



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**  
**INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

**EFFECTOS CELULARES Y MECANISMOS MOECULARES DE LA**  
**VASOINHIBINA SOBRE LAS NEURONAS DEL HIPOCAMPO**

**TESIS**  
**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**  
**DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**  
**RODRIGO MANUEL AROÑA SERRANO**

**DIRECTOR DE TESIS**  
**DR. GONZALO MARTÍNEZ DE LA ESCALERA L.**  
**INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

**COMITÉ TUTOR**  
**DRA. CITLALI TRUETA SEGOVIA**  
**INSTITUTO MEXICANO DE PSIQUIATRÍA "RAMÓN DE LA FUENTE"**  
**DR. ALFREDO VARELA ECHAVARRÍA**  
**INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

**JURIQUILLA, QUERÉTARO. SETIEMBRE DE 2020**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

### **Estrofa X**

¡Patria, Patria! tus hijos te juran  
exhalar en tus aras su aliento,  
si el clarín, con su bélico acento  
los convoca a lidiar con valor.  
¡Para ti las guirnaldas de oliva!  
¡Un recuerdo para ellos de gloria!  
¡Un laurel para ti de victoria!  
¡Un sepulcro para ellos de honor!

(Fragmento del Himno Nacional Mexicano;  
**Francisco González Bocanegra**, Letra  
y **Jaime Nunó Roca**, Música).

### **Letrilla IX**

De mi desdicha me fío,  
de fortuna nada espero,  
si no es algún mal postrero,  
que será el primer bien mío:  
no corra más tras desvío,  
y por no quedar corrido,  
yo he hecho lo que he podido;  
Fortuna, lo que ha querido.

(Fragmento de Letrillas Satíricas;  
Yo he hecho lo que he podido;  
Fortuna, lo que ha querido.  
**Francisco de Quevedo** 1580-1645)

## Crónica de mente

Cuando me miré al espejo, me veía  
Cuando sentí palpar mi pecho, temía  
Aparecieron mis diablos y me seguían  
Observaba al mundo, y el mundo reía

Castigaba a mi mente con la verdad  
Y mi mente decía que no sobreviviría  
Recibía miradas de odio y frialdad  
Eran animales con hambre de mi vida

Era un gato asediado por perros en jauría  
Lo supe todo, pero nada probaría  
Observé cómo, de sus hocicos, caía saliva  
Eran mi carne y mis huesos lo que querían

Cerré mis ojos buscando paz  
Pero los ojos de mi alma intuían  
Me crearon trampas, pero no caía  
Huía de ellos y otros más aparecían

Entonces, supe que jamás me dejarían  
El terror de mi faz tampoco se iría  
Se iba el tiempo, pero ellos volvían  
Eran mis amigos, mis maestros, mi familia

Desde entonces supe que estaba loco  
Supe que la locura no acabaría  
Supe que el destino me seguía  
Disfruté, entonces, de la cruel agonía

Después recordé que el pez por su boca  
muere  
Y de esa misma manera, yo, con mi alma,  
Hoy, mañana, pasado mañana,  
O cualquier otro día, al polvo volvería

Pero esa será historia de otro día.

**Rodrigo M. Aroña**

## **Créditos**

Este trabajo fue realizado con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) otorgándome una beca (Rodrigo Manuel Aroña Serrano 414069) para llevar a cabo mis estudios de doctorado dentro del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas en los Laboratorios A-14 y A-15, Endocrinología molecular y Neuroendocrinología de la reproducción, respectivamente, del Departamento de Neurobiología Celular y Molecular del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección de la Dra. Edith Arnold H., y la supervisión del Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera L.

## **Agradecimientos**

A la Universidad Nacional Autónoma de México por disponerme de toda su gran maquinaria institucional para mi formación doctoral.

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro por ser catapulta hacia mi actual posición.

Al Instituto de Neurobiología que me bien cobijó en esta etapa de mi vida y de mi formación académica, en su primer cuarto de siglo.

Al Centro de Investigación en Reproducción Caprina; CIRCA, por señalar mi paseo científico.

A los laboratorios A-15 y A-14, por atrincherarme en plena batalla. También al C-02, trinchera alterna, y al B-11, por nutrirme el espíritu de la ciencia.

A la Dra. Edith Arnold H., por brindarme la oportunidad de aprenderle siempre con el nada pequeño mérito de abatir mi desesperación con su heroica paciencia al dirigir mis pasos en el desarrollo de este proyecto de investigación. Por dirigirme siempre calma.

Al Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera L, por autorizarme el amarizaje de este sueño, en la bahía A-15 y poner a mi disposición no solo la vecina bahía A-14, sino la mar de esfuerzos humanos y económicos que representa el buen funcionamiento del INB.

A la Dra. Carmen Clapp Jiménez L., por soportar mi carácter apasionado y romántico, siendo ella una mujer con loable experiencia en el amor y la pasión por la ciencia.

A los miembros de mi Comité Tutor, la Dra. Citlali Trueta Segovia, por diluir con sus palabras la pesadumbre en el ánimo, en momentos decisivos para el exitoso término de esta empresa. Y al Dr. Alfredo Varela Echavarría, por las preciadas críticas y sugerencias para el desarrollo de este trabajo de investigación, y por darme, siempre que fue necesario, momentos dentro de la apretada agenda del director de un instituto como el INB a sus 25 años.

A los Drs. María Teresa Morales Guzmán, María de la Luz Torner Aguilar, María Esther Olvera Cortés y Marco Antonio Cerbón Cervantes, por enriquecer con sus comentarios y observaciones *Ad hoc*, el manuscrito de esta tesis.

A los Drs. Rosa M. Guzmán C, Jesús Vielma S, J. Alberto Delgadillo-S, Gonzalo Fitz-R, Gerardo Duarte M, Ilda G. Fernández, Horacio Hernández, por impulsar mi carrera académica y científica con sus consejos.

A la Dra. Bibiana Moreno, por la disposición de ayudarme siempre oportunamente manifiesta.

