000). Sin embargo, el destino de la leptina después de que alcance el sistema nervioso central y sus cambios regulatorios en situaciones de alteración del metabolismo de la energía; no han sido completamente aclaradas. Aunque la BHE limita la difusión de la mayoría de los péptidos y proteínas de la sangre al cerebro, hay sistemas de transporte de péptidos y adipoquinas (Kastin y Pan 2007; Banks y Kastin 1996; Kastin y Pan 2000). Ver Figura 5

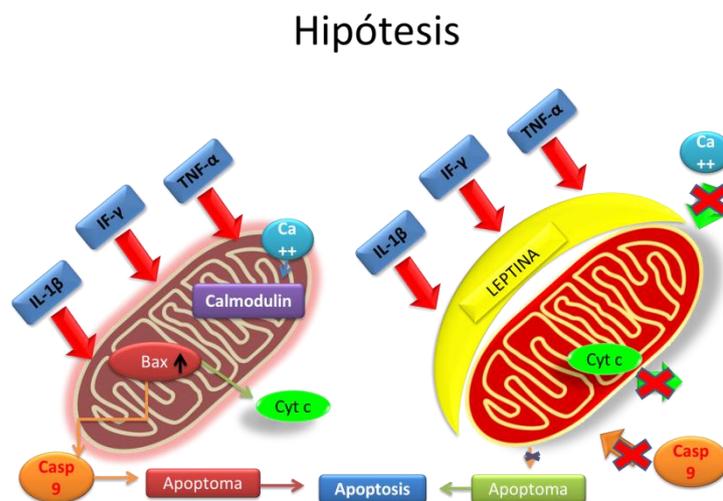


Figura 5. Hipótesis de la leptina como protector mitocondrial. Patraca et al. 2015

Las concentraciones de leptina están inversamente asociados con CD4 circulantes CD25 y células T reguladoras (X. Wu et al. 2013). La leptina puede activar los canales de potasio para regular la excitación de las neuronas del hipocampo (Shanley et al. 2002). Por otra parte, en el hipotálamo, la evidencia experimental ha dado lugar a un modelo propuesto en las señales anorexígenas, incluyendo Janus quinasas y señal del transductor y activador de la transcripción (STAT), que se activa por la leptina para converger en receptor de melanocortina (MCR-4) en neuronas (Nijenhuis et al. 2013; Bouret y Simerly 2007).

Señalización del receptor de leptina en neuronas y astrocitos

Se ha demostrado que los astrocitos expresan receptor de leptina (Ob-R) y responden a la leptina por la señalización de calcio (Hsuchou et al. 2009). Por lo tanto, muchas formas de la obesidad se asocian con un aumento de los niveles de leptina en la sangre en proporción a la masa de tejido adiposo.

El receptor de leptina en humanos (Ob-R) es miembro de la superfamilia de receptores de citoquinas de clase I (gp130). Los receptores de leptina están ampliamente expresados en el sistema nervioso central, comparten rutas de señalización comunes a las del receptor de insulina y se sabe que ambos mecanismos pueden actuar sinérgicamente mediando la evolución de los procesos neurodegenerativos. Por consiguiente, en el cerebro humano, la máxima expresión de la forma larga del receptor de leptina (Ob-Rb) tiene lugar en el núcleo arqueado y en la eminencia media del hipotálamo, aunque también se expresa de forma importante en el hipocampo, en el giro dentado y en las áreas CA1, seriamente afectadas en la enfermedad de Alzheimer (Ver Figura 6).

Introducción



Figura 6. Representación esquemática de la estructura general de los diferentes receptores para leptina. Las regiones de alta homología están representadas por Box 1. En la parte inferior se muestra el número de residuos de aminoácidos para cada receptor. Asimismo, se muestra otra secuencia característica del receptor más conocido Ob-Rb, la región Box 2.

En ratones de tipo salvaje, se pueden detectar niveles elevados del ARNm correspondiente a la isoforma Ob-Rb en el núcleo infundibular o arqueado, dorsomedial, Ventromedial y núcleo ventral premamilar. Niveles más moderados de expresión se pueden encontrar en el núcleo hipotalámico paraventricular y en el área hipotalámica lateral. Aún menores son los niveles que se encuentran en el núcleo paraventricular (Ver Figura 7).

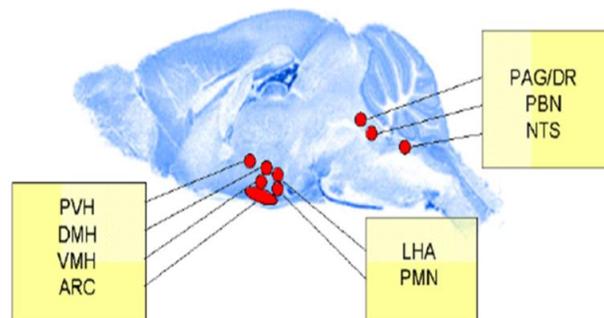


Figura 7. Distribución de los Ob-R funcionales en el cerebro de ratón. Núcleo infundibular o arqueado (ARC), dorsomedial (DMH), Ventromedial (VMH), núcleo ventral premamilar (PMV), área hipotalámica lateral (LHA), núcleo paraventricular (PVH), núcleo dorsomedial (DR), sustancia gris periacueductal (PAG), núcleo parabranchial (PBN), núcleo del tracto solitario (NTS). Adaptado de Folch et al 2013

1.5.2.1. Receptor de Leptina (Ob-R o LEPR)

La expresión de receptores de leptina (Ob-R) se expresan neuronas como astrocitos (Hsuchou et al. 2009), pero las funciones de señalización de la leptina astrocítica en las interacciones neurona-astrocito no están muy claras. El Ob-R β es la isoforma más larga del receptor, que es capaz de inducir la activación de p-STAT3; en ausencia de Ob-R β , los ratones *db/db* muestran la hiperfagia y diabetes severa; presentando también: hiperleptinemia, hiperinsulinemia, hipercorticosteronemia, infertilidad, e intolerancia al frío. El ARNm del Ob-R y la inmunorreactividad son altamente expresadas en muchas regiones del cerebro extra-hipotalámicas, incluyendo: el hipocampo, el tallo cerebral, el cerebelo, la amígdala y la sustancia negra (Elmqvist et al. 1998; Figlewicz et al. 2003; Folch et al. 2015).

La mutación neuronal específica de Ob-R afecta las funciones hipotalámicas y limita el fenotipo obeso observado en ratones *db/db* (Cohen et al. 2001; De Luca et al 2005; McMinn et al. 2005). (Ver Figura 8). Se ha demostrado que la obesidad del adulto aumenta específicamente la expresión Ob-R en astrocitos, mientras Ob-R neuronal no muestra ninguna regulación positiva,

Introducción

esto se lleva a cabo específicamente en el hipotálamo (Hsuchou et al. 2009; Pan et al. 2011). Los cambios regulatorios de expresión Ob-R se ha demostrado en ambos homogeneizados hipotalámicas y microvasos cerebrales enriquecidos que componen la BHE (Pan et al. 2008). En el hipotálamo, la Ob-R α es mayor en los recién nacidos, pero Ob-R β es mayor en ratones adultos. En los microvasos cerebrales, el ARNm tanto de Ob-R α como Ob-R β muestran reducciones dependientes de la edad de los recién nacidos a adultos jóvenes. No existe una regulación positiva robusta del receptor de leptina (Ob-R) en inmunoreactividad en la proteína glial fibrilar ácida (GFAP) (+) de astrocitos en el hipotálamo.

En estudios previos de nuestro grupo, analizamos la expresión de moléculas relacionadas con el metabolismo, particularmente PRL y Lep, en un modelo murino transgénico de EA familiar APP^{swe}/PS1^{dE9} (APP/PS1) a los 3 y 6 meses de edad, en comparación con controles ((Pedrós et al. 2015). En efecto, se observó una reducción significativa en los niveles de ARNm y proteína del receptor de PRL (PRL-R) en el hipocampo de ratones de 3 meses APP/PS1, con una disminución en los niveles de receptor de Lep (OB-R) a los 6 meses de edad.

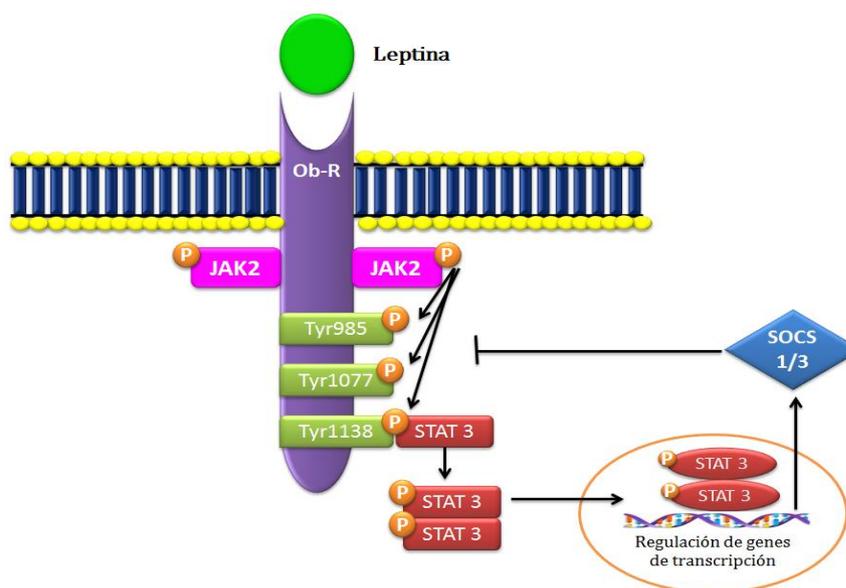


Figura 8. Leptina y la señalización de JAK/STAT. Adaptado de Paz-Filho, Mastronardi, Bertoldi 2012

1.5.3. Prolactina

La Prolactina (PRL) pertenece a una gran familia de proteínas, que también incluye la hormona del crecimiento (GH), lactógenos placentarios (PL), proteínas liposolubles de PRL como (PLP) y proteínas relacionadas con PRL (PRP). Todos estos miembros comparten homología estructural y características biológicas. Estas proteínas se expresan en la pituitaria, un solo gen PRL es expresado en el cromosoma humano 6 (Ben-Jonathan et al. 1996).

En el cuerpo humano se encuentran valores normales de prolactina: Hombres: 2 a 18 ng/mL; Mujeres que no estén embarazadas: 2 a 29 ng/mL y mujeres embarazadas: 10 a 209 ng/mL. Estos ejemplos son mediciones comunes para los resultados de estos exámenes. Los rangos de los valores normales pueden variar ligeramente entre diferentes laboratorios. Luego entonces, algunos laboratorios utilizan diferentes mediciones o analizan muestras diferentes. En los roedores, muchos genes relacionados con la PRL se expresan agrupados en el cromosoma 13 y 17, en ratones y ratas, respectivamente. Por lo tanto, se demostró a través de ensayos clínico-anatómicos que las dos hormonas (PRL y GH) están presentes en los seres humanos. Por último, (hPRL) se aisló con éxito y se purificó (Banks-Kastin et al. 1994) dando lugar a numerosos estudios fisiopatológicos posteriores. La PRL tiene más funciones que el resto de hormonas hipofisarias.

El paso inicial en la acción de PRL, como todas las otras hormonas, es la unión a un receptor de membrana específico, el receptor de la PRL (PRL-R). Similar al ligando, el PRL-R también se ha demostrado que es un miembro de la misma familia que el receptor de GH y parte de la clase más grande de receptores, conocida como la superfamilia de receptores de citoquinas de clase 1. (Ver Figura 9). Se le asocian al menos 300 funciones fisiológicas tales como la modulación inmune, osmorregulación, el metabolismo, el comportamiento, aspectos materno de reproducción y la lactancia, se han descubierto a través del tiempo pero, actualmente se conoce poco sobre la sinergia de esta hormona y el proceso inflamatorio (Freeman et al. 2000).

Las diferentes funciones se atribuyen en parte a los sitios extrapituitarios y de producción PRL (Ben-Jonathan et al. 1996) y la expresión de diferentes isoformas de PRL-R. La concentración de

1.5.3.1. Prolactina e inflamación

Después de una lesión cerebral, PRL estimula la proliferación y activación de la glía. La producción y secreción de PRL humana se activa por macrófagos (Sabharwal et al. 1992). Por consiguiente, la secreción de PRL por los macrófagos podría apoyar el papel de la PRL en la respuesta inflamatoria (Scotland et al. 2011).

En macrófagos, la estimulación con prolactina mejora de forma significativa la producción de IL-6 en respuesta a TNF alfa o CD40L, y es la primera evidencia de que se produce prolactina a nivel local en la membrana sinovial de pacientes con artritis inflamatoria y contribuye a la activación de macrófagos (Tang et al. 2014). Otros estudios muestran que los roedores y los macrófagos humanos sintetizan PRL en respuesta a inflamación y subidas de glucosa (Bole-Feysot et al. 1998a). También se conoce que la prolactina mejora las funciones inmunológicas tanto en peces como en mamíferos.

Los mecanismos moleculares precisos por PRL en la modulación de la respuesta inflamatoria son controvertidos. El papel modulador de la PRL en respuesta inflamatoria en las células mieloides se ha descrito anteriormente. MØ Peritoneales, responden a PRL mejorando de forma significativa la producción de ON a través de proteínas quinasas de tirosina, MAPK y activación de vías de canalización de Ca⁺⁺ (Trott et al. 2003). También en el mismo modelo experimental, PRL aumentó significativamente la producción de IL-1β, IL-12/p40 y IFN-γ a través de JAK/STAT1 y JNK/MAPK. También las vías de Ca⁺⁺ y la activación de p42/44 MAPK. Sin embargo, dosis más altas de la PRL (1000 ng/ml) induce IL-10 (Sodhi 2008). Así mismo, la activación de moléculas asociadas a las vías PRL/PRL-R de señalización podría abrir nuevos campos para la comprensión de los efectos de la PRL en los procesos inflamatorios en las células mieloides y en otros tipos de células y tejidos. De la misma forma, en este contexto, se ha descrito la papel de STAT3 en diferentes procesos inflamatorios, por ejemplo, en procesos tumorales, promueve la activación de NFκβ e inflamación por IL-6 (Yu et al. 2009). Por otra parte, su actividad anti-inflamatoria puede suprimir tanto la IL-6 y la síntesis de TNFα en MØ estimulada por LPS (Williams et al. 2007) puede estar mediada por aumento de IL-10.

Introducción

1.6. VÍAS DE ACTIVACIÓN INTRACELULAR: INFLAMACIÓN Y ENFERMEDADES NEUROLÓGICAS.

1.6.1. Vías de las MAPK y p38

Las vías de las MAPK están conservadas en todos los organismos eucariotas y son las responsables de transformar las señales externas que llegan a la célula en respuestas específicas, como pueden ser la migración, la proliferación, la diferenciación y la muerte celular. Estas vías van a ser identificadas gracias a estudios genéticos realizados en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y están formadas por una MAPK que es fosforilada por una MAPK quinasa (MAPKK), que a su vez es fosforilada por una MAPKK quinasa (MAPKKK) (Shaeffer y Weber 1999). Estudios posteriores demuestran la existencia de tres vías principales mediadas por MAPK, dos de las cuales, la de la JNK y la de p38, actúen en las respuestas activadas por el estrés ambiental que conduzca a la muerte de la célula, mientras que la tercera, la de ERK, transforma las señales extracelulares en señales de supervivencia y diferenciación celular (D'Mello y Chin 2005).

Otra vía intracelular implicada en la apoptosis neuronal aunque, comparado con la vía de la JNK, su papel no es tan importante es la vía de la p38. Al igual que la JNK, la p38 está altamente conservada y originalmente va a ser identificada a contribuir a la inflamación en respuestas a citoquinas (Ver figura 10). La p38 tiene cuatro isoformas diferentes: la p38 α , la p38 β , la p38 γ y la p38 δ (Kumar et al. 2003). La expresión de las isoformas p38 α y la p38 β es ubicua, pero su expresión es más elevada en el cerebro que en el resto de tejidos, en cambio las otras dos isoformas parece que son exclusivas del cerebro (Johnson y Bailey 2003). La p38 está regulada principalmente por las MAPKKK ASK-1, TAK-1 y MERKK-4 las cuales también regulan la JNK, y en menor grado también pueden estar reguladas por las MLK y la Tpl-2, aunque estas regulen principalmente la JNK. Por debajo de las anteriores se encuentran las MAPKK, que en el caso de la p38 son la MKK3 y la MKK6 y parece ser que también la MKK4, la que compartiera con la JNK (Takeda y Ichijo 2002). Las MAPKK activan la p38 fosforilando dualmente a la treonina 180 y a la tirosina 182 (Raingeaut et al. 1995).

La p38, igual que la JNK, puede tener efectos directos a través de la fosforilación de diferentes sustratos e indirectos a través de la fosforilación de factores de transcripción. Dentro de este grupo tenemos al factor de transcripción ATF-2, el cual puede contribuir a la activación de la expresión de c-Jun, ya que puede unirse a los lugares AP-1/TRE del promotor del gen c-Jun. También tenemos a MEF2C que igualmente regula el gen de c-Jun, a CHOP (CREB homologous protein), a GADD153 (Growth arrest and DNA damage inducible gene 153) (Mielke y Herdegen 2000) y a los TFC (Ternary Complex factors), como ERK-1, que activan la expresión de c-Fos (Whitmarsh et al. 1997). Algunos trabajos proponen que la p38 también es responsable de la fosforilación de la c-Jun inducida por la privación de potasio (Yamagishi et al. 2001), pero esto contradice otros trabajos que describen que la p38 no fosforila c-Jun (Watson et al 1998; Coffey et al 2002) en cuanto a los efectos directos de la p38, esta puede fosforilar diferentes sustratos citoplasmáticos como la proteína Tau (Reynolds et al. 1997) las MAPKAKP (MAPK-activated protein kinase) 2, 3 y 5 (Tan et al 1996; McLaughlin et al. 1996; Ni et al. 1998) las Mnk (MAPK-interacting kinase) 1 y 2 (Han et al. 1997; Waskiewicz et al. 1997) la PRAK (p38-regulated/activated kinase) 1 y 2 (Deak et al. 1998; Caivano y Cohen 2000). Finalmente, aunque la p38 está implicada en la apoptosis, en algunas situaciones también puede estar implicada en la supervivencia, como se ha observado en el modelo de supervivencia dependiente de actividad en CGC (Mao et al. 1999).

Asimismo, CREB es un factor de transcripción muy importante, el cual puede ser activado a través de las dos principales vías de supervivencia neuronal, Raf-MEK-ERK y PI3-K/AKT, promoviendo así la plasticidad sináptica a nivel cerebral dependiente de actividad neuronal y la supervivencia dependiente de factores tróficos. Se ha descrito que CREB activa la transcripción de genes que tienen lugar de unión CRE en sus promotores. Su forma activa es la fosforilada en el residuo serina 133 y esta fosforilación puede venir dada por diferentes quinasas, que se activan por estímulos como el aumento de AMPc, que activa la PKA, la entrada de calcio, que activa las CaMK, o la unión de factores neurotróficos, que activa las ERK 1/2. Una vez activo se une a la CBP/p300 que actúa como un coactivador transcripcional. Entre los genes que activa para promover la supervivencia, se encuentra el del BDNF (West et al. 2001) o el de Bcl-2 (Lonze et al. 2002).

Introducción

1.6.2. NF κ B

Las proteínas de la familia NF κ B son factores de transcripción inducibles que se expresan de manera ubicua y que regulan la expresión de genes involucrados en diferentes procesos como la inmunidad y la inflamación, el crecimiento, el desarrollo y la regulación de la muerte celular. En mamíferos existen 5 proteínas NF κ B: p50 (producto del corte de NF κ B /p105) la p52 (producto del corte de NF κ B2/p100) p65 (RelA), RelB y c-Rel.

La activación de NF κ B es el resultado de la fosforilación del I κ B por el complejo IKK, que conduce a la degradación del I κ B, que puede venir dada por la ubiquitinación y posteriormente la degradación del proteosoma o alternativamente por calpaínas. Esto permite que el NF κ B trasloque al núcleo y active la transcripción de genes dianas que contienen la secuencia consenso kB. Existen diferentes proteínas I κ B: I κ B α , I κ B β , I κ B γ e I κ B ϵ , de los cuales las dos primeras son las más estudiadas. Aparte, el NF κ B también se puede regular a otros niveles como por la fosforilación de p65 que produce un aumento de su actividad transcripcional o por la interacción con el coactivador transcripcional CBP/p300, que en algunos casos se ha observado que también aumenta la actividad de p65.

El papel del NF κ B en la regulación de la supervivencia neuronal es complejo. Se ha demostrado que se encuentra involucrado en los efectos inducidos de la supervivencia del NGF y de las citoquinas y su activación está asociada con la neuroprotección contra diferentes estímulos de muerte, como la exposición a la proteína β -amiloide, el estrés oxidativo y el óxido nítrico. (Ver Figura 10) En el modelo apoptótico de privación de potasio en CGC, se ha demostrado que este estímulo va acompañado de una disminución de la fosforilación de I κ B β y que la activación de NF κ B es necesaria para inducir supervivencia. En cambio en algunos casos el NF κ B puede promover la muerte neuronal. Así, se ha detectado la activación de NF κ B *in vitro* después de la exposición de algunos estímulos apoptóticos *in vivo* después de procesos de isquemia global, de ataques de apoplejía inducidos por kainato o de daños traumáticos de la medula espinal. Además, se han detectado niveles elevados de actividad del NF κ B en regiones vulnerables del

sistema nervioso central en enfermedades de Alzheimer, Parkinson y esclerosis lateral amiotrófica.

De igual forma, que el $\text{NF}\kappa\beta$ inhiba o promueva la apoptosis podría depender del tipo celular y de la naturaleza de los estímulos apoptóticos. También se cree que la composición de los homólogos y heterodímeros que forman el $\text{NF}\kappa\beta$ podría determinar su acción, ya que se ha observado que la activación de p65 aumenta la supervivencia en muchos casos, mientras que el c-Rel está asociado más con la apoptosis. No está muy claro como el $\text{NF}\kappa\beta$ regula la supervivencia celular, pero podría ser a través de la inducción de diferentes genes anti-apoptóticos como Bcl-2, Bcl-XL y A1, de algunos miembros de los IAP y de enzimas implicadas en el metabolismo de ROS como la MnSOD (Manganeso superóxido dismutasa). También se ha demostrado que puede activar genes pro-apoptóticos como el de p53, el C-myc o el de Fas (Aleyasin et al. 2004; Koulich et al. 2001).

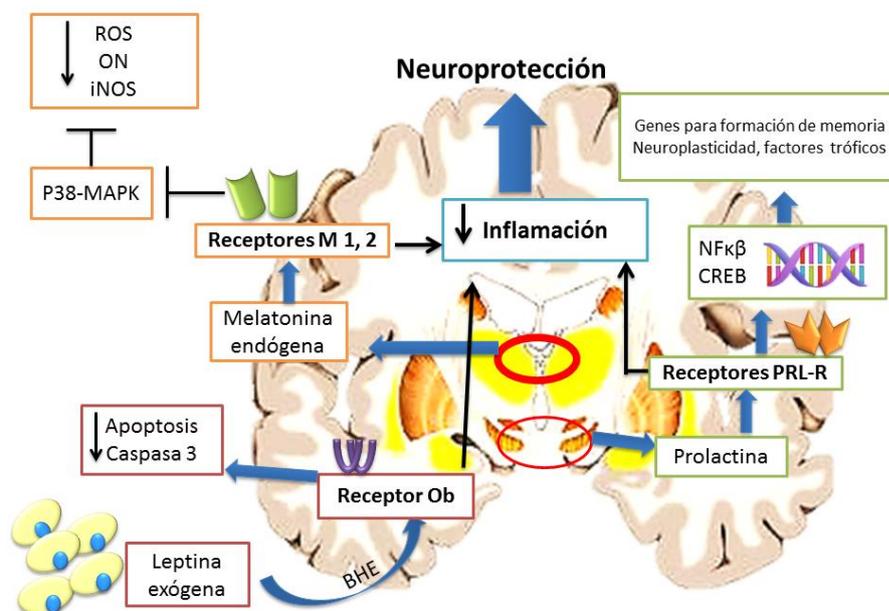


Figura 10. Integración de las vías en la inflamación. Patraca et al 2015.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE FACTORES ENDOCRINOS COMO MELATONINA Y PROLACTINA, Y DE ADIPOQUINAS COMO LEPTINA EN LA MODULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN ASOCIADA A PROCESOS NEURODEGENERATIVOS.

José Iván Patraca Fierro

Dipòsit Legal: T 242-2016

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE FACTORES ENDOCRINOS COMO MELATONINA Y PROLACTINA, Y DE ADIPOQUINAS COMO LEPTINA EN LA MODULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN ASOCIADA A PROCESOS NEURODEGENERATIVOS.

José Iván Patraca Fierro

Dipòsit Legal: T 242-2016

HIPÓTESIS

A lo largo de los últimos años la comunidad científica ha manifestado un interés creciente en los efectos pleiotrópicos de hormonas y de factores endógenos que experimentan cambios en su actividad a lo largo de la vida. En el contexto particular de las enfermedades neurodegenerativas, se han descrito cambios en los niveles de leptina, hiperlipidemia, así como alteraciones relacionadas con procesos inflamatorios. Hormonas como melatonina y prolactina, y adipoquinas como leptina, se ha descrito que pueden tener efectos neuroprotectores y moduladores de la inflamación. Por lo tanto, la hipótesis de este estudio es que estas hormonas (la melatonina, prolactina y leptina) sintetizadas en diferentes órganos, podrían tener un efecto anti-inflamatorio y antioxidante sobre las células gliales y una combinación de estas sustancias podrían reducir de forma sinérgica los daños inducidos por un estado inflamatorio.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE FACTORES ENDOCRINOS COMO MELATONINA Y PROLACTINA, Y DE ADIPOQUINAS COMO LEPTINA EN LA MODULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN ASOCIADA A PROCESOS NEURODEGENERATIVOS.

José Iván Patraca Fierro

Dipòsit Legal: T 242-2016

OBJETIVOS

Objetivo general:

Estudiar el potencial anti-inflamatorio de estas sustancias en un modelo *in vitro* de cultivos primario mixto de células gliales de ratón C57Bl/6J, previamente estimuladas con diferentes citoquinas pro-inflamatorias (TNF α , IL-1 β e IFN γ).

Objetivos específicos:

1. Caracterizar el efecto de las citoquinas pro-inflamatorias como inductores del estrés oxidativo y la producción de óxido nítrico en cultivos celulares de glía mixta.
2. Caracterizar el efecto anti-inflamatorio de la melatonina, leptina y prolactina
3. Estudiar el papel de la leptina, prolactina y melatonina en la activación de la vía p-38-MAPK en células gliales mixtas.
4. Estudiar el efecto de la leptina y la prolactina sobre moléculas relacionadas con procesos de apoptosis y neuroplasticidad.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE FACTORES ENDOCRINOS COMO MELATONINA Y PROLACTINA, Y DE ADIPOQUINAS COMO LEPTINA EN LA MODULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN ASOCIADA A PROCESOS NEURODEGENERATIVOS.

José Iván Patraca Fierro

Dipòsit Legal: T 242-2016

MATERIAL Y MÉTODOS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE FACTORES ENDOCRINOS COMO MELATONINA Y PROLACTINA, Y DE ADIPOQUINAS COMO LEPTINA EN LA MODULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN ASOCIADA A PROCESOS NEURODEGENERATIVOS.

José Iván Patraca Fierro

Dipòsit Legal: T 242-2016

MATERIAL Y MÉTODOS

Los animales en los procedimientos de cultivo celular in vitro.

En este estudio se utilizaron crías de ratones C57BL / 6 de tres días (p2-5) (Harlan, IN, EE.UU.). El tratamiento de las crías postnatales se llevó a cabo de conformidad con la Directiva 86/609EEC del Consejo de la Unión Europea y el procedimiento establecido por el Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca de la Generalitat de Catalunya. Se hizo todo lo posible para minimizar el sufrimiento de los animales y reducir el número de animales utilizados para experimentos en cultivos celulares.

Cultivo celular de Glia Mixto

Se prepararon cultivos de células gliales mixtas a partir de corteza cerebral de 3 días de edad, C57BL / 6 ratones. Brevemente, se diseccionaron cortezas cerebrales y meninges utilizando las placas de Petri se mantuvieron en solución PBS 1X estéril mientras se diseccionaban todos los córtex de los ratones. Seguido esto se procedió a la separación mecánica de las células de córtex, pipeteando de 3 a 5 veces para disociar más el tejido y que las células queden más disgregadas. Se transfirieron los pedazos de córtex en un Falcon de 15 ml con 10 ml de PBS estéril y se centrifugaron 3 min a 1000 rpm en centrifuga de rotor basculante.

Después de esto, el tejido se incubó con solución de tripsina (tripsina 0,05% (w / v) de tripsina-EDTA 5 mM) durante 15 min a 37°C. Luego, el tejido fue fragmentado con una pipeta Pasteur pulida al fuego. Las células disociadas se sembraron en placas de cultivo de 60 mm de diámetro (300.000 células / ml) y se cultivaron en medio de cultivo Dulbecco Modificado / F-12 medio de Eagle, suplementado con suero bovino fetal al 10% (FBS), 2% HEPES, 100 unidad/ml de penicilina, 100 mg / ml de estreptomycin. El medio fresco se cambió al día siguiente y luego cada 3 días después. Todos los experimentos se realizaron 7-9 días después de la siembra.

Preparación de medios:

Para la realización de medios de cultivos se necesitaron los siguientes reactivos:

Medio DMEM sin glutamina sigma Cat: D5671, botella de 500 ml a 4°C; Fetal Bovine Serum (FBS): en Falcon de 15 ml, a -20°C heat inactivated (30 min, 56°C). Tripsina-EDTA 0,25% (GIBCO): en falcon de 15 ml, -20°C.

Se preparó antes de la extracción de córtex las siguientes soluciones para la siembra de las células gliales mixtas:

Soluciones estériles a preparar extemporáneamente:

Solución STOP: DMEM + 10% FBS + DNasa (12 ml).

Se preparó en Falcon de 15 ml no estéril. Pesar 2 mg de DNasa. Se disolvió en campana de flujo con 10,8 ml de DMEM. Filtrar (filtro de 0,22) sobre un Falcon estéril y se agregaron 1,2 ml de FBS.

Solución FINAL: DMEM + 20% FBS + Gentamicina (0,1 mg/ml) + Glutamina (40 ml).

Se preparó en Falcon de 15 ml no estéril. Se pesó 4 mg de gentamicina y 23,4 mg de glutamina y se disolvió en 10 ml de DMEM. Se filtró sobre Falcon estéril de 50 ml. Se agregó 8 ml de FBS y 22 ml de DMEM.

Cambio de medio

El medio se cambia cada 3 o 4 días y el porcentaje de FBS se va disminuyendo progresivamente del 10% en el primer cambio y en el siguiente al 2% que es cuando las células se activan y preparan para el tratamiento (Figura 11) la confluencia se alcanza después de 9 día *in vitro*. En este punto el cultivo esta con una confluencia del 95% y listo para ser tratado.

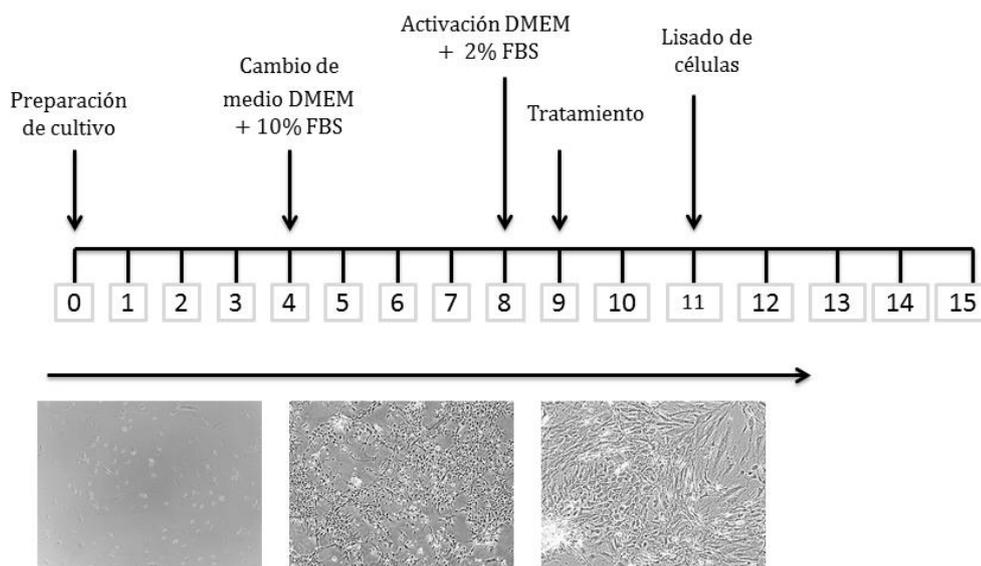


Figura 11. Cultivo primario de glia mixta de ratón C57Bl/6

Tratamientos:

Los cultivos gliales fueron tratados con citoquinas pro-inflamatorias (TNF α , 20 ng / ml; IL1 β , 20 ng/mL ; IFN γ 20 ng / ml 48 horas después del tratamiento neuroprotector) (PeproTech Inc. Rocky Hill, NJ, EE.UU.) o con el mismo volumen de solución salina tamponada con fosfato (PBS) como control.

Como se indica, las células fueron pre- tratadas (activación) con melatonina, leptina y prolactina (500 nM ; Sigma, St. Louis , MO , EE.UU.) 1 hora antes de la incubación con citoquinas durante

48 horas aproximadamente. Además, las células se pre-trataron con inhibidor de quinasa SB203580 (Calbiochem, EMD Millipore EE.UU.) y citoquinas, a concentraciones de 20 ng / ml , y con el fin de probar la especificidad de efecto inhibidor de la leptina sobre la vía p38.

Viabilidad celular:

Los ensayos de viabilidad celular se realizaron después de 48 horas de tratamiento y se determinaron utilizando MTT [3- (4,5-dimetil-2-tiazolil) -2,5-difenil-2H-tetrazolio; Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.] y la tinción de Hoechst 33342.

Ensayo MTT

El ensayo de MTT para medir citotoxicidad fue desarrollado por Mosmann 1983 y se siguiendo las modificaciones de Hansen et al 1989. Las células viables con las mitocondrias activos pueden metabolizar la sal de tetrazolio (MTT) de color violáceo.

- *Solución MTT*: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol, se disuelve a una concentración de 2,5 mg MTT/ml de PBS. Teniendo en cuenta que el MTT es fotosensible por lo tanto protegeremos la disolución de la luz y conservar a 4 °C.

- *Solución distaining*: utilizamos esta solución para disolver los cristales que produjeron las células. Se prepara para 50 mL de solución distaining: 5 g de SDS en unos 40 ml de DMSO 99% de pureza. Se añade 57,2 µl de ácido acético glacial por cada 10 ml de DMSO. Se enrasa hasta 50 mL con DMSO. Se almacena a temperatura ambiente.

Ensayo:

Ensayo de MTT se ha llevado a cabo en placas de 96 pozos o 24 según sea el caso. Sacamos las placas de 96 pozos del incubador y añadimos 10 µl de solución MTT a cada pozo, donde quedara una concentración final de 500 µg/mL de MTT. Regresamos las placas al incubador y se las dejamos 4 horas.

Durante este tiempo las células viables reducirán la sal de MTT dando lugar a la formación de los cristales. Para hacer el blanco dejamos algunos pozos sin tratar y sin añadir solución de MTT, pero sí que añadiremos la solución de lisa. Para disolver los cristales, añadimos 100 μ l de solución de lisa cada pozo e incubamos las placas en el incubador a 37 °C durante toda la noche. Leemos en la densidad óptica de 590 y 550 nm en el espectrofotómetro (Benchmark Plus de microplacas Espectrofotómetro BioRad), se utiliza la absorbancia a 590 nm como referencia y se obtiene la diferencia respecto a la absorbancia a 550 nm.

Tinciones con Hoechst 33342

El Hoescht 33342, también denominado de bisbenzimidide H33342 (Sigma-Aldrich), es un colorante específico para regiones del DNA que son ricas en adenina y timina. Se puede utilizar tanto para la detección de DNA en muestras tisulares, como en células en cultivo. Es un fluorocromo permeable a la membrana plasmática que se excita a una longitud de onda de 343 nm (luz ultravioleta) y que emite fluorescencia azul correspondiente a una longitud de onda de 455 nm. Con la finalidad de ver los cambios conformacionales de los núcleos de la glía mixta, se realizó la tinción con Hoechst 33342 para observar en conjunto la acción del tóxico como del tratamiento, comparando con la morfología del control. Se incubaron los pozos del tratamiento después de realizar los lavados pertinentes (3 con PBS 1X por 5 minutos) para quitar restos de tratamiento y de esta forma tener mayor permeabilidad en la célula.

Las células del cultivo se permeabilizaron con PFH al 4%, luego de esto se procedió a retirar el medio y bloquear con 5% albúmina de suero bovino (BSA) durante 30 min a Temperatura Ambiente (TA). Tras realizar 3 lavados se procedió a la incubación con Hoechst y con la concentración adecuada para el marcaje de los núcleos (de acuerdo al fabricante Dil: 0,5-1 mg/ml; 81845 Sigma-Aldrich, España). Después de esto se incubó durante 35-45 minutos en cámara de cultivos en condiciones óptimas para el cultivo (37° C, 5% de Co2), una vez transcurrido el tiempo de incubación se realizó 3 lavados con PBS 1X estéril para quitar los restos de producto y que la visibilidad al microscopio fuera buena. Se observó bajo el microscopio (Olympus BX61).

Medición de óxido nítrico:

Reacción de Griess (fundamento del método)

Este método se basa en la reacción del analito en el medio ácido para formar una sal diazonio que acopla a aminas aromáticas produce un colorante azo (diazotización de Griess). Esta reacción de color rosácea es monitoreada fácilmente por medio de espectrofotometría.

Procedimiento

Preparación de la recta patrón.

Para evaluar la producción de óxido nítrico en el medio de cultivo de glia mixto de ratón C57Bl/6 se preparó la siguiente curva de calibración: en un falcon de 50 mL preparar la solución de NaNO₃ al 10 mM (69mg/100ml) disolviéndola en H₂O Mq. Seguido de esto se preparó la recta patrón en eppendorfs de 1.5 mL a concentraciones de: 0 μM, 2,5 μM, 5 μM, 10 μM, 20 μM, 40 μM y 80 μM respectivamente, homogenizada en medio de cultivo DMEM con 2% de FBS. Después de 20 minutos, se leyó en espectrofotómetro (Benchmark Plus de microplacas Espectrofotómetro BioRad) a 570 nm. Asimismo, se ajustó el cero del instrumento con el blanco. Se trazó una curva graficando las concentraciones (en mg de NaNO₃) contra las absorciones obtenidas.

Preparación del reactivo de Griess

Mezclar 0,4 g de sulfanilamide, 40 mg de N-(1-Naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride (N9125 y S925-1 Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE.UU.), 2 mL de ácido fosfórico y disolver hasta llegar al volumen de 40 mL en un falcon de 50 mL, mantener en refrigeración este reactivo a 4 °C y lejos de la luz ya que es fotosensible.

Seguido de la preparación de los reactivos, y después de la incubación con los tratamientos se determinó la producción de Óxido Nítrico (ON) liberado de las células gliales que se convirtió en

nitrito en el medio de cultivo, lo cual pudo determinarse mediante la reacción de Griess. Se cogió de las placas 100 μ l del medio de cultivo medio después de 48 horas de tratamientos y un volumen igual (100 μ l) de reactivo de Griess se añadió, se esperó de 5-10 minutos a que la reacción del óxido nítrico se produjera. El nitrito es detectado y analizado por la formación de un color rojo-rosado al tratamiento de una muestra conteniendo NO₂ con el reactivo de Griess. Se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro a 570 nm, utilizando la recta patrón como un estándar.

Inmunofluorescencia

Los cultivos de células gliales mixtos se sembraron en cubreobjetos de vidrio. Después de los tratamientos, las células se fijaron como se ha descrito anteriormente. Después de lavar tres veces con PBS que contenía 0,02% de Tritón X-100 (PBST), la unión no específica de los anticuerpos fue bloqueado por 5% albúmina de suero bovino (BSA) durante 30 min a Temperatura Ambiente (TA). Luego, las células se lavaron dos veces con PBS-Tween (PBS-T) y se incubaron con anticuerpo primario de conejo anti-Ob-R a 4°C durante la noche (Over Nighth) (1: 1000, Santa Cruz) para detectar en las membranas de las células gliales el receptor. Después de tres lavados con PBS-T, las células se incubaron durante 90 min a TA con anticuerpo secundario anti-conejo AlexaFluor 647 (1: 500; Life Technologies. Finalmente, las células se incubaron con Hoechst (dil: 1mg/ml; 14533; Sigma Aldrich, España.) para 10 min y se lavaron dos veces con PBS. La tinción realizada en los cubreobjetos fueron montados en portaobjetos de microscopio con Fluoromont-G (Microscopía Electrónica de Ciencias, Hatfield, PA, EE.UU.) y la inmunotinción se observó bajo el microscopio (Olympus BX61).

Western-blot:

La técnica de Western blot permite observar los niveles de una proteína específica y combina un proceso de migración electroforética con una inmunodetección. La electroforesis permite la separación de las proteínas en un gel de acrilamida en función de su masa molecular.

Después de tratar las células con melatonina, leptina, prolactina y citoquinas las células se lavaron dos veces con enfriado con hielo solución salina y se recogieron en tampón de lisis que

contiene NaCl 150 mM , 5 mM tamponada con fosfato MgCl₂ , 50 mM Tris , 1 mM EDTA, 1 % Triton X- 100 , pH 7,2 con inhibidores de proteasa (Complete , Roche Diagnostics, Alemania). Posteriormente los extractos homogenizados se centrifugaron a 13000 g por 15 minutos a 4° C y el sobrenadante se guardó a -80° C para su posterior uso.

La determinación de la fracción proteica se realizó siguiendo los ensayos de Ácido Bicinconínic (BCA) y Método de Bradford.

Determinación por BCA:

La determinación de la concentración proteica se realizó mediante el método del ácido bicinconínic (BCA) (Pierce Company). Para ello, se añadieron 48 µl H₂O_mQ a 2µl de extracto proteico y a continuación se añadió 1 ml de reactivo de BCA (reactivo A + reactivo B, en proporción 50:1). Posteriormente, se incubó la mezcla durante 30 min a 65 °C y finalmente, tras dejarla enfriar 5 min, se procedió a la lectura de la absorbancia a 562 nm en un espectrofotómetro de microplaca (BioRad, Benchmarck Plus). La concentración de proteína se determinó por interpolación de las lecturas de absorbancia obtenidas en una recta de calibrado preparada con concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina (BSA, 2 mg/ml, Pierce Company).

Determinación por método de Bradford

La determinación de la fracción proteínica se realizó con el Kit de ensayo de proteínas Bradford (BioRad). Para ello se añadieron por duplicado, 2 µl del extracto de proteínas del cultivo versus 8 µl de H₂O_mQ quedando una proporción 2:8. Seguido de esto, se añadió 140 µl del reactivo de Bradford a los pozos estándar y muestras problemas preparadas como lo indica el fabricante. Posteriormente se dejó reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Se procedió a leer a una absorbancia a 595 nm en el espectrofotómetro POWER WAVE XS2, BioTek, USA. La concentración de proteína se determinó por interpolación de las lecturas de absorbancia obtenidas en una recta de calibrado preparada con concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina (BSA, standard curve 0.125-2.0 mg/ml, Quick Start Bio-Rad).

Preparación de la muestra y geles de poliacrilamida:

Un promedio de 50 µl de proteína fue desnaturalizado a 95 ° C, durante 5 min, en tampón de muestra (M Tris-HCl 0,5, pH 6,8, 10% de glicerol, 2% SDS, 5% β- mercaptoetanol, 0,05% de azul de bromofenol)

Las muestras se cargaron en un gel de electroforesis, que consta de dos fases: el gel concentrador, que permite concentrar las proteínas cargadas en el gel, y el gel separador, en el cual se separan las proteínas en función de su masa molecular.

Los reactivos y las proporciones necesarias para la elaboración de 2 geles de poliacrilamida-SDS se muestran en la siguiente tabla 2.

Tabla 2. Componente de los geles de separación y de concentración.

Componentes	Gel de separación	Gel de concentración
	10%	4%
Acrilamida-bisacrilamida 40%	3,8 ml	1.250 ml
Tris-HCL 1.5 pH 8.8	3,750 ml	-----
Tris- HCL 1.5 pH 6.8	-----	1.250 ml
SDS 10%	170 µl	100 µl
H2O mQ	7, 340 ml	7,500 ml
TEMED	10 µl	10 µl
APS	100 µl	50 µl

Una vez polimerizados los geles, éstos se colocaron dentro de una cubeta de electroforesis Miniprotein III (BioRad) con suficiente tampón de migración (Tris 125 mM, Glicina 1,25 M, SDS 0.5 %) para que ambos extremos del gel queden en contacto con el tampón y permitir de esta manera cerrar el circuito. Finalmente, se cargaron las muestras en el gel, junto con un marcador estándar de peso molecular (Precision Plus Protein™ Dual Color Standarts, 161-0374; BioRad). La electroforesis se llevó a cabo a 110 V-120 V el tiempo necesario para que la proteína se separe según su masa molecular.

Transferencia del gel a la membrana:

Finalizada la electroforesis, se llevó a cabo la transferencia del gel a una membrana de polivinilideno (PVDF, 162-0177; BioRad), utilizando el sistema Mini Trans-Blot® (Bio-Rad). Este proceso permite la transferencia de las proteínas a la membrana, donde se realizará posteriormente la inmunodetección de las proteínas de interés. La transferencia se realizó a una intensidad de corriente eléctrica constante de 200 mA en tampón de transferencia (Tris 25mM, Glicina 190mM, Metanol 20%) y manteniendo la cubeta de transferencia a 4 °C durante todo el proceso.

Inmunodetección

Para llevar a cabo la inmunodetección, se extrajeron las membranas de la cubeta de transferencia y se lavaron con TBS 1X-Tween® 0.1 % pH 7.4 (TBS-T: Tris 24,25g/L, NaCl 80g/L y Tween 20 1ml/L) durante 5 min. Posteriormente, se incubaron las membranas durante toda la noche a 4 °C en una solución bloqueadora (5% BSA en TBS-T) que contenía el anticuerpo primario de interés a la concentración correspondiente indicada en la Tabla 3.

Tras tres lavados de 5 min con TBS-T, se procedió a la incubación de las membranas con el anticuerpo secundario conjugado a un enzima peroxidasa, en TBS-T (Tabla 3) a temperatura ambiente durante 1 h. Como paso final de la inmunodetección, se lavaron las membranas con TBS-T para eliminar el exceso de anticuerpo secundario y se procedió a la detección de la proteína de interés mediante una reacción de quimioluminiscencia. Para ello, se procedió al

contacto de la membrana con la solución de detección (Amersham ECL Selec TM HARD y BioRad Clarity™ Western ECL substrate) durante 1 min. El revelado de la señal quimioluminiscente se llevó a cabo mediante el aparato Chemidoc XRS Bio-Rad® y su cuantificación, mediante el empleo de un software específico para capturar imágenes digitales (ImageLab, Bio-Rad). Para normalizar los resultados se utilizó la proteína β -actina, inmunodetectada en la misma membrana que la proteína de interés

Tabla 3.

Anticuerpo primario	Especie	Referencia	Dilución	Condiciones
Anti- β -Actina monoclonal	A. Mouse	A-5441 Sigma-Aldrich, St	1:50,000	Temperature ambiente 37°C
Anti- β -Tubulina monoclonal	A. Mouse	T4026 Sigma-Aldrich, St	1:50,000	Temperature ambiente 37°C
Citocromo C	A. Rabbit	4272 Cell signaling	1:1000	Over night 4°C
COX IV (3E11)	A. Rabbit	4850 Cell signaling	1:1000	Over night 4°C
CREB	A. Rabbit	9197 Cell signaling	1:1000	Over night 4°C
Cleaved caspasa-3 (Asp175)	A. Rabbit	9661 Cell signaling	2:1000	Over night 4°C
fosfo-CREB (Ser133)	A. Rabbit	9198 Cell signaling	1:1000	Over night 4°C
fosfo-JAK2 (Tyr1007/1008)	A. Rabbit	3771 Cell signaling	1:1000	Over night 4°C
fosfo-NF κ B (Ser536)	A. Rabbit	3033 Cell signaling	1:1000	Over night 4°C
fosfo-p38 MAPK (Thr180-Tyr182)	A. Rabbit	9211 Cell signaling	1:1000	Over night 4°C
fosfo-STAT1 (Tyr701)	A. Rabbit	4322 Cell signaling	2:1000	Over night 4°C
fosfo-STAT3 (Tyr705)	A. Rabbit	9131 Cell signaling	1:1000	Over night 4°C
fosfo-STAT5 (Tyr694)	A. Rabbit	9359 Cell signaling	1:1000	Over night 4°C
iNOS	A. Rabbit	2977 Cell signaling	1:1000	Over night 4°C
JAK2	A. Rabbit	3230 Cell signaling	1:1000	Over night 4°C
NF κ B	A. Rabbit	8242 Cell signaling	1:1000	Over night 4°C
Ob-R	A. Mouse	sc-8325 Santa Cruz de Biotecnología	2:1000	Over night 4°C
PRL-R (H-300)	A. Mouse	sc-20992 Santa Cruz de	2:1000	Over night 4°C

Biotecnología				
p38	A. Rabbit	9212 Cell signaling	1:1000	Over night 4°C
STAT1	A. Rabbit	9172 Cell signaling	1:1000	Over night 4°C
STAT3	A. Rabbit	9139 Cell signaling	1:1000	Over night 4°C
STAT5	A. Rabbit	9363 Cell signaling	1:1000	Over night 4°C

A continuación las membranas de los Western blots, se lavaron en TBS-T (3 lavados por 5 minutos cada uno) y se incubaron durante 2 horas con anticuerpo secundario anti-IgG Mouse o Rabbit conjugado con peroxidasa, según fuera el caso; seguido por el sistema de detección de quimioluminiscencia (Imagen Molecular XRS Cantidad ChemiDoc + BioRad) según las instrucciones del proveedor. Se utilizaron los líquidos reveladores para cada caso (Amersham ECL Selec TM HARD) y (BioRad Clarity™ Western ECL substrate) Las mediciones de quimioluminiscencia y los valores de semi-cuantitativos se obtuvieron usando el software correspondiente ImageLab, Quantity one (Bio-Rad) y los resultados se expresaron como un porcentaje con respecto al control. Las correspondiente β -actinas fueron tomadas para cada muestra y así, normalizar las diferencias en carga de gel.

Reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)

La PCR en tiempo real (RT-PCR) o PCR cuantitativa es una variante de la PCR en la cual, el proceso de amplificación y de detección se producen simultáneamente. Para ello, se realiza una reacción de PCR convencional, pero en la que a cada ciclo de reacción, le acompaña una lectura de fluorescencia, mediante el uso de fluoróforos. La fluorescencia liberada en cada ciclo es proporcional a la cantidad de DNA generado. La medición de esta emisión de fluorescencia y su representación gráfica se realiza en un detector, permitiendo así, la cuantificación de la expresión del gen de interés.

Extracción de ARN y síntesis de ADNc:

Después de la incubación, se retiró el medio de las células, estas se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS 1X) dos veces. ARN total fue preparado a partir de cultivo celular de glia mixto. El ARN total se extrajo usando el reactivo TRIzol (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se añadió 200 µl de cloroformo y, tras agitación, se dejó reposar la mezcla 5 min en hielo. A continuación, se centrifugó dicha mezcla a 13000 g durante 15 min a 4 °C y se recuperó la fase acuosa superior. Con el fin de obtener un ARN más limpio, se repitió este proceso de extracción clorofórmica una vez más. Una vez obtenida la fase acuosa definitiva, se le añadió 200 µl de isopropanol. Tras una mezcla por inversión y una etapa de reposo de 10 min en hielo, se centrifugó a 13000 g durante 15 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 1 ml de etanol al 70 %. Posteriormente se centrifugaron las muestras a 7500 g, durante 5 min a 4 °C. Se repitió el lavado con etanol al 70 % una segunda vez y tras la segunda centrifugación, se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet mediante evaporación del etanol. Finalmente, se resuspendió el pellet con 30 µl de H₂O_{mQ} autoclavada.

Para preparar el cDNA se utilizó el Reverse Transcription para RT-PCR (QuantiTect, Reverse Transcription Kit and SYBR Green PCR Kit, Germany). El ARN se cuantificó por espectrofotometría (Nanodrop 1000 espectrofotómetro, Thermo Scientific) en $\lambda = 260$ nm y la prueba de pureza (por A₂₆₀ / relación de 280) y la integridad (por electroforesis en gel desnaturalizante). El ADN complementario se generó mediante la alta capacidad de ADN complementaria inversa [Kit de Transcripción de Applied Biosystems (4.368.814)].

Cuantificación de ARNm:

Una vez extraído el ARN, se procedió a la determinación de la concentración de RNA de las muestras obtenidas, así como del análisis de la pureza de éstas. Para ello, se utilizó el NanoDrop (ND-1000), mediante el cual se obtuvieron las lecturas de las absorbancias a 230, 260 y 280 nm. A partir de la lectura de 260 nm se obtuvo la concentración de ARN de la muestra, mientras que

mediante las relaciones 260/280 nm y 260/230 nm se determinó la pureza de las mismas. Las muestras se consideraron puras cuando la primera relación era próxima a 2 y cuando la segunda era superior a 1.70. Tras la cuantificación de la concentración de ARN y de la pureza de las muestras, éstas fueron guardadas a -80° C hasta su uso posterior.

Amplificación ARN a ADNc

Un total de 10 ng de ADNc fue sometido a amplificación cuantitativa RT-PCR utilizando SYBR Green QuantiTect Reverse Transcription Kit de QIAGEN (205311. USA). Los cebadores directos (F) e inversos (R) para los genes de ratón analizados están en el listado en la Tabla A. Las reacciones se realizaron con una cuantitativa en tiempo real sistema de PCR (QIAGEN), y la PCR en tiempo real se realizó durante 45 ciclos de 95 °C durante 15 s y 60° C durante 1 minuto y 72° C durante 30 s.

Finalmente, los datos estadísticos se convirtieron y se normalizaron a la forma lineal usando el cálculo 2-CT ($\Delta\Delta CT$). El nivel de expresión relativa de los genes iNOS, COX IV e IL-6, entre otros y se evaluó en cultivos de glia mixtos, lo cual se normalizó con β -actina.

Tabla 4.

Nombre:	Forward	Reverse
<i>iNOS</i>	ACATCGACCCGTCAC-AGTAT	CAGAGGGGTAGGCTTGTCTC
<i>IL-1β</i>	GAAATGCCACCTTTTGACAGTG	CTGGATGCTCTCATCAGGACA
<i>IL-6</i>	TAGTCCTTCCCTACCC-AATTTCC	TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC
<i>TNF-α</i>	CGTCAGCCGATTTGCTATCT	CGGACTCCGCAAAGTCTAAG
<i>IFNγ</i>	CAGAGCCAAATTGTCTCCTTC	ATCCACCGGAATTTGAATCAG
<i>β-actina</i>	GGCTGTATTCCCCTCCATCG	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT
<i>COX-IV</i>	AGAAGGAAATGGCTGCAGAA	GCTCGGCTTCCAGTATTGAG
<i>nos2</i>	TGCTGTTCTCAGCCCAACAA	GAACTCAATGGCATGAGGCA

El análisis estadístico:

Los resultados se analizaron por ANOVA de una vía seguido de Bonferroni de comparación múltiple pruebas. Todos los datos fueron analizadas con los programas estadísticos: IBM SPSS Statistics 22 y GraphPad Prim 5 y comparadas con respecto a su control (células sin tratamiento). Las diferencias con * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ se consideraron significativos en cada experimento.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE FACTORES ENDOCRINOS COMO MELATONINA Y PROLACTINA, Y DE ADIPOQUINAS COMO LEPTINA EN LA MODULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN ASOCIADA A PROCESOS NEURODEGENERATIVOS.

José Iván Patraca Fierro

Dipòsit Legal: T 242-2016

RESULTADOS

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE FACTORES ENDOCRINOS COMO MELATONINA Y PROLACTINA, Y DE ADIPOQUINAS COMO LEPTINA EN LA MODULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN ASOCIADA A PROCESOS NEURODEGENERATIVOS.

José Iván Patraca Fierro

Dipòsit Legal: T 242-2016

Publicación 1

Melatonin suppresses nitric oxide production in glial cultures by pro-inflammatory cytokines through p38 MAPK inhibition

A. Vilar, L. de Lemos, **I. Patraca**, N. Martínez, J. Folch, F. Junyent, E. Verdaguer, M. Pallàs, C. Auladell, A. Camins.

Se ha demostrado que la melatonina regula las respuestas inflamatorias y proporciona neuroprotección ante la inflamación. Sin embargo, los mecanismos subyacentes y las propiedades anti-inflamatorias de melatonina son poco conocidas. En el presente trabajo, se estudió el efecto modulador de la melatonina contra las citoquinas pro-inflamatorias en cultivos de células gliales. El tratamiento con citocinas pro-inflamatorias principalmente factor de necrosis tumoral alfa, interleucina 1-beta, y gamma-interferón (TNF α , IL-1 β e IFN γ), inducen un aumento de expresión de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y producción de óxido nítrico (ON). El pre-tratamiento con melatonina produce un efecto inhibitor sobre la expresión de iNOS y la producción de ON. Los estudios bioquímicos revelaron que la agresión por citoquinas *in vitro* favorece la activación de varias vías, tales como MAPKs, STAT1, y STAT3; sin embargo, el efecto anti-inflamatoria de la melatonina sólo fue acompañado por una disminución en la actividad de p38-MAPK. Del mismo modo, el inhibidor SB203580 de la vía p38-MAPK resultó bloquear la producción de ON en cultivos gliales mixtos. Estos datos indican que la acción anti-inflamatoria de la melatonina en las células gliales después de la estimulación con citoquinas pro-inflamatorias puede ser en parte atribuible a la inhibición de p38-MAPK que se regula la baja la expresión de iNOS y la producción de ON.

José Iván Patraca Fierro
Dipòsit Legal: T. 242-2016
This article was downloaded by: [Universitat Rovira I Virgili]

On: 04 September 2015, At: 01:35

Publisher: Taylor & Francis

Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: 5 Howick Place,
London, SW1P 1WG



[Click for updates](#)

Free Radical Research

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.tandfonline.com/loi/lfra20>

Melatonin suppresses nitric oxide production in glial cultures by pro-inflammatory cytokines through p38 MAPK inhibition

A. Vilar^a, L. de Lemos^b, I. Patraca^c, N. Martínez^c, J. Folch^c, F. Junyent^{bc}, E. Verdaguer^a, M. Pallàs^b, C. Auladell^a & A. Camins^b

^a Departament de Biologia Cel·lular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

^b Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia Facultat de Farmàcia, Centres de Investigació Biomèdica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Institut de Biomedicina, Universitat de Barcelona, Nucli Universitari de Pedralbes, Barcelona, Spain

^c Unitat de Bioquímica, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain

Accepted author version posted online: 24 Sep 2013. Published online: 11 Oct 2013.

To cite this article: A. Vilar, L. de Lemos, I. Patraca, N. Martínez, J. Folch, F. Junyent, E. Verdaguer, M. Pallàs, C. Auladell & A. Camins (2014) Melatonin suppresses nitric oxide production in glial cultures by pro-inflammatory cytokines through p38 MAPK inhibition, *Free Radical Research*, 48:2, 119-128

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.3109/10715762.2013.845295>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Taylor & Francis makes every effort to ensure the accuracy of all the information (the "Content") contained in the publications on our platform. However, Taylor & Francis, our agents, and our licensors make no representations or warranties whatsoever as to the accuracy, completeness, or suitability for any purpose of the Content. Any opinions and views expressed in this publication are the opinions and views of the authors, and are not the views of or endorsed by Taylor & Francis. The accuracy of the Content should not be relied upon and should be independently verified with primary sources of information. Taylor and Francis shall not be liable for any losses, actions, claims, proceedings, demands, costs, expenses, damages, and other liabilities whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with, in relation to or arising out of the use of the Content.

This article may be used for research, teaching, and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, redistribution, reselling, loan, sub-licensing, systematic supply, or distribution in any form to anyone is expressly forbidden. Terms & Conditions of access and use can be found at <http://www.tandfonline.com/page/terms-and-conditions>

ORIGINAL ARTICLE

Melatonin suppresses nitric oxide production in glial cultures by pro-inflammatory cytokines through p38 MAPK inhibition

A. Vilar¹, L. de Lemos², I. Patraca³, N. Martínez³, J. Folch³, F. Junyent^{2,3}, E. Verdaguer¹,
M. Pallàs², C. Auladell¹ & A. Camins²

¹Departament de Biologia Cel·lular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain, ²Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia Facultat de Farmàcia, Centros de Investigació Biomèdica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Institut de Biomedicina, Universitat de Barcelona, Nucli Universitari de Pedralbes, Barcelona, Spain, and ³Unitat de Bioquímica, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain

Abstract

Melatonin has been shown to down-regulate inflammatory responses and provide neuroprotection. However, the mechanisms underlying the anti-inflammatory properties of melatonin are poorly understood. In the present work, we studied the modulatory effect of melatonin against pro-inflammatory cytokines in glial cell cultures. Treatment with pro-inflammatory cytokines mainly tumor necrosis factor-alpha, interleukin 1-beta, and interferon-gamma induces an increase in inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression and nitric oxide (NO) production. Pre-treatment with melatonin produced an inhibitory effect on iNOS expression and NO production. The biochemical studies revealed that cytokine treatment favors the activation of several pathways, such as mitogen-activated protein kinases (MAPKs), STAT1, and STAT3; however, the anti-inflammatory effect of melatonin was accompanied only by a decrease in p38 MAPK activity. Likewise, SB203580 a p38 kinase inhibitor inhibits NO production. These data indicate that the anti-inflammatory action of melatonin in glial cells after stimulation with pro-inflammatory cytokines may be in part, attributable to p38 inhibition which down-regulates iNOS expression and NO production.

Keywords: melatonin, nitric oxide, glial cells, inflammation

Introduction

It is well established that neuroinflammatory processes contribute to the cascade of events that participate in the progressive process of neuronal loss observed in many neurodegenerative diseases, most notably in Parkinson's disease (PD) and Alzheimer's disease (AD) [1,2]. Thus, drugs which are able to slow the brain inflammatory cascade may be of interest for the treatment of the aforementioned diseases [1,3]. As such, the use of non-steroidal anti-inflammatory drugs has been proposed to delay or even to prevent the onset of such neurodegenerative disorders [3]. However, to date, the main problem is that the majority of current drug treatments are effective only in treating the symptoms of these neurodegenerative disorders rather than in preventing the underlying degeneration of neurons. Consequently it is necessary to develop therapies capable of preventing or delaying the progressive loss of neuronal populations in these diseases.

With neuroinflammatory reaction, the glial cells, mainly microglia and astrocytes, are activated [4,5] and produce neurotoxic factors that contribute to neuronal injury. Of these factors, we can emphasize, nitric oxide

(NO), pro-inflammatory cytokines, reactive oxygen species, and glutamate increase [6–10]. In this glial process of activation, the excessive levels of NO are generated via the increased expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS), mainly as a result of microglial activity [6,7,9]. Likewise, this amount of NO production is harmful for neurons because it is a free radical which induce protein modifications by means of nitrosylation and nitration [7]. Accordingly, activation of iNOS in glial cells constitutes a critical event in inflammatory-mediated neurodegenerative disorders [9]. Thus, pro-inflammatory cytokines, mainly tumor necrosis factor-alpha (TNF α), interleukin 1-beta (IL1 β), and interferon-gamma (IFN γ), will be responsible for iNOS induction in glial cells and enhance the increase in NO production, which is probably one of the main mediators of neuronal cell loss [8,10–15]. Moreover, other signaling pathways, such as the mitogen-activated protein kinase (MAPK) and the NF- κ B signaling cascade, are considered canonical pathways involved in inflammatory-mediated neurodegenerative disorders [12–14]. Currently, three major constituents of the MAPK family have been characterized in mammals: extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2), c-Jun N-terminal

kinases (JNKs) (JNK1, 2, and 3), and p38 MAPKs consisting of four isoforms (α , β , γ , and δ). When activated, these kinases phosphorylate both cytosolic and nuclear target proteins. Previous studies suggest that these signaling cascades are critical for the control of inflammatory processes in the brain, including the activation of microglia in response to cytokines and the induction of iNOS [13,16–18].

Recently, there has been much interest in the neuroprotective effects of melatonin, which has been shown to be effective in protecting against almost all experimental models of neurodegenerative diseases and age-related cognitive decline, such as in beta-amyloid-treated C6 cells, in neurotoxicity induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and parkinsonian toxins, and in KA-induced cell loss and prion protein-mediated neurotoxicity [19–26]. The potential neuroprotective effects of melatonin may reside in a vast number of physiological functions, including its antioxidant properties, its interactions with intracellular signaling pathways, the regulation of cell survival or apoptotic genes, and mitochondrial function [19,22,26].

Few studies have been done with primary glial cell cultures (mixed cultures of astrocytes and microglia) in order to evaluate the anti-neuroinflammatory properties of melatonin. Although astrocytes and microglia are two distinct types of glial cells in the central nervous system (CNS) with differences in morphology and functional properties, they are regarded as immune active cells, and in some instances, they share common innate immune responses [26–30]. Moreover, astrocytes exert important functions in the brain, among them synthesis of neurotrophic factors, ion homeostasis, and regulation of extracellular glutamate concentration [27–30]. Moreover glial cells play a crucial role in the normal functioning of the CNS [30].

The aim of the present work was to assess the anti-inflammatory potential of melatonin in mixed glial cell cultures treated simultaneously with three pro-inflammatory cytokines, TNF α , IL1 β , and IFN γ , and consequently inducing high production of NO [27,28]. The results obtained supported the conclusion that melatonin has effects on the inhibition of NO production and on iNOS expression after cytokine treatments, giving support to the anti-oxidant potential of this compound and to its potential application in the treatment of neurological disorders.

Materials and methods

Animals and in vitro cell culture procedure

Three-day-old pups of C57BL/6 mice (Harlan, IN, USA) were used in this study. All animal care and experimental protocols with post-natal pups were carried out in accordance with the Directive 86/609EEC of the Council of the European Union and the procedure established by the Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca of the

Generalitat de Catalunya. Every effort was made to minimize animal suffering and reduce the number of animals used.

Mixed glial cell cultures were prepared from the cerebral cortices of 3-day-old C57BL/6 mice. Briefly, cerebral cortices were dissected and meninges removed. The tissue was incubated with trypsin solution (Trypsin 0.05% (w/v) trypsin-EDTA 5 mM) for 15 min at 37°C. After that, the tissue was fragmented with a fire-polished Pasteur pipette. The dissociated cells were plated into 60-mm diameter culture plates (300,000 cells/ml) and grown in Dulbecco's Modified Eagle's/F-12 medium, supplemented with 10% fetal bovine serum, 2% 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid, N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid), 100 units/ml penicillin, and 100 μ g/ml streptomycin. Fresh medium was changed the next day and then every 3 days afterwards. All experiments were done 7–9 days after plating.

Cell treatment

Glial cultures were treated with pro-inflammatory cytokines (TNF α , 20 ng/ml; IL1 β , 20 ng/ml; IFN γ , 20 ng/ml) (PeproTech Inc., Rocky Hill, NJ, USA) or with the same volume of phosphate buffer saline (PBS) as the control. As indicated, cells were pre-treated with melatonin (1 mM; Sigma, St. Louis, MO, USA) 1 h prior to cytokine treatments or with melatonin alone as a control. In addition, cells were pre-treated with either SB203580 kinase inhibitor (Calbiochem, EMD Millipore USA) or melatonin, at concentrations ranging from 10 μ M to 1 mM, and in order to test the specificity of melatonin inhibitory effect on p38 pathway.

Cell viability

Cell viability assays were performed after 48 h of treatment and were determined using 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide [MTT; Sigma, St. Louis, MO, USA] assay, crystal violet, and Hoechst staining. MTT was added to the cells at a final concentration of 250 μ M and incubated for 4 h at 37°C allowing the formation of formazan crystals. Then, the media were removed and formazan crystals were dissolved with DMSO. Formazan production was measured by the absorbance at 540 nm using a spectrophotometer (Microplate Spectrophotometer Benchmark Plus Bio-Rad). For crystal violet staining, cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 20 min at room temperature (RT). After that, cells were washed twice with PBS, incubated 30 min at RT in a 0.25% crystal violet solution, washed twice again with PBS, and left to dry. Finally a 30% acetic acid solution was added to remove the dye incorporated in the cells and absorbance was read at 590 nm. For nuclei staining, cells were plated onto glass coverslips. After treatments, cells were fixed as described above, incubated for 10 min with Hoechst 33342 (1 μ g/ml, Sigma, St. Louis, MO, USA) and then washed again. Coverslips were mounted with Fluoromont-G (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA,

USA), and conserved at 4°C until observation in the fluorescent microscope (Olympus BX61). All viability results were expressed as percentages with respect to non-treated cells.

Immunofluorescence

Mixed glial cell cultures were plated onto glass coverslips. After treatments, cells were fixed as described above. After washing three times with PBS containing 0.02% Triton X-100 (PBST), nonspecific binding of antibodies was blocked by 5% Bovine Serum Albumin for 30 min at RT. Then cells were washed twice with PBST and incubated with rabbit anti-Iba1 antibody at 4°C overnight (ON) (1:1000, Wako Chemicals, Richmond, VA, USA) to detect microglial cells. After three washes with PBST, cells were incubated for 90 min at RT with goat anti-rabbit AlexaFluor 594 secondary antibody (1:500; Life Technologies). Cells were washed three times with PBST before incubation for 90 min at RT with monoclonal antibody against GFAP (1:500; Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) After that, cells were washed and incubated with goat anti-mouse AlexaFluor 488 secondary antibody (1:500; Life Technologies). Finally, cells were incubated with Hoechst for 10 min and washed twice with PBS. Stained cover-slips were mounted onto microscope slides with Fluoromont-G (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) and immunostaining was observed under the microscope (Olympus BX61).

NO measurement

NO released from glial cells was converted to nitrite in the culture medium, which can be determined using the Griess reaction. Culture medium was collected after 48 h of treatments and an equal volume of Griess reagent was added (sulfanilamide 1%, α -naphthylethylenediamine dihydrochloride 0.1%, and 2.5% phosphoric acid). Absorbance was read in a spectrophotometer at 540 nm and sodium nitrite was used as a standard. From the same dishes, protein concentrations were measured using bicinchoninic acid (Pierce Company, Rockford, IL, USA) in order to normalize the nitrite concentrations.

Western blot

After treating cells with cytokines and melatonin, cells were washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline and harvested in lysis buffer containing 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 50 mM Tris, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, and pH 7.2 with protease inhibitors (Complete, Roche Diagnostics, Germany). Protein concentration was determined using bicinchoninic acid protein assay with the Pierce BCA Protein Assay Kit (Pierce Company, Rockford, IL, USA). Ten microgram of protein was denatured at 95°C for 5 min in sample buffer (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, 10% glycerol, 2% sodium dodecyl sulfate (SDS), 5% β -mercaptoethanol, and 0.05% bromophenol blue) and samples were subjected to

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (7.5% Acrylamide: N,N'-methylbisacrylamide, 37,5:1; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and subsequently transferred onto polyvinylidene fluoride membrane (Immun-Blot PVDF Membrane, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Membranes were incubated ON at 4°C with primary antibodies against phospho-JNK (Thr183/Tyr185), phospho-c-Jun (Ser73), phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr203), iNOS, phospho-Stat1 (Tyr701), phospho-Stat3 (Tyr705), IKB α , and β -actin (1:20000; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The blots were then washed thoroughly in TBS-T and incubated for 2 h with a horseradish peroxidase-conjugated anti-IgG antibody, followed by the enhanced chemiluminescence detection system (Molecular Image Quantity ChemiDoc XRS+ BioRad) according to the supplier's instructions. Chemiluminescence measurements and semi-quantitative values were obtained using the corresponding software Imagelab (Bio-Rad) and the results were expressed as a percentage with respect to control. The corresponding β -actin was taken for each sample to normalize for any differences in gel loading.

p38 activity assay

P38 activity assay was performed using the p38 MAP Kinase Assay Kit (Cell signaling) following the manufacturer's recommendations. Briefly, p38 was immunoprecipitated from 200 μ g protein. After that, the samples were washed and centrifuged twice with lysis buffer and kinase buffer discarding supernatants. ATP, protein fusion (ATF), and kinase buffer were added to each sample, which was then incubated at 37°C for 30 min. After that, samples were used to follow the western blot protocol described previously. The primary antibody was pATF2 in a 1:1000 dilution. Chemiluminescence measurements and semi-quantitative values were obtained using the corresponding software Imagelab (Bio-Rad) and the results were expressed as a percentage with respect to control.

RT-PCR

Total RNA was isolated from mixed glial cultures treated with cytokines and melatonin at 6 and 24 h. Briefly, cells were homogenized in the presence of Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (Sigma-Aldrich, MO, USA). Chloroform was added and the RNA was precipitated from the aqueous phase with isopropanol at 4°C. RNA was reconstituted in RNase-free water. The RNA quality and concentration were evaluated by NanoDrop ND-1000 spectrophotometry (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA).

First-strand cDNA was reverse transcribed from 1 μ g of total RNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). The same amounts of cDNA were subsequently used for qRT-PCR and each sample was analyzed in triplicate. The Taqman Gene Expression Assay (Applied

Biosystems) was used for the *nos2* gene and data were obtained with the MiniOpticon Real-Time PCR system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) and normalized to GAPDH using the delta-delta Ct method.

Statistical analysis

Results were analyzed by one-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison tests. Differences with $p < 0.05$ were considered significant.

Results

Effect of cytokines on glial viability

Firstly, we evaluated the viability of cell culture under each different treatment by MTT, crystal violet, and Hoechst assays. The results obtained evidence that any treatment (cytokines alone, melatonin, and the combination of melatonin and cytokines) affected cell viability (Figure 1).

Likewise glial cell culture was characterized using specific antibodies (see material and methods) (Figure 2). As shown in the Figure 2, we used two specific antibodies, GAF (marker of astrocytes) and IBA-1 (marker of microglial cells). Following treatment with cytokines an activation of microglial cells was observed.

Cytokine treatment induces an increase in glial NO production

To investigate whether cytokine-treated glial cells increase NO production, we treated primary glial cells with different pro-inflammatory cytokines, such as TNF α , IL1 β , and IFN γ . Treatments were done individually, in combinations of two (TNF α -IFN γ , TNF α -IL1 β , and IL1 β -IFN γ), and with all three cytokines. To determine NO production, we measured nitrite released into the culture medium using the Griess reagent. Only the combinations TNF α -IFN γ , IL1 β -IFN γ , and TNF α -IL1 β -IFN γ showed a significant NO increment respect control (Figure 3A). The most significant increment was obtained when cells were treated with three cytokines together. Then, we tested NO synthesis at 24, 48, and 72 h in cells treated with TNF α , IL1 β , and IFN γ . Results showed a progressive increase of NO levels at 48 and 72 h after cytokine treatment (Figure 3B). Since the combination of the three pro-inflammatory cytokines was the treatment that resulted in the greatest induction of NO production, the following experiments were performed with this treatment.

Melatonin decrease NO production mediated by cytokines in glial cells

When glial cells were pre-treated with melatonin before cytokine treatment, the production of NO was significantly inhibited (Figure 4A). The observed inhibition is proportional to melatonin concentration and can be

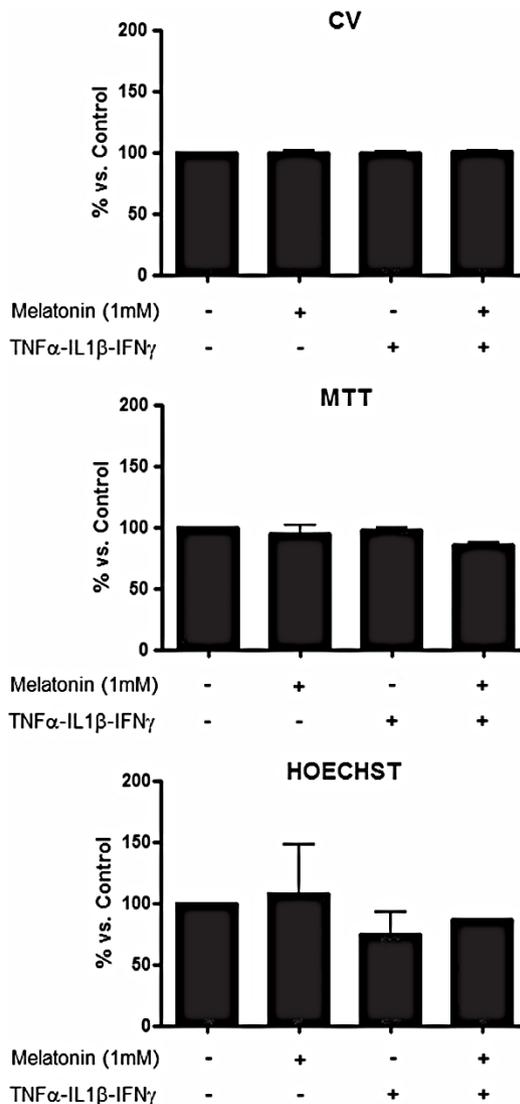


Figure 1. Treatment of glial cell cultures with three TNF α -IL1 β -IFN γ does not induces cell death. After 48 h of cytokine treatment different cell viability assays were performed (see material and methods). Each point is the mean \pm SEM of three or four independent experiments.

related to the effect of melatonin on p38 pathway, as can be seen when glial cells are pre-treated with the kinase inhibitor SB203580 (Figure 4B).

In addition, to support this diminution of NO, we also evaluated whether melatonin suppresses the induction of *nos2* transcription. Thus, from the different treatments of glial cells, the relative amounts of *nos2* mRNA were determined by real-time RT-PCR. As expected, cytokine treatment induced a marked increase in *nos2* mRNA levels in glial cells, which was reduced by pre-treatment with melatonin (Figure 4C). The inhibitory effects of melatonin on cytokine-induced *nos2* mRNA up-regulation were accompanied by a reduction in iNOS protein levels (Figure 4B). Taken together, our current data prove that

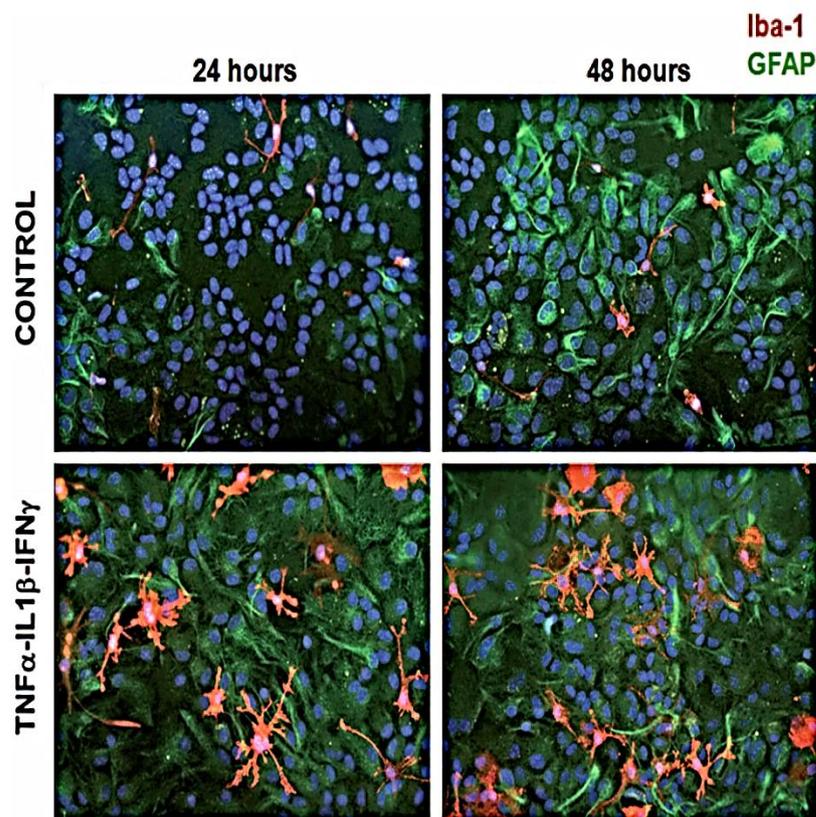


Figure 2. Typical image of glial cultures which have been characterized with two specific glial markers such as GFAP (astrocytes, green) and Iba 1 (microglia, red) at 24 and 48 h. Likewise, Hoechst (blue), it is also used to marked the cell nuclei. For further details see materials and methods.

melatonin inhibits the inflammatory activation of glial cells with respect to *nos2* induction and NO production.

Molecular pathways involved in NO generation by cytokines in glial cells

MAPKs are known to play an important role in the signaling pathways that induce pro-inflammatory cytokines and iNOS increase in glial cells [13,16–18]. Western blot analyses showed that the combination of the three cytokines, TNF α -IL1 β -IFN γ , induced the activation of different MAPK proteins. More specifically, a time-course analysis evidenced the activation of JNK and its substrate c-Jun at ser73, and p38, while no hyperphosphorylation of ERK1/2 was observed at any time under these experimental conditions (Figure 5). These activations occurred between 30 min and 1 h after treatment. Moreover, pro-inflammatory pathways, such as STAT-1 and STAT-3, were activated after 30 min of cytokine treatment, together with a decrease in IKB α levels, indicating the activation of NF κ B (Figure 5).