A la Dra. Yazmín Macotela, por sus críticas al proyecto de investigación durante los seminarios del laboratorio.

A la M.C. Leonor Casanova, por su siempre apreciado trabajo para lidiar y dar solución a las impensables situaciones académicas.

A la Dra. Nuri Aranda López y a Ma. Carmen Mendoza López por maniobrar hábilmente en la tramitología.

A Fernando López Barrera, Gabriel Nava y Xarubet Ruiz por el trabajo y esfuerzo titánico que da soporte, estructura y mantiene en pie a los laboratorios A-14 y A-15.

A Ericka A. de los Ríos por el gran trabajo técnico que realiza.

A Antonio Prado y Daniel Mondragón, por el laborioso trabajo de ordenar lo que nosotros nos permitimos desordenar con nuestro trabajo.

Al Dr. Martín García Servín, a la Dra. Alejandra Castilla León y a Fernando Rodríguez Flores, por la presteza de proveernos siempre de los modelos experimentales en las mejores condiciones.

A Elsa Nydia Hernández Ríos, por su asesoría y ayuda en el buen uso de los equipos en el área de microscopía.

A la Lic. María de Lourdes Lara Ayala, por su ayuda y trabajo de organización para siempre encontrar un espacio disponible para realizar las videoconferencias en las mejores condiciones.

Al M.C. Alberto Lara Rubalcava y al Ing. Omar González Hernández, por mantenernos siempre “en línea”.

A Laura Sánchez Carballo, por capturar siempre los mejores ángulos en esta etapa tan sentida de mi vida.



Al Dr. Francisco Javier Valles Valenzuela, a la Lic. Teresita de Jesús Pérez Cruz y a la Lic. Soledad Medina Malagón por mantener siempre el orden de la literatura.

A Miriam Ulloa, Fernando Macías y Josué Rivera por formar parte de un gran equipo.

## **Dedicatoria**

A Dios.

A papá y mamá, por mantenerme vigente y ser mi guía.

A Edith Arnold Hernández, por darme todo lo que no merecía.

A mis padres Susana y Jesús M., por permitirme abrir las alas siempre e impulsar mi vuelo con la libertad.

A mis hermanos, Jesús M. Jr., María B., I. Yamile., X y J. Carlos, por engrandecerme siempre con su vida.

A Doña Ofelia, Doña María, Don Jesús y Don Polo, grandes padres para mis padres y más grandes abuelos para mí.

A mis tías y tíos, por el apoyo y el ánimo que siempre me han dado.

A Rocío C-R B, Adriana V. A D, a Rebeca L R, a Narcisa, a Silvia A F, a Adriana M. L M, a L. Aline L V, J. Ángel G T, F. Javier y J. Roberto N S, J. Antonio M G, David G C, Pedro S O, J. Antonio C S, Ricardo D B, Javín R A, J. Ramón B H, Israel P, Isaac V R, y a todos y cada uno de los actores en esta vida.

## Resumen

La vasoinhibina es un fragmento resultante del corte proteolítico de la prolactina. La vasoinhibina promueve acciones proapoptóticas y antiangiogénicas sobre las células endoteliales. Esta hormona actúa también sobre los lactotrópos adenohipofisarios promoviendo su apoptosis, sobre las neuronas sensoriales bloqueando el crecimiento neurítico, y sobre las células de feocromocitoma PC12 bloqueando la diferenciación y sobrevivencia. Además, la administración intracerebroventricular de vasoinhibina induce comportamientos de ansiedad y depresión, a través de mecanismos celulares aún desconocidos. En este trabajo, exploramos si las neuronas del sistema nervioso central son blanco de las acciones de la vasoinhibina. Usamos cultivos primarios de neuronas del hipocampo de ratones de 16 días de edad gestacional para evaluar las acciones proapoptóticas de la vasoinhibina. Los cultivos neuronales fueron tratados con vasoinhibina recombinante humana o su correspondiente vehículo en el día *In vitro* 1. Luego de 24, 48 y 72 horas de tratamiento con concentraciones de 5, 10 y 20 nM de vasoinhibina, evaluamos la densidad celular a través del conteo de células. Después, utilizando las imágenes de una inmunocitoquímica para  $\beta$ III-tubulina realizamos la cuantificación del porcentaje de neuronas a las 72 h de incubación, ya sea, con concentraciones de 5, 10, 20 y 40 nM de vasoinhibina, con concentraciones de 10, 20 y 100 nM de prolactina, o coincubando la vasoinhibina 20 nM con algunas concentraciones de prolactina (20 y 100 nM). También evaluamos la activación de la caspasa 3 por inmunocitoquímica a las 4, 16 y 24 horas del tratamiento con una concentración de 20 nM de vasoinhibina. Asimismo,

evaluamos la muerte por apoptosis mediante el ensayo de TUNEL y la expresión de genes relacionados a la apoptosis por RT qPCR en cultivos de neuronas a 24 horas de tratados con vasoinhibina (20 nM) o vehículo. Para probar la especificidad de la vasoinhibina sobre las neuronas, como experimentos de pérdida de función secuestrando a la vasoinhibina, se hicieron tratamientos en cada experimento usando un anticuerpo anti vasoinhibina,  $\alpha$ 16kDa PRL. La vasoinhibina en concentraciones de 10 y 20 nM disminuyó la densidad celular de los cultivos a las 72 h de incubación, en forma dependiente de la concentración. El porcentaje de neuronas disminuyó en todas las concentraciones usadas de vasoinhibina (5, 10, 20 y 40 nM) y el área de  $\beta$ III-tubulina disminuyó solo con la concentración de 40 nM de vasoinhibina. La prolactina solo mostró efecto en la concentración de 100 nM revirtiendo los efectos deletéreos de la vasoinhibina sobre las neuronas en cultivo primario, así como protegiéndolas de la muerte espontánea. Los cultivos mostraron señal doble-positiva para neuronas y caspasa 3 activa, así como una característica morfología apoptótica. La vasoinhibina también incrementó el porcentaje de neuronas en apoptosis e incrementó la expresión relativa de genes proapoptóticos como BAD, BIM, BAX y PUMA, comparado con el vehículo. En todos los experimentos realizados el  $\alpha$ 16kDa PRL bloqueó los efectos de la vasoinhibina. Estos resultados muestran que las neuronas del hipocampo son blanco celular de las acciones proapoptóticas de la vasoinhibina. Si bien, queda por determinar las implicaciones fisiopatológicas de estas acciones proapoptóticas de la vasoinhibina sobre las neuronas del hipocampo.