Melatonin inhibits p38 signaling pathway in glial cells

To investigate whether the inhibition of *nos2* induction and NO production by melatonin is regulated by one of

these pathways, we examined the effects of melatonin on cytokine-induced phosphorylation of JNK, c-Jun, STAT-1, STAT-3, IKB α , and p38 MAPK activity. Pre-treatment with 1-mM melatonin before incubation with cytokines only inhibited the activity of the MAPK p38. The phosphorylation of JNK, ERK, STAT1, STAT3, and IKB α levels was not affected (Figures 6 and 7). Strikingly, melatonin only inhibits the p38 MAPK activity in glial cell cultures.

Discussion

Neuroinflammation is involved in the pathology of neurodegenerative disease through the expression of cytotoxic mediators, especially pro-inflammatory cytokines and free radicals [4,12,14,17,31]. It is well known that inflammatory mediators are able to activate glial cells and trigger the expression of different genes, such as *nos2*.

Likewise, iNOS contributes to NO synthesis, increasing free radical formation and promoting brain damage [4,5,7–10]. High levels of NO exert their toxic effects through multiple mechanisms, including lipid peroxidation, mitochondrial damage, protein nitration and oxidation, depletion of antioxidant reserves, activation or inhibition of various signaling pathways, and DNA

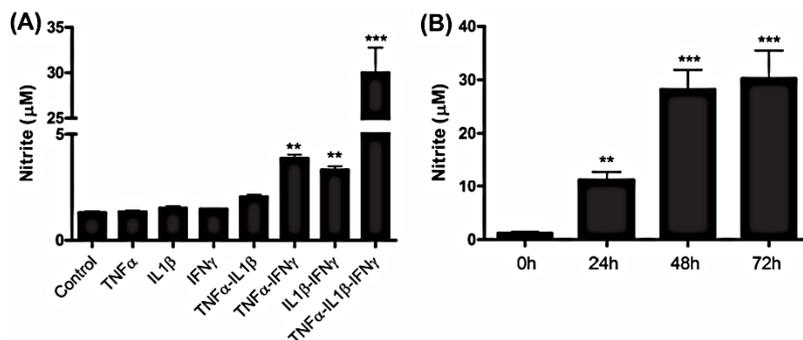


Figure 3. (A) Nitrite levels in medium of glial cells at 48 h of treatment with different cytokines and their combinations. (B) Nitrite levels at 24, 48, and 72 h after treatment with TNFα-IL1β-IFNγ. Each point is the mean ± SEM of three independent experiments. (**, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ with respect to control).

damage [1,6,7,12]. Thus, NO produced by iNOS seems to be a key mediator of such glial activation induced neuronal death [7]. In the present study we demonstrated that melatonin counteracted both the over-expression of *nos2* mRNA and the production of NO induced by pro-inflammatory cytokines. Likewise, nitrite release after glial activation by pro-inflammatory cytokines may be a potential pathological event responsible for neuronal degeneration in neighboring neurons [6,12,14,29]. Inter-

estingly, we demonstrated this immunomodulatory effect of melatonin in primary glial culture. Melatonin inhibits *nos2* expression and, consequently, the increase in iNOS protein levels and NO production. Moreover, previous studies have described that up-regulation of iNOS is involved in neuronal degeneration associated with PD and AD [12,14,25,31]. Therefore, this immunomodulatory effect of melatonin on glial cell activation might partly explain its central role in brain neuroprotective action. The

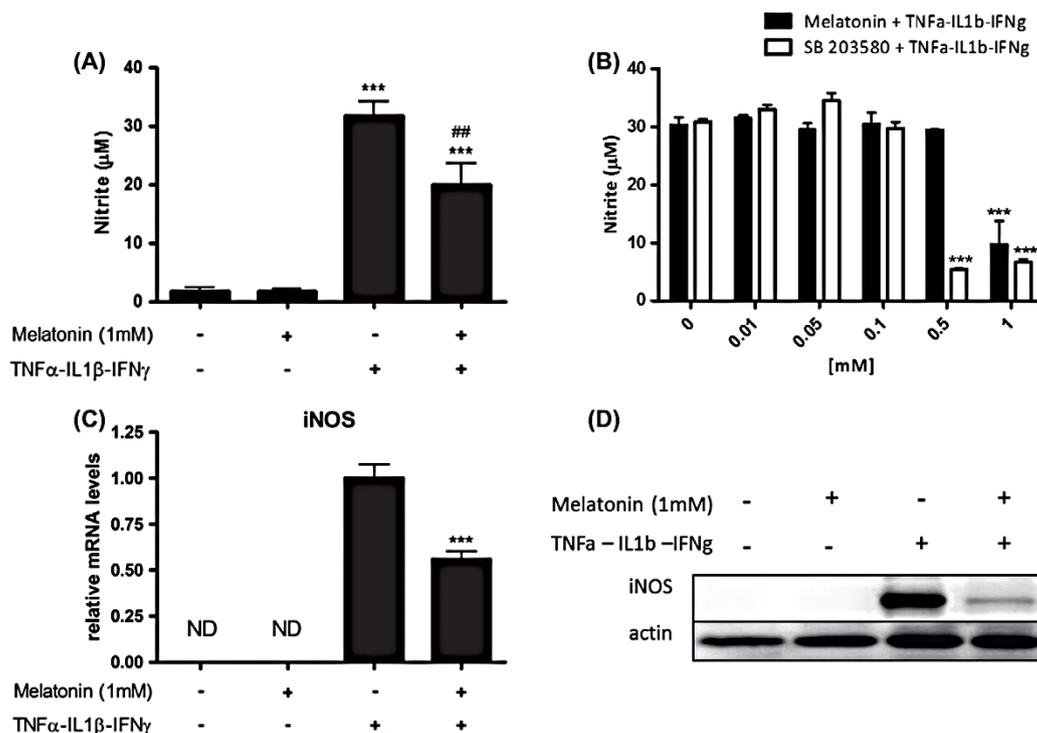


Figure 4. (A) Nitrite levels at 48 h in medium of non-treated cells, melatonin (1 mM)-treated cells, cytokine-treated cells and melatonin pre-treated cells before cytokine treatment. (B) Nitrite levels at 48 h in medium of cytokine-treated cells, pre-treated with concentrations ranging from 10 μM to 1 mM of either melatonin or the specific kinase inhibitor SB203580. Both SB203580 and melatonin reduced significantly nitrite levels at 0.5 mM and 1 mM, respectively. (C) *nos2* mRNA levels at 6 h of different treatments. (D) Western blot against iNOS at 24 h of different treatments. Each point is the mean ± SEM of three independent experiments. (***, $p < 0.001$ with respect to vehicle control and ##, $p < 0.01$ for melatonin pre-treated cells with respect to cytokine alone treated cells).

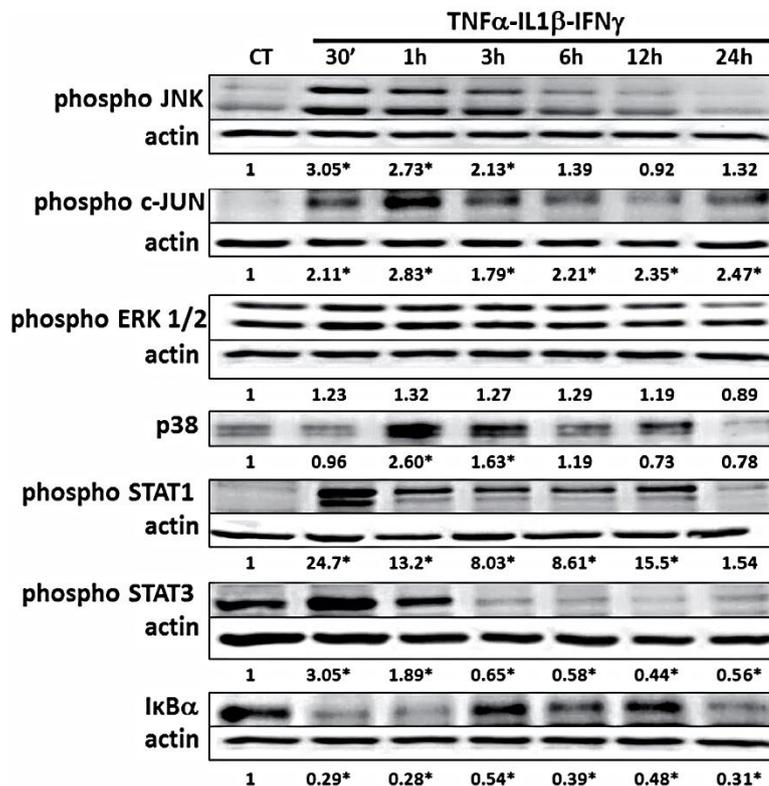


Figure 5. Western blots against phospho JNK, phospho c-Jun, phospho ERK1/2, phospho STAT1, phospho STAT3, I κ B α , and p38 activity at different time points after cytokine treatment. All western blots were normalized with actin. For each point, the mean value of three independent experiments is presented. (*, $p < 0.05$ with respect to vehicle control).

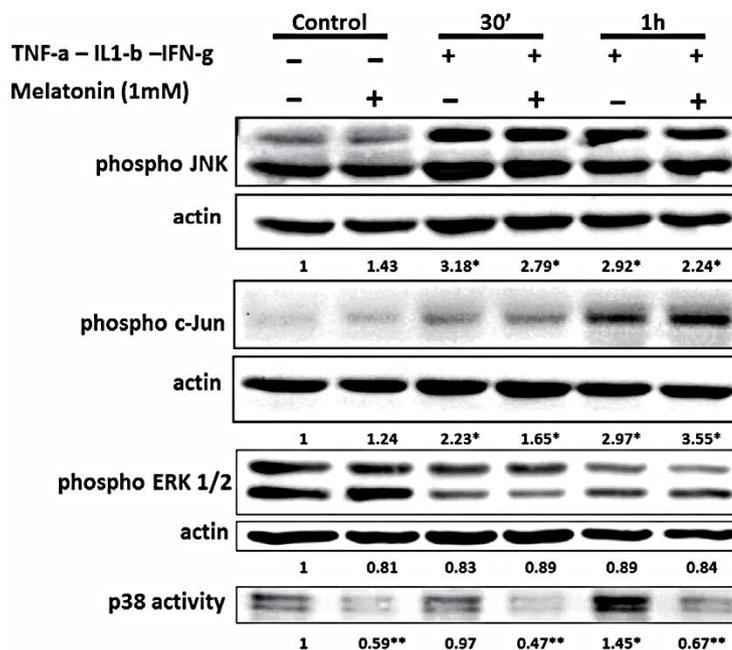


Figure 6. Western blots against phospho JNK, phospho c-Jun, phospho ERK1/2, p38 activity at 30 min and 1 h after cytokine treatment with or without melatonin pre-treatment. All western blots were normalized with actin. For each point, the mean value of three independent experiments is presented. (*, $p < 0.05$ with respect to vehicle control and #, $p < 0.05$ with respect to melatonin pre-treated cells).

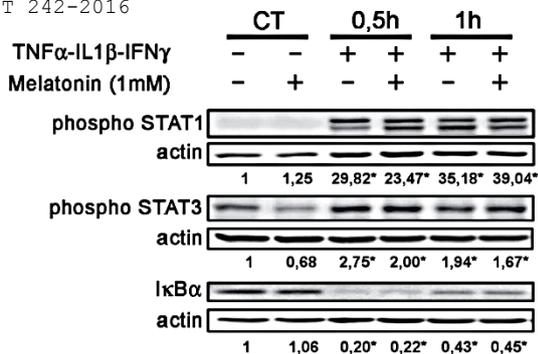


Figure 7. Western blots against phospho STAT1, phospho STAT3, and I κ B α , at 30 min and 1 h after cytokine treatment with or without melatonin pre-treatment. For each point, the mean value of three independent experiments is presented. (*, $p < 0.05$ with respect to vehicle control).

study of melatonin effects on glial cells is particularly important, considering the coexistence of neurons and glia in the brain. The interactions of different cell types under damaging conditions have an important role since they can favor the process of cell death or neuroprotection.

Likewise, neurotoxic molecules, such as MPTP and β -amyloid, may induce iNOS in glial cells [6,7,24]. Indeed, in amyotrophic lateral sclerosis (ALS), iNOS immunoreactivity is showed in activated astrocytes [19]. All these experiments give support to the involvement of iNOS in neurological disorders.

Several reports have previously described that melatonin down-regulated iNOS induction in various models such as in the C6 astrocytoma cell line after treatment with the parkinsonian neurotoxin MPTP, in renal tissues, and in the liver of SAMP8 [32,33]. In addition, melatonin has been used as a model to design and synthesize new families of compounds that act as NOS inhibitors and as potential neuroprotective drugs [34]. However, the mechanism involved in melatonin-induced iNOS inhibition in glial cells mediated by pro-inflammatory cytokines is not clearly understood [27,28,35,36].

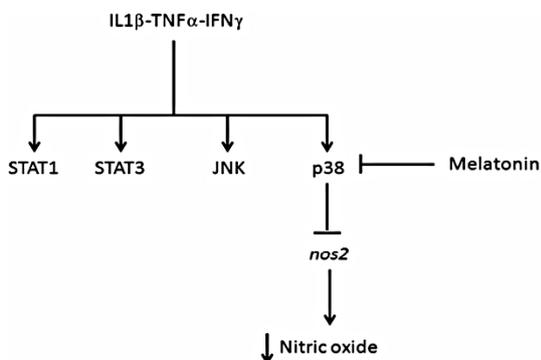


Figure 8. Pro-inflammatory cytokines activate different pathways in glial cells. Cytokines induce an increase of NO through an induction of *nos2* expression. Melatonin inhibits NO production, since it partially inhibits the expression of *nos2*, through the inhibition of p38 MAPK.

For this reason, in the present study we also investigated the signaling pathways involved in pro-inflammatory cytokines. As shown in Figure 3, cytokines trigger the activation of several pathways, such as the JNK and p38 kinase, which are known to be intimately involved in the inflammatory process and apoptosis. In addition, we found a significant increase in STAT1 and STAT3 phosphorylation. Moreover, the levels of I κ B α decreased, indicating the activation of NF κ B. In the present study, we demonstrated that melatonin was only able to inhibit p38 MAPK specifically, without affecting the other pathways, as can be shown by the exposure of cells to a p38 specific inhibitor SB203580. The p38 MAPK family consists of highly conserved proline-directed serine/threonine protein kinases that are activated in response to inflammatory signals [13]. These protein kinases differ in their tissue distribution, regulation of kinase activation, and subsequent phosphorylation of downstream substrates [17,18]. Interestingly, in recent studies on C6 astrocytoma cells, it has been demonstrated that MPTP regulated iNOS activity through p38 activation and was also inhibited by melatonin [33].

Previous studies have shown that MAPKs are involved in cytokine-mediated iNOS induction in astrocytes, oligodendrocytes, and microglial cells. Moreover, the p38 MAPK was found to play an important role in *nos2* gene expression in response to cytokine and some stimuli, such as taxol [27,28]. Likewise, both the p38 MAPK and JNK pathways could function in parallel in the process of glial activation. Thus, in the present study, our data indicate that, in mixed glial cells, multiple mechanisms may contribute to the *nos2* expression, including the activation of MAPK, NF κ B, and JAK-STAT pathways; however, melatonin specifically inhibits only p38.

In addition to glial activation, p38 MAPK is also recognized as a kinase responsible for excessive tau phosphorylation in AD [37]. Likewise the p38 MAPK cascade is involved in the regulation of the memory process mainly, through induction of mGluR-dependent LTD in the hippocampus [38]. Accordingly, all these studies suggest that activation of p38 MAPK accompanies memory deficit in AD. Moreover, in a model of transient focal cerebral ischemia, antisense knockdown of *NOS2* mRNA significantly reduced ischemic brain lesion [39]. On the other hand, in experimental models of PD and inflammation, iNOS inhibition ameliorates all the symptomatology of this neurodegenerative process [34,40,41].

Emphasize that melatonin concentrations used in our study and therefore the immunomodulatory effects are in line with the anti-inflammatory effects of melatonin in other cell lines specifically macrophages and BV2 murine microglial cell line [42,43].

In summary, the present study demonstrates that pro-inflammatory cytokines activate glial cells increasing NO production through a sustained activation of MAPK and STAT pathways. However melatonin significantly only prevents p38 MAPK activation following cytokine treatment, enough to reduce the *nos2* expression and subsequent nitrite release (Figure 8). Our data suggest that,

in addition to the well-known free radical scavenger properties of melatonin, neuroprotective effects may be also mediated by the inhibition of nitrite release by glial cells through the inhibition of *nos2* expression. For that reason, we propose that this hormone may be a promising therapeutic strategy in neuroinflammatory-associated disorders.

Acknowledgments

We thank the Language Advisory Service of the University of Barcelona for revising this manuscript.

Declaration of interest

The authors report no declarations of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

This study was funded by grant 2009/SGR00853 from the Generalitat de Catalunya (autonomous government of Catalonia), by grants BFU2010-19119/BFI, SAF2011-23631 and SAF2012-39852-C02-01 from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación.

References

- [1] Khandelwal PJ, Herman AM, Moussa CE. Inflammation in the early stages of neurodegenerative pathology. *J Neuroimmunol* 2011;238:1–11.
- [2] Smith JA, Das A, Ray SK, Banik NL. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases. *Brain Res Bull* 2012;87:10–20.
- [3] Di Stefano A, Iannitelli A, Laserra S, Sozio P. Drug delivery strategies for Alzheimer's disease treatment. *Expert Opin Drug Deliv* 2011;8:581–603.
- [4] Rubio-Perez JM, Morillas-Ruiz JM. A review: Inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines. *Scientific WorldJournal* 2012;75:63–57.
- [5] Suzumura A, Takeuchi H, Zhang G, Kuno R, Mizuno T. Roles of glia-derived cytokines on neuronal degeneration and regeneration. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1088:219–229.
- [6] Brown GC. Mechanisms of inflammatory neurodegeneration: Inos and nadph oxidase. *Biochem Soc Trans* 2007;35:1119–1121.
- [7] Brown GC. Nitric oxide and neuronal death. *Nitric Oxide* 2010;23:153–165.
- [8] Chen M, Sun HY, Li SJ, Das M, Kong JM, Gao TM. Nitric oxide as an upstream signal of p38 mediates hypoxia/reoxygenation-induced neuronal death. *Neurosignals* 2009;17:162–168.
- [9] Saha RN, Pahan K. Signals for the induction of nitric oxide synthase in astrocytes. *Neurochem Int* 2006;49:154–163.
- [10] Saha RN, Pahan K. Regulation of inducible nitric oxide synthase gene in glial cells. *Antioxid Redox Signal* 2006;8:929–947.
- [11] Bhat NR, Zhang P, Lee JC, Hogan EL. Extracellular signal-regulated kinase and p38 subgroups of mitogen-activated protein kinases regulate inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor-alpha gene expression in endotoxin-stimulated primary glial cultures. *J Neurosci* 1998;18:1633–1641.

- [12] Brown GC, Neher JJ. Inflammatory neurodegeneration and mechanisms of microglial killing of neurons. *Mol Neurobiol* 2010;41:242–247.
- [13] Kaminska B, Gozdz A, Zawadzka M, Ellert-Miklaszewska A, Lipko M. Mapk signal transduction underlying brain inflammation and gliosis as therapeutic target. *Anat Rec (Hoboken)* 2009;292:1902–1913.
- [14] Sastre M, Klockgether T, Heneka MT. Contribution of inflammatory processes to Alzheimer's disease: molecular mechanisms. *Int J Dev Neurosci* 2006;24:167–176.
- [15] Sheng W, Zong Y, Mohammad A, Ajit D, Cui J, Han D, et al. Pro-inflammatory cytokines and lipopolysaccharide induce changes in cell morphology, and upregulation of erk1/2, inos and *spla(2)-iia* expression in astrocytes and microglia. *J Neuroinflammation* 2011;8:121.
- [16] Bachstetter AD, Van Eldik LJ. The p38 map kinase family as regulators of proinflammatory cytokine production in degenerative diseases of the CNS. *Aging Dis* 2010;1:199–211.
- [17] Ji RR, Suter MR. P38 mapk, microglial signaling, and neuropathic pain. *Mol Pain* 2007;3:33.
- [18] Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mapk signal transduction pathways activated by stress and inflammation: A 10-year update. *Physiol Rev* 2012;92:689–737.
- [19] Barbeito LH, Peñar M, Cassina P, Vargas MR, Peluffo H, Viera L, et al. A role for astrocytes in motor neuron loss in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res Brain Res Rev* 2004;47:263–274.
- [20] Bondy SC, Li H, Zhou J, Wu M, Bailey JA, Lahiri DK. Melatonin alters age-related changes in transcription factors and kinase activation. *Neurochem Res* 2010;35:2035–2042.
- [21] Borah A, Mohanakumar KP. Melatonin inhibits 6-hydroxydopamine production in the brain to protect against experimental parkinsonism in rodents. *J Pineal Res* 2009;47:293–300.
- [22] Carpentieri A, Diaz de Barboza G, Areco V, Peralta Lopez M, Tolosa de Talamoni N. New perspectives in melatonin uses. *Pharmacol Res* 2012;65:437–444.
- [23] Chung SY, Han SH. Melatonin attenuates kainic acid-induced hippocampal neurodegeneration and oxidative stress through microglial inhibition. *J Pineal Res* 2003;34:95–102.
- [24] Feng Z, Zhang JT. Protective effect of melatonin on beta-amyloid-induced apoptosis in rat astrogloma c6 cells and its mechanism. *Free Radic Biol Med* 2004;37:1790–1801.
- [25] Ionov M, Burchell V, Klajnert B, Bryszewska M, Abramov AY. Mechanism of neuroprotection of melatonin against beta-amyloid neurotoxicity. *Neuroscience* 2011;180:229–237.
- [26] Jeong JK, Moon MH, Lee YJ, Seol JW, Park SY. Melatonin-induced autophagy protects against human prion protein-mediated neurotoxicity. *J Pineal Res* 2012;53:138–146.
- [27] Bhat NR, Feinstein DL, Shen Q, Bhat AN. P38 mapk-mediated transcriptional activation of inducible nitric-oxide synthase in glial cells. Roles of nuclear factors, nuclear factor kappa b, camp response element-binding protein, ccaat/enhancer-binding protein-beta, and activating transcription factor-2. *J Biol Chem* 2002;277:29584–29592.
- [28] Bhat NR, Zhang P, Bhat AN. Cytokine induction of inducible nitric oxide synthase in an oligodendrocyte cell line: Role of p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J Neurochem* 1999;72:472–478.
- [29] Verkhratsky A. Physiology of neuronal-glia networking. *Neurochem Int* 2010;57:332–343.
- [30] Verkhratsky A, Kirchhoff F. Glutamate-mediated neuronal-glia transmission. *J Anat* 2007;210:651–660.
- [31] Graeber MB, Li W, Rodriguez ML. Role of microglia in cns inflammation. *FEBS Lett* 2011;585:3798–3805.
- [32] Lee IC, Kim SH, Lee SM, Baek HS, Moon C, Park SC, et al. Melatonin attenuates gentamicin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats. *Arch Toxicol* 2012;86:1527–1536.

- [33] Niranjana R, Nath C, Shukla R. The mechanism of action of MPTP-induced neuroinflammation and its modulation by melatonin in rat astrocytoma cells, c6. *Free Radic Res* 2010; 44:1304–1316.
- [34] Camacho ME, Carrion MD, Lopez-Cara LC, Entrena A, Gallo MA, Espinosa A, et al. Melatonin synthetic analogs as nitric oxide synthase inhibitors. *Mini Rev Med Chem* 2012;12:600–617.
- [35] Bettahi I, Pozo D, Osuna C, Reiter RJ, Acuna-Castroviejo D, Guerrero JM. Melatonin reduces nitric oxide synthase activity in rat hypothalamus. *J Pineal Res* 1996;20:205–210.
- [36] Tocharus J, Chongthammakun S, Govitrapong P. Melatonin inhibits amphetamine-induced nitric oxide synthase mRNA overexpression in microglial cell lines. *Neurosci Lett* 2008; 439:134–137.
- [37] Chang KH, de Pablo Y, Lee HP, Lee HG, Smith MA, Shah K. Cdk5 is a major regulator of p38 cascade: relevance to neurotoxicity in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 2010; 113:1221–1229.
- [38] Ashabi G, Ramin M, Azizi P, Taslimi Z, Alamdary SZ, Haghparast A, et al. Erk and p38 inhibitors attenuate memory deficits and increase creb phosphorylation and pgc-1alpha levels in abeta-injected rats. *Behav Brain Res* 2012;232: 165–173.
- [39] Parmentier-Batteur S, Bohme GA, Lerouet D, Zhou-Ding L, Beray V, Margail I, Plotkine M. Antisense oligodeoxynucleotide to inducible nitric oxide synthase protects against transient focal cerebral ischemia-induced brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001;21:15–21.
- [40] Tapias V, Escames G, Lopez LC, Lopez A, Camacho E, Carrion MD, et al. Melatonin and its brain metabolite n(1)-acetyl-5-methoxykynuramine prevent mitochondrial nitric oxide synthase induction in parkinsonian mice. *J Neurosci Res* 2009;87:3002–3010.
- [41] Niranjana R, Nath C, Shukla R. Melatonin attenuated mediators of neuroinflammation and alpha-7 nicotinic acetylcholine receptor mRNA expression in lipopolysaccharide (LPS) stimulated rat astrocytoma cells, C6. *Free Radic Res* 2012; 46:1167–1177.
- [42] Xia MZ, Liang YL, Wang H, Chen X, Huang YY, Zhang ZH, et al. Melatonin modulates TLR4-mediated inflammatory genes through MyD88- and TRIF-dependent signaling pathways in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells. *J Pineal Res* 2012;53:325–334.
- [43] Min KJ, Jang JH, Kwon TK. Inhibitory effects of melatonin on the lipopolysaccharide-induced CC chemokine expression in BV2 murine microglial cells are mediated by suppression of Akt-induced NF-κB and STAT/GAS activity. *J Pineal Res* 2012;52:296–304.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE FACTORES ENDOCRINOS COMO MELATONINA Y PROLACTINA, Y DE ADIPOQUINAS COMO LEPTINA EN LA MODULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN ASOCIADA A PROCESOS NEURODEGENERATIVOS.

José Iván Patraca Fierro

Dipòsit Legal: T 242-2016

Publicación 2

Leptin suppresses nitric oxide production in murine primary glial cultures, by exposure to pro-inflammatory cytokines, through p38 MAPK pathway inhibition

I. Patraca, N. Martínez, A. Martí, I. Pedrós, D. Petrov, M. Ettcheto, F. Sureda, C. Auladell, A. Camins and J. Folch.

La leptina (LEP) es una adipoquina pleiotrópica codificada por el gen *Ob*. Se identificó y partir de tejido adiposo clonado en de roedores en 1994, y se ha comprobado que desempeña un papel central en el control del peso corporal y la homeostasis energética. La leptina se ha demostrado que regular a la baja las respuestas inflamatorias y proporcionan neuroprotección. Sin embargo, los mecanismos que subyacen a las propiedades anti-inflamatorias de Leptina en el cerebro son controvertidos y a veces mal interpretados. En el presente trabajo se estudió el efecto modulador de Leptina contra citoquinas pro-inflamatoria en cultivos murinos de células gliales. El tratamiento con citocinas proinflamatorias principalmente, factor de necrosis tumoral-alfa (TNF α), la interleucina 1-beta (IL1- β) e interferón gamma (IFN γ), inducen un aumento de la expresión óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y la producción de óxido nítrico. Los resultados mostrados con el tratamiento previo con 500 nM de Leptina ha producido un efecto inhibitorio y anti-inflamatorio sobre la expresión de iNOS y la producción de ON, acompañado por una disminución actividad de la vía de p38-MAPK. Asimismo, el tratamiento con Leptina también redujo la activación de la apoptosis, inhibiendo la liberación de citocromo C (Cyt-c) y la actividad de la caspasa 3.

Journal of Neuroendocrinology

Journal of Neuroendocrinology

**Leptin suppresses cytokine induced nitric oxide production
in murine primary glial cultures through p38 MAPK pathway
inhibition**

Journal:	<i>Journal of Neuroendocrinology</i>
Manuscript ID	JNE-15-0116-OA.R1
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Camins, Antoni; University of Barcelona, Pharmacology and Chemical Chemistry Folch, Jaume; University Rovira i Virgili, Biochemistry Patraca, Ivan; University Rovira i Virgili, Biochemistry Martinez, Nohora; University Rovira i Virgili, Biochemistry Marti, Aleix; University Rovira i Virgili, Biochemistry Sureda, Francesc; University Rovira i Virgili, Biochemistry Petrov, Dmitry; University of Barcelona, Pharmacology Etcheto, Miren; University of Barcelona, Pharmacology Auladell, Carme; University of Barcelona, Pharmacology Busquets, Oriol; University Rovira i Virgili, Biochemistry
Keywords:	Adiponectin, Cytokines, Leptin, NO; NOS

SCHOLARONE™
Manuscripts

Only

Leptin suppresses nitric oxide production in murine primary glial cultures, by exposure to pro-inflammatory cytokines, through p38 MAPK pathway inhibition

Iván Patraca^{1,3}, Nohora Martínez^{1,3}, Aleix Martí¹, Ignacio Pedrós^{1,2}, Dmitry Petrov^{2,3}, Miren Ettcheto^{2,3}, Francesc Sureda^{1,3}, Carme Auladell⁴, Antoni Camins^{2,3} and Jaume Folch^{1,3}

¹*Unitats de Bioquímica i Farmacologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili, C./ St. Llorenç 21 43201 Reus (Tarragona), Spain.*

²*Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia Facultat de Farmàcia, Institut de Biomedicina (IBUB), Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain.*

³*Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED). Instituto de Salud Carlos Tercero. Madrid, Spain.*

⁴*Departament de Biologia Cel·lular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain.*

RUNNING TITLE: Anti-inflammatory role of Leptin in glial cells.

Correspondence and reprint requests to: Antoni Camins PhD

Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Facultat de Farmàcia Universitat de Barcelona, Spain.

Avda/ Diagonal 643, E-08028 Barcelona, Spain.

Tel: +34 93 4024531, Fax: +34 934035982

Email: camins@ub.edu

KEYWORDS: Leptin, Glial cells, iNOS, p38 MAPK, Caspase-3, Cytochrome-c

ABSTRACT

Leptin (Lep) is a pleiotropic cytokine encoded by the *ob* gene. It was identified and cloned from rodent adipose tissue in 1994, and plays a central role in the control of body weight and energy homeostasis. Leptin has been shown to down-regulate inflammatory responses and provide neuroprotection. However, the mechanisms underlying the anti-inflammatory properties of Lep in brain are controversial and poorly understood. In the present work, we studied the modulatory effect of Lep against pro-inflammatory cytokines in glial cell cultures. Treatment with pro-inflammatory cytokines mainly, tumor necrosis factor-alpha (TNF α), interleukin 1-beta (IL1 β) and interferon-gamma (IFN γ) induces an increase in inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression and nitric oxide production. Results shown that pre-treatment with 500nM Lep produced an inhibitory effect on iNOS expression and NO production, accompanied by a decrease in p38 MAP Kinase (MAPK) pathway activity. Treatment with Lep also reduced the activation of apoptosis through cytochrome c (Cyt-c) release and caspase-3 inhibition. Then, Lep would act as an anti-inflammatory factor in glial cells exposed to pro-inflammatory cytokines, exerting its function at different levels: acting on p38 MAPK pathway and reducing its activity and NO production; acting on mitochondrial drivers of apoptosis and reducing their content, like for Cyt-c, and activity as in the case of the executioner caspase-3.

1. Introduction

Chronic inflammatory processes are common in obesity, cancer and neurodegenerative diseases like Alzheimer's disease (AD). In this context, it is well established that deregulation of glial cell activity, and chronic neuroinflammatory processes, contribute to the cascade of events that participate in the progressive process of neuronal loss observed in many neurodegenerative diseases, most notably in Parkinson's disease (PD) and AD [1,2]. Specifically in the AD, the apoE4 genotype, lifestyle-induced obesity and dyslipidemia could be considered as systemic inflammatory stimuli, whereas β -amyloid and Tau protein accumulation are considered a local stimulus.

The involvement of microglia and astrocytes in the onset and progress of neurodegeneration in AD is increasingly well characterized [3]. Recent findings demonstrate different roles for glial cells such as maintenance of brain plasticity and brain protection to ensure functional recovery from injuries. Dysfunction of glial cells may promote neurodegeneration and, eventually, the retraction of neuronal synapses, which leads to cognitive deficits [3, 4]. With neuroinflammatory reaction, the glial cells, mainly microglia and astrocytes, are activated [5, 6] and produce neurotoxic factors as nitric oxide, pro-inflammatory cytokines, reactive oxygen species, and glutamate increase [7-11]. The release of these factors is a key event that contributes to neuronal injury.

Pro-inflammatory cytokines, mainly $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL1}\beta$ and $\text{IFN}\gamma$, will be responsible for inducible iNOS induction in glial cells and enhance nitric oxide production [9-16]. The excessive levels of nitric oxide are harmful for neurons because it is a free radical which induce protein modifications by means of nitrosylation and nitration, which is probably one of the main mediators of neuronal cell loss [8]. Accordingly, activation of iNOS in glial cells constitutes a critical event in inflammatory-mediated neurodegenerative disorders, mainly as a result of microglial activity [7, 8, 10].

Leptin is an important modulator of both inflammation and energy homeostasis, making it a key interface between the inflammatory response to pathogenic stimuli and the energetic status of the host [17]. These studies shown that higher Lep levels in diet-induced obesity (DIO) rats contributed to the maintenance of the late phase of fever, a hallmark of disease induced by the exposure to lipopolysaccharide (LPS). Studies in DIO rodent models have indicated not only peripheral inflammation, but also increased

inflammatory signalling in the hypothalamus, which was linked to the development of central Lep resistance and obesity [18]. Chronic inflammation is known to cause Lep resistance that is a status related to Type-2 diabetes mellitus (T2DM) and AD [19]. It has been suggested that an increased tyrosine phosphatase-1B (PTP1 β) expression, in the hypothalamus, underlies the development of Lep resistance during repeated exposure to LPS [20].

Loss of Lep signalling may increase the likelihood of developing atherosclerosis, obesity and T2DM, all independent risk factors for AD. Circulating Lep is transported across the Brain blood barrier (BBB) into the brain, where it regulates food intake, glucose homeostasis, and energy expenditure mainly via the hypothalamic circuits. However, functional Lep receptors (LepR or ObRb) also have been reported to be expressed in the hippocampus and other cortical regions of the brain. It has been demonstrated that both Lep and insulin markedly influence key cellular events that underlie hippocampal learning and memory, including activity-dependent synaptic plasticity and the trafficking of glutamate receptors to-, and away from- the hippocampal synapses [21, 22]. Furthermore, the induction of apoptosis among hippocampal cells can be related to impairments in either Lep or insulin function. Thus, it appears that Lep confers protection against hippocampal-dependent AD neuropathology.

So far, few studies have been done with primary glial cell cultures (mixed cultures of astrocytes and microglia) in order to evaluate the anti-neuroinflammatory properties of Lep. Although astrocytes and microglia are two distinct types of glial cells in the central nervous system with differences in morphology and functional properties, they are regarded as immune active cells, and in some instances, they share common innate immune responses [23-27]. Moreover, astrocytes exert important functions in the brain, among them synthesis of neurotrophic factors, ion homeostasis, and regulation of extracellular glutamate concentration [24-27].

The aim of the present work was to assess the anti-inflammatory potential effects of Lep, in mixed glial cell cultures treated simultaneously with three pro-inflammatory cytokines TNF α , IL1 β and IFN γ , and, consequently, inducing high production of NO [24, 25]. The results obtained supported the conclusion that Lep has effects on the inhibition of NO production and iNOS expression, after cytokine treatments, giving support to the anti-oxidant potential of this compound and to its potential application in the treatment of neurological disorders.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Animals and *in vitro* cell culture procedure

Three-day-old pups of C57BL/6 mice (Harlan, IN, USA) were used in this study. All animal care and experimental protocols with post-natal pups were carried out in accordance with the Directive 86/609EEC of the Council of the European Union and the procedure established by the *Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca* of the *Generalitat de Catalunya*. Every effort was made to minimize animal suffering and reduce the number of animals used.

Mixed glial cell cultures were prepared from the cerebral cortices from 3-day-old C57BL/6 mice. Briefly, cerebral cortices were dissected and meninges removed. The tissue was incubated with trypsin solution (Trypsin 0.05% (w/v) trypsin-EDTA 5mM) for 15 min at 37°C. After that, the tissue was fragmented with a fire-polished Pasteur pipette. The dissociated cells were plated into 60 mm diameter culture plates (300,000 cells/ml) and grown in Dulbecco's Modified Eagle's /F-12 medium, supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2% HEPES, 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin. Fresh medium was changed the next day and then every 3 days afterwards. All experiments were done 7-9 days after plating.

2.2 Cell treatment

Glial cultures were treated with pro-inflammatory cytokines (TNF α , 20 ng/ml; IL1 β , 20 ng/ml; IFN γ 20 ng/ml) (PeproTech Inc., Rocky Hill, NJ, USA) or with the same volume of phosphate buffer saline (PBS) as a control. As indicated, cells were pre-treated with Lep (500nM; Sigma, St. Louis, MO, USA), 1 hour prior to cytokine treatment, or with Lep alone as a control. In addition, cells were pre-treated with either SB203580 kinase inhibitor (Calbiochem, EMD Millipore USA), and cytokines at concentrations of 20ng/ml, and in order to test the specificity of Lep inhibitory effect on p38 MAPK pathway.

2.3 Cell viability

Cell viability assays were performed after 48 hours of treatment, and were determined using MTT [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide; Sigma, St. Louis, MO, USA] assay, crystal violet, and Hoechst staining. MTT was added to the cells at a final concentration of 250 μ M and incubated for 4 hours at 37°C allowing the formation of formazan crystals. Then, the media was removed and formazan crystals were dissolved with DMSO. Formazan production was measured by the absorbance at 540nm using a spectrophotometer (Microplate Spectrophotometer Benchmark Plus BioRad). For crystal violet staining, cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS, for 20 min, at room temperature. After that, cells were washed twice with PBS, incubated 30 min at RT in a 0,25% crystal violet solution, washed twice again with PBS, and left to dry. Finally, a 30% acetic acid solution was added to remove the dye incorporated in the cells, and absorbance was read at 590 nm. For nuclei staining, cells were plated onto glass coverslips. After treatments, cells were fixed as described above, incubated for 10 min with Hoechst 33342 (1 μ g/ml, Sigma, St. Louis, MO, USA) and then washed again. Coverslips were mounted with Fluoromont-G (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA), and conserved at 4°C until observation in the fluorescent microscope (Olympus BX61). All viability results were expressed as percentages with respect to non-treated cells.

2.4 Nitric oxide measurement

NO released from glial cells was converted to nitrite in the culture medium, which can be determined using the Griess reaction. Culture medium was collected after 48 hours of treatments and an equal volume of Griess reagent was added (sulfanilamide 1%, N-(1-Naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride 0.1%, 2.5% phosphoric acid. Absorbance was read in a spectrophotometer at 540 nm, and sodium nitrite was used as a standard. From the same dishes, protein concentrations were measured using bicinchoninic acid (Pierce Company, Rockford, IL, USA) in order to normalize the nitrite concentrations.

2.5 Western-blot

After treating cells with cytokines and Lep, cells were washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline and harvested in lysis buffer containing 150 mM NaCl, 5mM MgCl₂, 50mM Tris, 1mM EDTA, 1%Triton X-100, pH 7,2 with protease inhibitors (Complete, Roche Diagnostics, Germany). Protein concentration was determined using bicinchoninic acid protein assay with the Pierce BCA Protein Assay Kit (Pierce

Company, Rockford, IL, USA). An average of 10 µg of protein was denatured at 95°C, for 5 min, in sample buffer (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, 10% glycerol, 2% SDS, 5%β-mercaptoethanol, 0.05% bromophenol blue) and samples were subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (7.5% Acrilamide: N,N'methylbisacrylamide, 37,5:1: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA) and subsequently transferred onto polyvinylidene fluoride membrane (Immun-Blot PVDF Membrane, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Membranes were incubated overnight at 4°C with primary antibodies against iNOS, phospho-Stat1 (Tyr701), phospho-Stat3 (Tyr705), monoclonal Anti-β-Tubulin and β-actin (1:20000; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) COX IV (3E11) Cytochrome c Antibody p38 MAPK Antibody Cleaved Caspase-3 (Asp175) antibody (Cell signalling) and Ob-R (H-300): sc-8325 (Santa Cruz Biotechnology). The blots were then washed thoroughly in TBS-T and incubated for 2 hours with a horseradish peroxidase-conjugated anti-IgG antibody, followed by the enhanced chemiluminescence detection system (Molecular Image Quantity ChemiDoc XRS+ BioRad) according to the supplier's instructions. Chemiluminescence measurements and semi-quantitative values were obtained using the corresponding software Imagelab (Bio-Rad) and the results were expressed as a percentage with respect to control. The corresponding β-actin was taken for each sample to normalize for any differences in gel loading.