## Abstract

Vasoinhibin is a prolactin fragment resulting from a posttranslational cleavage that possess antiangiogenic effects involving proapoptotic and atrophic actions on endothelial cells. Proapoptotic actions of vasoinhibin have also been reported in adeno-hypophyseal lactotrophs, and atrophic actions on primary sensory neurons and PC12 pheochromocytoma cells. In addition, the intracerebroventricular administration of vasoinhibin induces behaviors associated with anxiety and depression, although their cellular target in the central nervous system is unknown. In this work, we explored whether central nervous system neurons are responsive to vasoinhibin. We used primary hippocampal neuronal cultures from E16 mice to assess the proapoptotic actions of vasoinhibin. These neuronal cultures were treated with human recombinant vasoinhibin or the corresponding vehicle at day 1 *In vitro*. Cell density was assessed by cell counting after 24, 48 and 72 h of treatment with 5, 10 and 20 nM vasoinhibin. After that, we quantified the percentage of neurons using images of the immunocytochemical detection of  $\beta$ III-tubulin after 72 hours of treatment either with 5, 10, 20 or 40 nM vasoinhibin, with 10, 20 or 100 nM prolactin, or vasoinhibin 20 nM in cocubation with prolactin at two concentrations (20 and 100 nM). Caspase 3 activation was assessed by double immunocytochemical detection for cleaved caspase 3 and  $\beta$ III-tubulin at 4, 16 or 24 hours after 20 nM vasoinhibin treatment. Cultures were treated with 20 nM of vasoinhibin or vehicle to assess both, apoptotic cell death by TUNEL dye and apoptosis related gene expression by RT-qPCR after 24 hours of treatment. To test vasoinhibin specificity

upon neurons, we performed experiments sequestering vaso-inhibin as a loss of function experiment, using an anti vaso-inhibin antibody,  $\alpha$ 16kDa PRL. Vaso-inhibin (10 and 20 nM) diminished cell density after 72 h of treatment in a concentration-dependent manner. The percentage of neurons decreased with all concentrations used (5, 10, 20 and 40 nM) and  $\beta$ III-tubulin area was diminished with 40 nM vaso-inhibin. Only 100 nM prolactin showed effects by reversing the deleterious actions of vaso-inhibin, as well as protecting the neuronal spontaneous cell death in our primary cultures. Cultures showed neurons with positive signal for caspase 3 and the characteristic apoptotic-like shape. Also, vaso-inhibin increased the percentage of neurons in apoptotic process and increased the expression of proapoptotic genes BAD, BIM, BAX and PUMA compared to vehicle. In all experiments performed with  $\alpha$ 16kDa PRL the effects of vaso-inhibin were prevented. These results show that hippocampal neurons are targets of the proapoptotic actions of vaso-inhibin. However, further investigation is needed to understand the pathophysiological implications of these proapoptotic actions of vaso-inhibin on hippocampal neurons.

## Índice de Contenido

Crónica de mente .....	iii
Créditos .....	iv
Agradecimientos.....	v
Dedicatoria .....	ix
Resumen.....	x
Abstract .....	xii
Índice de Contenido .....	xiv
Introducción.....	16
Revisión de literatura.....	17
1. La PRL. ....	17
1.1. Efectos neuroprotectores de la PRL. ....	19
2. La vasoinhibina.....	20
2.1. Las acciones proapoptóticas de la vasoinhibina. ....	21
2.2. Las acciones antitróficas de la vasoinhibina. ....	22
2.3. El (los) receptor (es) de la vasoinhibina. ....	22
3. La asociación de la PRL y la vasoinhibina con los comportamientos de ansiedad y depresión. ....	23
4. Apoptosis.....	24
4.1. Apoptosis neuronal .....	26
5. Antecedentes inmediatos. ....	28
Planteamiento del problema.....	28
Hipótesis.....	29

Materiales y métodos. ....	29
Animales. ....	29
La disección del hipocampo y el cultivo primario de neuronas del hipocampo. .	30
Los tratamientos de los cultivos de neuronas del hipocampo. ....	31
Inmunocitoquímica y adquisición de imágenes. ....	31
Ensayo de TUNEL. ....	32
La retrotranscripción de RNA mensajero y la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT qPCR). ....	33
Análisis estadísticos. ....	34
Resultados. ....	35
La caracterización de la composición de los cultivos primarios de neuronas del hipocampo. ....	35
El establecimiento y la estandarización de los cultivos primarios de las neuronas del hipocampo. ....	37
El análisis de los efectos de la vasoinhibina sobre la densidad celular en los cultivos primarios de neuronas del hipocampo. ....	39
El análisis de los efectos de la vasoinhibina sobre la densidad neuronal. ....	41
La PRL reduce la muerte celular basal e inducida por la vasoinhibina en los cultivos primarios de neuronas del hipocampo. ....	44
Los efectos de la vasoinhibina sobre la muerte por apoptosis de las neuronas del hipocampo en cultivo. ....	46
Los efectos de la vasoinhibina sobre la expresión génica de las neuronas del hipocampo en cultivo primario. ....	50
Discusión. ....	53
Literatura citada. ....	59



## Introducción

La vaso inhibina es un fragmento peptídico generado por el corte proteolítico de la prolactina (PRL; 1–3). Nuevas funciones antiangiogénicas de la PRL han sido descritas a través de su fragmentación en residuos N-terminal, de ahí que se ganara su nombre como vaso inhibina (4–7). El factor antiangiogénico, la vaso inhibina, no solo es capaz de detener el ciclo celular en diferentes fases bloqueando la proliferación celular (8), sino que también puede ejercer acciones antiangiogénicas activando el mecanismo de apoptosis *In vitro* e *In vivo* (4). La vaso inhibina puede activar la apoptosis en las células endoteliales de la vena umbilical de humano y de los capilares del cerebro bovino mediante la participación de la familia de proteínas de linfoma de células B-2 (*B cell lymphoma-2*, BCL-2) relacionadas con la apoptosis (9) e inducir la activación de la apoptosis dependiente de las caspasas, en las células endoteliales de los capilares de la corteza adrenal bovina (10). Asimismo, la vaso inhibina estimula la regresión mediada por apoptosis de los vasos hialoideos en los ojos de ratas neonatas (11). Además, la vaso inhibina también mostró tener acciones proapoptóticas y antiproliferativas dependientes del estradiol, sobre los lactotrofos de la adenohipófisis (12).

Se conoce que la vaso inhibina puede interferir con la activación de las vías de señalización de las proteínas quinasas activadas por mitógeno (*mitogen-activated protein kinases*, MAPK) y de la proteína quinasa B (*protein kinase B*, AKT) en las células endoteliales (13–17), en las células neuronales sensoriales (18) y en las neuronas de la línea celular PC12 (19). Aunque la naturaleza química y estructural del (los) receptor (es) de la vaso inhibina no es completamente esclarecida hasta

ahora, se sabe que las acciones de la vasoinhibina no ocurren a través del receptor de la PRL (PRLR, por sus siglas en inglés; 20). Se conoce que la vasoinhibina antagoniza de manera funcional las acciones tróficas, proliferativas y en pro de la sobrevivencia celular estimulada por algunos factores de crecimiento, interfiriendo con las vías mencionadas anteriormente (4–6). Adicionalmente, en ratas, la vasoinhibina induce comportamientos relacionados a la ansiedad y a la depresión después de ser administradas de forma intracerebroventricular (21), aunque hasta ahora no se han establecido los mecanismos moleculares ni los blancos celulares para estas acciones de la vasoinhibina dentro del sistema nervioso central (SNC). La administración de la vasoinhibina de manera intraventricular dentro del SNC y la consecuente inducción de comportamientos de ansiedad y depresión (21) sugirieron que la vasoinhibina podría ser un regulador local de la función neuronal más allá de las células endoteliales. Por lo tanto, en este trabajo, hipotetizamos que las neuronas del SNC son un blanco de la vasoinhibina, y evaluamos las acciones proapoptóticas de la vasoinhibina sobre cultivos primarios de neuronas del hipocampo.

## **Revisión de literatura**

### **1. La PRL.**

La PRL es una hormona sintetizada y secretada principalmente por la glándula pituitaria anterior, pero también puede ser sintetizada en otros tejidos como la glándula mamaria (22,23), la decidua (24), la próstata (25), la piel (26) y el cerebro (27). El control hipotalámico de la secreción de la PRL es predominantemente

inhibitorio, por medio de la dopamina producida por las neuronas tuberoinfundibulares dopaminérgicas (28). El gen de la PRL se localiza en el cromosoma 6 en humanos (29) y codifica para una cadena de 199 aminoácidos con un peso molecular de ~23kDa (30), y una estructura terciaria formada por un haz de 4  $\alpha$  hélices dispuestas 2 arriba 2 abajo conectadas por 3 asas (4,31). La versatilidad de la PRL es evidente en los varios cientos de acciones que posee en diversas especies de vertebrados (30), las cuales caen en las siguientes categorías generales: la reproducción, la preñez y la lactancia, el crecimiento y el desarrollo, el metabolismo, la modulación inmune, el transporte electrolítico, la regulación del integumento, el comportamiento y la carcinogénesis (32). Las acciones biológicas de la PRL ocurren a través del receptor de PRL (PRLR, por sus siglas en inglés), el cuál es expresado en muchos tejidos blanco de la PRL y en el cerebro (30,31). El PRLR posee tres isoformas (larga, 80-85kDa; corta, 45kDa; y la intermedia, 65kDa; 33). El PRLR transmite una señal a través de la proteína citoplasmática asociada quinasa Janus 2 (*Janus protein kinase 2*, JAK2; 33). En el cerebro se ha reportado la expresión de la PRL en diversas áreas, incluyendo el hipotálamo (34), el tálamo y el hipocampo (27), y del PRLR en estas y algunas otras regiones, tales como, el bulbo olfatorio y la corteza cerebral (27). Además, se conoce que la PRL puede ingresar al cerebro a través de un mecanismo mediado por el PRLR en los plexos coroideos para ser llevado después al líquido cerebroespinal (35), aunque también está demostrado el ingreso de la PRL al interior del cerebro por un mecanismo saturable en la barrera hematoencefálica independiente del PRLR en los plexos coroideos (36).

### 1.1. *Efectos neuroprotectores de la PRL.*

Está reportado que la PRL tiene un papel neuroprotector en algunas regiones cerebrales, como, por ejemplo, atenuando el infarto cerebral, el edema cerebral y restableciendo constantes fisiológicas como la presión sanguínea, la tasa de latidos y el flujo de sangre en el cerebro tras la isquemia inducida en ratas macho por la oclusión de la carótida común bilateral (37), reduciendo la pérdida neuronal en algunas regiones del hipocampo (CA1, CA3 y CA4) en ratas intactas y ovariectomizadas pretratadas con PRL y sometidas después a las acciones excitotóxicas en el modelo de epilepsia por kainato (38), asimismo, un pretratamiento con PRL incrementó la viabilidad celular de las neuronas del hipocampo en cultivo primario que fueron sometidas a un insulto de excitotoxicidad inducida por glutamato a diferencia de aquellas que no recibieron pretratamiento con PRL (39–41), además, cuando el PRLR fue bloqueado, se elucidó que estos efectos de protección sobre las neuronas del hipocampo en cultivo primario ocurren vía su receptor (40). La PRL también resulta en un potencial agente terapéutico contra las enfermedades neurodegenerativas, ya que, el pretratamiento con PRL ha mostrado efectos antiapoptóticos sobre las neuronas del hipocampo inducidas a excitotoxicidad por glutamato implicando mecanismos de restablecimiento de la homeostasis del calcio intracelular, de la actividad mitocondrial, así como evitando el corte de la procaspasa 3 y promoviendo la activación de NF- $\kappa$ B (39).