2.6 Determination of p38 activity

The p38 activity assay was performed using the p38 MAP Kinase Assay Kit (Cell Signalling) following the manufacturer's recommendations. Briefly, p38 was immunoprecipitated from 200 µg protein. After that, the samples were washed and centrifuged twice with lysis buffer and kinase buffer discarding supernatants. ATP protein fusion (ATF) and kinase buffer, were added to each sample, which was then incubated at 37°C for 30 min. After that, samples were used to follow the Western-blot protocol described previously. The primary antibody was pATF2 in a 1:1000 dilution. Chemiluminescence measurements and semi-quantitative values were obtained using the corresponding software Imagelab (Bio-Rad) and the results were expressed as a percentage with respect to control.

2.7 Statistical analysis

Results were analyzed by one-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison tests. Differences with $p < 0.05$ were considered significant.

3. Results

3.1 Effect of cytokines on glial viability

Glial cell culture was characterized using specific antibodies (see material and methods). In order to characterize the culture model, the presence of Ob receptor was determined by immunoblotting with Ob-Receptor antibody. Since results revealed a significant reduction in ObR content after 9 days after plating cells, all the experiments were performed within the first 72 hours (Figure 1a).

To investigate whether cytokine-treated glial cells show an impaired mitochondrial function, we treated primary glial cells with three pro-inflammatory cytokines, such as $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL1}\beta$, and $\text{IFN}\gamma$, at concentrations of 20ng/ml. Likewise we evaluated the viability of cell culture under each different treatment by MTT, crystal violet, and Hoechst assays. The results obtained evidence that any treatment (cytokines alone, Lep, and the combination of Lep and cytokines) did not affected cell viability, as shown when measured by MTT method (Figure 1b).

By contrast, we observed a significantly increased fraction of apoptotic cells when stained with Hoechst 33342 (Figure 2a). Pictures show the increased number of apoptotic nucleus caused by the exposure to the cytokines (Figure 2b-e).

3.2 Leptin decreased Nitric Oxide production mediated by pro-inflammatory cytokines in glial cells

To investigate whether cytokine-treated glial cells increase nitric oxide production, we treated primary glial cells with three pro-inflammatory cytokines, such as $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL1}\beta$, and $\text{IFN}\gamma$. To determine NO production, we measured nitrite released into the culture medium using the Griess reagent. Since combination of three pro-inflammatory cytokines was the treatment that resulted in the greatest induction of NO production, and showing a significant NO increment when compared with control (Fig. 3a), the following experiments were done with all three cytokines together ($\text{TNF}\alpha$, $\text{IL1}\beta$ and

IFN γ) at concentrations of 20 ng/ml. Exposure of cells to Lep (500 nM), for 1h prior the cytokine treatment, reduced significantly the NO production at 48h, as it is also shown in Figure 3a.

Then, we performed the monitoring of anti-inflammatory effect of Lep across time. We tested NO synthesis at 24, 48 and 72h in cells treated with TNF α , IL1 β and IFN γ , and the most significant increment was obtained when cells were treated for up to 24h. Results showed a progressive increase of NO levels at 48 and 72 hours after cytokine treatment (Fig. 3b). Pre-treatment of cells with Lep 500nM reduced significantly the NO production, markedly at 72h.

To support this diminution of NO, we also evaluated whether Lep suppresses iNOS content by western-blot. As expected, cytokine treatment induced a marked increase in iNOS levels in glial cells, which was reduced by pre-treatment with Lep (Fig. 3c). Taken together, our current data prove that Lep inhibits the inflammatory activation of glial cells with respect to iNOS induction and NO production.

3.3 Leptin decreased Nitric Oxide production is related to p38 MAP Kinase pathway in glial cells

As shown before, exposure to Lep inhibits significantly the inflammatory activation of glial cells. Since previous investigations of our group suggest that this observation can be related to p38 MAPK pathway, we intended to shown the effect of Lep on p38 pathway. In fact, results from the present research show a significant increase on the content of the active form of p38 (Phospho-p38 Thr180/Tyr182) as a result of the exposure to cytokines, that can be reversed by pre-treatment of glial cells with Lep (Figure 4b). In fact, p38 MAPK is activated by a variety of cellular stresses including osmotic shock, inflammatory cytokines, lipopolysaccharide (LPS), UV light and growth factors.

To validate results from p38 MAPK activation, glial cells were pre-treated with the p38 specific inhibitor SB203580. In fact, the exposure of glial cells to both cytokines and SB203580 resulted in a significant reduction in NO production as shown by Griess method (Figure 5a). Then, the present results demonstrate that Lep is able to inhibit specifically p38 MAPK pathway, as demonstrated by the exposure of cells to p38 specific inhibitor SB203580. To reinforce this observation, we intended to observe the

effect of p38 specific inhibitor SB203580 over time and, in fact, the inhibition in NO production measured by Griess method was constant up to 72h (Figure 5b).

In addition, the exposure to p38 specific inhibitor SB203580 also prevented the activation of p38 MAPK by phosphorylation (Phospho-p38 Thr180/Tyr182) as shown in Figure 5d. All in all, these results demonstrate the involvement of p38 MAPK in NO production induced by cytokines, and also a specific inhibitory effect of Lep on this pathway.

Moreover, additionally pro-inflammatory pathways that can be activated by cytokines, such as STAT-3, can be also modulated by Lep signalling. The present results show a significant activation of STAT-3 in glial cells exposed to cytokines (Figure 6b). In fact, STAT-3 is activated by phosphorylation at Tyr 705, which induces dimerization, nuclear translocation and DNA binding. Results depicted in Figure 6 also shown that pre-treatment of glial cells with Lep (500nM) prevents STAT-3 activation by phosphorylation at Tyr 705. Since STAT-3 also has anti-apoptotic effects, it seems controversial that its inactivation by Lep could protect cells from apoptosis. Then, we intended to study in a more detailed manner the effects of Lep on apoptosis of glial cells exposed to pro-inflammatory cytokines.

3.4 Leptin decreased the apoptosis induced by pro-inflammatory cytokines in glial cells

As we stated before, the exposure to specific inhibitor SB203580 prevented the activation of p38 MAPK by phosphorylation (Phospho-p38 Thr180/Tyr182) and NO production that, in turn, is involved in cell death by apoptosis. Then, we observed the presence of picnotic nucleus and increased cell death in cells treated with pro-inflammatory cytokines, as shown by the Hoechst 33342 staining (Figure 7). This significant increase in cell death can be prevented by p38 specific inhibitor SB203580 and, then, demonstrating the involvement of NO production on this process. In this context, since STAT-3 also has anti-apoptotic effects, and resulted inhibited by exposure to Lep, we intended to study the effects of Lep on apoptosis of glial cells exposed to pro-inflammatory cytoquines.

Firstly, our results shown that despite the apparently controversial effects of Lep on apoptosis, and in relation with STAT-3 activity, this adipokine is in fact able to reduce the activity of the effector caspase-3. This was shown by western-blot detection of a reduction in the content of the cleaved, and active, form of caspase-3 (Figure 8).

Furthermore, results from our experiments shown the effects of Lep on mitochondrial MnSOD2 content as well as in cytochrome-c (Cyt-c) release. Pre-treatment of glial cells with 500 nM Lep, before incubation with pro-inflammatory cytokines, significantly reduced both MnSOD2 and Cyt-c content, in agreement with the observed reduction in apoptosis.

Finally, Lep also seems to act on the activity of an anti-apoptotic molecule Bcl-2, although in a slightly significant manner. Then, as a whole, we can summarize the present results concluding that Lep acts as an anti-inflammatory factor in glial cells exposed to pro-inflammatory cytokines, exerting its function at different levels: acting on p38 MAPK pathway and reducing its activity and NO production; acting on mitochondrial drivers of apoptosis and reducing their content, like for Cyt-c and as in the case of the executioner caspase-3.

4. Discussion

After 20 years of research on Lep, the first reference describing the neuroprotective activity of this adipokine come from the year 2001, on a primary neuronal culture model exposed to NMDA-induced cell death [28]. Later on, in another seminal early report, authors describe that Lep was able to protect hippocampal neurons against Kainic acid-induced excitotoxicity, in an experimental model of epilepsy with Lep deficient ob/ob mice [29].

Despite these initial papers, today persist the controversial about roles of Lep in inflammatory processes in brain. Furthermore, some reports evidence a controversial relationship between Lep and oxidative stress, but suggest a possible interaction of reactive oxygen species (ROS) and Lep in the regulation of energy metabolism in obesity. Previous studies have reported that Lep stimulates the secretion of anti- and pro-inflammatory cytokines [32] and a pro-oxidative role of Lep has been noticed [33]. Nevertheless, at present it seems widely demonstrated that not only Lep, but also adipokines and circulating food-intake-controlling metabolites, are capable of reducing glial activation in models of excitotoxicity, despite the molecular mechanisms are not well understood. There is growing evidence that low-grade chronic inflammatory state, associated with obesity, could play a key role in disrupting Lep signalling [30, 31]. Then, it could be of interest to restore Lep signalling and, in particular, the STAT-3 pathway, together contributing to reduce the inflammatory processes common in both

obesity and brain diseases. STAT3 is a transcription factor that, upon phosphorylation, dimerizes and is translocated to the nucleus, where it controls the transcription of target genes. In agreement with that, results from the present research clearly show a significant anti-inflammatory activity of Lep against treatments performed with cytokines TNF α -IFN γ , TNF α -IL1 β and IL1 β -IFN γ , in mixed glial cell cultures from C57BL/6 mice pups. We describe a significant reduction in NO production, from measured nitrite released into the culture medium, using the Griess reagent, and related to Lep exposure.

Neuroinflammation is involved in the pathology of neurodegenerative disease through the expression of cytotoxic mediators, especially pro-inflammatory cytokines and free radicals [5, 13, 15, 34, 35]. Previous studies have described that up-regulation of iNOS is involved in neuronal degeneration associated with PD and AD [13, 15, 35, 36]. In agreement with that, results from the present research clearly show that immunomodulatory effect of Lep on glial cell activation might partly explain its central role in brain neuroprotective action through iNOS inhibition. It is well known that inflammatory mediators are able to activate glial cells and trigger the expression of different genes, such as iNOS. Likewise, iNOS contributes to NO synthesis, increasing free radical formation and promoting brain damage [5-11].

High levels of NO exert their toxic effects through multiple mechanisms, including lipid peroxidation, mitochondrial damage, protein nitration and oxidation, depletion of antioxidant reserves, activation or inhibition of various signalling pathways, and DNA damage [1, 7, 8, 13]. Thus, NO produced by iNOS seems to be a key mediator of such glial activation induced neuronal death. In the present study we demonstrated that Lep counteracted both the over-expression of iNOS and the production of NO induced by pro-inflammatory cytokines. The observed inhibition is proportional to Lep concentration and can be related to the effect of Lep on p38 MAPK pathway. In fact, the exposure of glial cells to both cytokines and SB203580 resulted in a significant reduction in NO production and, then, in the present study we demonstrated that Lep was able to inhibit p38 MAPK specifically, as can be shown by the exposure of cells to a p38 specific inhibitor SB203580.

This observation can be relevant since experiments with neurotoxic molecules, such as 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and β -amyloid, have been shown that induce iNOS in glial cells [7,8, 37]. Indeed, in amyotrophic lateral sclerosis (ALS), iNOS immunoreactivity is showed in activated astrocytes [38]. All these experiments give support to the involvement of iNOS in neurological disorders. Then, the inhibitory

effects of Lep on iNOS activity could be important to prevent oxidative damage in mitochondria, the concomitant release of Cyt-c, and the activation of apoptosis effector molecules like caspase-3.

The study of Lep effects on glial cells is particularly important, considering the coexistence of neurons and glia in the brain. The interactions of different cell types under damaging conditions have an important role since they can favour the process of cell death or neuroprotection. In this context, the effects of Lep on energy metabolism and mitochondrial function, are key factors in homeostasis and survival of neuronal cells. As we stated before, Lep and insulin receptors are widely expressed in the central nervous system. The human ObRb is a member of the superfamily of cytokine receptor class I (gp130). The best-described signalling pathway activated in response to receptor activation involves the coordinated functions of JAK2/STAT3. Key downstream effectors of ObRb include AMP-activated protein kinase (AMPK), PGC-1 α (involved in mitochondrial biogenesis), peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) as well as aspartyl protease β -site A β PP-cleaving enzyme (BACE1) that is involved in A β generation, as we described in a recent review [39].

The present research show that Lep prevents mitochondrial Cyt-c release and reduces MnSOD2 content. These observations are in agreement with previous findings that have been described on an *in vitro* Type II Alveolar Epithelial Cells model (AEC) [40]. Analysis of the expression/activation of key molecular factors involved in AEC apoptosis, or survival, indicated that the leptin-mediated protective effects depend on the PI3K/Akt signalling pathway, and involve the stimulation of Akt phosphorylation, prevention of mitochondrial Cyt-c release, as well as suppression of caspase-3 cleavage and activation. In agreement with that, our results shown that despite the apparently controversial effects of Lep on apoptosis, and in relation with STAT-3 activity, this adipokine is in fact able to reduce the activity of the effector caspase-3 and also seems to act on the activity of an anti-apoptotic molecule Bcl-2, although in a slightly significant manner. In fact, previous research of our group studied molecular pathways involved in the apoptosis of cerebellar granule cells (CGNs) [41]. We focused in the PI3K/Akt pathway, which plays a key role in neuronal survival, and we compared two models of apoptosis in CGNs, namely inhibition of PI3K/Akt, and serum potassium deprivation (S/K deprivation). S/K deprivation causes PI3K inhibition and increases GSK3 β activity and c-Jun phosphorylation activation, which implicates these two pathways in this apoptotic route.

In summary, the present study demonstrates that pro-inflammatory cytokines activate glial cells increasing NO production through a sustained activation of p38 MAPK pathway. However, Lep significantly prevents p38 MAPK activation following cytokine treatment, enough to reduce the iNOS expression and subsequent NO release. Our data suggest that Lep acts as an anti-inflammatory factor in glial cells exposed to pro-inflammatory cytokines, exerting its function at different levels: acting on p38 MAPK pathway and reducing its activity and NO production; acting on mitochondrial drivers of apoptosis and reducing their content, like Cyt-c; and reducing the activity of the executioner caspase-3. In the present investigation we contribute to demonstrate a direct effect of Lep as an anti-inflammatory agent. Then, for these reasons, we propose that Lep may be a promising therapeutic strategy in neuroinflammatory-associated brain disorders.

DISCLOSURE STATEMENT

The authors declare no competing financial interests.

ACKNOWLEDGMENTS

All authors are members of 2014SGR525 from Generalitat de Catalunya. We also would like to express our gratitude to Ms Ana Nieto for revising this manuscript.

ABBREVIATIONS

AD: Alzheimer's disease

AEC: Alveolar Epithelial Cells model

ALS: Amyotrophic lateral sclerosis

AMPK: AMP-activated protein kinase

ATF: ATF protein fusion

BACE1: Aspartyl protease β -site A β PP-cleaving enzyme

BBB: Brain Blood Barrier

CGNs: cerebellar granule cells cells (CGNs)

Cyt-c: Cytochrome c

DIO: Diet-induced obesity

FBS: Fetal bovine serum

HFD: High-fat diet

IFN γ : Interferon-gamma

IL1 β : Interleukin 1-beta

iNOS: Nitric oxide synthase

Lep: Leptin

LepR (or ObRb): Leptin receptors

LPS: Lipopolysaccharide

MAPK: MAP Kinase

MPTP: 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine

NO: Nitric oxide

ObRb: Leptin receptor

PD: Parkinson's disease

PPARs: Peroxisome proliferator-activated receptors

PTP1 β : Protein tyrosine phosphatase 1 β

ROS: Reactive oxygen species

STAT3: Signal transducers and activators of transcription

SOCS3: Suppressor of cytokine signalling 3

T2DM: Type-2 diabetes mellitus

TNF α : Tumor necrosis factor-alpha

REFERENCES

- [1] Khandelwal PJ, Herman AM, Moussa CE. Inflammation in the early stages of neurodegenerative pathology. *J Neuroimmunol* 2011;238:1-11.
- [2] Smith JA, Das A, Ray SK, Banik NL. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases. *Brain Res Bull* 2012;87:10-20.
- [3] Azizi G, Mirshafiey A. The potential role of proinflammatory and antiinflammatory cytokines in Alzheimer disease pathogenesis. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 34 (2012)881-895.
- [4] Farfara D, Lifshitz V, Frenkel D. Neuroprotective and neurotoxic properties of glial cells in the pathogenesis of Alzheimer's disease, *J Cell Mol Med*, 12 (2008) 762–780.
- [5] Rubio-Perez JM, Morillas-Ruiz JM. A review: Inflammatory process in alzheimer's disease, role of cytokines. *ScientificWorldJournal* 2012;75:63-57.
- [6] Suzumura A, Takeuchi H, Zhang G, Kuno R, Mizuno T. Roles of glia-derived cytokines on neuronal degeneration and regeneration. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1088:219-229.
- [7] Brown GC. Mechanisms of inflammatory neurodegeneration: Inos and nadph oxidase. *Biochem Soc Trans* 2007;35:1119-1121.
- [8] Brown GC. Nitric oxide and neuronal death. *Nitric Oxide* 2010;23:153-165.
- [9] Chen M, Sun HY, Li SJ, Das M, Kong JM, Gao TM. Nitric oxide as an upstream signal of p38 mediates hypoxia/reoxygenation-induced neuronal death. *Neurosignals* 2009;17:162-168.
- [10] (a)Saha RN, Pahan K. Signals for the induction of nitric oxide synthase in astrocytes. *Neurochem Int* 2006;49:154-163.
- [11] (b)Saha RN, Pahan K. Regulation of inducible nitric oxide synthase gene in glial cells. *Antioxid Redox Signal* 2006;8:929-947.
- [12] Bhat NR, Zhang P, Lee JC, Hogan EL. Extracellular signal-regulated kinase and p38 subgroups of mitogen-activated protein kinases regulate inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor-alpha gene expression in endotoxin-stimulated primary glial cultures. *J Neurosci* 1998;18:1633-1641.
- [13] Brown GC, Neher JJ. Inflammatory neurodegeneration and mechanisms of microglial killing of neurons. *Mol Neurobiol* 2010;41:242-247.
- [14] Kaminska B, Gozdz A, Zawadzka M, Ellert-Miklaszewska A, Lipko M. Mapk signal transduction underlying brain inflammation and gliosis as therapeutic target. *Anat Rec (Hoboken)* 2009;292:1902-1913.
- [15] Sastre M, Klockgether T, Heneka MT. Contribution of inflammatory processes to alzheimer's disease: Molecular mechanisms. *Int J Dev Neurosci* 2006;24:167-176.

- [16] Sheng W, Zong Y, Mohammad A, Ajit D, Cui J, Han D, Hamilton JL, Simonyi A, Sun AY, Gu Z, Hong JS, Weisman GA, Sun GY. Pro-inflammatory cytokines and lipopolysaccharide induce changes in cell morphology, and upregulation of erk1/2, inos and spla(2)-ii α expression in astrocytes and microglia. *J Neuroinflammation* 2011;8:121.
- [17] Pohl J, Woodside B, Luheshi GN. Leptin modulates the late fever response to LPS in diet-induced obese animals. *Brain Behav Immun.* 2014 Nov;42:41-7.
- [18] de Git KC, Adan RA. Leptin resistance in diet-induced obesity: the role of hypothalamic inflammation. *Obes Rev.* 2015 Mar;16(3):207-24.
- [19] Martin SS, Qasim A, Reilly MP. Leptin resistance: a possible interface of inflammation and metabolism in obesity-related cardiovascular disease, *J Am Coll Cardiol*, 52 (2008) 1201–1210.
- [20] Borges B de C, Rorato RC, Uchoa ET, Marangon PB, Elias CF, Antunes-Rodrigues J, Elias LL Protein tyrosine phosphatase-1B contributes to LPS-induced leptin resistance in male rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2015 Jan 1;308(1):E40-50.
- [21] Greco SJ, Hamzelou A, Johnston JM, Smith MA, Ashford JW, Tezapsidis N, Leptin boosts cellular metabolism by activating AMPK and the sirtuins to reduce tau phosphorylation and β -amyloid in neurons. *Biochem Biophys Res Commun*, 14 (2011) 170-174.
- [22] McGregor G, Malekizadeh Y, Harvey J, Minireview: food for thought: regulation of synaptic function by metabolic hormones, *Mol Endocrinol*, 29 (2015) 3-13.
- [23] Jeong JK, Moon MH, Lee YJ, Seol JW, Park SY. Melatonin-induced autophagy protects against human prion protein-mediated neurotoxicity. *J Pineal Res* 2012;53:138-146.
- [24] Bhat NR, Feinstein DL, Shen Q, Bhat AN. P38 mapk-mediated transcriptional activation of inducible nitric-oxide synthase in glial cells. Roles of nuclear factors, nuclear factor kappa b, camp response element-binding protein, ccaat/enhancer-binding protein-beta, and activating transcription factor-2. *J Biol Chem* 2002;277:29584-29592.
- [25] Bhat NR, Zhang P, Bhat AN. Cytokine induction of inducible nitric oxide synthase in an oligodendrocyte cell line: Role of p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J Neurochem* 1999;72:472-478.
- [26] Verkhratsky A. Physiology of neuronal-glia networking. *Neurochem Int* 2010;57:332-343.
- [27] Verkhratsky A, Kirchhoff F. Glutamate-mediated neuronal-glia transmission. *J Anat* 2007;210:651-660.
- [28] Dicou E, Attoub S, Gressens P. Neuroprotective effects of leptin in vivo and in vitro. *Neuroreport.* 2001 Dec 21;12(18):3947-51.
- [29] E. Erbayat-Altay, A.J. Fessler, M. Gallagher, H.P. Attarian, F. Dehdashti, V.J. Vahle, J. Ojemann, J.L. Dowling, F.G. Gilliam, Correlation of severity of FDG-PET hypometabolism and interictal regional delta slowing in temporal lobe epilepsy, *Epilepsia*, 46 (2005) 573-576.

- [30] Sáinz N, Barrenetxe J, Moreno-Aliaga MJ, Martínez JA. Leptin resistance and diet-induced obesity: central and peripheral actions of leptin. *Metabolism*. 2015 Jan;64(1):35-46.
- [31] Sáinz N, González-Navarro CJ, Martínez JA, Moreno-Aliaga MJ. Leptin signaling as a therapeutic target of obesity. *Expert Opin Ther Targets*. 2015 Jul;19(7):893-909.
- [32] Loffreda S, Yang SQ, Lin HZ, Karp CL, Brengman ML, Wang DJ, et al. Leptin regulates proinflammatory immune responses. *FASEB J* 1998;12(1):57-65.
- [33] Beltowski J, Wojcicka G, Marciniak A, Jamroz A. Oxidative stress, nitric oxide production, and renal sodium handling in leptin-induced hypertension. *Life Sci* 2004;74(24): 2987-3000.
- [34] Ji RR, Suter MR. P38 mapk, microglial signaling, and neuropathic pain. *Mol Pain* 2007;3:33.
- [35] Graeber MB, Li W, Rodriguez ML. Role of microglia in cns inflammation. *FEBS Lett* 2011;585:3798-3805.
- [36] Ionov M, Burchell V, Klajnert B, Bryszewska M, Abramov AY. Mechanism of neuroprotection of melatonin against beta-amyloid neurotoxicity. *Neuroscience* 2011;180:229-237.
- [37] Feng Z, Zhang JT. Protective effect of melatonin on beta-amyloid-induced apoptosis in rat astrogloma c6 cells and its mechanism. *Free Radic Biol Med* 2004;37:1790-1801.
- [38] Barbeito LH, Pehar M, Cassina P, Vargas MR, Peluffo H, Viera L, Estevez AG, Beckman JS. A role for astrocytes in motor neuron loss in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res Brain Res Rev* 2004;47:263-274.
- [39] Folch J, Patraca I, Martínez N, Pedrós I, Petrov D, Ettcheto M, Abad S, Marin M, Beas-Zarate C, Camins A. The role of leptin in the sporadic form of Alzheimer's disease. Interactions with the adipokines amylin, ghrelin and the pituitary hormone prolactin. *Life Sci*. 2015 May 19. pii: S0024-3205(15)00258-1.
- [40] Chen H, Liang ZW, Wang ZH, Zhang JP, Hu B, Xing XB, Cai WB. Akt Activation and Inhibition of Cytochrome c Release: Mechanistic Insights Into Leptin-Promoted Survival of Type II Alveolar Epithelial Cells. *J Cell Biochem*. 2015 Apr 2.
- [41] Vazquez de la Torre A, Junyent F, Folch J, Pelegrí C, Vilaplana J, Auladell C, Beas-Zarate C, Pallàs M, Camins A, Verdaguer E. Study of the pathways involved in apoptosis induced by PI3K inhibition in cerebellar granule neurons. *Neurochem Int*. 2011 Aug;59(2):159-67.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. (A) Expression of astrocytic ObR in cell culture mix of C57BL/6J mice. (B) The WB show an increase in the 9th day and the decrease in the days after planting in 60 mm dishes. Treatment of glial cell cultures with tree $\text{TNF}\alpha$ - $\text{IL1}\beta$ - $\text{IFN}\gamma$ does not induce cell death. After 48 hours of cytokine treatment, different cell viability assays were performed (see material and methods). Each point is the mean \pm -SEM of three or four independent experiments.

Figure 2. The graph illustrates the Hoechst 33342 staining of nuclei. Images show increased apoptosis in glial cells with chromatin condensation in the nuclei (A). The cytokines increased number of condensed nuclei (C) whereas treatment with 500 nM Lep prevents this effect (E), all with respect to control. Measures were performed with a Reader: Ascent Labsystems Flouroskan Ex: 350 nm Em: 463 nm. (** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ with respect to control).

Figure 3. (A) Figure show nitrite levels in glial cells, measured by Griess method, after 48 hours of treatment with pro-oxidant cytokines, and the anti-inflammatory effect of pre-treatment with 500nM Lep. (B) Time course of NO release at 24, 48 and 72 hours after treatment with cytokines. Each point is the mean \pm -SEM of three independent experiments. (C) The content of iNOS in glial cells 48h after cytokine treatment, and the effect of pre-treatment with 500nM Lep. On the right is shown the graphical representation of the normalized level of iNOS with beta actin (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.01$ with respect to control).

Figure 4. Western-blot against (A) p38 and (B) phospho-P38 activity after cytokine treatment. All Western blots were normalized with actin. For each point is presented the mean value of three independent experiments. (* $P < 0.05$; ** $P < 0,01$ with respect to control).

Figure 5. (A) NO release measured by Griess method, and the combined effect of P38 MAPK inhibitor SB203580 and Lep reducing this effect. (B) Time-course of nitrite levels at 24, 48 and 72 hours after treatment with cytokines, and the effect of the inhibitor in glial cells. Western-blot against (C) p38 and (D) phospho-p38 form after treatment of cytokine and SB203580 inhibitor as a positive control of the action with Lep. All Western-blot were normalized with B-tubulin. For each point the mean of three independent experiments is presented. Each point is the mean \pm SEM of three independent experiments. (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0,001$ control vs. Inhibitor 500 nM).

Figure 6. Western-blot against (A) STAT3 and (B) phospho-STAT3 1 hour after addition of cytokines treatment 48 hours with or without pretreatment with Lep. For each point the average of three independent experiments. (* $P < 0.05$ compared to vehicle control).

Figure 7. (A) Bar graph illustrating the percentage of condensed nuclei after treatment with and without 500 nM SB203580 / cytokine. Images (B, C, D and E) represents Hoechst chromatin condensation after treatment with inhibitor SB203580 500 nM /

cytokines. Data are expressed as mean \pm SEM , analyzed by ANOVA and *post hoc* Bonferroni multiple comparison test (** $P < 0.001$).

Figure 8. (A) Effects of Lep pre-treatment on caspase-3 activation. Astrocytes were incubated with leptin 500nM in the absence or presence of cytokines. (B) The activation of the cleaved and activated form of caspase-3 was determined by Western blotting. The density of the band of cleaved caspase 3 under the indicated treatments was quantified and divided by the value of the density of actin. The percentages of cleaved caspase 3 levels are normalized to cells treated vs control. The value of cleaved caspase 3 under -treatment Control was taken as 100 %. For each point the mean of three independent experiments is presented. (* $P < 0.05$; ** $P < 0,001$ compared to control and with respect to pre-treated Lep cells).

Figure 9. Effects of Lep in apoptosis: western-blot against MnSOD2, Cytochrome-c and Bcl-2. The graphs (A, B) show increased MnSOD2 and Cytochrome C content, indicating activation of apoptosis stimulated by cytokines. Pre-treatment with Lep 60 minutes before treatment with cytokines reduced significantly this pro-apoptotic effect. (C) Bcl-2, considered to be a pro-survival mitochondrial molecule resulted stimulated by Lep, indicating a protection against inflammation and apoptosis activation. Western blots were normalized to actin (C) respectively and COX IV (A, B) . For each point the mean of three independent experiments is presented. (* $P < 0.05$; ** $P < 0,01$ compared to control and with respect to pre-treated Lep cells).

Figure 1

[Click here to download high resolution image](#)

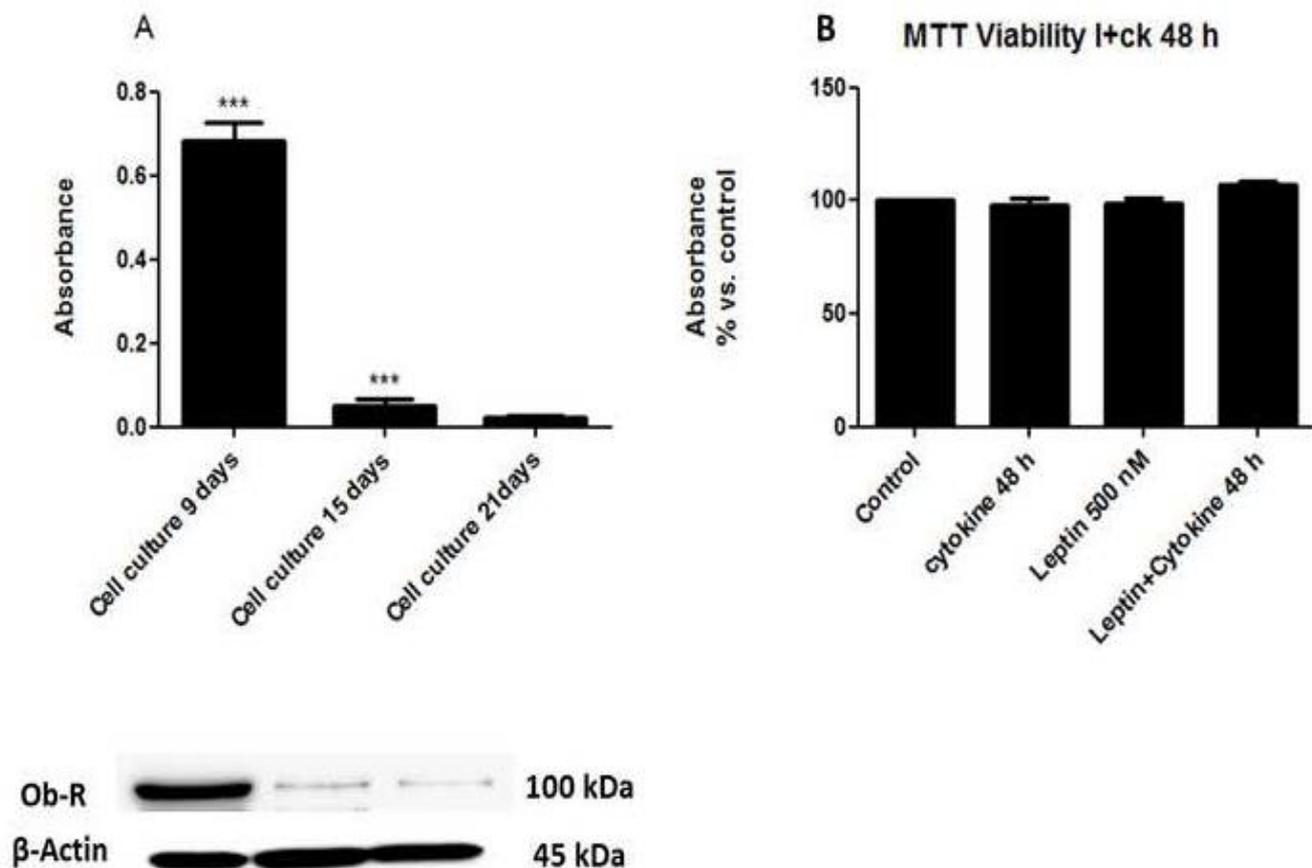


Figure 2
[Click here to download high resolution image](#)

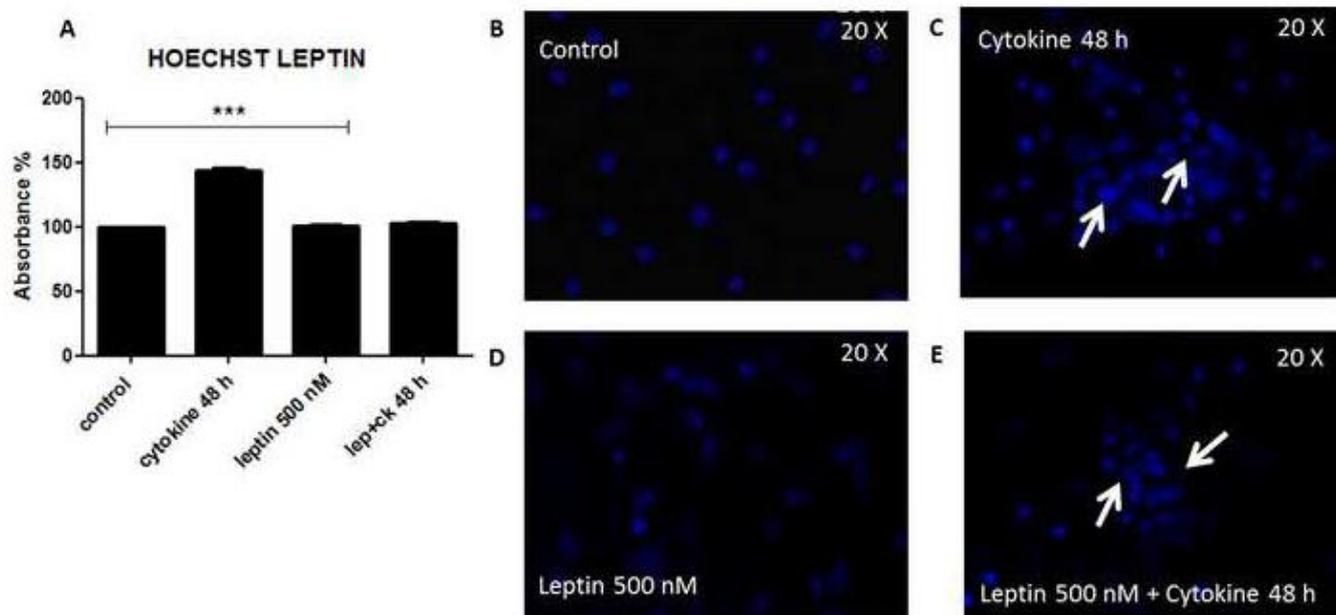


Figure 3

[Click here to download high resolution image](#)

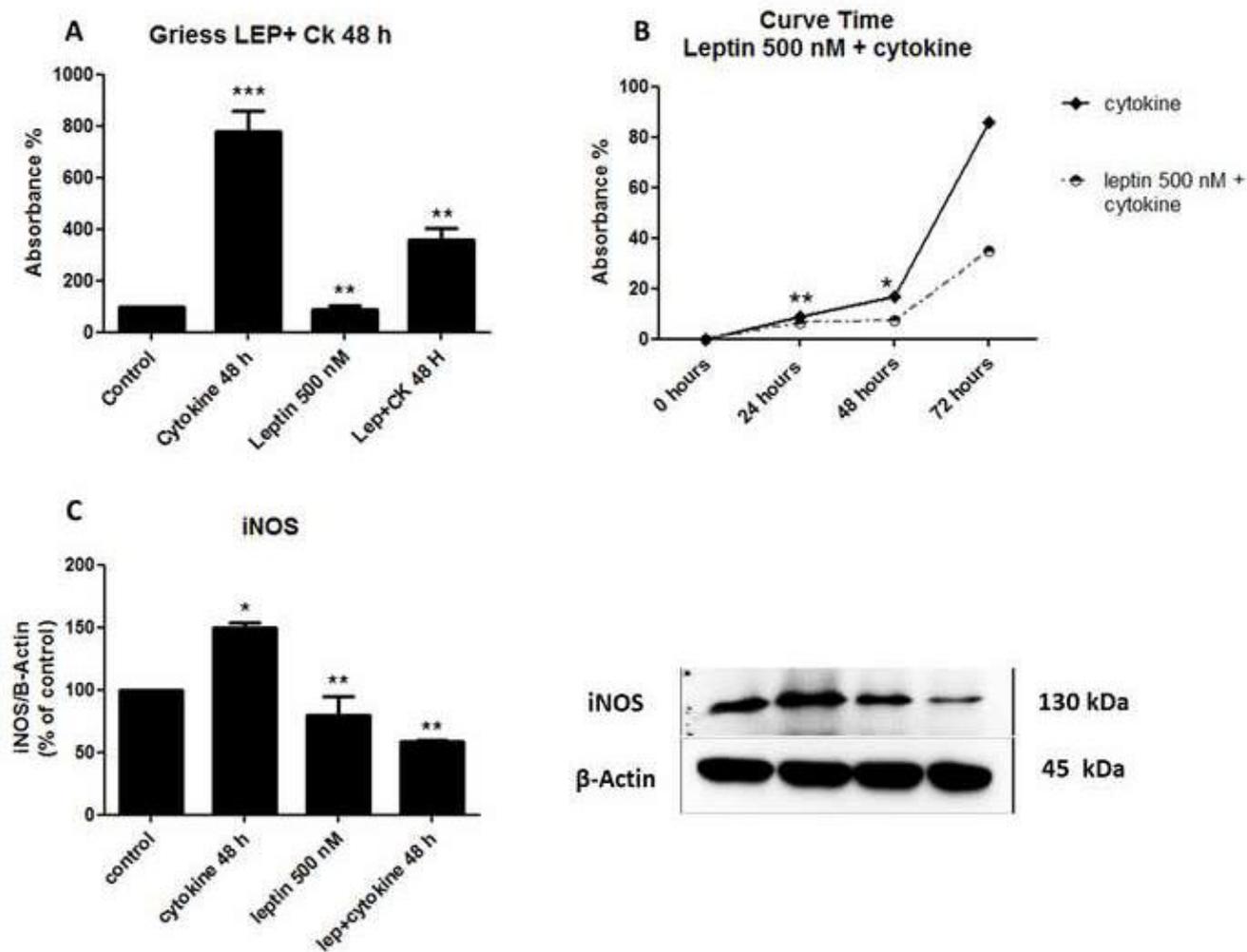


Figure 4
[Click here to download high resolution image](#)

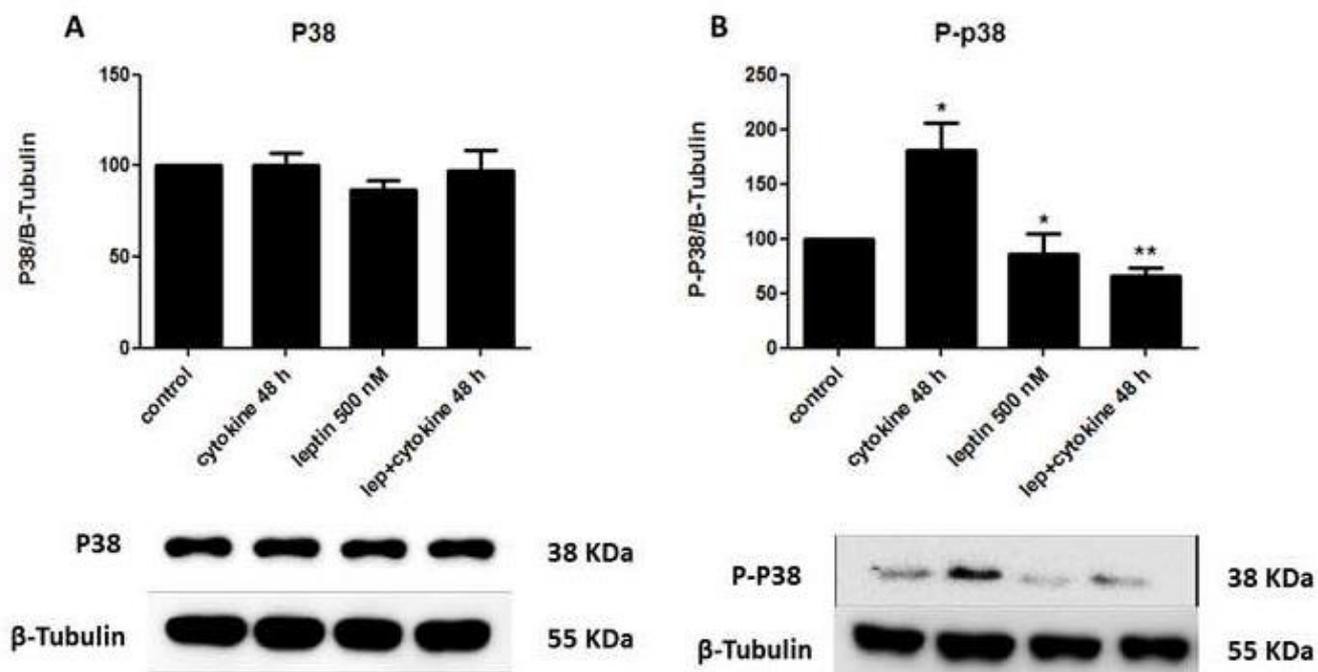


Figure 5

[Click here to download high resolution image](#)