## **2. La vasoinhibina.**

La vasoinhibina ha sido caracterizada como un regulador antiangiogénico en el sistema vascular, y su origen a través de la fragmentación en residuos N-terminal a partir de la PRL (4–7,42). El corte de la PRL resulta en fragmentos de diferente masa molecular y diferente tamaño de la secuencia de la cadena de aminoácidos de la PRL dependiendo de cuál sea la proteasa que realice el procesamiento de la PRL. La proteólisis de la PRL humana por la catepsina D produce péptidos antiangiogénicos que fueron identificados como N-terminal y que corresponden a la secuencia de aminoácidos 1-132 (15kDa), 1-147 (16.5kDa) y 1-150 (17kDa; 3). Las metaloproteasas de matriz 1, 2, 3, 8, 9 y 13 de los condrocitos muestran en mayor o menor medida la capacidad de generar fragmentos de 16kDa biológicamente funcionales a partir de la PRL (2). Asimismo, la proteína 1 morfogenética de hueso es capaz de realizar el corte proteolítico de la PRL a un fragmento N-terminal de 17kDa manteniendo las propiedades antiangiogénicas (1). En el sistema hipotálamo-hipófisis, el corte de la PRL por la catepsina D puede generar vasoinhibina de 14-18kDa (4,34,43). En algunas ocasiones el corte proteolítico de la PRL resulta en un fragmento de ~16kDa de peso molecular (44) que se conoce posee características de potente inhibidor de la angiogénesis (45). Por otra parte, se sabe que el fragmento C-terminal de la PRL generado por la trombina parece no tener actividad antiangiogénica (46). Las propiedades antiangiogénicas de la vasoinhibina están presentes en los primeros 79 aminoácidos de la cadena de aminoácidos de la PRL, y un modelado dinámico molecular muestra que la pérdida

de la cuarta hélice de la PRL expone el núcleo hidrofóbico de la molécula generando una nueva conformación del asa 1 que esconde de nuevo el núcleo hidrofóbico (47).

### 2.1. *Las acciones proapoptóticas de la vasoinhibina.*

El factor antiangiogénico, vasoinhibina, inhibe la síntesis de ácido desoxirribonucleico (ADN) inducida por el suero en las células endoteliales de aorta bovina. Además, esta inhibición está asociada al arresto del ciclo celular en las fases G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>-M mediado por la disminución de la expresión de la ciclina D1 y de los reguladores negativos del ciclo celular p21 (cip1) y p27 (kip1; 8). También, la vasoinhibina puede ejercer acciones antiangiogénicas activando el mecanismo de apoptosis *In vitro* e *In vivo* (4).

La vasoinhibina puede activar la apoptosis en las células endoteliales de la vena umbilical de humano y en las de los capilares del cerebro bovino con la participación de la familia de proteínas BCL-2 relacionadas con la apoptosis, favoreciendo la conversión de BCL-X<sub>L</sub> a BCL-X<sub>S</sub> que es la forma proapoptótica de BCL-X (9). Además, la vasoinhibina puede inducir la apoptosis activando a la caspasa 3 (efectora) dependiente de caspasas iniciadoras como la caspasa 8 y la caspasa 9, de manera dependiente de NF-κB, en las células endoteliales de los capilares de la corteza adrenal bovina (10). La vasoinhibina, también estimula la regresión mediada por apoptosis de los vasos hialoideos en ratas neonatas (11). Asimismo, la vasoinhibina muestra ser proapoptótica pero dependiente del estradiol y antiproliferativa sobre los lactotopos de la adenohipófisis (12).

## 2.2. *Las acciones antitróficas de la vasoinhibina.*

La vasoinhibina antagoniza de manera funcional las acciones tróficas, proliferativas y en pro de la sobrevivencia celular que promueven algunos factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento del endotelio vascular (*vascular endothelial growth factor*, VEGF; 4–6). La vasoinhibina bloquea la fosforilación de la MAPK inducida por el VEGF y por el factor de crecimiento fibroblástico básico (13) e inhibe la activación de la vía de señalización de las MAPK inhibiendo la activación de Ras-Raf-1 inducida por el VEGF en células endoteliales de los capilares del cerebro bovino (14). La vasoinhibina inhibe la activación de eNOS, bloquea el incremento intracelular transitorio de  $Ca^{2+}$  y la proliferación inducidos por la bradiquinina en las células endoteliales de la vena umbilical bovina y en las células endoteliales de los capilares de la retina de la rata (16,17). La vasoinhibina inhibe la permeabilidad inducida por el VEGF en células endoteliales de la aorta bovina y en las células endoteliales de los capilares de la retina de rata. Además, la vasoinhibina bloquea la vasopermeabilidad en la retina de ratas inducida por la inyección intravitreal del VEGF, así como en la retina de ratas diabéticas, a través de la activación de la fosfatasa de serina/treonina 2A (*serine/threonine protein phosphatase 2A*, PP2A; 15).

## 2.3. *El (los) receptor (es) de la vasoinhibina.*

Aunque la naturaleza química y estructural del (los) receptor (es) de la vasoinhibina no es completamente entendida hasta ahora, se han identificado proteínas de 52 y 32kDa como los principales sitios de unión de la vasoinhibina sobre la membrana

de las células endoteliales (4,20). Asimismo, se ha sugerido al complejo proteínico formado por el plasminógeno activador inhibidor-1 (*plasminogen activator inhibitor-1*, PAI-1)– el activador de plasminógeno de tipo uroquinasa (*urokinase-type plasminogen activator*, uPA)– y el receptor de uPA (*uPA receptor*, uPAR), como receptor de la vasoinhibina dado que se ha mostrado que la unión de la vasoinhibina a este complejo impide la vascularización y el crecimiento tumoral, mediado por la actividad antifibrinolítica de PAI-1 (48). También, se ha sugerido la participación de las proteínas integrinas como receptores de la vasoinhibina, ya que la neutralización de las integrinas beta1 y alpha5 beta1 con anticuerpos específicos inhibe los efectos apoptóticos de la vasoinhibina, aunque no la proliferación celular de las células endoteliales de la vena umbilical de humano (49). Además, ya que la estructura de la vasoinhibina carece del primer sitio de unión de la molécula de la PRL al PRLR, se sabe que las acciones de la vasoinhibina no ocurren a través del PRLR (20).

### **3. La asociación de la PRL y la vasoinhibina con los comportamientos de ansiedad y depresión.**

La vasoinhibina induce comportamientos relacionados a la ansiedad y a la depresión en las ratas (21). La administración intracerebroventricular de vasoinhibina es capaz de reducir el porcentaje de tiempo que permanecen los animales en los brazos abiertos en la prueba del laberinto de cruz elevado; y reducir las entradas en el cuadro central e incrementar el número de bolas fecales en la prueba de campo abierto, lo cual indica un aumento en los niveles de ansiedad de las ratas después de este tratamiento. Adicionalmente, la inyección intracerebroventricular de vasoinhibina reduce la latencia a la flotación e incrementa



el tiempo de flotación en la prueba de nado forzado, indicando un estado más depresivo en los animales (21). Sin embargo, hasta ahora no se han establecido los mecanismos moleculares ni los blancos celulares que pudieran explicar estas acciones de la vasoinhibina en el SNC. En contraste, la administración intracerebroventricular de la PRL a ratas hembra vírgenes y a ratas macho, disminuye los comportamientos relacionados a la ansiedad al aumentar el porcentaje de entradas y el porcentaje de tiempo que pasan en los brazos abiertos en la prueba del laberinto de cruz elevado. Asimismo, la PRL administrada de manera intravenosa en ratas hembra disminuye los comportamientos de ansiedad, revelado por el incremento en el porcentaje de entradas en los brazos abiertos en la prueba del laberinto de cruz elevado. Por otra parte, cuando el PRLR es regulado a la baja, los comportamientos relacionados a la ansiedad se incrementan, como muestra la reducción en el porcentaje de entradas y el tiempo en los brazos abiertos en la prueba del laberinto de cruz elevado (50). Interesantemente, algunos autores muestran una relación entre los comportamientos de ansiedad y depresión con los cambios en las vías de señalización de factores de crecimiento (51,52) y la muerte neuronal en el hipocampo y/o la disminución del volumen del hipocampo (53–56).

#### **4. Apoptosis.**

El término apoptosis que significa: *apó* "a partir de" + *ptōsis* "caída", es propuesto en 1972 para nombrar un mecanismo reconocido hasta ese entonces de supresión celular controlada, lo que parecía jugar un rol complementario pero opuesto al de la mitosis en la regulación de la población de las células animales (57). La apoptosis se lleva a cabo generalmente a través de mecanismos

bioquímicos dependientes de energía, que dan lugar a características morfológicas particulares; y es considerada un componente vital de varios procesos incluyendo el recambio celular normal, el desarrollo propio y el funcionamiento del sistema inmune, de la atrofia dependiente de las hormonas, del desarrollo embrionario y la muerte celular inducida por químicos (58). De entre los hallazgos que llevaron a acuñar el término apoptosis está la observación por microscopía electrónica de pequeños cuerpos redondos resultado de la condensación celular que están bordeados de membrana y contienen orgánulos intactos y, que son fagocitados y digeridos por células residentes del hígado incluyendo las células epiteliales (59). Los distintivos morfológicos y bioquímicos de la apoptosis permiten distinguirla de otros tipos de muerte celular (60). Cuando la apoptosis empieza, existe una transición en la permeabilidad de la membrana caracterizada por la pérdida del potencial transmembranal mitocondrial interno (61). El siguiente paso se caracteriza por la condensación de la cromatina y la fragmentación nuclear mediada principalmente por las enzimas caspasas (62,63). Después la célula se rompe en fragmentos pequeños rodeados de membrana y bien conservados que son ingeridos por macrófagos, lo que previene la inducción de la inflamación (57,64).

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada activada por cualquier receptor de muerte, por una vía apoptótica extrínseca, o por factores proapoptóticos de la mitocondria, tal como una vía apoptótica mitocondrial o intrínseca, la principal vía de muerte en las neuronas. Ambas vías activan cascadas de enzimas, tales como las proteasas específicas de aspartato (caspasa 3 y caspasa 8) resultando en muerte celular. En la vía extrínseca se implica una interacción clásica de ligando-

receptor membranal, con receptores de muerte, como la familia del receptor de del factor de necrosis tumoral (*tumor necrosis factor*, TNFR). En contraste, la vía apoptótica mitocondrial es usualmente iniciada de una manera autónoma de la célula (44). En la vía apoptótica mitocondrial, factores proapoptóticos, tales como el citocromo C y el factor de inducción de la apoptosis (AIF, por sus siglas en inglés) se mueven de la mitocondria hacia al citoplasma o hacia al núcleo llevando a la activación de caspasa 3 y a la fragmentación del ADN (63).