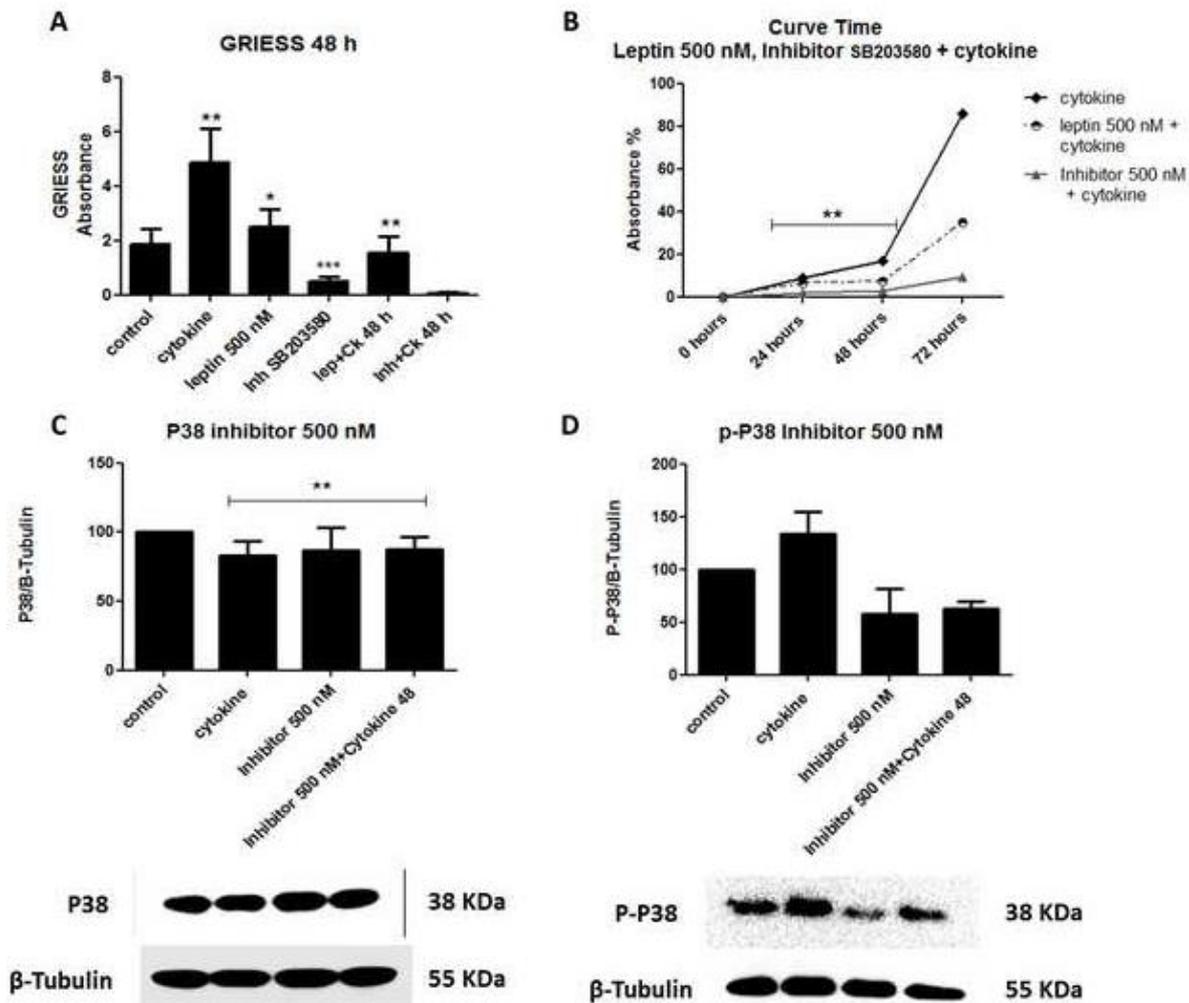


Figure 6
[Click here to download high resolution image](#)

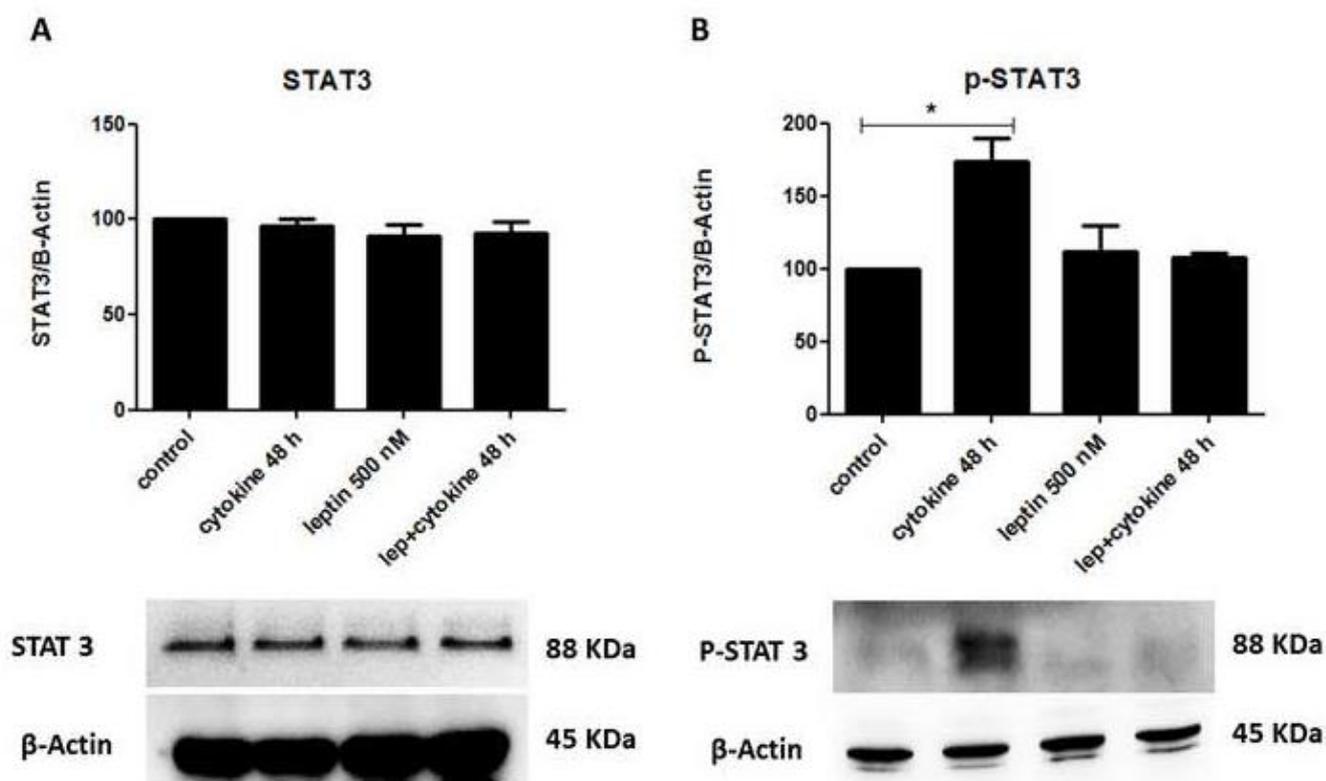


Figure 7
[Click here to download high resolution image](#)

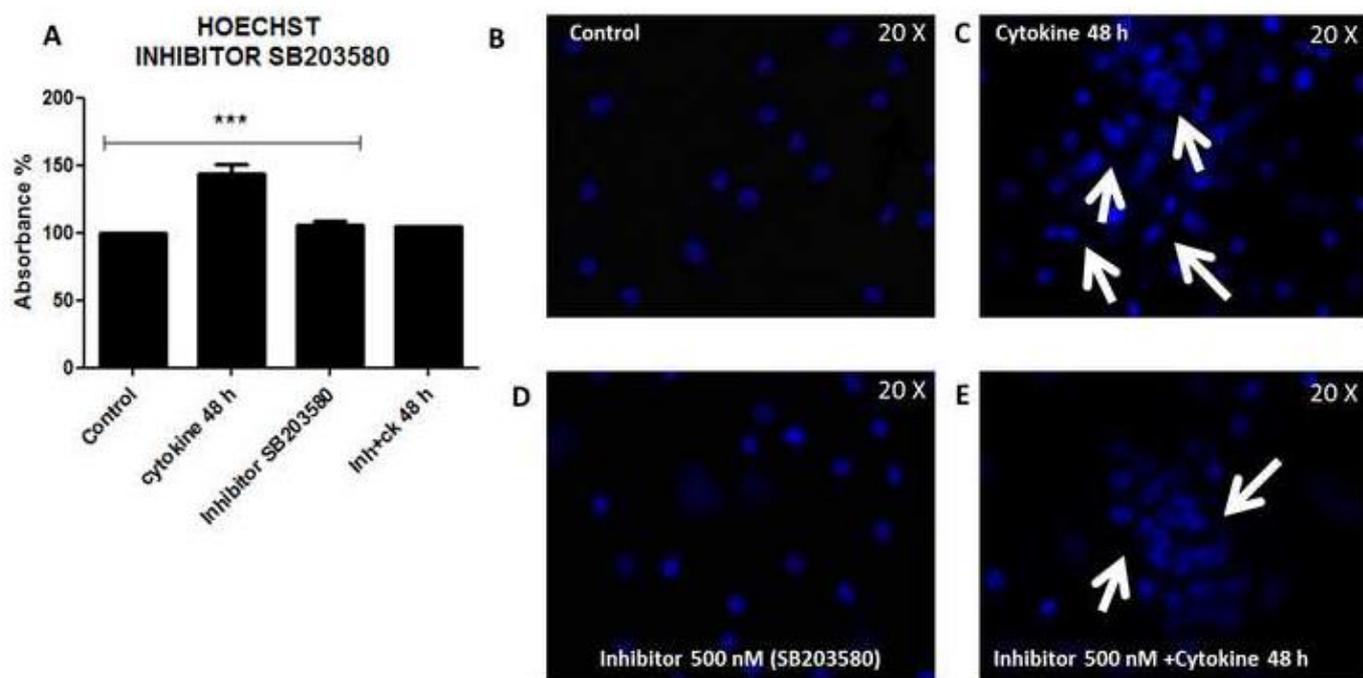


Figure 8
[Click here to download high resolution image](#)

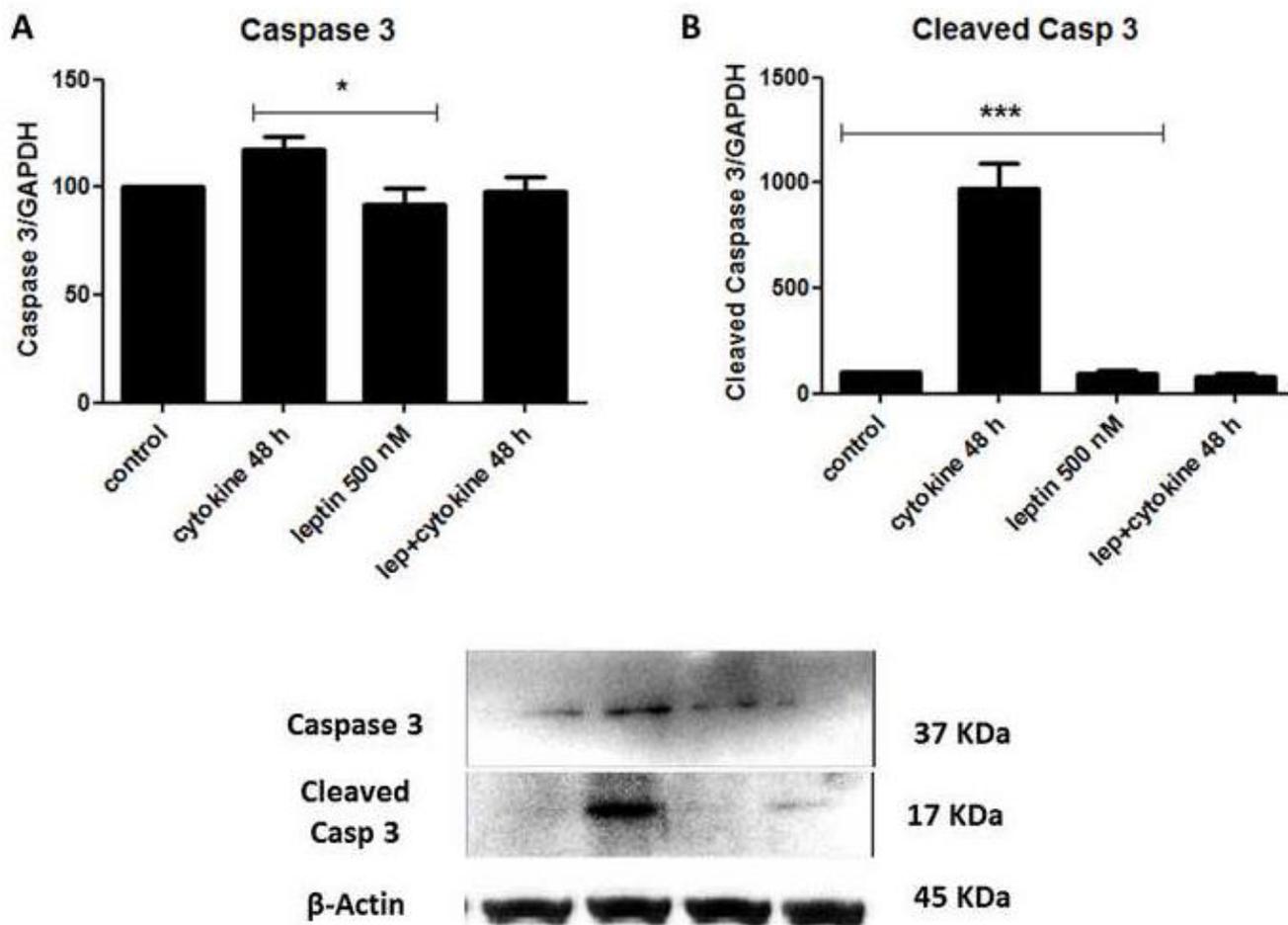
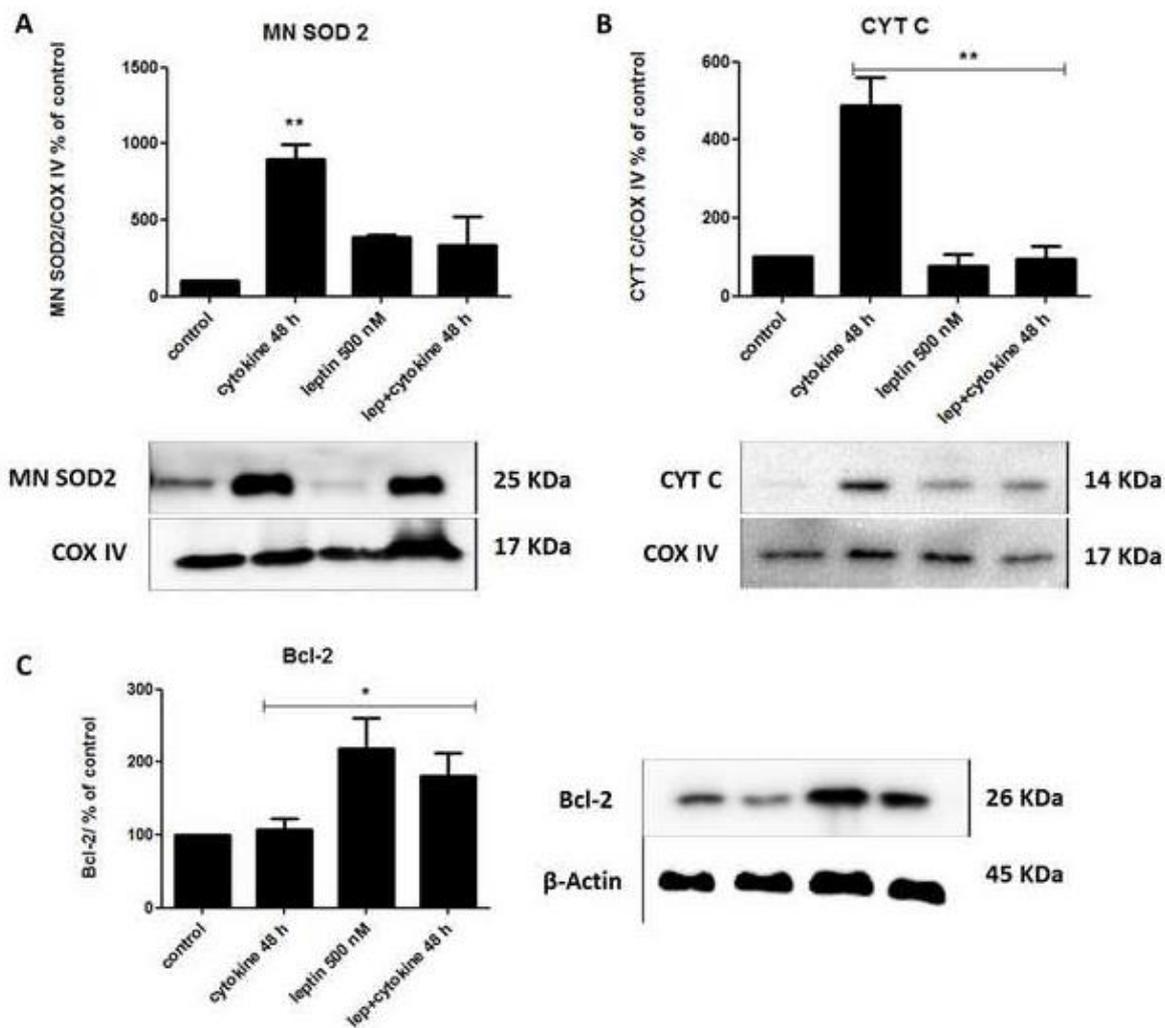
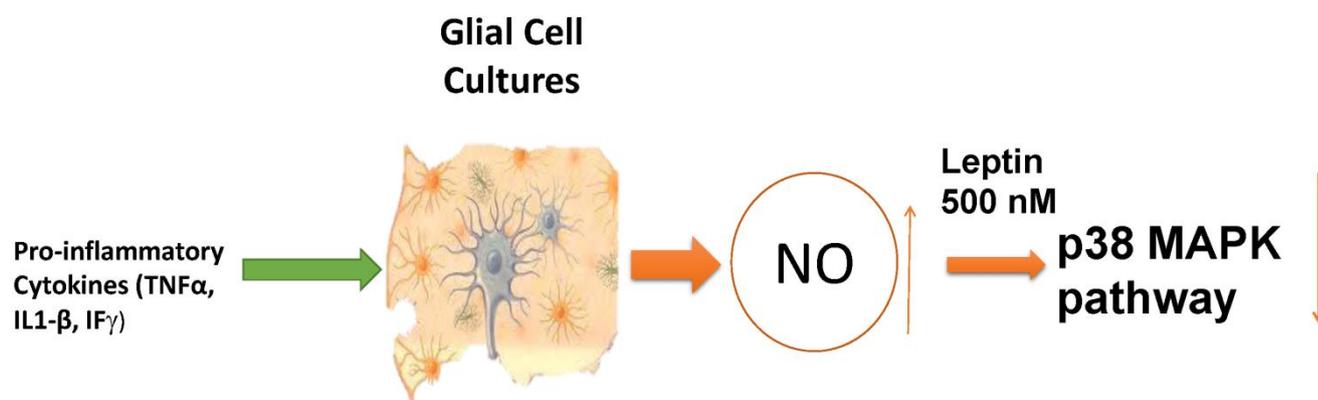


Figure 9

[Click here to download high resolution image](#)





Publicación 3

The combined effect of the pituitary hormone Prolactin and the adipokine Leptin suppresses nitric oxide production in glial cultures by pro-inflammatory cytokines

Iván Patraca, Nohora Martínez, Oriol Busquets, Aleix Martí, Ignacio Pedrós, Dmitry Petrov, Miren Ettcheto, Francesc Sureda, Antoni Camins and Jaume Folch

La hormona pituitaria prolactina (PRL) está involucrado en el proceso de la lactancia, pero se ha descrito también que puede tener efectos neuroprotectores sobre las neuronas del hipocampo. La leptina (LEP) es una citoquina pleiotrópica codificada por el gen *Ob* y desempeña un papel central en el control del peso corporal y la homeostasis energética. La primera evidencia de efectos de acciones combinadas de estas moléculas viene del hecho de que los altos niveles circulantes de PRL (o lactógenos placentarios) durante el embarazo, pueden interferir directamente con la señalización del receptor LEPR, posiblemente predisponiendo a la resistencia a la leptina. Considerando que leptina se ha demostrado regular a la baja las respuestas inflamatorias y proporciona neuroprotección, se propone también que PRL está implicada en procesos anti-inflamatorios además, de la regulación inmune en astrocitos y células gliales. Sin embargo, los mecanismos subyacentes a las propiedades anti-inflamatorias de estas hormonas en el cerebro, son poco conocidos. En el presente trabajo se estudió el efecto modulador de prolactina y leptina pudiendo prevenir los daños causados por la exposición de citoquinas pro-inflamatorias induce un aumento de la expresión óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y la producción de óxido nítrico en las células gliales. El pre-tratamiento de los cultivos con prolactina y leptina a 500 nM produjo un efecto inhibitor tanto en gen iNOS, actividad transcripcional y expresión de la proteína, con una disminución concomitante en la producción de ON. El efecto combinado de estas hormonas bajó la producción de especies reactivas del oxígeno por la ciclooxigenasa 2 (COX-2) inhibiendo la vía de señalización p-STAT1/5 través de una disminución en la expresión de p-JAK2, y produjo una disminución significativa en los

niveles de IL-6. Las células pre-tratadas con prolactina y leptina también redujeron la expresión de contenido p-NF κ β y la respuesta de CREB que se encuentran involucrados en la neuroplasticidad y la formación de la memoria a largo plazo. Estos datos indican la acción anti-inflamatoria por la combinación de prolactina y leptina en las células gliales después de la estimulación con citocinas pro-inflamatorias.

The combined effect of the pituitary hormone Prolactin and the adipokine Leptin suppresses nitric oxide production in glial cultures by pro-inflammatory cytokines

Iván Patraca^{1,3}, Nohora Martínez^{1,3}, Oriol Busquets¹, Aleix Martí¹, Ignacio Pedrós^{1,3},
Dmitry Petrov^{2,3}, Miren Ettcheto^{2,3}, Francesc Sureda^{1,3}, Antoni Camins^{2,3} and Jaume
Folch^{1,3}

¹Unitats de Bioquímica i Farmacologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut,
Universitat Rovira i Virgili, C./ St. Llorenç 21 43201 Reus (Tarragona), Spain.

²Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia Facultat de Farmàcia, Institut de Biomedicina
(IBUB), Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain.

³Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Neurodegenerativas
(CIBERNED). Instituto de Salud Carlos Tercero. Madrid, Spain.

⁴Departament de Biologia Cel·lular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona,
Barcelona, Spain.

RUNNING TITLE: Anti-inflammatory role of Prolactin and Leptin in glial cells.

Correspondence and reprint requests to: Antoni Camins PhD

Unitat de Farmacologia i Farmacognòsia, Facultat de Farmàcia Universitat de
Barcelona, Spain.

Avda/ Diagonal 643, E-08028 Barcelona, Spain.

Tel: +34 93 4024531, Fax: +34 934035982

Email: camins@ub.edu

KEYWORDS: Prolactin, Lep, Glial cells, iNOS, COX-2, STAT1/5, IL-6

ABSTRACT

The pituitary hormone prolactin (PRL) is involved in lactation, but it has been also described that may also have neuroprotective effects on hippocampal neurons. Leptin (Lep) is a pleiotropic cytokine encoded by the *ob* gene and plays a central role in the control of body weight and energy homeostasis. The first evidence of effects from combined actions of these molecules comes from the fact that the high circulating levels of PRL (or placental lactogens) during pregnancy, may directly interfere with Lep receptor signaling, possibly predisposing to Lep resistance. Whereas Lep has been shown to down-regulate inflammatory responses and provide neuroprotection, PRL is also involved in immune regulation in both astrocytes and glial cells. However, the mechanisms underlying the anti-inflammatory properties of these hormones in brain are poorly understood. In the present work, we studied the modulatory effect of PRL and Lep preventing damage caused by the exposure of glial cells to pro-inflammatory cytokines. Treatment with pro-inflammatory cytokines mainly, tumour necrosis factor- α (TNF α), interleukin 1-beta (IL1 β) and interferon-gamma (IFN γ) induces an increase in inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression and nitric oxide production. Pre-treatment of cultures with 500nM PRL and Lep produced an inhibitory effect in both iNOS gene transcriptional activity and protein expression, with a concomitant decrease in NO production. The combined effect of PRL and Lep lowered the production of reactive oxygen species by Cyclooxygenase-2 (COX-2) activity, inhibited the p-STAT1/5 signaling pathway through a decrease in p-JAK2 expression, and produced a significant decrease of IL-6 levels. Cells pre-treated with PRL and Lep also lowered the expression of p-NFKB content and cyclic AMP response element-binding protein (CREB). These data indicate the combined anti-inflammatory action of PRL and Lep in glial cells after stimulation with pro-inflammatory cytokines.

Introduction

Chronic inflammatory processes are common in obesity, cancer and neurodegenerative diseases like Alzheimer's disease (AD). Despite this fact, few studies have been done with primary glial cell cultures (mixed cultures of astrocytes and microglia) in order to evaluate the anti-neuroinflammatory properties of endogenous hormones and adipokines like prolactin (PRL) and Leptin (Lep). Glial cells, or simply glia, are cells in the nervous system whose primary function is not to transmit, encode, or amplify signals from sensory organs or other neurons, with astrocytes being the most common form (Purves et al., 2001; Lee et al., 2014). Although astrocytes and microglia are two distinct types of glial cells in the central nervous system (CNS) with differences in morphology and functional properties, they are regarded as immune active cells, and in some instances, they share common innate immune responses (Jeong et al., 2012; Bhat et al., 1999-2002; Verkhratsky 2007-2010). They form the brain blood barrier (BBB), deliver nutrients and hormones to neurons, and hold neurons in place, among other things (Purves et al., 2001). Although the BBB restricts access of immune cells and mediators from the blood, innate immune activation can occur throughout the brain in response to both local and systemic inflammatory stimuli (Laflamme et al 2001). Moreover, astrocytes exert important functions in the brain, among them synthesis of neurotrophic factors, ion homeostasis, and regulation of extracellular glutamate concentration (Bhat et al., 1999-2002; Verkhratsky 2007-2010). Moreover, glial cells play a crucial role in the normal functioning of the CNS.

Neuroinflammation is involved in the pathology of neurodegenerative diseases through the expression of cytotoxic mediators, especially pro-inflammatory cytokines and free radicals (Rubio-Perez et al., 2012; Brown GC, Neher 2010; Sastre et al., 2006; Ji & Suter 2007; Graeber et al., 2011). With neuroinflammatory reaction, the glial cells, mainly microglia and astrocytes, are activated and produce neurotoxic factors that contribute to neuronal injury (Rubio-Perez et al., 2012; Suzumura et al., 2006). Nitric oxide (NO) production is probably one of the main mediators of neuronal cell loss (Chen et al., 2009; Saha & Pahan, 2006; Bhat et al., 1998; Brown & Neher, 2010; Kaminska et al., 2009; Sastre et al., 2006; Sheng et al., 2011). Previous studies suggest that these signaling cascades are critical for the control of inflammatory processes in the brain, including the activation of microglia in response to cytokines and the induction of iNOS (Kaminska et al., 2009; Bachstetter & Van Eldik, 2010; Ji &

Suter, 2007; Kyriakis & Avruch, 2012). Accordingly, activation of iNOS in glial cells constitutes a critical event in inflammatory-mediated neurodegenerative disorders (Saha & Pahan, 2006). Moreover, other signaling pathways, such as the mitogen-activated protein kinase (MAPK) and the NF- κ B signaling cascade, are considered canonical pathways involved in inflammatory-mediated neurodegenerative disorders (Brown & Neher, 2010; Kaminska et al., 2009; Sastre et al., 2006). Currently, three major constituents of the MAPK family have been characterized in mammals: extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2), c-Jun N-terminal kinases (JNKs) (JNK1, 2, and 3), and p38 MAPKs consisting of four isoforms (α , β , γ , and δ).

Among the effects derived from the exposure to pro-inflammatory cytokines it can be found the glutamate increase that produces excitotoxicity (Brown 2007-2010; Chen et al., 2009; Saha & Pahan 2006). Lactation is a natural model for neuroprotection because it effectively prevents acute and chronic cell damage of the hippocampus that can be induced by excitotoxicity. It is becoming apparent that neuroendocrine hormones including oxytocin, progesterone and PRL, apart from their roles in lactation, may also have neuroprotective effects on hippocampal neurons (Warren et al., 2012). Among the pituitary hormones, PRL is the most versatile in the spectrum and number of functions it regulates. PRL modulates virtually every aspect of vertebrate physiology, including osmoregulation, growth, metabolism, development, reproduction, parental behaviour, and immune function (Freeman et al., 2000).

Leptin (Lep) is an important modulator of both inflammation and energy homeostasis, making it a key interface between the inflammatory response to pathogenic stimuli and the energy status of the host (Pohl et al., 2014). Lep signaling occurs typically through the JAK/STAT pathway. Janus kinase 2 (JAK2) leads to activation of STAT proteins by a process consisting on tyrosine phosphorylation of Lep receptor (Hegyí et al., 2004; Aleffi et al., 2005; Fruhbeck 2006). Leptin, besides the effects on hypothalamic control of anorexigenic neurons and in reducing body weight and adiposity, has been demonstrated to be able to protect hippocampal neurons against kainate excitotoxicity, in an experimental model of epilepsy with Lep deficient ob/ob mice (Erbayat-Altay et al., 2005).

Besides the compelling evidence concerning the effects of pituitary-derived hormones like PRL, and adipokynes like Lep in the brain, there is a relative lack of knowledge in relation to either the synergistic or antagonistic effects of their combinations. According with that, we intended to study in deep the observed combined anti-inflammatory effect of both molecules in glial cells. Then, we aimed the present research to demonstrate

an anti-inflammatory effect derived from the combined effects of PRL and Lep acting on mixed glial cell cultures from C57BL/6 mice pups, treated with the pro-inflammatory cytokines TNF α -IFN γ , TNF α -IL1 β and IL1 β -IFN γ (Vilar et al., 2014).

MATERIALS AND METHODS

Animals and *in vitro* cell culture procedure

Three-day-old pups of C57BL/6 mice (Harlan, IN, USA) were used in this study. All animal care and experimental protocols with post-natal pups were carried out in accordance with the Directive 86/609EEC of the Council of the European Union and the procedure established by the *Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca* of the *Generalitat de Catalunya*. Every effort was made to minimize animal suffering and reduce the number of animals used.

Mixed glial cell cultures were prepared from the cerebral cortices of 3-day-old C57BL/6 mice. Briefly, cerebral cortices were dissected and meninges removed. The tissue was incubated with trypsin solution (Trypsin 0.05% (w/v) trypsin-EDTA 5mM) for 15 min at 37°C. After that, the tissue was fragmented with a fire-polished Pasteur pipette. The dissociated cells were plated into 60 mm diameter culture plates (300,000 cells/ml) and grown in Dulbecco's Modified Eagle's /F-12 medium, supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS), 2% HEPES, 100 units/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin. Fresh medium was changed the next day and then every 3 days afterwards. All experiments were done 7-9 days after plating.

Cell treatment

Glial cultures were treated with pro-inflammatory cytokines (TNF α , 20 ng/ml; IL1 β , 20 ng/ml; IFN γ 20 ng/ml) (PeproTech Inc., Rocky Hill, NJ, USA) or with the same volume of phosphate buffer saline (PBS) as the control. As indicated, cells were pre-treated with PRL and Lep (500nM; Sigma, St. Louis, MO, USA) 1 hour prior to cytokine treatments or with Lep alone as a control. In addition, cells were pre-treated with either SB203580 kinase inhibitor (Calbiochem, EMD Millipore USA) and cytokines, at concentrations of 20ng/ml, and in order to test the specificity of Lep inhibitory effect on p38 pathway.

Cell viability

Cell viability assays were performed after 48 hours of treatment and were determined using MTT [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide; Sigma, St. Louis, MO, USA] assay, crystal violet, and Hoechst staining. MTT was added to the cells at a final concentration of 250 μ M and incubated for 4 hours at 37°C allowing the formation of formazan crystals. Then, the media were removed and formazan crystals were dissolved with DMSO. Formazan production was measured by the absorbance at 540nm using a spectrophotometer (Microplate Spectrophotometer Benchmark Plus BioRad). For crystal violet staining, cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 20 min at room temperature. After that, cells were washed twice with PBS, incubated 30 min at RT in a 0,25% crystal violet solution, washed twice again with PBS, and left to dry. Finally a 30% acetic acid solution was added to remove the dye incorporated in the cells and absorbance was read at 590 nm. For nuclei staining, cells were plated onto glass coverslips. After treatments, cells were fixed as described above, incubated for 10 min with Hoechst 33342 (1 μ g/ml, Sigma, St. Louis, MO, USA) and then washed again. Coverslips were mounted with Fluoromont-G (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA), and conserved at 4°C until observation in the fluorescent microscope (Olympus BX61). All viability results were expressed as percentages with respect to non-treated cells.

Nitric oxide measurement

NO released from glial cells was converted to nitrite in the culture medium, which can be determined using the Griess reaction. Culture medium was collected after 48 hours of treatments and an equal volume of Griess reagent was added (sulfanilamide 1%, N-(1-Naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride 0.1%, 2.5% phosphoric acid. Absorbance was read in a spectrophotometer at 540 nm and sodium nitrite was used as a standard. From the same dishes, protein concentrations were measured using bicinchoninic acid (Pierce Company, Rockford, IL, USA) in order to normalize the nitrite concentrations.

p38 activity assay

P38 activity assay was performed using the p38 MAP Kinase Assay Kit (Cell Signalling) following the manufacturer's recommendations. Briefly, p38 was immunoprecipitated from 200 μ g protein. After that, the samples were washed and centrifuged twice with lysis buffer and kinase buffer discarding supernatants. ATP

protein fusion (ATF) and kinase buffer were added to each sample, which was then incubated at 37°C for 30 min. After that, samples were used to follow the western blot protocol described previously. The primary antibody was pATF2 in a 1:1000 dilution. Chemiluminescence measurements and semi-quantitative values were obtained using the corresponding software Imagelab (Bio-Rad) and the results were expressed as a percentage with respect to control.

Western-blot

After treating cells with cytokines and Lep, cells were washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline and harvested in lysis buffer containing 150 mM NaCl, 5mM MgCl₂, 50mM Tris, 1mM EDTA, 1%Triton X-100, pH 7,2 with protease inhibitors (Complete, Roche Diagnostics, Germany). Protein concentration was determined using bicinchoninic acid protein assay with the Pierce BCA Protein Assay Kit (Pierce Company, Rockford, IL, USA). An average of 10 µg of protein was denatured at 95°C for 5 min in sample buffer (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8, 10% glycerol, 2% SDS, 5%β-mercaptoethanol, 0.05% bromophenol blue) and samples were subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (7.5% Acrilamide: N,N'methylbisacrylamide, 37,5:1: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA) and subsequently transferred onto polyvinylidene fluoride membrane (Immun-Blot PVDF Membrane, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Membranes were incubated overnight at 4°C with primary antibodies against iNOS, phospho-Stat1 (Tyr701), phospho-Stat3 (Tyr705), monoclonal Anti-β-Tubulin and β-actin (1:20000; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) COX IV (3E11) Cytochrome c Antibody p38 MAPK Antibody Cleaved Caspase-3 (Asp175) Antibody (Cell signalling) PRL-R (H-300) and Ob-R: sc-20992 sc-8325 (Santa Cruz Biotechnology). The blots were then washed thoroughly in TBS-T and incubated for 2 hours with a horseradish peroxidase-conjugated anti-IgG antibody, followed by the enhanced chemiluminescence detection system (Molecular Image Quantity ChemiDoc XRS+ BioRad) according to the supplier's instructions. Chemiluminescence measurements and semi-quantitative values were obtained using the corresponding software Imagelab (Bio-Rad) and the results were expressed as a percentage with respect to control. The corresponding β-actin was taken for each sample to normalize for any differences in gel loading.

RT-PCR

Total RNA was isolated from mixed glial cultures treated with cytokines and melatonin at 6 and 24 h. Briefly, cells were homogenized in the presence of Trizol reagent

(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (Sigma-Aldrich, MO, USA). Chloroform was added and the RNA was precipitated from the aqueous phase with isopropanol at 4°C. RNA was reconstituted in RNase-free water. The RNA quality and concentration were evaluated by NanoDrop ND-1000 spectrophotometry (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA).

First-strand cDNA was reverse transcribed from 1 µg of total RNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). The same amounts of cDNA were subsequently used for qRT-PCR and each sample was analyzed in triplicate. The Taqman Gene Expression Assay (Applied Biosystems) was used for the *INOS2* gene and data were obtained with the MiniOpticon Real-Time PCR system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) and normalized to GAPDH using the delta-delta Ct method.

Statistical analysis

Results were analyzed by one-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison tests. Differences with $p < 0.05$ were considered significant.

Statistical analysis

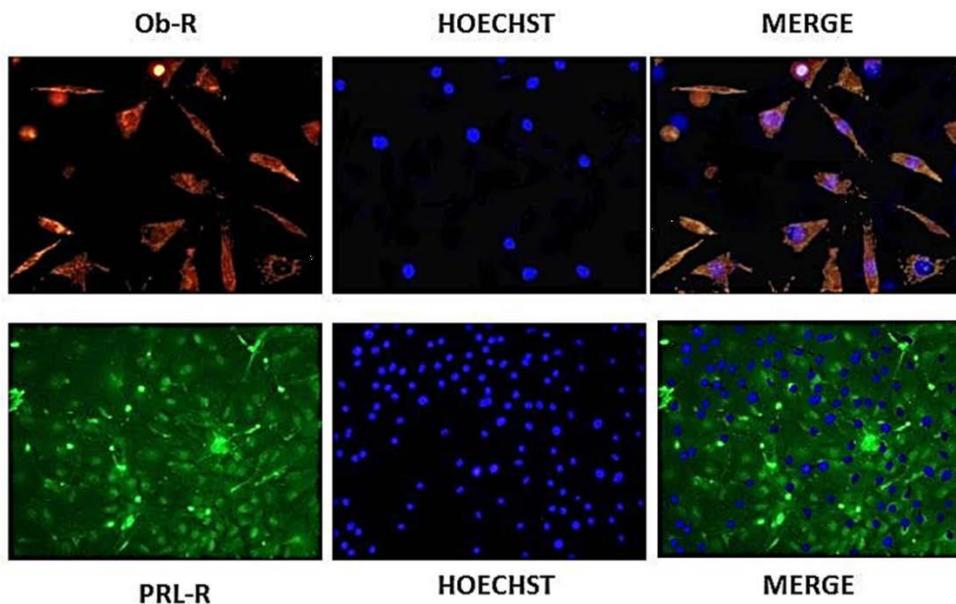
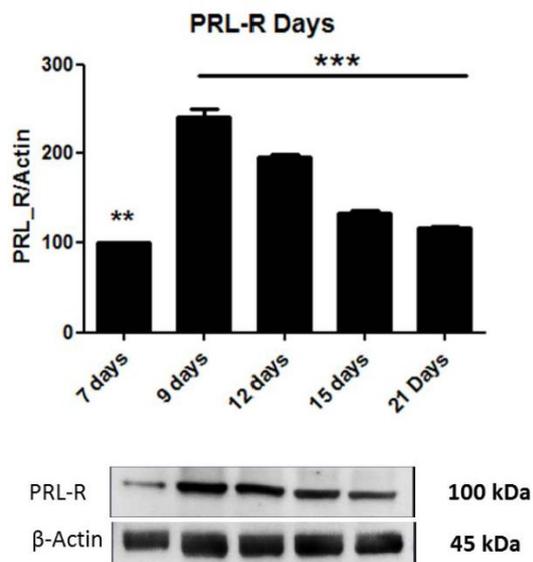
Results were analyzed by one-way ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison tests. Differences with $p < 0.05$ were considered significant.