#### 4.1. *Apoptosis neuronal*

Las neuronas en desarrollo están programadas para morir por apoptosis a menos que sean rescatadas por factores de crecimiento extrínsecos que generan una respuesta antiapoptótica (65). Es a menudo sorprendente saber que las células comprendidas por distintos órganos y tejidos, incluyendo el sistema nervioso, representan solo del 20 al 70 % o menos de las células que estuvieron presentes más temprano en el desarrollo. Lo que hace parecer contra intuitivo saber que los embriones en crecimiento produzcan números masivos de células para luego desecharlas (65). En contraste, las neuronas adultas necesitan sobrevivir por el resto de la vida del organismo y su muerte prematura puede causar déficits funcionales irreversibles. La muerte apoptótica de las neuronas en desarrollo es apagada cuando el desarrollo es completado y los factores de crecimiento no son requeridos más para prevenir su muerte. Para proteger de la muerte celular apoptótica son activados mecanismos antiapoptóticos en neuronas maduras en respuesta al estrés (66). La activación inapropiada de la apoptosis puede contribuir a la neurodegeneración, un proceso multifacético que resulta en desordenes

crónicos, incluyendo las enfermedades de Alzheimer y de Parkinson (67). Varios estudios *In vivo* e *In vitro* han demostrado que la apoptosis neuronal es un proceso de muerte celular que requiere síntesis de ácido ribonucleico (ARN). Por lo tanto, los genes activados transcripcionalmente cuyos productos inducen muerte celular pueden ser disparados por diferentes estímulos y antagonizados por factores neurotróficos (68). En la muerte neuronal, en un desequilibrio capaz de interrumpir la homeostasis neuronal, se ven directamente involucradas proteínas de la familia BCL-2 proapoptóticas y en pro de la sobrevivencia que determinan la permeabilización de la membrana mitocondrial (69). Existen dos grupos proapoptóticos de proteínas de la familia BCL-2. En el primero poseen por lo menos los dominios BH1 y BH3 y en este grupo se incluye a la proteína X asociada del linfoma de células B-2 (*B-cell lymphoma 2-associated protein X*, BAX). En el segundo, todas las proteínas contienen solo el dominio BH3 e incluye a al mediador de la muerte celular que interactúa con BCL-2 (*BCL-2-interacting mediator of cell death*, BIM), a la proteína de muerte asociada a BCL-2 (*BCL-2-associated death protein*, BAD), al modulador de apoptosis regulado por p53 (*p53-upregulated modulator of apoptosis*, PUMA) y a la proteína 1 inducida por forbol-12-miristato-13-acetato (*phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1*, PMAIP1/NOXA), y todos estos participan de la vía intrínseca o mitocondrial de la apoptosis (66). Por ejemplo, en cultivo celular y en ratones transgénicos, la sobreexpresión de BCL-2 incrementa la resistencia de las neuronas a la muerte inducida por insultos excitotóxicos, metabólicos y oxidativos. Inversamente, las neuronas carentes de BAX son protegidas contra la muerte por apoptosis al verse interrumpida la vía de señalización por la falta de esta proteína (70).

## **5. Antecedentes inmediatos.**

La vasoinhibina muestra tener como blanco de sus acciones a las células de tipo neuronal, esto tras elucidarse que la vasoinhibina bloquea el crecimiento neurítico de las neuronas sensoriales del ganglio de la raíz dorsal de rata en cultivo primario. Estos efectos fueron, como mecanismos de acción de la vasoinhibina, observados antagonizando los efectos tróficos de los factores de crecimiento neural (NGF, por sus siglas en inglés) y del VEGF bloqueando la fosforilación de ERK y AKT (18). También, ha sido elucidado que la vasoinhibina recombinante, así como la transducción de un vector lentiviral con la secuencia de la vasoinhibina humana, disminuyen significativamente el crecimiento neurítico y la fosforilación de AKT y ERK 1 / 2 inducidos por el NGF en células neuronales PC12 (19). Asimismo, la vasoinhibina recombinante y transducida afecta la sobrevivencia neuronal inducida por NGF de la línea celular PC12, generando la activación de la vía apoptótica como fue revelado por el incremento de la fragmentación de ADN precedida por la activación de la caspasa 3 (19).

### **Planteamiento del problema.**

La administración de vasoinhibina de manera intraventricular en el cerebro y la consecuente inducción de comportamientos de ansiedad y de depresión (21) sugieren que la vasoinhibina podría ser reguladora local de la función neuronal actuando sobre las neuronas centrales más allá de actuar sobre las células endoteliales. La incierta naturaleza del receptor de la vasoinhibina (5), y la pregunta

de si las neuronas del SNC son blanco directo de las acciones de la vasoinhibina, hacen interesante conocer mejor el papel de la vasoinhibina en el cerebro.

### **Hipótesis.**

Si la vasoinhibina tiene como blanco a las neuronas del SNC, evaluando las acciones proapoptóticas de la vasoinhibina sobre las neuronas del hipocampo en cultivo primario.

### **Materiales y métodos.**

#### **Animales.**

Ratones de 16 días de edad gestacional (E16) fueron disecados de una ratona CD1 que antes se alimentó *Ad libitum* y se mantuvo en un ambiente con humedad y temperatura controladas, bajo fotoperiodo controlado (ciclos de 12 horas luz/obscuridad). El promedio del tamaño de la camada usada para cada cultivo primario neuronal fue de 10 crías por ratona gestante. Todos los esfuerzos fueron hechos para minimizar el sufrimiento animal y el número de animales utilizados (71) y completar el diseño experimental de acuerdo a los análisis estadísticos apropiados. Todos los procedimientos fueron realizados bajo la aprobación del Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México y bajo la observación de la norma, *NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.*