Results

Glial cells express Prolactin and Lep receptors

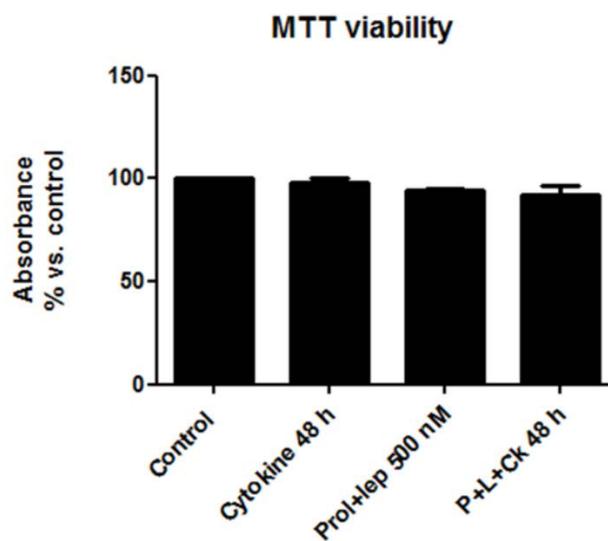
Firstly, glial cell culture was characterized using specific antibodies. In order to characterize the culture model, the presence of PRL and Lep receptors was determined by Western-blot and immunohistochemistry with either anti-PRL-R and Ob-R antibodies (see material and methods). Results from Western-blot analysis demonstrate the presence of PRL-R up to 9 days of cell culture, with a progressive decrease 21 days after the cell plating (Figure 1a).

Previous results of our group revealed a significant reduction in Ob-R content after 9 days after plating cells (not shown in the present paper). Results from immunohistochemistry show the presence of both receptors up to 9 days of cell culture (Figure 2).



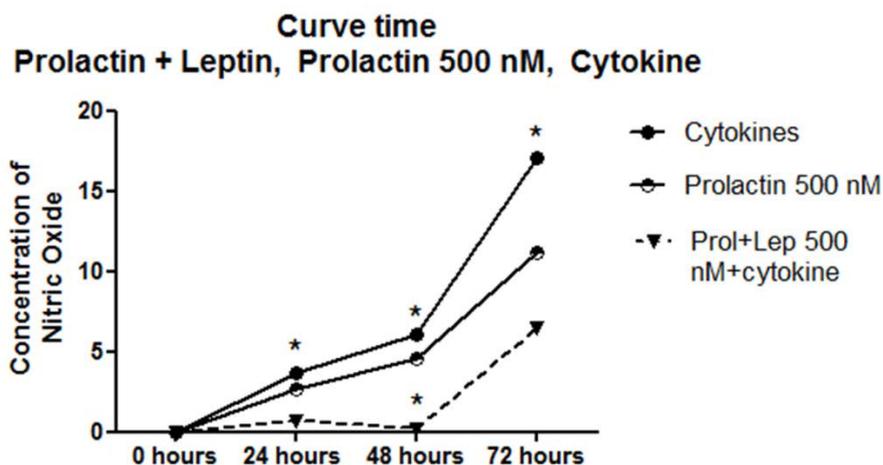
Effect of cytokines on glial viability

To investigate whether cytokine-treated glial cells show an impaired mitochondrial function, we treated primary glial cells with three pro-inflammatory cytokines, such as TNF α , IL1 β , and IFN γ at concentrations of 20ng/ml. Then, we evaluated the viability of cell culture under each different treatment by MTT. The results obtained evidence that any treatment (cytokines alone, PRL and Lep, and the combination of PRL, Lep and cytokines) did not affected cell viability, as shown when measured by MTT method (Figure 3).



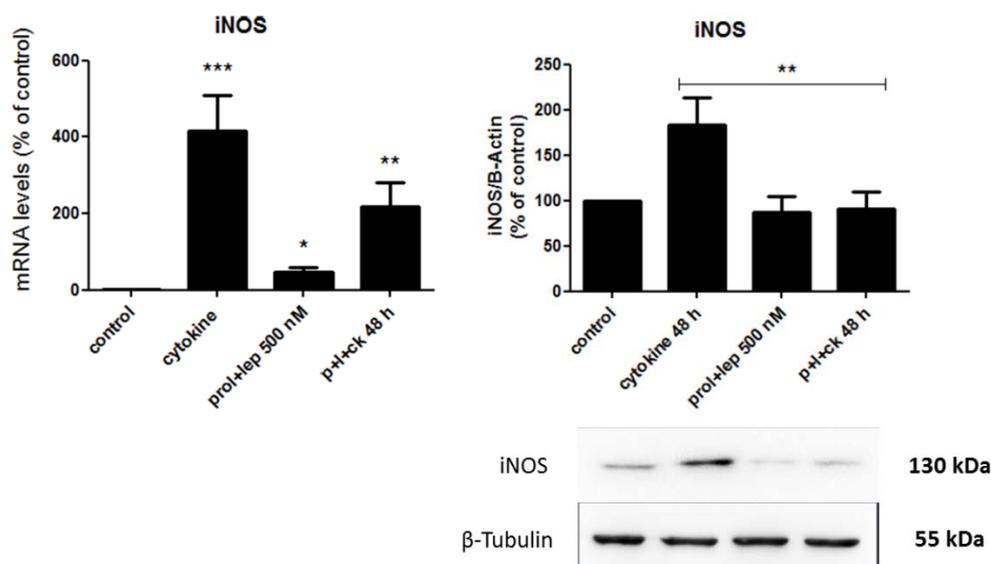
Combined exposure to Prolactin and Leptin decreased Nitric Oxide production mediated by pro-inflammatory cytokines in glial cells

To investigate whether cytokine-treated glial cells increase nitric oxide production, we treated primary glial cells with three pro-inflammatory cytokines, such as TNF α , IL1 β , and IFN γ . To determine NO production, we measured nitrite released into the culture medium using the Griess reagent. Previous results from our group showed that the combination of three pro-inflammatory cytokines was the treatment that resulted in the greatest induction of NO production, and showing a significant NO increment when compared with controls (results not shown in the present document). Thus, the following experiments were done with all three cytokines together (TNF α , IL1 β and IFN γ) at 20 ng/ml. We performed the monitoring of anti-inflammatory effect of PRL and Lep across time. We tested NO synthesis at 24, 48 and 72h in cells treated with TNF α , IL1 β and IFN γ , and the most significant increment was obtained when cells were treated for up to 24h. Results showed a progressive increase of NO levels at 48 and 72 hours after cytokine treatment (Fig. 4). Whereas previous results from our group demonstrated a significant anti-inflammatory effect of Lep in inhibiting the production of NO (not shown in this document), no significant effects were found when PRL was tested alone (Figure 4). By contrast, the exposure of cells to the combined effect of PRL and Lep (500 nM) were able to reduce significantly the NO production, markedly at 72h, as it is shown in Figure 4. Then, experiments described in the next chapters of the present investigation were conducted with the combination of both molecules, PRL and Lep.

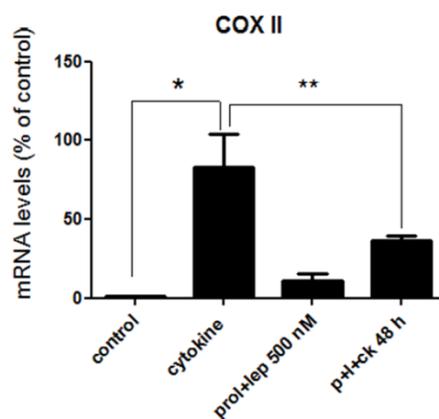


Combined exposure to Prolactin and Leptin decreased iNOS activity and free radicals production

To further study the decrease in NO production, we also evaluated whether exposure to PRO and Lep modify iNOS gene activity and enzyme content, by either PRC Real-time and Western-blot. As expected, cytokine treatment induced a marked increase in both transcriptional activity of iNOS gene and enzyme content in glial cells, which was prevented by pre-treatment with the combined exposure to PRL and Lep (Fig. 5). Taken together, our current data show that exposure to PRL and Lep inhibits significantly the inflammatory activation of glial cells with respect to iNOS induction and NO production.

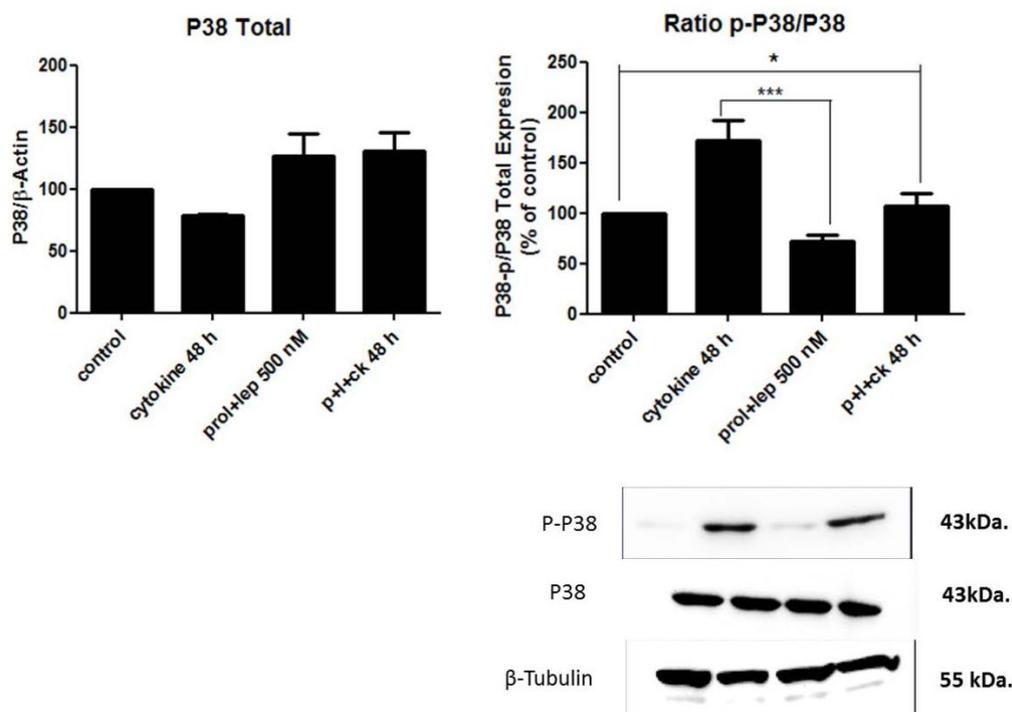


Cyclooxygenase-2 is another primary inflammatory mediator in glia, and responsible of producing reactive oxygen species. The exposure of glial cells to PRL and Lep also prevented significantly the transcriptional induction of COX-2 gene (Figure 6). Then it seems that the combined effect of PRL and Lep is able to reduce the oxidative burden derived from the exposure of glia cells to pro-inflammatory cytokines.

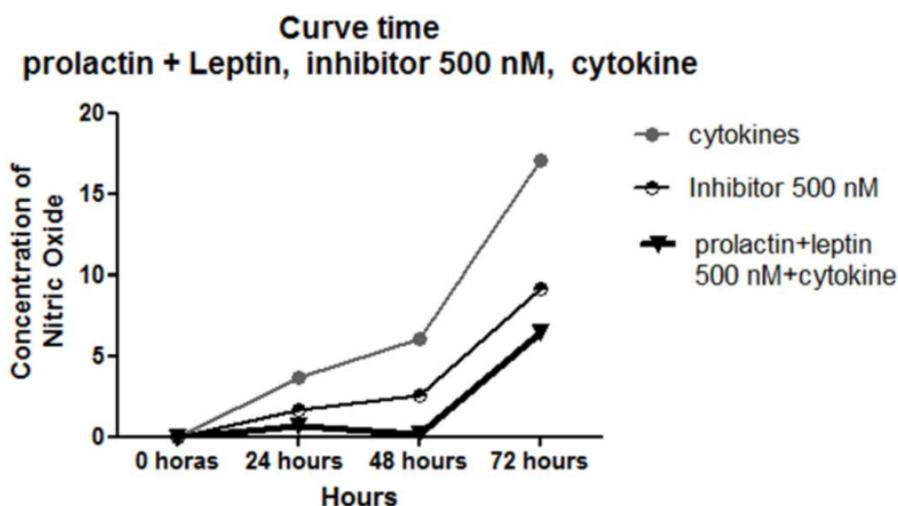


Exposure to PRL and Leptin decreased Nitric Oxide production related to p38 MAP Kinase pathway in glial cells

Since previous investigations of our group suggest that this observation concerning iNOS can be related to p38 MAP Kinase (MAPK) pathway, we intended to show the effect of PRL and Lep on p38 pathway. In fact, results show a significant increase on the content of the active form of p38 (Phospho-p38 Thr180/Tyr182) as a result of the exposure to pro-inflammatory cytokines, that can be reversed by pre-treatment of glial cells with PRL and Lep (Figure 7).

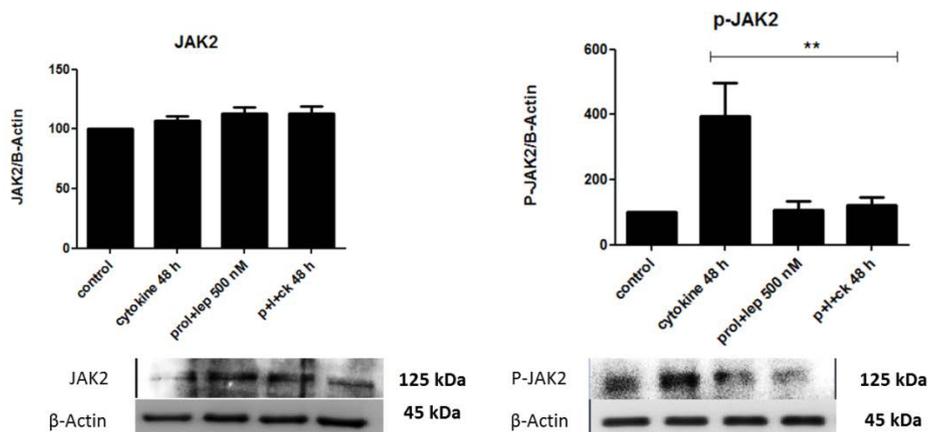


To validate results from p38 MAPK activation, glial cells were pre-treated with the p38 specific inhibitor SB203580, and we intended to observe the effect of this inhibitor over time. In fact, the exposure of glial cells to both cytokines and SB203580 resulted in a significant reduction in NO production up to 72h (Figure 8). Then, then present results demonstrate that pre-treatment of cells with PRL and Lep is able to inhibit specifically p38 MAPK pathway, as demonstrate the exposure of cells to p38 specific inhibitor SB203580.



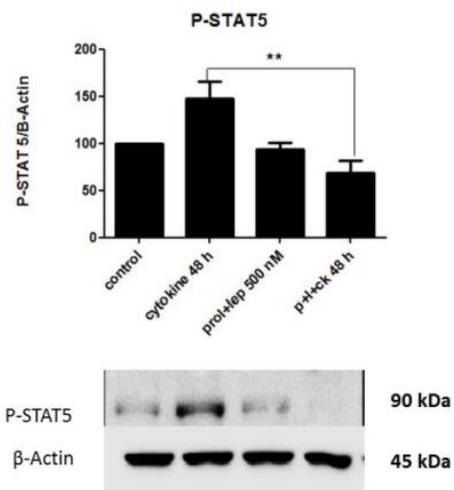
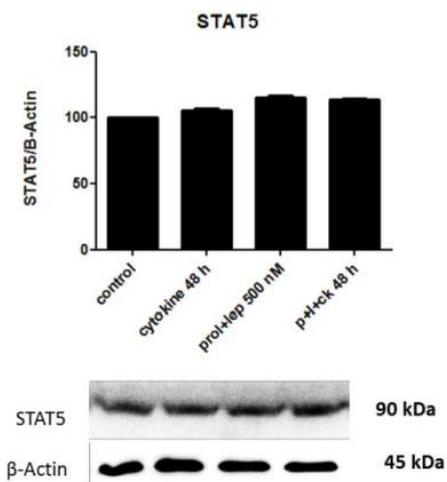
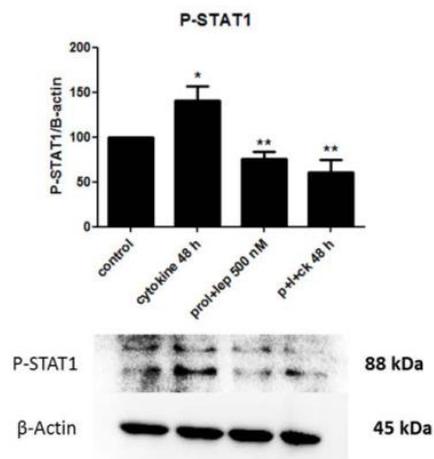
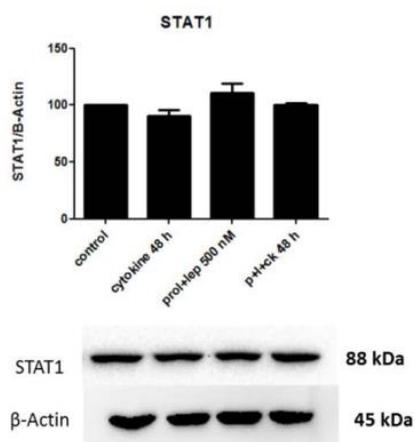
Exposure to Prolactin and Leptin decreased JAK/STAT signaling pathway in glial cells

As shown before, exposure to PRL and Lep inhibits significantly the inflammatory activation of glial cells. Both molecules share common signaling pathways and are able to activate their receptors through the JAK/STAT pathway. Then, results from the present research show a significant activation of the phosphorylated form of JAK2 (Tyr1007/1008) and is significantly reversed by the exposure to PRL and Lep (Figure 9).



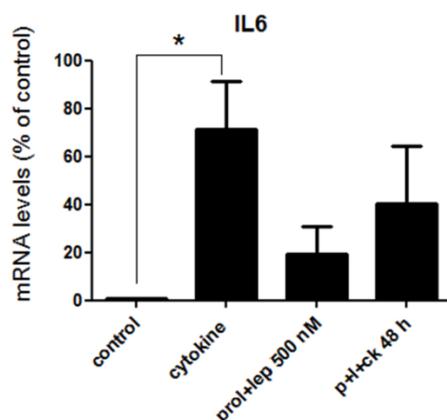
As we stated above, the decrease in the activation of the JAK2 phosphorylation should alter, in turn, the STATs activity. In agreement with that, the present results show a significant activation of both, STAT-1 and -5, in glial cells exposed to pro-inflammatory cytokines (Figure 10). In fact, STAT-1 is activated by phosphorylation at Tyr701 and STAT-5 by Tyr694, which induce dimerization, nuclear translocation and DNA binding. Results depicted in Figure 9 also shown that pre-treatment of glial cells with PRL and Lep (500 nM) prevents activation by phosphorylation of both STAT-1 and STAT-5.

Given the critical roles of STAT proteins such as activation of pro-inflammatory and anti-proliferative processes by STAT1, and control of cell-cycle progression and apoptosis by STAT3 and STAT5, we studied the effects of the observed changes in molecules related with these processes.

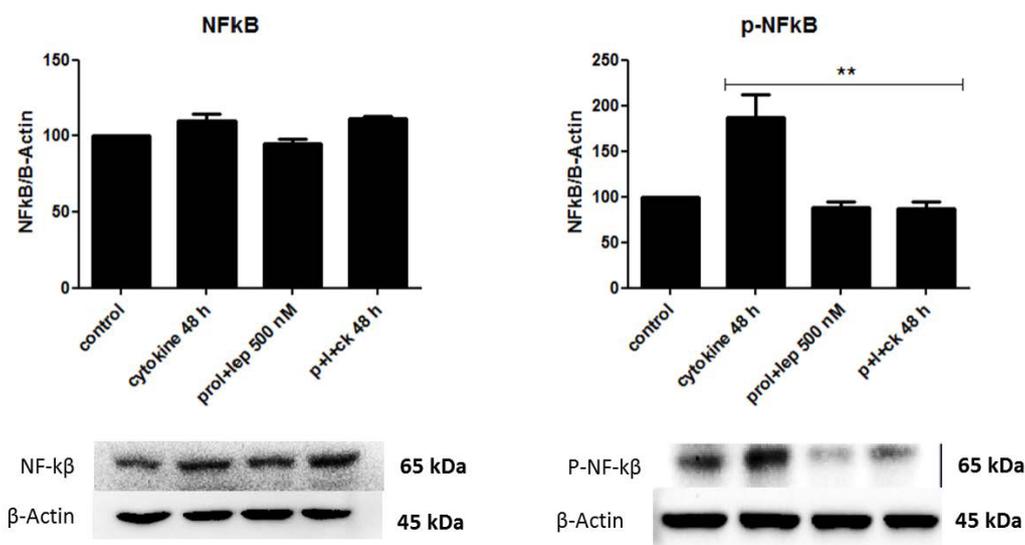


Exposure to PRL and Leptin prevented the activation of chemokines related to inflammation.

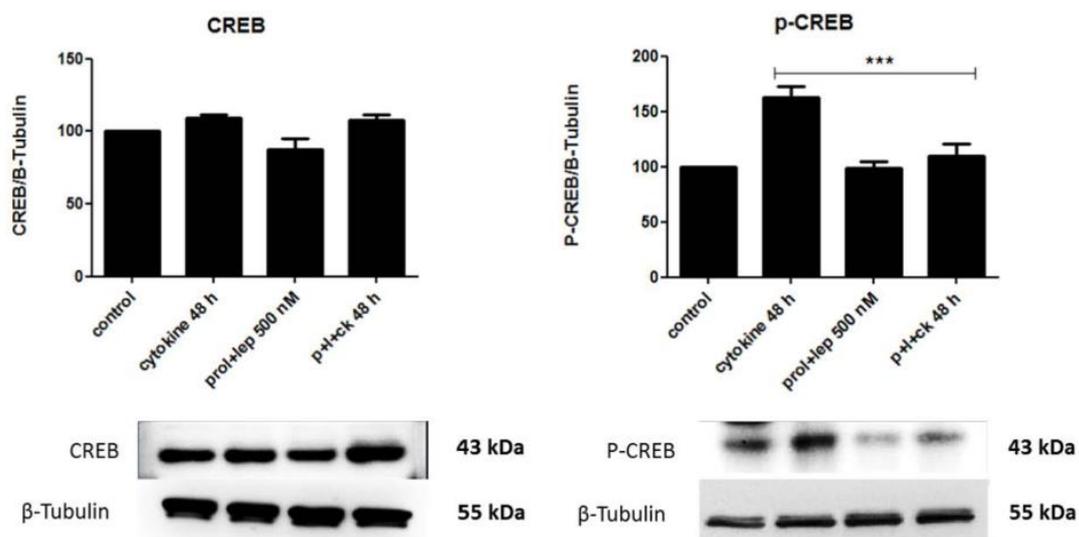
As we described before, the exposure of glial cells to IL-1 β and TNF- α induced the expression of cytokines and chemokines like IL-6. The release of IL-6 is a key event related to several neurodegenerative processes. Then, despite the controversial and so complex interactions among cytokines and transcription factors like STAT-1, we intended to study the effects of PRL and Lep on IL-6 at transcriptional level. In fact, transcriptional activity of IL-6 gene resulted significantly up-regulated in glial cells by the exposure to pro-inflammatory cytokines (Figure 11). This up-regulation resulted also prevented by the exposure to PRL and Lep.



Another molecule involved in the regulation of inflammation in glial cells is NF- κ B. This transcription factor plays a key role in regulating the immune response to infection. Then, we also intended to determine the effects of PRL and Lep in the content of this molecule. In fact, glial cells responded to the exposure to pro-inflammatory cytokines by an increase in the phosphorylated form of NF- κ B (Ser536), and it was also reversed by PRL and Lep (Figure 12).



In neurons, NF- κ B has also been implicated in processes of synaptic plasticity and memory, and regulates the PKA/CREB pathway function in learning and memory. Then, it was considered of interest to study the effects of PRL and Lep on CREB phosphorylation (Figure 13). In fact, glial cells responded to the exposure to pro-inflammatory cytokines by an increase in the phosphorylated form of CREB (Ser133), and it was also reversed by PRL and Lep (Figure 13).



Discussion

At present, it seems widely demonstrated that not only Lep, but also adipokines and circulating food-intake-controlling metabolites, are capable of modulate glial activation in models of excitotoxicity, despite the molecular mechanisms are not well understood. The present research was aimed to demonstrate an anti-inflammatory effect derived from the combined effects of PRL and Lep acting on glial cells. In agreement with that, results from the present research clearly show a significant anti-inflammatory activity of PRL and Lep, when acting together, against the exposure to cytokines TNF α , IL1 β and IFN γ , in mixed glial cell cultures from C57BL/6 mice pups.

Whereas previous results from our group demonstrated a significant anti-inflammatory effect of Lep inhibiting the production of NO in mixed cell cultures exposed to pro-inflammatory cytokines, in the present research no significant effects were found when PRL was tested alone. By contrast, the exposure of cells to the combined effect of PRL and Lep were able to reduce significantly the NO production. Despite the apparent lack of physiological basis for this combination, emerging research seems to reinforce the complex matrix of interactions of these molecules. Even more, both molecules share common chemokine receptor-derived pathways.

In fact, PRL and Lep share in common some characteristics concerning brain and neurodegenerative processes, and show pleiotropic effects besides their canonical functions. In previous studies from our group, we analysed the expression of molecules related to metabolism, with the main focus on PRL and Lep signaling pathways in an APP_{swe}/PS1_{dE9} (APP/PS1) transgenic familial AD mice model, at 3 and 6 months of age, compared to wild-type controls (Pedrós et al, 2015). Then, we observed a significant reduction in both mRNA and protein levels of the prolactin receptor (PRL-R) in the hippocampus of 3 months old APP/PS1 mice, with a decrease in the levels of the Lep receptor (OB-R) first becoming evident at 6 months of age.

Furthermore, it has been shown that Lep is a powerful stimulator of *in vitro* PRL release and that its actions occur in part through stimulation of ERK1/2 (Tipsmark et al., 2008). This observation, suggest the existence of a complex net of interactions among different adipokines, and related hormones like PRL, that should be extensively analysed to gain a better understanding of AD aetiology. In studies from human populations, alterations in both PRL and Lep serum levels have been found to be related to inflammatory and neuroendocrine responses, and also in mood alterations and psychosis. Results from experimental administration of endotoxin

lipopolysaccharide (LPS) in humans showed differences among sex groups, with increased levels of cortisol and increased secretion of PRL in women (Engler et al., 2015). Results from studies intended to determine immune and hormonal changes, and their relationship with the incidence of upper respiratory tract infections during an extremely stressful military training, showed that blood levels of PRL, testosterone, Lep and total IGF-I were reduced (Gomez-Merino et al., 2005). Even more, results from a recent multinomial logistic regression study adjusting for age, sex and life stress, show that PRL is a predictor of psychosis transition (Labad et al., 2015). Then, some experimental evidences show changes in both PRL and Lep under stressful situations, inflammatory context and neurologic alterations.

As a result of the exposure to pro-inflammatory cytokines, we describe results from measured nitrite released into the culture medium, using the Griess reagent. A significant reduction in NO production related to PRL and Lep exposure was also observed. High levels of NO exert their toxic effects through multiple mechanisms, including lipid peroxidation, mitochondrial damage, protein nitration and oxidation, depletion of antioxidant reserves, activation or inhibition of various signalling pathways, and DNA damage (Khandelwal et al., 2011; Brown 2007; Brown 2010; Brown & Neher 2010). Thus, NO produced by iNOS seems to be a key mediator of such glial activation induced neuronal death. Previous studies have described that up-regulation of iNOS is involved in neuronal degeneration associated with PD and AD (Brown GC, Neher 2010; Sastre et al., 2006; Ionov et al., 2011; Graeber et al., 2011). In agreement with that, results from the present research clearly show that immunomodulatory effect of PRL and Lep on glial cell activation might partly explain its central role in brain neuroprotective action through iNOS inhibition.

The exposure of glial cells to PRL and Lep also prevented significantly the transcriptional induction of COX-2 gene that is another primary inflammatory mediator in glia. This enzyme converts arachidonic acid into precursors of vasoactive prostaglandins, producing reactive oxygen species in the process. Although the levels of COX-2 and its metabolic product prostaglandin (PG)E₂ are elevated in the brain of AD patients, the mechanisms for the development of AD remain unknown (Wang et al., 2014). COX-2 mediates the reciprocal regulation of IL-1 β and A β between glial and neuron cells. More importantly, experiments in glioblastoma cells demonstrated that A β deposition mediated the inflammatory response of glial cells via inducing the expression of COX-2 (Wang et al., 2014). Despite no specific information is available concerning the effects of hormones like PRL and Lep on COX-2 in glia, a recent paper

demonstrate that astrocytes change their receptivity for sex steroid hormones by switching steroid hormone receptor expression and that 17β -Estradiol and progesterone modify or antagonize proinflammatory COX-2 synthesis (Habib 2014). Chronic COX-2 production may contribute to free radical mediated cellular damage, vascular dysfunction, and alterations in cellular metabolism. These may cause secondary injuries to the brain that promote neuropathology and worsen behavioral outcome. In fact, many observed changes in brains, involving neuroinflammatory and arachidonic acid cascade, may contribute to progression in AD, and can help to identify new targets for drug development (Rao et al., 2012).

As we commented above, we demonstrated that the combined effect of PRL and Lep counteracted both the over-expression of iNOS mRNA and the production of NO. The second question to address is to determine which pathway can be involved. In previous papers from our group it was shown that the observed inhibition can be related to the effect of PRL Lep on p38 MAPK pathway (Vilar et al., 2014). It has been widely demonstrated that p38 MAPK is activated by a variety of cellular stresses including osmotic shock, inflammatory cytokines, LPS, UV light and growth factors. The results from the present investigation show that the exposure of glial cells to pro-inflammatory cytokines in the presence of a p38 MAPK inhibitor SB203580, resulted in a significant reduction in NO production. Then, in the present study we also demonstrated that the combined effect of PRL and Lep was able to inhibit p38 MAPK specifically.

As shown before, PRL and Lep share common signaling pathways and are able to activate their receptors through the JAK/STAT pathway. Binding of PRL to its plasma membrane receptor (long form) activates the tyrosine-specific protein kinase JAK2. In turn, JAK2 activation leads to tyrosine phosphorylation of both PRL and Lep receptors and serve as binding sites for STAT proteins (STAT/1/3 and 5). The tyrosine phosphorylation of Stat-5 induces the translocation into the nucleus, where it binds to the DNA sequence of the Stat-5 box and activates transcription of milk protein genes (Gouilleux et al., 1994). Binding of PRL to the short form of the receptor does not activate JAK2. Thus, results from the present research show a significant activation of the phosphorylated form of JAK2 (Tyr1007/1008) and is significantly reversed by the exposure to PRL and Lep.

As we stated above, the decrease in the activation of the JAK2 phosphorylation alters the STATs activity. Moreover, it has been described that IFN γ , used in the treatment of glia cells in the present research, is a pluripotent cytokine whose major biological

effects are mediated through a pathway in which STAT1 is the predominant and essential transcription factor (Quing et al., 2004). Then, alterations in STAT molecules should be observed in our experiments. In agreement with that, the present results show a significant activation of both, STAT-1 and -5, in glial cells exposed to pro-inflammatory cytokines and can be reversed by PRL and Lep. STAT proteins play critical roles such as activation of pro-inflammatory and antiproliferative processes by STAT1, and control of cell-cycle progression and apoptosis by STAT3 and STAT5. In previous studies from our group, we analyzed the expression of molecules related to metabolism, in an APP^{swe}/PS1^{dE9} (APP/PS1) transgenic mice model, at 3 and 6 months of age (Pedrós et al, 2015). In particular, we studied the expressions of the intracellular signaling molecules downstream of these receptors, including STAT1/5, SOS1, KRAS and Suppressor of cytokine signalling 1/3 (SOCS1/3). Our data suggest a downregulation in some of these molecules such as STAT-5b and SOCS1/3, in 3 months-old APP/PS1 brains.

Proinflammatory cytokines secreted from microglia are known to induce a secondary immune response in astrocytes leading to an inflammatory loop (Kaltschmidt 2009). Cytokines also interfere with neurogenesis during aging and in neurodegenerative diseases. The release of IL-6 is a key event related to several neurodegenerative processes and, then, we intended to study the effects of PRL and Lep on IL-6 at transcriptional level. In fact, our results show transcriptional activity of IL-6 gene that resulted significantly up-regulated in glial cells by the exposure to pro-inflammatory cytokines, and was also prevented by the exposure to PRL and Lep. It has been described that pro-inflammatory cytokines, mainly TNF α , IL1 β , and IFN γ , will be responsible for iNOS induction in glial cells, enhance the increase in NO, and the expression of cytokines and chemokines in differentiated human differentiated neuroprogenitor cells (NPCs) as shown by an immune pathway-specific array (Kaltschmidt 2009). Among them, we can found IL-6 that is a cytokine released by neurons, astrocytes, microglia and endothelial cells depending on the stimuli (Erta et al., 2012). IL-6 has been related to many brain diseases like Multiple sclerosis and AD, where Amyloid- β peptide (A β) produced by cleavage of amyloid precursor protein (APP) induces microgliosis, astrogliosis and triggers IL-6 production in both types of cells which upregulates APP and hyperphosphorylates tau in neurons.

We observed another key molecule related to inflammation that responded to the exposure to pro-inflammatory cytokines. An increase in the phosphorylated form of NF- κ B (Ser536) was found in cells exposed to pro-inflammatory cytokines, and was reversed by PRL and Lep. NF- κ B is a transcription factor that plays a key role in regulating the immune response to infection (Kaltschmidt & Kaltschmidt, 2009). In glia cells NF- κ B is involved in inflammatory processes that exacerbate diseases such as autoimmune encephalomyelitis, ischemia, and AD and its inhibition might ameliorate disease. In neurons, NF- κ B has also been implicated in processes of synaptic plasticity and memory, and regulates the PKA/CREB pathway function in learning and memory.

CREB activity seems to be involved in crucial events related to brain physiology. The CREB activation pathway could contribute to AD disease and has been implicated in the pathophysiology of depression, as well as in the efficacy of antidepressant treatment (Gundersen et al., 2013). In experimental-induced chronic ischemic retina, the experiments induced long-term aberrant CREB signaling, and time-dependent progressive dysregulation of neurotrophic and inflammatory systems (Guo et al., 2014). Then, it should be a link between CREB activity and inflammatory mechanism. Furthermore, CREB down regulation could modify patterns of epigenetic modification of chromatin and, in particular, in the histones acetylation. Chromatin modifying enzymes DNA methyltransferases (DNMTs), Histone deacetylases (HDAC2) and the HAT CREB binding protein (CBP) play a crucial role in memory, particularly during consolidation process which declines with advancing age (Singh et al., 2014). The main epigenetic modifications of chromatin include hypermethylation of CpG islands, where methyl transferases transform cytosines into 5-methylcytosine, histone modifications by acetylation, methylation and phosphorylation and, finally, complex chromatin remodeling of nucleosomes (Portela & Esteller, 2010). The implications of these modifications have pleiotropic effects in the organism, and constitute a global mechanism of adaptation to environmental changes. Moreover, mutations of epigenetic modulator genes have been shown to be implicated in neurodegenerative disorders like AD. Then, despite glial cells seems not to be directly related to learning and memory processes, it has been hypothesized that 'glia bridges' contribute to the formation of the physical structures that allows neurons to connect among them, leading to memory structuration (Ross & Redpath, 2009). These temporary 'glia bridges' create long term memory by stimulating the growth of axons, dendrites and synapses, and provide the pathways enabling permanent neural structures to be constructed. This fundamental algorithm for how the brain generates new links is the

underlying process of memory maintenance, learning and creativity. Unfortunately, our *in vitro* experimental model do not allow us to deep in this crucial concern and it should be necessary to study in deep this aspect in further experiments, and by the use of a more complex models.

In summary, the present study demonstrates that pro-inflammatory cytokines activates glial cells, increasing NO production through a sustained activation of p38 MAPK pathway. However, the combined effects of PRL and Lep significantly prevents p38 MAPK activation following cytokine treatment, enough to reduce the iNOS expression and subsequent NO release. Our data suggest the combined effect of PRL and Lep acting as an anti-inflammatory factors in glial cells exposed to pro-inflammatory cytokines, exerting its function at different levels: acting on p38 MAPK pathway and reducing its activity and NO production; acting on COX-2 release of reactive oxygen species; acting on JAK-2 and STAT1/5 signaling pathway; acting on IL-6 release, NF- κ B and CREB activity. For these reasons, we propose that the combined effect of PRL and Lep may be a promising therapeutic strategy in neuroinflammatory-associated brain disorders.

DISCLOSURE STATEMENT

The authors declare no competing financial interests.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was funded by grant 2009/SGR00853 from the Generalitat de Catalunya (autonomous government of Catalonia), by grants SAF2011-23631 from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación. Grant 0177594 from the CONACYT (Mexico). Project "Prometeo" from SENESCYT (Government of Ecuador). We also would like to express our gratitude to Ms Ana Nieto for revising this manuscript.

ABBREVIATIONS

A β : Amyloid- β peptide

AD: Alzheimer's disease

APP: Amyloid precursor protein

BBB: Brain Blood Barrier

CBP: HAT CREB binding protein

CNS: Central nervous system

COX-2: Cyclooxygenase-2

CREB: cyclic AMP response element-binding protein

DNMTs: DNA methyltransferases

ERK1/2: Extracellular signal-regulated kinases

HDAC2: Histone deacetylases

IFN γ : Interferon-gamma

IL1 β : Interleukin 1-beta

iNOS: Nitric oxide synthase

JAK2: Janus kinase 2

JNKs: c-Jun N-terminal kinases

Lep: Leptin

LepR (or ObRb): Leptin receptors

LPS: lipopolysaccharide

MAPK: Mitogen-activated protein kinase

NO: Nitric oxide

NPCs: Differentiated neuroprogenitor cells

OB-R: Leptin receptor

PG: Prostaglandin

PRL: Prolactin

PRL-B: Prolactin receptor

STATs: Signal transducers and activators of transcription

SOCS3: Suppressor of cytokine signalling 3

TNF α : Tumour necrosis factor-alpha

REFERENCES

Aleffi S, Petrai I, Bertolani C, Parola M, Colombatto S, Novo E, Vizzutti F, Anania FA, Milani S, Rombouts K, Laffi G, Pinzani M, Marra F. Upregulation of proinflammatory and proangiogenic cytokines by leptin in human hepatic stellate cells. *Hepatology* (Baltimore, Md.) 2005 Dec;42(6):1339-48

Erta M, Quintana A, Hidalgo. Interleukin-6, a Major Cytokine in the Central Nervous System. *J. Int J Biol Sci* 2012; 8(9):1254-1266. doi:10.7150/ijbs.4679

Freeman ME, Kanyicska S, Lerant A. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion, *Physiological Reviews*, 80 (2000) 1523–1631.

Fruhbeck G. Intracellular signalling pathways activated by leptin. *The Biochemical journal* 2006 Jan 1;393(Pt 1):7-20

Guo XJ, Tian XS, Ruan Z, Chen YT, Wu L, Gong Q, Wang W, Zhang HY. Dysregulation of neurotrophic and inflammatory systems accompanied by decreased CREB signaling in ischemic rat retina. *Exp Eye Res.* 2014 Aug;125:156-63. doi: 10.1016/j.exer.2014.06.003. Epub 2014 Jun 19.

Kaltschmidt B and Kaltschmidt C. NF- κ B in the Nervous System. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009;1:a001271

Engler H, Benson S, Wegner A, Spreitzer I, Schedlowski M, Elsenbruch S. Men and women differ in inflammatory and neuroendocrine responses to endotoxin but not in the severity of sickness symptoms. *Brain Behav Immun.* 2015 Aug 17. pii: S0889-159

Freeman ME, Kanyicska S, Lerant A. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion, *Physiological Reviews*, 80 (2000) 1523–1631.

Gomez-Merino D, Drogou C, Chennaoui M, Tiollier E, Mathieu J, Guezennec CY. Effects of combined stress during intense training on cellular immunity, hormones and respiratory infections. *Neuroimmunomodulation.* 2005;12(3):164-72.

Gouilleux F, Wakao H, Mundt M, and Groner B. Prolactin induces phosphorylation of Tyr694 of Stat5 (MGF), a prerequisite for DNA binding and induction of transcription. *EMBO J.* 1994 Sep 15; 13(18): 4361–4369. PMID: PMC395363

Gundersen BB, Briand LA, Onksen JL, Lelay J, Kaestner KH, Blendy JA. J Neurosci. Increase hippocampal neurogenesis and accelerated response to antidepressants in mice with specific deletion of CREB in the hippocampus: role of cAMP response-element modulator τ . 2013 Aug 21;33(34):13673-85. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1669-13.2013

Habib P, Dang J, Slowik A, Victor M, Beyer C. Hypoxia-induced gene expression of aquaporin-4, cyclooxygenase-2 and hypoxia-inducible factor 1 α in rat cortical astroglia is inhibited by 17 β -estradiol and progesterone. *Neuroendocrinology*. 2014;99(3-4):156-67. doi: 10.1159/000362279. Epub 2014 Mar 28.

Hegy K, Fulop K, Kovacs K, Toth S, Falus A. Leptin-induced signal transduction pathways. *Cell biology international* 2004;28(3):159-69

Labad J, Stojanovic-Perez A, Montalvo I, Sole M, Cabezas A, Ortega L, Moreno I, Vilella E, Martorell L, Reynolds RM, Gutierrez-Zotes A. Stress biomarkers as predictors of transition to psychosis in at-risk mental states: Roles for cortisol, prolactin and albumin. *Journal of Psychiatric Research* 60 (2015) 163e169.

Laflamme N, Rivest S. Toll-like receptor 4: the missing link of the cerebral innate immune response triggered by circulating gram-negative bacterial cell wall components, *FASEB J*, 15 (2001) 155–163.

Lee H.S., *et al. Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. Early edition (2014).

Pedrós I¹, Petrov D, Artiach G, Abad S, Ramon-Duaso C, Sureda F, Pallàs M, Beas-Zarate C, Folch J, Camins A. Adipokine pathways are altered in hippocampus of an experimental mouse model of Alzheimer's disease. *J Nutr Health Aging*. 2015 Apr;19(4):403-12. doi: 10.1007/s12603-014-0574-5.

Popovic V, Duntas LH. Brain somatic cross-talk: ghrelin, leptin and ultimate challengers of obesity, *Nutritional Neurosci*. 8 (2005) 1–5.

Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol*. 2010 Oct;28(10):1057-68. doi: 10.1038/nbt.1685.

Purves D. *et al. Neuroscience*. (Sinauer Associates, Sunderland, ed. 2, 2001)

Pugazhenth S, Zhang Y, Bouchard R, Mahaffey G. Induction of an Inflammatory Loop by Interleukin-1 β and Tumor Necrosis Factor- α Involves NF- κ B and STAT-1 in Differentiated Human Neuroprogenitor Cells. *PLOS ONE* | www.plosone.org 1 July 2013 | Volume 8 | Issue 7 | e69585

Qing Y and Stark GR. Alternative Activation of STAT1 and STAT3 in Response to Interferon- γ October 1, 2004 *The Journal of Biological Chemistry*, 279,41679-41685.

Rao JS, Keleshian VL, Klein S, Rapoport SI. Epigenetic modifications in frontal cortex from Alzheimer's disease and bipolar disorder patients. *Transl Psychiatry*. 2012 Jul 3;2:e132. doi: 10.1038/tp.2012.5

Ross CT, Redpath S. Physical Formation of Memory. The Role of Glia Cells. *NeuroQuantology* | December 2009 | Vol 7 | Issue 4 | Page 596-60.

Singh P, Thakur MK. Reduced recognition memory is correlated with decrease in DNA methyltransferase1 and increase in histone deacetylase 2 protein expression in old male mice. *Biogerontology*. 2014 Aug;15(4):339-46. doi: 10.1007/s10522-014-9504-5. Epub 2014 Jun 13

Strauss KI, Barbe MF, Marshall RM, Raghupathi R, Mehta S, Narayan RK. Prolonged cyclooxygenase-2 induction in neurons and glia following traumatic brain injury in the rat. *J Neurotrauma*. 2000 Aug;17(8):695-711.

Tipsmark KC, Strom CN, Bailey ST, Borski RJ. Leptin stimulates pituitary prolactin release through an extracellular signal-regulated kinase-dependent pathway, *J Endocrinol*, 196 (2008) 275-81.

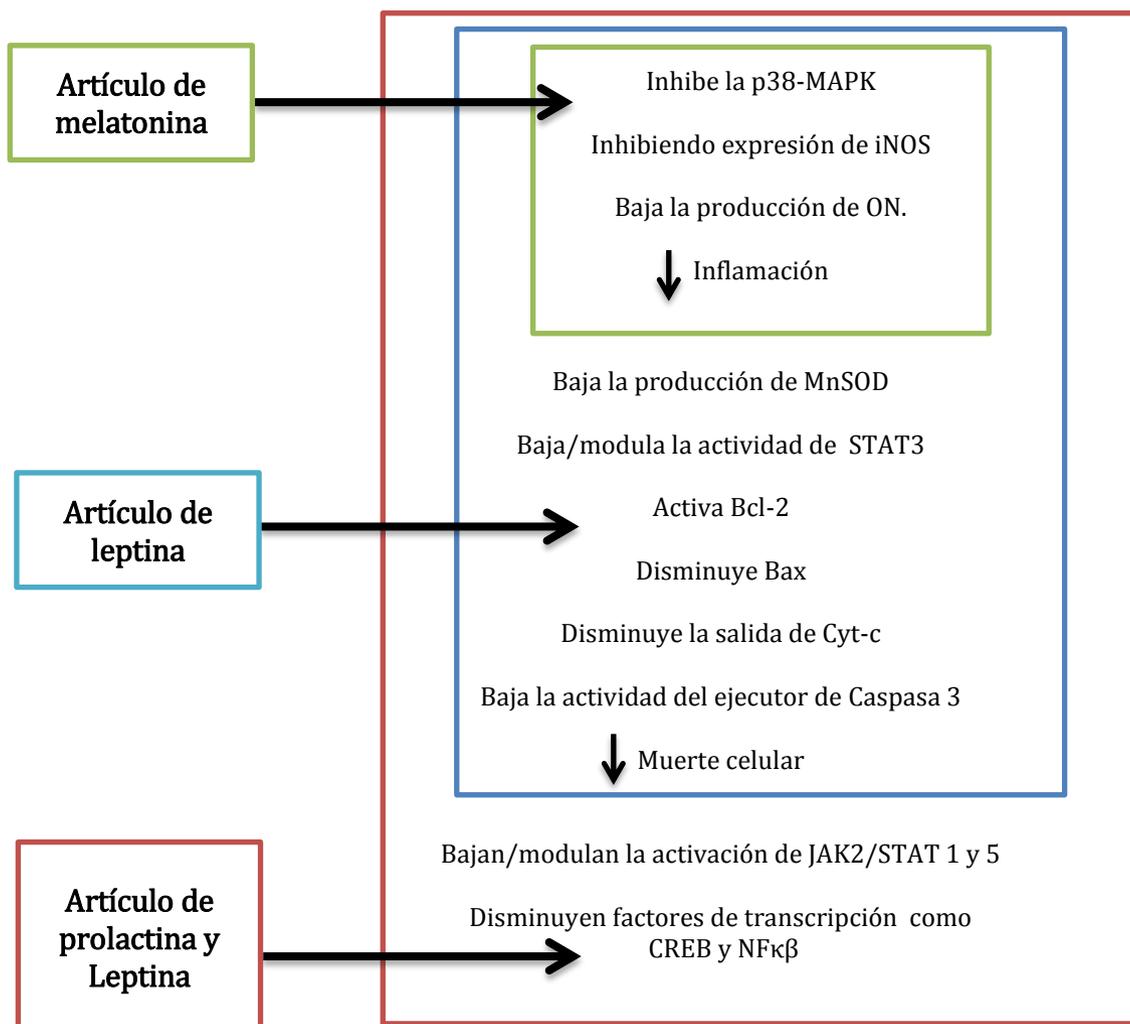
Trevor C, Redpath S. Physical Formation of Memory. The Role of Glia Cells. *NeuroQuantology* | December 2009 | Vol 7 | Issue 4 | Page 596-60

Vilar A, de Lemos L, Patraca I, Martínez N, Folch J, Junyent F, Verdaguer E, Pallàs M, Auladell C, Camins A. Melatonin suppresses nitric oxide production in glial cultures by pro-inflammatory cytokines through p38 MAPK inhibition.

Wang P, Guan PP, Wang T, Yu X, Guo JJ, Wang ZY. Aggravation of Alzheimer's disease due to the COX-2-mediated reciprocal regulation of IL-1 β and A β between glial and neuron cells. *Aging Cell*. 2014 Aug;13(4):605-15. doi: 10.1111/ace.12209. Epub 2014 Mar 13.

Warren MW, Hynan LS, Weiner MF. Lipids and adipokines as risk factors for Alzheimer's disease, *J Alzheimers Dis*, 29 (2012) 151-157.

Resumen de resultados obtenidos



DISCUSIÓN

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE FACTORES ENDOCRINOS COMO MELATONINA Y PROLACTINA, Y DE ADIPOQUINAS COMO LEPTINA EN LA MODULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN ASOCIADA A PROCESOS NEURODEGENERATIVOS.

José Iván Patraca Fierro

Dipòsit Legal: T 242-2016

DISCUSIÓN

Efecto de las citoquinas pro-inflamatorias como inductores del estrés oxidativo y la producción de óxido nítrico en cultivos de glía.

En la presente tesis doctoral hemos tomado como modelo experimental la exposición a citoquinas pro-inflamatorias. Ello es debido a que la expresión de mediadores citotóxicos, citoquinas pro-inflamatorias y radicales libres, son la vía de mediación para las respuestas neuroinflamatorias, conllevando al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Rubio-Perez et al 2012; Graeber et al 2011). Así, en esta investigación se evaluó la viabilidad celular de los cultivos de glía expuestos a las citoquinas TNF α , IL-1 β e IFN γ , mediante MTT y Hoechst, y se observó una pérdida significativa de la misma por exposición a dichas citoquinas. Se realizaron tratamientos determinando la producción de ON mediante el uso del reactivo de Griess. El incremento más significativo de ON se observó a las 48 y 72 horas. Por otra parte, en la tinción de GFAP e Iba-1 se observó que estas citoquinas generan una activación de astrocitos y microglía lo que se traduce en un aumento de la producción de ON. En efecto, se ha demostrado que las citoquinas pro-inflamatorias TNF α , IFN γ e IL-1 β , disminuyen la función de la barrera hematoencefálica (Csuka et al. 1999; Kleine et al. 2003) mientras que la liberación de nitrito puede ser un evento potencialmente patológico responsable de la degeneración neuronal (Brown, G, Neher 2010; Sastre et al 2006a; Verkhatsky et al 2010). Por otra parte, los astrocitos están ligados a la barrera hematoencefálica y estos sintetizan ON, que a su vez es un potente vasodilatador (Bulkert et al., 2012; Mulligan y MacVicar 2004). Los astrocitos, conjuntamente con la microglía, producen ON provocando el aumento del flujo sanguíneo, puesto que aumentando el aporte de oxígeno se obtiene la energía requerida durante la reparación celular. Estudios previos han descrito que la activación de iNOS está implicada en la degeneración neuronal asociada a EP y EA (Brown, Neher 2010; Sastre et al 2006a; Ionov et al 2011; Graeber et al 2011). La liberación de nitrito después de la activación glial por las citoquinas pro-inflamatorias, puede ser un evento patológico potencial responsable de la degeneración neuronal en las neuronas vecinas (Brown 2007; Brown, Neher 2010; Sastre et al 2006b; Verkhatsky 2010). Los altos niveles de ON ejercen su efecto tóxico a través de múltiples

mecanismos, incluyendo la peroxidación lipídica, daños mitocondriales, desnaturalización de proteínas, oxidación de membrana citoplasmática, agotamiento de antioxidantes, daños a la activación o inhibición de diferentes vías de señalización, y del ADN (Khandelwal et al 2011a; Brown 2010). Por lo tanto, el ON producido por iNOS parece ser un mediador clave de la muerte neuronal (Brown 2010).

Por otra parte, el óxido nítrico sintasa-2 (iNOS o NOS-2) es la isoforma inducible e independiente de calcio del óxido nítrico sintasa, la enzima responsable de la producción del óxido nítrico (ON). En condiciones fisiológicas normales no se expresa NOS-2. Sin embargo, sí que se activa como respuesta a una lesión o inflamación por una variedad de estímulos, incluyendo IL-1 β , TNF α , IFN γ y LPS en astrocitos y microglía (Hamby, Hewett 2008; Csernansky y Choi 1994). Por ello, los resultados del presente trabajo muestran una inducción significativa de la actividad transcripcional de NOS-2, a las 6 horas posteriores a la exposición a las citoquinas, mediante la técnica de RT-PCR. Ello causa, finalmente, la liberación de ON.

Una vez descrita la activación de iNOS nos planteamos estudiar el papel de la vía de las MAP quinasas y, en particular, de p38 en la respuesta de las células gliales expuestas a citoquinas pro-inflamatorias.

Efecto anti-inflamatorio de la melatonina, leptina y prolactina.

Se estudió el potencial anti-inflamatorio de las hormonas melatonina y prolactina, y de la adipoquina leptina. Se evaluó la viabilidad celular de los cultivos de glía mixtos expuestos a 1 h de tratamiento con dichas hormonas, mediante MTT, y se observó que a concentraciones de 500 nM para leptina y prolactina, y 1 μ M para melatonina, no hay cambios en la viabilidad celular del cultivo de glía mixto. De igual manera, la técnica de tinción Hoechst no mostraron cambios en el patrón de condensación de la cromatina.

En la actualidad se propone que las hormonas melatonina y prolactina así como la adipoquina leptina se encuentran relacionados con el control de la inflamación, y estos a su vez son capaces de modular la activación glial en modelos de excitotoxicidad, a pesar de que los mecanismos

moleculares no se han comprendido en su totalidad (Chuang E 2007; Sainz et al; Tocharus et al 2008). Estas observaciones han sugerido que tanto melatonina, leptina y prolactina estimulan la secreción de citoquinas anti-inflamatorias en parámetros fisiológicos normales y pro-inflamatorias en condiciones fisiopatológicas (Beltowski et al 2004). Se ha descrito que éstas producen un efecto inhibitorio en la activación de la vía p38-MAPK (a las 48 h y 72 h) en células como hepatocitos, neuronas de hipocampo y astrocitos de la espina dorsal (Kim et al. 2007; Burkert et al. 2012).

Resultados obtenidos en este trabajo de tesis demostraron un efecto anti-inflamatorio significativo tanto de melatonina, como de leptina inhibiendo la producción de ON en cultivos de células gliales mixtas, expuestas a citoquinas pro-inflamatorias. Los altos niveles de ON ejercen sus efectos tóxicos a través de múltiples mecanismos, incluyendo: la peroxidación lipídica, daño mitocondrial, la nitración de proteínas y la oxidación celular, y así como el agotamiento de reservas de antioxidante, la activación o inhibición de diversas vías de señalización, y los daños al ADN (Khandelwal et al 2011b; Brown, G, Neher 2010). Por otro lado, los tratamientos combinados de leptina y prolactina producen una inhibición de la producción de nitrito en el medio de cultivo, sugiriendo que en conjunto son supresoras del ON en células de cultivos gliales mixtos. En la presente investigación no se encontraron efectos anti-inflamatorios significativos cuando se probó la prolactina de manera individual, aunque sí se pudo observar un efecto anti-inflamatorio inducido por prolactina al realizar un tratamiento conjuntamente con leptina. Ambas moléculas comparten receptores y vías de señalización comunes propias de las citoquinas (Miljic et al. 2006; Watanobe et al 2000; Gualillo et al 1999).

En los trabajos de la presente tesis doctoral se observó que la exposición de las células gliales al tratamiento combinado de leptina y prolactina también inhibió significativamente la inducción transcripcional del gen de COX-2, que es otro mediador inflamatorio primario en glía. Esta enzima convierte el ácido araquidónico en precursores de las prostaglandinas vasoactivas, produciendo especies reactivas del oxígeno en el proceso (Song et al. 2014; Icksoo et al 2014).

También se observó un aumento de la actividad transcripcional del gen de IL-6 en células gliales por la exposición a citoquinas pro-inflamatorias, la cual resultó significativamente disminuida

por la co-exposición leptina y prolactina. Dado que esta interleuquina es la primera en reaccionar en inflamación de fase aguda, se concluye que ambas moléculas inhiben la inflamación en las primeras 24 h tras ser activadas las células gliales.

Otra molécula importante también relacionada con la inflamación es NF κ B que resultó igualmente incrementada como resultado de la exposición a las citoquinas pro-inflamatorias. Se observó un aumento en la forma fosforilada de NF κ B (Ser536) se encontró en células expuestas a citoquinas pro-inflamatorias, que fue regulada a la baja por la exposición a dicho tratamiento.

NF κ B es un factor de transcripción que juega un papel clave en la regulación de la respuesta inflamatoria frente a la infección (Kaltschmidt 2009). En las neuronas, NF κ B también ha sido implicado en procesos de plasticidad sináptica y memoria, regulando la función de la vía PKA/CREB (Spooren et al. 2010). En este trabajo, el bloqueo de la expresión de genes inflamatorios estimulados por TNF α , IL-1 β e IFN γ produjo un efecto inhibitorio sobre la apoptosis y sobre factores de transcripción tales como NF κ B y STATs.

Se decidió estudiar en mayor detalle las vías de señalización moduladas por las hormonas estudiadas, las cuales jugarían un papel protector en la apoptosis. Uno de esos posibles mecanismos podría ser la inhibición de la actividad de la I κ B kinasa (IKK), la cual fosforila la proteína I κ B, evitando así la degradación I κ B y su separación del complejo p50/Rel-A. Esto a su vez evitaría la movilización del complejo p50/Rel-A dentro del núcleo y su unión a NF κ B, inhibiendo la transcripción de genes relacionados con inflamación. Se ha comprobado que NF κ B activa la expresión de su propio represor, I κ B α (Guma et al. 2011; Jiang and Cadenas 2014). De acuerdo con los resultados del presente estudio, diferentes trabajos muestran la activación de NF κ B tras un estímulo inflamatorio y la activación de la expresión de genes dependientes de su activación como TNF, COX-2 y IL-6 (Hsu et al. 2013) en una línea celular (RAW264.7) de macrófagos de ratón y monocitos de humanos (THP-1). Otra posible proteína inhibidora de la actividad de NF κ B es IFRD1, que suprime la actividad de NF κ B mediante un aumento de la desacetilación mediada por HDAC de la subunidad p65 a lisina 310, favoreciendo el secuestro de p65 por HDAC3 a (Gu et al. 2009). La inhibición de estas vías de activación de NF κ B, podrían verse moduladas por las hormonas estudiadas las cuales ayudarían a la protección de células

gliales y de la inhibición de la inflamación. De la misma forma, diversos estudios coinciden que la activación glial crónica es un evento neurotóxico latente en diferentes enfermedades neurodegenerativas. Se postula así que esta neurotoxicidad puede ser causada por una presencia continua de niveles elevados de mediadores pro-inflamatorios como $TNF\alpha$, ON y ROS. Por tanto, disminuir la producción de éstos con hormonas tales como melatonina y prolactina así como con la adipoquina leptina podría suponer una reducción de la inflamación en células gliales.

Papel de la melatonina, leptina y prolactina en la activación de la vía p38-MAPK en células gliales mixtas.

Después de estudiar el efecto anti-inflamatorio mediado por melatonina, leptina y prolactina, se caracterizaron las vías por las cuales se dan dichos procesos anti-inflamatorios.

En el presente trabajo de tesis doctoral se observó que la combinación de las tres citoquinas pro-inflamatorias induce la activación de diferentes proteínas relacionadas con la familia de las MAPK. Además, vías como JAK/STAT se activan después de 30 minutos de los tratamientos con dichas citoquinas. Así mismo, las células gliales tratadas con éstas, mostraron una activación significativa de p38-MAPK, comparado con las células gliales control. Se ha demostrado ampliamente que la vía de p38-MAPK es activada por una variedad de situaciones de estrés celulares incluyendo choque osmótico, citoquinas pro-inflamatorias, factores de crecimiento, LPS y radiaciones UV (Cuenda et al. 1997; Sabio et al. 2004; Sabio et al. 2005).

Para comprobar la participación de p38-MAPK en la generación de ON se expusieron las células gliales a SB203580, un inhibidor específico de la vía p38-MAPK, resultando una reducción significativa de la producción de ON. Recientemente (H. Wu et al. 2015) describieron que SB203580 es un control positivo de la inhibición de la vía estudiada en células epiteliales de ratón ob/ob. De acuerdo con esto, los resultados muestran claramente que el efecto inmunomodulador de melatonina, leptina y prolactina en la activación de células gliales, podría explicarse en parte por su papel inhibitorio de la actividad p38-MAPK. Por otra parte, la familia p38-MAPK regula las respuestas celulares al estrés, pero también integran señales que afectan a

muchos otros procesos celulares dependiendo del contexto y del tipo celular específico (Kuma et al. 2005; Thompson and Van Eldik 2009). El uso de animales modificados genéticamente ha sido muy útil para dilucidar las funciones reguladas por dicha familia. Además, la señalización por MAPKs también desempeña un papel importante regulando la producción de mediadores inflamatorios (Uhlik et al. 2003; Ferrer et al. 2001; S. Pugazhenthii et al. 1999).

Efecto de la leptina y prolactina en los procesos de señalización de los receptores de citoquinas.

Como se ha indicado anteriormente, las hormonas melatonina, prolactina y la adipoquina leptina comparten vías de señalización comunes y, por ello, se observó mediante *western blot*, la capacidad que poseen todas ellas de activar la vía JAK/STAT a través de sus propios receptores. La unión del receptor a su ligando activa la proteína tirosina kinasa JAK2, que a su vez fosforila las tirosinas de estos receptores, y esto genera sitios de unión para las proteínas del grupo de las STATs (STAT/1/3 y 5). La fosforilación de las tirosinas de STATs induce la movilización al núcleo, donde se une a la secuencia de ADN responsable de la activación de la transcripción de genes (Gouilleux et al. 1994; Pedrós et al 2015). Como se ha mencionado, la disminución en la activación por fosforilación de JAK2 altera la actividad de las moléculas STAT. Además, se ha descrito que IFN γ , utilizado en el tratamiento de las células de la glía en esta investigación, es una citoquina pluripotente cuyos principales efectos biológicos están mediados por una vía en la cual STAT1 es el factor de transcripción esencial y predominante (Quing et al 2004; Pedrós et al 2015). Por lo tanto, sería posible observar alteraciones en las moléculas STAT en estos experimentos. De acuerdo con ello, los resultados de la presente tesis doctoral mostraron una significativa activación de las STATs (STAT/1/3 y 5) en células gliales expuestas a citoquinas pro-inflamatorias, que puede revertirse por la exposición a melatonina, y con el tratamiento combinado de leptina y prolactina. Se ha descrito en estudios anteriores que la unión de prolactina a la forma corta de su receptor no es capaz de activar JAK2 (Bole-Feysot et al 1998b; Ouhtit et al 1993). Los resultados que se presentan en esta investigación muestran que el efecto de la prolactina debe ser causado por su unión y activación de los receptores de forma larga de prolactina, los cuales son capaces de activar JAK2. Por lo tanto, los resultados demuestran una activación significativa de la forma fosforilada de JAK2 (Tyr1007/1008) que

puede ser revertida significativamente por la exposición a melatonina, así como la combinación de leptina y prolactina.

Efecto de la leptina en moléculas relacionadas con la señalización de procesos de apoptosis.

Se observó que la expresión de MnSOD2 se encuentra incrementada tras la exposición a citoquinas pro-inflamatorias. La exposición a leptina produjo una disminución de los efectos observados por el tratamiento con citoquinas, disminuyendo la expresión de MnSOD en mitocondria y la liberación de citocromo C al citosol, inhibiendo con ello la activación de la apoptosis. Estas observaciones concuerdan con anteriores resultados que se han descrito *in vitro in e vivo*, el primero en un modelo de células epitelial alveolar Tipo II (AEC) y el segundo en APPswe/PS1dE9 un modelo de ratón de EA (Chen et al 2015; Pedrós et al. 2014). Estos autores analizaron la expresión y activación de los factores pro-apoptóticos, indicando que los efectos protectores de leptina dependen de la vía de señalización PI3K/Akt e involucran a la estimulación de la fosforilación de Akt, previniendo la liberación mitocondrial de citocromo C en células epiteliales como en el modelo APPswe/PS1dE9, así como la supresión de la caspasa 3. Igualmente, en el presente trabajo la leptina redujo la actividad caspasa 3.

La función de Bcl-2 es el bloqueo de la muerte celular, la condensación nuclear, la desorganización de la membrana plasmática y la ruptura endonucleolítica del ADN (Subbiah Pugazhenthí et al. 2003; Li et al. 2010). En respuesta a los estímulos apoptóticos como los inducidos por las citoquinas, se activan los miembros de la familia Bax. Éstos se oligomerizan en las mitocondrias e inducen la permeabilización de la membrana, que conduce a la liberación de factores tales como el citocromo C, promoviendo la activación de las caspasas y la muerte celular apoptótica (Li et al. 2010; H. Wu et al. 2015; Pedrós et al. 2014). En esta investigación, la leptina causó un aumento en el ratio de Bcl-2/Bax, activando Bcl-2 con respecto a Bax. La primera se expresó de manera significativa mostrando un efecto protector frente citoquinas, por lo cual la leptina junto con Bcl-2 prevendría la apoptosis por la vía intrínseca de la mitocondria, en otras palabras se propone a leptina como activadora de esta vía de señalización anti-

apoptótica, desempeñando un papel importante para frenar procesos de lesión celular e inflamación.

Efecto del tratamiento combinado de leptina y la prolactina sobre factores de transcripción como CREB

La activación glial, tal como se ha explicado, es un proceso en el cual los astrocitos y la microglía sufren cambios morfológicos, proliferan y producen factores tróficos, citoquinas pro-inflamatorias, de igual forma a lo que ocurre en otros procesos inflamatorios. De la misma manera, se ha observado como diferentes factores de transcripción implicados en la regulación de genes importantes en estos procesos inflamatorios, como $\text{NF}\kappa\beta$ y CREB se encuentran también implicados en la activación glial *in vitro*.

El conjunto de células del SNC forman una red compleja para realizar funciones tales como el pensamiento, la memoria, y las acciones de regulación (Frank and Greenberg 1994). Una vez que la red neural ha sido dañada por enfermedades cerebrovasculares, enfermedades neurodegenerativas o lesiones nerviosas causadas por inflamación, la modulación de esta red no continúa su actividad normal. Por lo tanto, se cree que la protección de las neuronas, antes del deterioro o la muerte, es una estrategia razonable para el tratamiento de trastornos y lesiones nerviosas (Campuzano et al. 2009). Aunque un gran número de publicaciones han discutido el efecto neuroprotector inducido por agentes farmacéuticos y productos naturales contra el estrés oxidativo, la inflamación, la excitotoxicidad en desórdenes neurológicos (Hayashi and Takagi 2015; Shapira et al 2014; Kaur et al 2013) y lesiones traumáticas (Kabadi-Faden 2014; McConeghy et al 2012) del SNC, los siguientes resultados servirán para debatir posibles factores neuroprotectores y neuroendocrinos de las hormonas leptina y prolactina.

Paralelamente, se observó que el tratamiento combinado leptina/prolactina produce un efecto inhibitorio en la expresión del factor de transcripción CREB en el cultivo de células gliales mixto. CREB está relacionado con aprendizaje y memoria a largo plazo, siendo necesaria para la última

fase de formación de la memoria a largo plazo observado *in vivo* (Benito and Barco 2010; Frank and Greenberg 1994).

Se sabe que las moléculas reguladas por CREB son neurotrofina y BDNF (Hu et al. 2013). La función de la primera, es impedir que las neuronas inicien la apoptosis, permitiendo así que las neuronas sobrevivan. Ésta también induce la diferenciación celular de células progenitoras para formar neuronas (Gundersen et al 2013; Halassa and Haydon 2010). La segunda es una proteína que actúa como factor de crecimiento de la familia de las neurotrofinas asociadas al factor de crecimiento nervioso (Moghbelinejad et al. 2014). La activación de CREB total y de su isoforma fosforilada, mediada por citoquinas pro-inflamatorias, da como resultado el inicio de la transcripción de genes de las neurotrofinas y de factores inhibidores/moduladores de inflamación como COX-2 observados *in vitro* (Spooren et al. 2010; Hamby, Hewett, and Hewett 2008). Por esto, en esta investigación se sugiere que el efecto de las hormonas *in vitro* es bloquear o inhibir el sistema de transcripción de CREB en el núcleo, inhibiendo así la transcripción de factores de inflamación y estabilizando la neurotrofina.

CONCLUSIONES

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE FACTORES ENDOCRINOS COMO MELATONINA Y PROLACTINA, Y DE ADIPOQUINAS COMO LEPTINA EN LA MODULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN ASOCIADA A PROCESOS NEURODEGENERATIVOS.

José Iván Patraca Fierro

Dipòsit Legal: T 242-2016

CONCLUSIONES

Las conclusiones del presente trabajo de tesis doctoral se relacionan a continuación.

1. La acción de las hormonas melatonina y prolactina, y la adipoquina leptina, atenúan la activación de la vía JAK/STAT inducida por la exposición a citoquinas pro-inflamatorias, en un modelo *in vitro* de cultivo primario de células de glía mixta.
2. La acción de las hormonas melatonina y prolactina, y la adipoquina leptina, inhiben la vía de señalización de p38-MAPK inducida por citoquinas pro-inflamatorias en un modelo *in vitro* de cultivo primario de células de glía mixta.
3. Las hormonas melatonina, prolactina y la adipoquina leptina intervienen en la inhibición de la expresión de mediadores pro-inflamatorios como IL-6, iNOS y COX-2, inducidos por citoquinas pro-inflamatorias en un modelo *in vitro* de células de glía mixta.
4. La exposición a leptina de cultivos primarios células de glía mixta inhibe la apoptosis celular inducida por citoquinas pro-inflamatorias. Esto se debe al aumento de los niveles de Bcl-2 y a la disminución de los de Bax, inhibiendo la salida de citocromo C y la activación de caspasa 3.
5. La exposición de cultivos primarios células de glía mixta al efecto combinado de leptina y prolactina, causa una disminución significativa de los niveles de NFκβ y CREB.

Conclusión final: la exposición a melatonina, leptina y al tratamiento combinado de leptina y prolactina, puede ser una estrategia efectiva en la disminución de los niveles de neuroinflamación asociada a los procesos neurodegenerativos.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE FACTORES ENDOCRINOS COMO MELATONINA Y PROLACTINA, Y DE ADIPOQUINAS COMO LEPTINA EN LA MODULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN ASOCIADA A PROCESOS NEURODEGENERATIVOS.

José Iván Patraca Fierro

Dipòsit Legal: T 242-2016

BIBLIOGRAFÍA

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

PAPEL DE FACTORES ENDOCRINOS COMO MELATONINA Y PROLACTINA, Y DE ADIPOQUINAS COMO LEPTINA EN LA MODULACIÓN DE LA INFLAMACIÓN ASOCIADA A PROCESOS NEURODEGENERATIVOS.

José Iván Patraca Fierro

Dipòsit Legal: T 242-2016

BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, Nagat, Ivan Bednar, Eilhard Mix, Svedberg Marie, David Paterson, Anna Ljungberg, Chris Morris, Bengt Winblad, Agneta Nordberg, and Jie Zhu. 2002. "Up-Regulation of the Inflammatory Cytokines IFN- γ and IL-12 and down-Regulation of IL-4 in Cerebral Cortex Regions of APPSWE Transgenic Mice." *Journal of Neuroimmunology*.
- Akiyama, H, S Barger, S Barnum, B Bradt, J Bauer, G M Cole, N R Cooper, et al. "Inflammation and Alzheimer's Disease." *Neurobiology of Aging* 2.
- Al, Takano et. 2007. "Two-Photon Imaging of Astrocytic Ca²⁺ Signaling and the Microvasculature in Experimental Mice Models of Alzheimer's Disease." *Ann. N.Y. Acad. Sci.*
- Aleyasin et al. 2004. "Nuclear Factor-(kappa)B Modulates the p53 Response in Neurons Exposed to DNA Damage." *J Neuroscience*.
- Allaman et al. 2010. "Amyloid-Beta Aggregates Cause Alterations of Astrocytic Metabolic Phenotype: Impact on Neuronal Viability." *J Neuroscience*.
- Amarante et al. 1999. "The Regulation of Apoptotic Cell Death." *J Med Biol Res*.
- Anderson C. M., Swanson R. A. 2000. "Astrocyte Glutamate Transport: Review of Properties, Regulation, and Physiological Functions." *Glia*.
- Angeloni et al. 2000. "Production and Characterization of Antibodies Directed against the Human Melatonin Receptors Mel-1a (mt1) and Mel-1b (MT2)." *European Journal of Histochemistry*.
- Bach et al. 1997. "The IFN Gamma Receptor: A Paradigm for Cytokine Receptor Signaling." *Annu. Rev. Immunol.*
- Baehrecke, Eric H. 2002. "How Death Shapes Life during Development." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*.
- Banchereau et al. 2004. "Autoimmunity through Cytokine-Induced Dendritic Cell Activation." *Immunity*.
- Banks y Kastin. 1996. "Passage of Peptides across the Blood-Brain Barrier: Pathophysiological Perspectives." *Life Sciences*.
- Banks-Kastin et al. 1994. "Penetration of Interleukin-6 across the Murine Blood-Brain Barrier." *Neuroscience Letters*.
- Barbeito et al. 2004. "A Role for Astrocytes in Motor Neuron Loss in Amyotrophic Lateral Sclerosis." *Brain Res Brain Res Rev*.
- Beltowski et al. 2004. "Oxidative Stress, Nitric Oxide Production, and Renal Sodium Handling in Leptin-Induced Hypertension." *Life Sciences*.
- Benito, Eva, and Angel Barco. 2010. "CREB's Control of Intrinsic and Synaptic Plasticity: Implications for CREB-Dependent Memory Models." *Trends in Neurosciences*.
- Ben-Jonathan et al. 1996. "Extrapituitary Prolactin: Distribution, Regulation, Functions, and Clinical Aspects." *Endocr Rev*.
- Benzing, W.C., J.R. Wujek, E.K. Ward, D. Shaffer, K.H. Ashe, S.G. Younkin, and K.R. Brunden. 1999. "Evidence for Glial-Mediated Inflammation in Aged APPSW Transgenic Mice." *Neurobiology of Aging*.
- Bertin, J, R C Armstrong, S Ottilie, D A Martin, Y Wang, S Banks, G H Wang, et al. 1997. "Death Effector Domain-Containing

Bibliografia

- Herpesvirus and Poxvirus Proteins Inhibit Both Fas- and TNFR1-Induced Apoptosis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Bhat et al. 2002. "P38 Mapk-Mediated Transcriptional Activation of Inducible Nitric-Oxide Synthase in Glial Cell." *Biol Chem*.
- Birketvedt et al. 1999. "Behavioral and Neuroendocrine Characteristics of the Night-Eating Syndrome." *JAMA*.
- Boche, D, V H Perry, and J A R Nicoll. 2013. "Review: Activation Patterns of Microglia and Their Identification in the Human Brain." *Neuropathology and Applied Neurobiology*.
- Bole-Feysot et al. 1998a. "Prolactin (PRL) and Its Receptor: Actions, Signal Transduction Pathways and Phenotypes Observed in PRL Receptor Knockout Mice." *Endocr Rev*.
- . 1998b. "Prolactin (PRL) and Its Receptor: Actions, Signal Transduction Pathways and Phenotypes Observed in PRL Receptor Knockout Mice." *Endocr Rev*.
- Bouret y Simerly. 2007. "Development of Leptin-Sensitive Circuits." *Journal of Neuroendocrinology*.
- Boutajangout-Wisniewski. 2013. "The Innate Immune System in Alzheimer's Disease." *International Journal of Cell Biology*.
- Braak et al. 2000. "Amyloid Beta-Protein (Abeta)-Containing Astrocytes Are Located Preferentially near N-Terminal-Truncated Abeta DEPOSITS in the Human Entorhinal Cortex." *Acta Neuropathol*.
- Brown, GC. 2007. "Mechanisms of Inflammatory Neurodegeneration: Inos and Nadph Oxidase." *BiolChem Soc Trans*.
- . 2010. "Nitric Oxide and Neuronal Death." *Nitric Oxide*.
- Brown, G, Neher, J. 2010. "Inflammatory Neurodegeneration and Mechanisms of Microglial Killing of Neurons." *Mol Neurobiol*.
- Brunner, P., N. Sözer-Topcular, R. Jockers, R. Ravid, D. Angeloni, F. Fraschini, A. Eckert, F. Müller-Spahn, and Egemen Savaskan. 2006. "Pineal and Cortical Melatonin Receptors MT1 and MT2 Are Decreased in Alzheimer's Disease." *European Journal of Histochemistry*.
- Burkert, Kristina, Kiebashne Moodley, Catherine E Angel, Anna Brooks, and E Scott Graham. 2012. "Detailed Analysis of Inflammatory and Neuromodulatory Cytokine Secretion from Human NT2 Astrocytes Using Multiplex Bead Array." *Neurochemistry International*.
- Caivano y Cohen. 2000. "Role of Mitogen-Activated Protein Kinase Cascades in Mediating Lipopolysaccharide-Stimulated Induction of Cyclooxygenase-2 and IL-1 Beta in RAW264 Macrophages." *J Immunol*.
- Campuzano, O, M M Castillo-Ruiz, L Acarin, B Castellano, and B Gonzalez. 2009. "Increased Levels of Proinflammatory Cytokines in the Aged Rat Brain Attenuate Injury-Induced Cytokine Response after Excitotoxic Damage." *Journal of Neuroscience Research*.
- Canpolat et al. 2001. "Effects of Pinealectomy and Exogenous Melatonin on Serum Leptin Levels in Male Rat." *Eur J Pharmacol*.
- Capuron y Miller. 2011. "Immune System to Brain Signaling: Neuropsychopharmacological Implications." *Pharmacology & Therapeutics*.

- Carpentieri et al. 2012. "New Perspectives in Melatonin Uses." *Pharmacol Res*.
- Cascales Angosto, M. 2003. "Bases Moleculares de La Apoptosis." *Anal. Real Acad. Nal. Farm.*
- Castello et al. 2013. "Rational Heterodoxy: Cholesterol Reformation of the Amyloid Doctrine." *Ageing Res Rev*.
- Castello-Soriano et al. 2014. "On the Origin of Alzheimer's Disease. Trials and Tribulations of the Amyloid Hypothesis." *Ageing Res Rev*.
- Cerretti, D P, C J Kozlosky, B Mosley, N Nelson, K Van Ness, T A Greenstreet, C J March, S R Kronheim, T Druck, and L A Cannizzaro. 1992. "Molecular Cloning of the Interleukin-1 Beta Converting Enzyme." *Science*.
- Chen et al. 2015. "Akt Activation and Inhibition of Cytochrome c Release: Mechanistic Insights Into Leptin-Promoted Survival of Type II Alveolar Epithelial Cells." *J Cell Biochem*.
- Chern, Chang-Ming, Jyh-Fei Liao, Yea-Hwey Wang, and Yuh-Chiang Shen. 2012. "Melatonin Ameliorates Neural Function by Promoting Endogenous Neurogenesis through the MT2 Melatonin Receptor in Ischemic-Stroke Mice." *Free Radical Biology & Medicine*.
- Chuang E, Molitch ME. 2007. "Prolactin and Autoimmune Diseases in Humans." *Chuang E, Molitch ME*.
- Cochran et al. 2014. "The Dendritic Hypothesis for Alzheimer's Disease Pathophysiology." *Brain Res Bull*.
- Coffey et al. 2002. "C-Jun N-Terminal Protein Kinase (JNK) 2/3 Is Specifically Activated by Stress, Mediating c-Jun Activation, in the Presence of Constitutive JNK1 Activity in Cerebellar Neurons." *J. Neurosci*.
- Cohen, P, C Zhao, X Cai, J M Montez, S C Rohani, P Feinstein, P Mombaerts, and J M Friedman. 2001. "Selective Deletion of Leptin Receptor in Neurons Leads to Obesity." *The Journal of Clinical Investigation*.
- Csuka, Esther, Maria C Morganti-Kossmann, Philipp M Lenzlinger, Helen Joller, Otmar Trentz, and Thomas Kossmann. 1999. "IL-10 Levels in Cerebrospinal Fluid and Serum of Patients with Severe Traumatic Brain Injury: Relationship to IL-6, TNF- α , TGF- β 1 and Blood-brain Barrier Function." *Journal of Neuroimmunology*.
- Cuenda, A, P Cohen, V Buée-Scherrer, and M Goedert. 1997. "Activation of Stress-Activated Protein Kinase-3 (SAPK3) by Cytokines and Cellular Stresses Is Mediated via SAPKK3 (MKK6); Comparison of the Specificities of SAPK3 and SAPK2 (RK/p38)." *The EMBO Journal*.
- D'Mello y Chin. 2005. "Treating Neurodegenerative Conditions through the Understanding of Neuronal Apoptosis." *Curr. Drugs. Targets*.
- De Bellis et al. 2005. "Prolactin and Autoimmunity." *Pituitary*.
- De Felice et al. 2014. "Alzheimer's Disease and Insulin Resistance: Translating Basic Science into Clinical Applications." *Diabetes*.
- de Haas, A H, H R J van Weering, E K de Jong, H W G M Boddeke, and K P H Biber. 2007. "Neuronal Chemokines: Versatile Messengers in Central Nervous System Cell Interaction." *Molecular Neurobiology*.
- De Luca et al. 2005. "Complete Rescue of Obesity, Diabetes, and Infertility in Db/db Mice by Neuron-Specific LEPR-B Transgenes." *The Journal of Clinical Investigation*.
- Deak et al. 1998. "Mitogen and Stress-Activated Protein Kinase-1 (MSK1) Is Directly Activated by MAPK and SAPK2/p38, and May Mediated Activation of CREB." *EMBO J*.

Bibliografía

- Dubocovich, Margarita L., Kenneth Yun, Walid M. Al-Ghoul, Susan Benloucif, and Monica I. Masana. 1998. "Selective MT2 Melatonin Receptor Antagonists Block Melatonin-Mediated Phase Advances of Circadian Rhythms." *FASEB Journal*.
- Duong et al. 1997. "Neuronal Expression and Intracellular Localization of Presenilins in Normal and Alzheimer Disease Brains." *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*.
- Ekmekcioglu, C. 2006. "Melatonin Receptors in Humans: Biological Role and Clinical Relevance." *Biomedical Pharmacotherapy*.
- Elmqvist, J K, C Bjørbaek, R S Ahima, J S Flier, and C B Saper. 1998. "Distributions of Leptin Receptor mRNA Isoforms in the Rat Brain." *The Journal of Comparative Neurology*.
- Ferrer, I, R Blanco, M Carmona, B Puig, M Barrachina, C Gómez, and S Ambrosio. 2001. "Active, Phosphorylation-Dependent Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK/ERK), Stress-Activated Protein Kinase/c-Jun N-Terminal Kinase (SAPK/JNK), and p38 Kinase Expression in Parkinson's Disease and Dementia with Lewy Bodies." *Journal of Neural Transmission*.
- Figlewicz, D.P, S.B Evans, J Murphy, M Hoen, and D.G Baskin. 2003. "Expression of Receptors for Insulin and Leptin in the Ventral Tegmental Area/substantia nigra (VTA/SN) of the Rat." *Brain Research*.
- Fleisher-Berkovich, Sigal, Talia Filipovich-Rimon, Sarit Ben-Shmuel, Claudia Hülsmann, Markus P Kummer, and Michael T Heneka. 2010. "Distinct Modulation of Microglial Amyloid β Phagocytosis and Migration by Neuropeptides (i)." *Journal of Neuroinflammation*.
- Folch et al. 2015. "The Role of Leptin in the Sporadic Form of Alzheimer's Disease. Interactions with the Adipokines Amylin, Ghrelin and the Pituitary Hormone Prolactin." *Life Sciences*.
- Folch, Jaume, Iván Patraca, Nohora Martínez, Ignacio Pedrós, Dmitry Petrov, Miren Ettcheto, Sonia Abad, Miguel Marin, Carlos Beas-Zarate, and Antoni Camins. 2015. "The Role of Leptin in the Sporadic Form of Alzheimer's Disease. Interactions with the Adipokines Amylin, Ghrelin and the Pituitary Hormone Prolactin." *Life Sciences*.
- Frank, David A., and Michael E. Greenberg. 1994. "CREB: A Mediator of Long-Term Memory from Mollusks to Mammals." *Cell*.
- Freeman et al. 2000. "Prolactin: Structure, Function, and Regulation of Secretion." *Physiological Reviews*.
- Gogvadze V, Orrenius S. 2006. "Mitochondrial Regulation of Apoptotic Cell Death." *Chem Biol Interact*.
- Gouilleux, F, H Wakao, M Mundt, and B Groner. 1994. "Prolactin Induces Phosphorylation of Tyr694 of Stat5 (MGF), a Prerequisite for DNA Binding and Induction of Transcription." *The EMBO Journal*.
- Graeber et al. 2011. "Role of Microglia in Cns Inflammation." *FEBS Letters*.
- Grammas. 2001. "Inflammatory Factors Are Elevated in Brain Microvessels in Alzheimer's Disease." *Neurobiology of Aging*.
- Green et al. 1998. "The Central Executioners of Apoptosis: Caspases or Mitochondria?" *Trends Cell Biol*.
- Griffin, W Sue T, and Robert E Mruk. 2002. "Interleukin-1 in the Genesis and Progression of and Risk for Development of Neuronal Degeneration in Alzheimer's Disease." *Journal of Leukocyte Biology*.
- Gu, YuanYuan, Isaac T W Harley, Lindsay B Henderson, Bruce J Aronow, Ilja Vietor, Lukas A Huber, John B Harley, et al.

2009. "Identification of IFRD1 as a Modifier Gene for Cystic Fibrosis Lung Disease." *Nature*.
- Gualillo et al. 1999. "Prolactin Stimulates Leptin Secretion by Rat White Adipose Tissue." *Endocrinology*.
- Guerreiro, Rita, Aleksandra Wojtas, Jose Bras, Minerva Carrasquillo, Ekaterina Rogaeva, Elisa Majounie, Carlos Cruchaga, et al. 2013. "TREM2 Variants in Alzheimer's Disease." *The New England Journal of Medicine*.
- Guma, Monica, Dariusz Stepniak, Helena Shaked, Martina E Spehlmann, Steve Shenouda, Hilde Cheroutre, Ildelfonso Vicente-Suarez, Lars Eckmann, Martin F Kagnoff, and Michael Karin. 2011. "Constitutive Intestinal NF- κ B Does Not Trigger Destructive Inflammation Unless Accompanied by MAPK Activation." *The Journal of Experimental Medicine*.
- Gundersen et al. 2013. "Increase Hippocampal Neurogenesis and Accelerated Response to Antidepressants in Mice with Specific Deletion of CREB in the Hippocampus: Role of cAMP Response-Element Modulator τ ." *J Neurosci*.
- Haass et al. 2012. "Trafficking and Proteolytic Processing of APP." *Cold Spring Harb Perspect Med*.
- Halassa, Michael M, and Philip G Haydon. 2010. "Integrated Brain Circuits: Astrocytic Networks Modulate Neuronal Activity and Behavior." *Annual Review of Physiology*.
- Hall y Rosen. 2010. "Type I Interferons: Crucial Participants in Disease Amplification in Autoimmunity." *Nature Reviews Rheumatology*.
- Hamby, Mary E, James A Hewett, and Sandra J Hewett. 2008. "TGF-beta1 Reduces the Heterogeneity of Astrocytic Cyclooxygenase-2 and Nitric Oxide Synthase-2 Gene Expression in a Stimulus-Independent Manner." *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*.
- Han et al. 1997. "Activation of the Transcription Factor MEF2C by the MAP Kinase p38 in Inflammation." *Nature*.
- Hardly et al. 1992. "Alzheimer's Disease: The Amyloid Cascade Hypothesis." *Science*.
- Hayashi, Hideki, and Norio Takagi. 2015. "Endogenous Neuroprotective Molecules and Their Mechanisms in the Central Nervous System." *Biological & Pharmaceutical Bulletin*.
- Hengartner M. 2000. "The Biochemistry of Apoptosis." *Nature*.
- Hewett, Sandra I, Cynthia A. Csernansky, and Dennis W. Choi. 1994. "Selective Potentiation of NMDA-Induced Neuronal Injury Following Induction of Astrocytic iNOS." *Neuron*.
- Holmes, C., C. Cunningham, E. Zotova, J. Woolford, C. Dean, S. Kerr, D. Culliford, and V. H. Perry. 2009. "Systemic Inflammation and Disease Progression in Alzheimer Disease." *Neurology*.
- Hsu, Chun-Chieh, Jin-Cherng Lien, Chia-Wen Chang, Chien-Hsin Chang, Sheng-Chu Kuo, and Tur-Fu Huang. 2013. "Yuwen02f1 Suppresses LPS-Induced Endotoxemia and Adjuvant-Induced Arthritis Primarily through Blockade of ROS Formation, NF κ B and MAPK Activation." *Biochemical Pharmacology*.
- Hsueh et al. 2009. "Obesity Induces Functional Astrocytic Leptin Receptors in Hypothalamus." *Brain: A Journal of Neurology*.
- Hu, Yuan-Shih, Nancy Long, Gustavo Pigino, Scott T Brady, and Orly Lazarov. 2013. "Molecular Mechanisms of Environmental Enrichment: Impairments in Akt/GSK3 β , Neurotrophin-3 and CREB Signaling." *PloS One*.
- Huang et al. 2002. "Alzheimer Mechanisms and Therapeutic Strategies." *Science*.

Bibliografía

- Hugh et al. 2007. "Systemic Infections and Inflammation Affect Chronic Neurodegeneration." *Nature Reviews Immunology*.
- Hunter, Jesse M, Jason Kwan, Michael Malek-Ahmadi, Chera L Maarouf, Tyler A Kokjohn, Christine Belden, Marwan N Sabbagh, Thomas G Beach, and Alex E Roher. 2012. "Morphological and Pathological Evolution of the Brain Microcirculation in Aging and Alzheimer's Disease." *PloS One*.
- Icksoo et al. 2014. "Energy Crisis: The Role of Oxidative Phosphorylation in Acute Inflammation and Sepsis." *Biochimica and Biophysica Acta*.
- Ionov et al. 2011. "Mechanism of Neuroprotection of Melatonin against Beta-Amyloid Neurotoxicity." *Neuroscience*.
- Ivashkiv y Donlin. 2014. "Regulation of Type I Interferon Responses." *Nature Reviews Immunology*.
- Jeong et al. 2012. "Melatonin-Induced Autophagy Protects against Human Prion Protein-Mediated Neurotoxicity." *J Pineal Res*.
- Jiang, Tianyi, and Enrique Cadenas. 2014. "Astrocytic Metabolic and Inflammatory Changes as a Function of Age." *Aging Cell*.
- Jin, X., C. von Gall, R. L. Pieschl, V. K. Gribkoff, J. H. Stehle, S. M. Reppert, and D. R. Weaver. 2003. "Targeted Disruption of the Mouse Mel1b Melatonin Receptor." *Molecular and Cellular Biology* 23 (3): 1054-60.
doi:10.1128/MCB.23.3.1054-1060.2003.
- Jockers, R, P Maurice, J A Boutin, and P Delagrangé. 2008. "Melatonin Receptors, Heterodimerization, Signal Transduction and Binding Sites: What's New?" *British Journal of Pharmacology*.
- Johnson y Bailey. 2003. "The p38 MAP Kinase Signaling Pathway in Alzheimer's Disease." *Experimental Neurology*.
- Kabadi-Faden. 2014. "Neuroprotective Strategies for Traumatic Brain Injury: Improving Clinical Translation." *Int. J. Mol. Sci*.
- Kaltschmidt. 2009. "NF-kB in the Nervous System." *Cold Spring Harb Perspect Biol*.
- Kastin y Pan. 2000. "Dynamic Regulation of Leptin Entry into Brain by the Blood-brain Barrier." *Regulatory Peptides*.
- . 2007. "Adipokines and the Blood-Brain Barrier." *Peptides*.
- Kaur et al. 2013. "Drug Therapy in Stroke: From Preclinical to Clinical Studies." *Pharmacology*.
- Kerr et al. 1972. "Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-Ranging Implications in Tissue Kinetics." *British Journal of Cancer*.
- Khandelwal et al. 2011a. "Inflammation in the Early Stages of Neurodegenerative Pathology." *J Neuroimmunol*.
- . 2011b. "Inflammation in the Early Stages of Neurodegenerative Pathology." *J Neuroimmunol*.
- Kim, Hyeon Ju, Michael Rowe, Ming Ren, Jau-Shyong Hong, Po-See Chen, and De-Maw Chuang. 2007. "Histone Deacetylase Inhibitors Exhibit Anti-Inflammatory and Neuroprotective Effects in a Rat Permanent Ischemic Model of Stroke: Multiple Mechanisms of Action." *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*.
- Kitazawa, Masashi, David Cheng, Michelle R Tsukamoto, Maya A Koike, Paul D Wes, Vitaly Vasilevko, David H Cribbs, and Frank M LaFerla. 2011. "Blocking IL-1 Signaling Rescues Cognition, Attenuates Tau Pathology, and Restores

- Neuronal β -Catenin Pathway Function in an Alzheimer's Disease Model." *Journal of Immunology*.
- Klein, Ronald L, Robert D Dayton, Cynthia G Diaczynsky, and David B Wang. 2010. "Pronounced Microgliosis and Neurodegeneration in Aged Rats after Tau Gene Transfer." *Neurobiology of Aging*.
- Kleine, Tilmann O, Peter Zwerenz, Claus Graser, and Peter Zöfel. 2003. "Approach to Discriminate Subgroups in Multiple Sclerosis with Cerebrospinal Fluid (CSF) Basic Inflammation Indices and TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8." *Brain Research Bulletin*.
- KOH, Phil-Ok. 2008. "Melatonin Regulates Nitric Oxide Synthase Expression in Ischemic Brain Injury." *Journal of Veterinary Medical Science*.
- Koistinaho et al. 2004. "Apolipoprotein E Promotes Astrocyte Colocalization and Degradation of Deposited Amyloid-Beta Peptides." *Nat Med*.
- Koulich et al. 2001. "NF-Kappa B Is Involved in the Survival of Cerebellar Granule Neurons: Association of Ikappabeta Phosphorylation With Cell Survival." *J Neurochem*.
- Kuma, Yvonne, Guadalupe Sabio, Jenny Bain, Natalia Shpiro, Rodolfo Márquez, and Ana Cuenda. 2005. "BIRB796 Inhibits All p38 MAPK Isoforms in Vitro and in Vivo." *The Journal of Biological Chemistry*.
- Kumar et al. 2003. "p38 MAPK Kinases: Key Signaling Molecules as Therapeutic Targets for Inflammatory Diseases." *Nat. Rev. Drug Discov*.
- Lee, Jae Woong, Yong Kyung Lee, Dong Yeon Yuk, Dong Young Choi, Sang Bae Ban, Ki Wan Oh, and Jin Tae Hong. 2008. "Neuro-Inflammation Induced by Lipopolysaccharide Causes Cognitive Impairment through Enhancement of Beta-Amyloid Generation." *Journal of Neuroinflammation*.
- Levin et al. 2004. "Obesity-Prone Rats Have Normal Blood-Brain Barrier Transport but Defective Central Leptin Signaling before Obesity Onset." *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*.
- Li et al. 2001. "Endonuclease G Is an Apoptotic DNase When Released from Mitochondria." *Nature*.
- Li P et al. 1997. "La Mitochondria Secuestra Un Potente Cóctel de Proteínas Proapoptóticas." *Cell*.
- Li, Zheng, Jihoon Jo, Jie-Min Jia, Shih-Ching Lo, Daniel J Whitcomb, Song Jiao, Kwangwook Cho, and Morgan Sheng. 2010. "Caspase-3 Activation via Mitochondria Is Required for Long-Term Depression and AMPA Receptor Internalization." *Cell*.
- Liu y Bian. 2010. "Hydrogen Sulfide Protects Amyloid- β Induced Cell Toxicity in Microglia." *Journal of Alzheimer's Disease*.
- Llano et al. 2012. "Cerebrospinal Fluid Cytokine Dynamics Differ Between Alzheimer Disease Patients and Elderly Controls." *Alzheimer Disease and International Journal*.
- Loffreda et al. 1998. "Leptin Regulates Proinflammatory Immune Responses." *FASEB Journal*.
- Lonze et al. 2002. "Function and Regulation of CREB Family Transcription Factors in the Nervous System." *Neuron*.
- Lopez-Rincon et al. 2013. "Mycobacterium Bovis Infection in Cattle Induces Differential Expression of Prolactin Receptor Isoforms in Macrophages." *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*.

Bibliografia

- Lucin y Wyss-Coray. 2009. "Immune Activation in Brain Aging and Neurodegeneration: Too Much or Too Little?" *Neuron*.
- Mao et al. 1999. "Neuronal Activity-Dependent Cell Survival Mediated by Transcription Factor MEF2." *Science*.
- McConeghy et al. 2012. "A Review of Neuroprotection Pharmacology and Therapies in Patients with Acute Traumatic Brain Injury." *CNS Drugs*.
- McKhann et al. 1984. "Clinical Diagnosis of Alzheimer's Disease: Report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the Auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease." *Neurology*.
- McLaughlin et al. 1996. "Identification of Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase-Activated Protein Kinase-3, a Novel Substrate of CSBP p38 MAP Kinase." *J Biol Chem*.
- McMinn, Julie E, Shun-Mei Liu, Hong Liu, Ioannis Dragatsis, Paula Dietrich, Thomas Ludwig, Carol N Boozer, and Streamson C Chua. 2005. "Neuronal Deletion of Lepr Elicits Diabesity in Mice without Affecting Cold Tolerance or Fertility." *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*.
- Melino, G. 2001. "The Sirens' Song." *Nature*.
- Mielke y Herdegen. 2000. "JNK and p38 Stresskinases-Degenerative Effectors of Signaltransduction-Cascades in the Nervous System." *Progress in Neurobiology*.
- Miljic, D., S. Pekic, M. Djurovic, M. Doknic, N. Milic, F. F. Casanueva, M. Ghatei, and V. Popovic. 2006. "Ghrelin Has Partial or No Effect on Appetite, Growth Hormone, Prolactin, and Cortisol Release in Patients with Anorexia Nervosa." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*.
- Mitchell R, Cotran R. 2003. "Acute and Chronic Inflammation." In *Robbins Basic Pathology*.
- Moghbelinejad, Sahar, Marjan Nassiri-Asl, Taghi Naserpour Farivar, Esmail Abbasi, Mehdi Sheikhi, Mina Taghiloo, Farzaneh Farsad, Amir Samimi, and Farid Hajiali. 2014. "Rutin Activates the MAPK Pathway and BDNF Gene Expression on Beta-Amyloid Induced Neurotoxicity in Rats." *Toxicology Letters*.
- Montgomery, Sara L, Wade C Narrow, Michael A Mastrangelo, John A Olschowka, M Kerry O'Banion, and William J Bowers. 2013. "Chronic Neuron- and Age-Selective down-Regulation of TNF Receptor Expression in Triple-Transgenic Alzheimer Disease Mice Leads to Significant Modulation of Amyloid- and Tau-Related Pathologies." *The American Journal of Pathology*.
- Mucke et al. 2012. "Neurotoxicity of Amyloid β -Protein: Synaptic and Network Dysfunction." *Cold Spring Harb Perspect Med*.
- Mulligan S. J., Macvicar B. A. 2004. "Calcium Transients in Astrocyte Endfeet Cause Cerebrovascular Constrictions." *Nature*.
- Mulligan y MacVicar. 2004. "Calcium Transients in Astrocyte Endfeet Cause Cerebrovascular Constrictions." *Nature*.
- Nagele, Robert G, Jerzy Wegiel, Venkat Venkataraman, Humi Imaki, Kuo-Chiang Wang, and Jarek Wegiel. 2004. "Contribution of Glial Cells to the Development of Amyloid Plaques in Alzheimer's Disease." *Neurobiology of Aging*.
- Nair, Shiva M, Rosanna M A Rahman, Andrew N Clarkson, Brad A Sutherland, Sebastien Taurin, Ivan A Sammut, and Ian Appleton. 2011. "Melatonin Treatment Following Stroke Induction Modulates L-Arginine Metabolism." *Journal of*

Pineal Research.

- Ni et al. 1998. "MAPKSPK5, a Novel Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK)-Activated Protein Kinase, Is a Substrate of the Extracellular-Regulated Kinase (ERK) and p38 Kinase." *Biochem Biophys Res Commun*.
- Nicola, J. A., and A. B. Ben. 2009. "Neuroscience: Glia [mdash] More than Just Brain Glue." *Nature* 457 (7230). Nature.
- Nijenhuis et al. 2013. "AgRP(83–132) Acts as an Inverse Agonist on the Human-Melanocortin-4 Receptor." *Molecular Endocrinology*, July. Endocrine Society.
- O'Keefe et al. 1999. "Class II Transactivator and Class II MHC Gene Expression in Microglia: Modulation by the Cytokines TGF-Beta, IL-4, IL-13 and IL-10." *European Journal of Immunology*.
- Ojala, Johanna, Irina Alafuzoff, Sanna-Kaisa Herukka, Thomas van Groen, Heikki Tanila, and Tuula Pirttilä. 2009. "Expression of Interleukin-18 Is Increased in the Brains of Alzheimer's Disease Patients." *Neurobiology of Aging*.
- Olabarria et al. 2010. "Concomitant Astroglial Atrophy and Astrogliosis in a Triple Transgenic Animal Model of Alzheimer's Disease." *Glia*.
- Orrenius et al. 2007. "Mitochondrial Oxidative Stress: implications for Cell Death." *Annu Rev Pharmacol Toxicol*.
- Ouhtit et al. 1993. "Visualization of Gene Expression of Short and Long Forms of Prolactin." *Endocrinology*.
- Pan et al. 2011. "Glial Leptin Receptors and Obesity. In: Modern Insights into Disease—from Molecules to Man: Adipokines." *Science*.
- Pan, Weihong, Hung Hsueh, Hong Tu, and Abba J Kastin. 2008. "Developmental Changes of Leptin Receptors in Cerebral Microvessels: Unexpected Relation to Leptin Transport." *Endocrinology*.
- Pandi-Perumal, Seithikurippu R, Ahmed S BaHammam, Gregory M Brown, D Warren Spence, Vijay K Bharti, Charanjit Kaur, Rüdiger Hardeland, and Daniel P Cardinali. 2013. "Melatonin Antioxidative Defense: Therapeutical Implications for Aging and Neurodegenerative Processes." *Neurotoxicity Research*.
- Pedrós et al. 2015. "Adipokine Pathways Are Altered in Hippocampus of an Experimental Mouse Model of Alzheimer's Disease." *J Nutr Health Aging*.
- Pedrós, Ignacio, Dmitry Petrov, Michael Allgaier, Francesc Sureda, Emma Barroso, Carlos Beas-Zarate, Carme Auladell, et al. 2014. "Early Alterations in Energy Metabolism in the Hippocampus of APPswe/PS1dE9 Mouse Model of Alzheimer's Disease." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*.
- Pellerin et al. 1998. "Expression of Monocarboxylate Transporter mRNAs in Mouse Brain: Support for a Distinct Role of Lactate as an Energy Substrate for the Neonatal vs. Adult Brain." *proc.Natl. Acad. Sci*.
- Perea, G., M. Navarrete y A. Araque. 2009. "Tripartite Synapses: Astrocytes Process and Control Synaptic Information." *Trends Neurosci*.
- Pestka et al. 1997. "The Interferon Gamma (IFN-Gamma) Receptor: A Paradigm for the Multichain Cytokine Receptor." *Cytokine Growth Factor Rev*.
- Pfeffer, Martina, Anke Rauch, Horst-Werner Korf, and Charlotte von Gall. 2012. "The Endogenous Melatonin (MT) Signal Facilitates Reentrainment of the Circadian System to Light-Induced Phase Advances by Acting upon MT2 Receptors." *Chronobiology International*.

Bibliografia

- Pugazhenth, S., E. Miller, C. Sable, P. Young, K. A. Heidenreich, L. M. Boxer, and J. E.- B. Reusch. 1999. "Insulin-like Growth Factor-I Induces Bcl-2 Promoter through the Transcription Factor cAMP-Response Element-Binding Protein." *Journal of Biological Chemistry*.
- Pugazhenth, Subbiah, Albina Nesterova, Purevsuren Jambal, Gerald Audesirk, Marcey Kern, Leigh Cabell, Eva Eves, Marsha R. Rosner, Linda M. Boxer, and Jane E.-B. Reusch. 2003. "Oxidative Stress-Mediated down-Regulation of Bcl-2 Promoter in Hippocampal Neurons." *Journal of Neurochemistry*.
- Quing et al. 2004. "Alternative Activation of STAT1 and STAT3 in Response to Interferon- γ ." *The Journal of Biological Chemistry*.
- Raingeaut et al. 1995. "Pro-Inflammatory Cytokines and Environmental Stress Cause p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Activation by Dual Phosphorylation on Tyrosine and Threonine." *J Biol Chem*.
- Ralay Ranaivo, Hantamalala, Jeffrey M Craft, Wenhui Hu, Ling Guo, Laura K Wing, Linda J Van Eldik, and D Martin Watterson. 2006. "Glia as a Therapeutic Target: Selective Suppression of Human Amyloid-Beta-Induced Upregulation of Brain Proinflammatory Cytokine Production Attenuates Neurodegeneration." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*.
- Rasmussen et al. 1999. "Daily Melatonin Administration at Middle Age Suppresses Male Rat Visceral Fat, Plasma Leptin, and Plasma Insulin to Youthful Levels." *Endocrinology*.
- Reyes-Haro, Daniel, Larissa Bulavina, and Tatyana Pivneva. 2014. "La Glia, Pegamento de Las Ideas." *Ciencia*.
- Reynolds et al. 1997. "Reactivating kinase/p38 Phosphorylates Tau Protein in Vitro." *J. Neurochemistry*.
- Ritzenthaler, Thomas, Isabelle Lhommeau, Samuel Douillard, Tea Hee Cho, Jocelyne Brun, Thierry Patrice, Norbert Nighoghossian, and Bruno Claustrat. 2013. "Dynamics of Oxidative Stress and Urinary Excretion of Melatonin and Its Metabolites during Acute Ischemic Stroke." *Neuroscience Letters*.
- Roach, HI., and N. M. Clarke. 2000. "Physiological Cell Death of Chondrocytes in Vivo Is Not Confined to Apoptosis. New Observations on the Mammalian Growth Plate." *J Bone Joint Surg Br*.
- Rodríguez et al. 2009. "Astroglia in Dementia and Alzheimer's Disease." *Cell Death Differ*.
- Rotonda, J, D W Nicholson, K M Fazil, M Gallant, Y Gareau, M Labelle, E P Peterson, et al. 1996. "The Three-Dimensional Structure of apopain/CPP32, a Key Mediator of Apoptosis." *Nature Structural Biology*.
- Rubio-Perez et al. 2012. "Inflammatory Process in Alzheimer's Disease, Role of Cytokines." *Scientific World Journal*.
- Rubio-Perez, Jose Miguel, and Juana Maria Morillas-Ruiz. 2012. "A Review: Inflammatory Process in Alzheimer's Disease, Role of Cytokines." *The Scientific World Journal* 2012.
- Sabharwal et al. 1992. "Prolactin Synthesized and Secreted by Human Peripheral Blood Mononuclear Cells: An Autocrine Growth Factor for Lymphoproliferation." *Proc Natl Acad Sci*.
- Sabio, Guadalupe, James Simon Campbell Arthur, Yvonne Kuma, Mark Pegg, Julia Carr, Vicky Murray-Tait, Francisco Centeno, Michel Goedert, Nicholas A Morrice, and Ana Cuenda. 2005. "p38gamma Regulates the Localisation of SAP97 in the Cytoskeleton by Modulating Its Interaction with GKAP." *The EMBO Journal*.
- Sabio, Guadalupe, Suzana Reuver, Carmen Feijoo, Masato Hasegawa, Gareth M Thomas, Francisco Centeno, Sven Kuhlendahl, et al. 2004. "Stress- and Mitogen-Induced Phosphorylation of the Synapse-Associated Protein

- SAP90/PSD-95 by Activation of SAPK3/p38gamma and ERK1/ERK2." *The Biochemical Journal*.
- Sainz et al. "Leptin Signaling as a Therapeutic Target of Obesity." *Expert Opin Ther Targets*.
- Sastre et al. 2006a. "Contribution of Inflammatory Processes to Alzheimer's Disease: Molecular Mechanisms." *Int J Dev Neurosci*.
- . 2006b. "Contribution of Inflammatory Processes to Alzheimer's Disease: Molecular Mechanisms." *International Journal of Developmental Neuroscience: The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience*.
- . 2008. "Interactions between APP Secretases and Inflammatory Mediators." *Journal of Neuroinflammation*.
- Savaskan, Egemen, Mohammed A Ayoub, Rivka Ravid, Debora Angeloni, Franco Fraschini, Fides Meier, Anne Eckert, Franz Müller-Spahn, and Ralf Jockers. 2005. "Reduced Hippocampal MT2 Melatonin Receptor Expression in Alzheimer's Disease." *Journal of Pineal Research*.
- Scotland et al. 2011. "Endogenous Prolactin Generated during Peripheral Inflammation Contributes to Thermal Hyperalgesia." *Eur J Neurosci*.
- Shaeffer y Weber. 1999. "Mitogen Activated Protein Kinases: Specific Messages from Ubiquitous Messengers." *Molecular and Cellular Biology*.
- Shanley, L J, D O'Malley, A J Irving, M L Ashford, and J Harvey. 2002. "Leptin Inhibits Epileptiform-like Activity in Rat Hippocampal Neurones via PI 3-Kinase-Driven Activation of BK Channels." *The Journal of Physiology*.
- Shapira et al. 2014. "Slowing of Neurodegeneration in Parkinson's Disease and Huntington's Disease: Future Therapeutic Perspectives." *Lancet*.
- Sheng et al. 2003. "Lipopolysaccharide-Induced-Neuroinflammation Increases Intracellular Accumulation of Amyloid Precursor Protein and Amyloid β Peptide in APPswe Transgenic Mice." *Neurobiology of Disease*.
- Sheng, J G, S G Zhu, R A Jones, W S Griffin, and R E Mrak. 2000. "Interleukin-1 Promotes Expression and Phosphorylation of Neurofilament and Tau Proteins in Vivo." *Experimental Neurology*.
- Simpson, J E, P G Ince, G Lace, G Forster, P J Shaw, F Matthews, G Savva, C Brayne, and S B Wharton. 2010. "Astrocyte Phenotype in Relation to Alzheimer-Type Pathology in the Ageing Brain." *Neurobiology of Aging*.
- Sodhi A, Tripathi A. 2008. "Prolactin and Growth Hormone Induce Differential Cytokine and Chemokine Profile in Murine Peritoneal Macrophages in Vitro: Involvement of P-38 MAP Kinase, STAT3 and NF-kappaB." *Cytokine*.
- Sofroniew y Vinters. 2010. "Astrocytes: Biology and Pathology." *Acta Neuropathologica*.
- Song, Erqun, Juanli Fu, Xiaomin Xia, Chuanyang Su, and Yang Song. 2014. "Bazhen Decoction Protects against Acetaminophen Induced Acute Liver Injury by Inhibiting Oxidative Stress, Inflammation and Apoptosis in Mice." *PLoS One*.
- Spooren, Anneleen, Ron Kooijman, Béatrice Lintermans, Kathleen Van Craenenbroeck, Linda Vermeulen, Guy Haegeman, and Sarah Gerlo. 2010. "Cooperation of NFkappaB and CREB to Induce Synergistic IL-6 Expression in Astrocytes." *Cellular Signalling*.
- Stegh, Alexander H, Bryan C Barnhart, Jorg Volkland, Alicia Algeciras-Schimmich, Ning Ke, John C Reed, and Marcus E Peter. 2002. "Inactivation of Caspase-8 on Mitochondria of Bcl-xL-Expressing MCF7-Fas Cells: Role for the

Bibliografía

- Bifunctional Apoptosis Regulator Protein." *The Journal of Biological Chemistry*.
- Sunhee et al. 1993. "Macrophage Colony-Stimulating Factor in Human Fetal Astrocytes and Microglia." *The Journal of Immunology*.
- Susin et al. 1999. "Molecular Characterization of Mitochondrial Apoptosis Inducing Factor." *Nature*.
- Takeda y Ichijo. 2002. "Neuronal p38 MAPK Signaling: On Emerging Regulator of Cell Fate and Function in the Nervous System." *Genes Cells*.
- Takuma, Kazuhiro, Fang Fang, Wensheng Zhang, Shiqiang Yan, Emiko Fukuzaki, Heng Du, Alexander Sosunov, et al. 2009. "RAGE-Mediated Signaling Contributes to Intraneuronal Transport of Amyloid-Beta and Neuronal Dysfunction." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Tan, Dun-Xian, Lucien C Manchester, Maria P Terron, Luis J Flores, and Russel J Reiter. 2007. "One Molecule, Many Derivatives: A Never-Ending Interaction of Melatonin with Reactive Oxygen and Nitrogen Species?" *Journal of Pineal Research*.
- Tan et al. 1996. "FGF and Stress Regulate CREB and ATF-1 via Pathway Involving p38 MAP Kinase and MAPKAP Kinase-2." *EMBO J*.
- Tang et al. 2014. "Prolactin Is Locally Produced in the Synovium of Patients with Inflammatory Arthritic Diseases and Promotes Macrophage Activation." *Ann Rheum Dis*.
- Thome, M, P Schneider, K Hofmann, H Fickenscher, E Meinel, F Neipel, C Mattmann, et al. 1997. "Viral FLICE-Inhibitory Proteins (FLIPs) Prevent Apoptosis Induced by Death Receptors." *Nature*.
- Thompson, Wendy L, and Linda J Van Eldik. 2009. "Inflammatory Cytokines Stimulate the Chemokines CCL2/MCP-1 and CCL7/MCP-3 through NFkB and MAPK Dependent Pathways in Rat Astrocytes [corrected]." *Brain Research*.
- Thorburn A. 2004. "Death Receptor-Induced Cell Killing." *Cell Signal*.
- Tinel A, Tschopp J. 2004. "The PIDDosome, a Protein Complex Implicated in Activation of Caspase-2 in Response to Genotoxic Stress." *Science*.
- Tocharus et al. 2008. "Melatonin Inhibits Amphetamine-Induced Nitric Oxide Synthase Mrna Overexpression in Microglial Cell Lines." *Neurosci Lett*.
- Trott et al. 2003. "Alternative Splicing to Exon 11 of Human Prolactin Receptor Gene Results in Multiple Isoforms Including a Secreted Prolactinbinding Protein." *J. Mol. Endocrinol*.
- Tuppo y Arias. 2005. "The Role of Inflammation in Alzheimer's Disease." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*.
- Uhlik, Mark T, Amy N Abell, Nancy L Johnson, Weiyong Sun, Bruce D Cuevas, Katherine E Lobel-Rice, Eric A Horne, Mark L Dell'Acqua, and Gary L Johnson. 2003. "Rac-MEKK3-MKK3 Scaffolding for p38 MAPK Activation during Hyperosmotic Shock." *Nature Cell Biology*.
- Veenman et al. 2008. "VDAC Activation by the 18 kDa Translocator Protein (TSPO), Implications for Apoptosis." *J Bioenerg Biomembr*.
- Verhagen et al. 2000. "Identification of DIABLO, a Mammalian Protein That Promotes Apoptosis by Binding to and Antagonizing IAP Proteins." *Cell*.

- Verkhatsky A, Kirchoff F. 2007. "Glutamate-Mediated Neuronal-Glial Transmission." *J. Anat.*
- Verkhatsky A. 2010. "Physiology of Neuronal-Glial Networking." *Neurochem Int.*
- Verkhatsky et al. 2010. "Physiology of Neuronal-Glial Networking." *Neurochem Int.*
- von Bernhardt et al. 2010. "Aging-Dependent Changes of Microglial Cells and Their Relevance for Neurodegenerative Disorders." *Journal of Neurochemistry.*
- Vukic, Vanja, Debbie Callaghan, Douglas Walker, Lih-Fen Lue, Qing Yan Liu, Pierre-Oliver Couraud, Ignacio A Romero, Babette Weksler, Danica B Stanimirovic, and Wandong Zhang. 2009. "Expression of Inflammatory Genes Induced by Beta-Amyloid Peptides in Human Brain Endothelial Cells and in Alzheimer's Brain Is Mediated by the JNK-AP1 Signaling Pathway." *Neurobiology of Disease.*
- Wang, David B, Robert D Dayton, Richard M Zweig, and Ronald L Klein. 2010. "Transcriptome Analysis of a Tau Overexpression Model in Rats Implicates an Early pro-Inflammatory Response." *Experimental Neurology.*
- Waskiewicz et al. 1997. "Mitogen-Activated Protein Kinases Activated the Serine/threonine Kinases Mnk1 and Mnk2." *EMBO J.*
- Watanobe et al. 2000. "Stimulation of Prolactin Secretion by Chronic, but Not Acute, Administration of Leptin in the Rat." *Brain Res.*
- Watson et al. 1998. "Phosphorylation of c-Jun Is Necessary for Apoptosis Induced by Survival Signal Withdrawal in Cerebellar Granule Neurons." *J. Neurosci.*
- Wegrzynowicz et al. 2011. "Role of Astrocytes in Brain Function and Disease." *Toxicol. Pathol.*
- West et al. 2001. "Calcium Regulation of Neuronal Gene Expression." *Proc Natl Acad Sci.*
- Whitmarsh et al. 1997. "Role of p38 and JNK Mitogen-Activated Protein Kinases in the Activation of Ternary Complex Factors." *Mol Cell Biol.*
- Williams et al. 2007. "Expression of Constitutively Active STAT3 Can Replicate the Cytokine-Suppressive Activity of Interleukin- 10 in Human Primary Macrophages." *J Biol Chem.*
- Wilson, M L. 1994. "Developing Paradigms to Anticipate Emerging Diseases. Transmission Cycles and a Search for Pattern." *Annals of the New York Academy of Sciences.*
- Wolden-Hanson et al. 2000. "Daily Melatonin Administration to Middle- Aged Male Rats Suppresses Body Weight, Intraabdominal Adiposity, and Plasma Leptin and Insulin Independent of Food Intake and Total Body Fat." *Endocrinology.*
- Wu et al. 2006. "Distribution of MT1 Melatonin Receptor Immunoreactivity in the Human Hypothalamus and Pituitary Gland: Colocalization of MT1 with Vasopressin, Oxytocin, and Corticotropin-Releasing Hormone." *The Journal of Comparative Neurology.*
- Wu, G, J Chai, T L Suber, J W Wu, C Du, X Wang, and Y Shi. "Structural Basis of IAP Recognition by Smac/DIABLO." *Nature.*
- Wu, Haijiang, Yonghong Shi, Xinna Deng, Ye Su, Chunyang Du, Jinying Wei, Yunzhuo Ren, Ming Wu, Yanjuan Hou, and Huijun Duan. 2015. "Inhibition of c-Src/p38 MAPK Pathway Ameliorates Renal Tubular Epithelial Cells Apoptosis in Db/db Mice." *Molecular and Cellular Endocrinology.*

Bibliografia

- Wu, Xiaojun, Hung Hsueh, Abba J Kastin, Pramod K Mishra, and Weihong Pan. 2013. "Upregulation of Astrocytic Leptin Receptor in Mice with Experimental Autoimmune Encephalomyelitis." *Journal of Molecular Neuroscience*.
- Wyss-Coray, Tony, John D Loike, Thomas C Brionne, Emily Lu, Roman Anankov, Fengrong Yan, Samuel C Silverstein, and Jens Husemann. 2003. "Adult Mouse Astrocytes Degrade Amyloid-Beta in Vitro and in Situ." *Nature Medicine*.
- Xia, M Q, S X Qin, L J Wu, C R Mackay, and B T Hyman. 1998. "Immunohistochemical Study of the Beta-Chemokine Receptors CCR3 and CCR5 and Their Ligands in Normal and Alzheimer's Disease Brains." *The American Journal of Pathology*.
- Yamagishi et al. 2001. "p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Regulates Low Potassium-Induced c-Jun Phosphorylation and Apoptosis in Cultured Cerebellar Granule Neurons." *J Biol Chem*.
- Yeh et al. 2000. "Requirement for Casper (c-FLIP) in Regulation of Death Receptor-Induced Apoptosis and Embryonic Development." *Immunity*.
- Yu et al. 2009. "STATs in Cancer Inflammation and Immunity: A Leading Role for STAT3." *Nat Rev Cancer*.
- Zamzami et al. 1996. "Mitochondrial Control of Nuclear Apoptosis." *J Exp Med*.
- Zlokovic, B V, S Jovanovic, W Miao, S Samara, S Verma, and C L Farrell. 2000. "Differential Regulation of Leptin Transport by the Choroid Plexus and Blood-Brain Barrier and High Affinity Transport Systems for Entry into Hypothalamus and across the Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier." *Endocrinology*.
- Zonta, Micaela, María Cecilia Angulo, Sara Gobbo, Bernhard Rosengarten, Konstantin-A Hossmann, Tullio Pozzan, and Giorgio Carmignoto. 2003. "Neuron-to-Astrocyte Signaling Is Central to the Dynamic Control of Brain Microcirculation." *Nature Neuroscience*.