## **La disección del hipocampo y el cultivo primario de neuronas del hipocampo.**

La ratona gestante fue adormecida con CO<sub>2</sub> e inmediatamente fue decapitada y los embriones fueron retirados. Intactos, los ratones E16 fueron colocados en buffer frío (*HBSS* sin Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>; *Gibco*, cat. no. 14175095, *USA*) suplementado con piruvato de sodio (*Gibco*, cat. no. 11360070, *China*) a 1 mM, glucosa (*Sigma-Aldrich*, cat. no. G-6152, *USA*) al 0.1% y HEPES (pH 7.3, *Sigma-Aldrich*, cat. no. H-4034, *USA*) a 10 mM y llevados a la campana de flujo laminar siguiendo el protocolo de Beaudoin III *et al.* (72), con algunas modificaciones. Los bulbos olfatorios, el cerebelo, las meninges y el diencéfalo fueron disecados del cerebro. Dentro de un tubo cónico de 15 mL, 10 hipocampos fueron colocados e inmediatamente incubados con tripsina (*Gibco*, cat. no. 27250-018, *Canada*) al 2.5 % durante 20 minutos a 37°C y 10 minutos más con DNAsa (*Worthington-Biochem*, cat. no. LS002140, *USA*) al 1% a temperatura ambiente. Después de la digestión enzimática, los tejidos fueron disgregados usando una pipeta Pasteur con puntas pre pulidas. Las células fueron resuspendidas en 2.5 mL de medio de sembrado (*BME medium*; *Gibco*, cat. no. 21010-046, *USA*) suplementado con suero fetal bovino (*Gibco*, cat. no. 26140-079, *USA*) al 10 %, glucosa al 0.1 %, piruvato de sodio a 11 µg / mL, glutamina (*Gibco*, cat. no. 35050-061, *Japan*) a 2 mM y penicilina-estreptomicina (*BioWest*, cat. no. L0022-100, *France*) al 1 %. Las células fueron contadas y sembradas a una densidad celular de 50,000 células / cm<sup>2</sup> en placas de cultivo previamente recubiertas con poli-L-lisina (*Sigma-Aldrich*, cat. no. P4707, *USA*) al 0.01 % e incubados a 37° C. Luego de 5 horas, el medio de sembrado fue sustituido por medio de mantenimiento constituido por medio Neurobasal (*Gibco*,

cat. no. 21103049, UK), suplementado con B-27 (1x, Gibco, cat. no. 17504044, USA) al 2%, glutamina 2 mM y antibióticos al 1 %.

### **Los tratamientos de los cultivos de neuronas del hipocampo.**

En el día *In vitro* (DIV) 1, los cultivos de neuronas del hipocampo fueron tratados con una vasoinhibina recombinante que contiene los 123 aminoácidos de la secuencia de la PRL humana, conteniendo una cola de 7 histidinas, generada como fue descrito previamente (73), para investigar los efectos de la vasoinhibina sobre la viabilidad celular, la fragmentación del ADN y la expresión de genes de la apoptosis. Adicionalmente, otros dos grupos de cultivos fueron tratados solo con PRL ovina (oPRL; Sigma-Aldrich, cat. no. L6520 MO, USA) o en combinación con vasoinhibina. La especificidad de las acciones de la vasoinhibina fue verificada preincubando vasoinhibina con un anticuerpo policlonal ( $\alpha$ 16kDa PRL) a una dilución final de 1:500. El anticuerpo fue generado y caracterizado como se describió previamente (74).

### **Inmunocitoquímica y adquisición de imágenes.**

Las neuronas del hipocampo obtenidas de embriones disecados de 12 ratonas gestantes fueron cultivadas sobre cubreobjetos cubiertos con poli-L-lisina para llevar a cabo el inmunomarcaje para  $\beta$ -III tubulina (marcador específico neuronal) y caspasa 3 cortada (marcador de caspasa 3 activa) como fue descrito previamente (18,75). Las neuronas fueron fijadas en paraformaldehído al 4% / sacarosa al 4% en PBS por 10 minutos a temperatura ambiente, se hicieron lavados con PBS tres veces, y se permeabilizaron con triton X-100 (J.T. Baker, cat. no. X198-



07, USA) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después, fueron bloqueados con suero normal de cabra (*Gibco*, cat. no. 10000C, USA) al 10 % durante 1 hora a temperatura ambiente. La incubación con los anticuerpos primarios monoclonal anti  $\beta$ III-tubulina (dilución 1:1000; *Covance*, cat. no. MMS-435P, USA), policlonal anti proteína ácida fibrilar glial (dilución 1:1000; cat. no. AB5804, *Merck Millipore*, MA, USA) o policlonal anti-caspasa 3 cortada (dilución 1:400; *Cell Signaling*, cat. no. 9661, USA) fue realizada durante la noche a 4°C. Después, las células fueron lavadas e incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpo secundario anti-ratón hecho en cabra acoplado a rojo Texas (dilución 1:1000, *Molecular Probes*, *Invitrogen*, cat. no. T-862, USA) o anticuerpo secundario anti-conejo hecho en cabra acoplado con AlexaFluor488 (dilución 1:1000, *Abcam*, cat. no. ab150077, UK). Finalmente, los cubreobjetos fueron montados sobre laminillas con medio de montaje (*Vectashield*; *Vector Laboratories*, cat. no. H-1200, USA) suplementado con DAPI. Todas las imágenes fueron capturadas y digitalizadas con el microscopio confocal Zeiss LSM 780 (Carl Zeiss, Alemania).

### **Ensayo de TUNEL.**

Los cultivos primarios de neuronas del hipocampo de embrión obtenidos de 3 ratonas preñadas fueron utilizados para realizar el ensayo de TUNEL como previamente fue descrito (75), y de acuerdo con las instrucciones del fabricante (*In Situ Cell Death Detection kit, fluorescein*. *Roche Diagnostics*, cat. no. 11684795910, USA). Los cubreobjetos fueron montados sobre laminillas con medio de montaje (*Vectashield*; *Vector Laboratories*, cat. no. H-1200, USA) suplementado con DAPI.

## La retrotranscripción de RNA mensajero y la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT qPCR).

La RT PCR fue realizada como previamente fue descrito (76). En breve, el ARN total de cultivos primarios de neuronas del hipocampo de embriones de 4 ratonas preñadas fue extraído usando el Kit *RNeasy* (*Qiagen*, cat. no. 74106, *Germany*) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Un microgramo de ARN fue retro transcrito usando el Kit de retro transcripción de alta capacidad de ADN (*Applied Biosystems*, cat. no. 4368814, *USA*) en un termociclador *Mastercycler* (*Eppendorf*, *Germany*) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La reacción en cadena de la polimerasa fue realizada en un termociclador (*Bio-Rad*, *Inc.* *USA*), con secuencias de oligonucleótidos como se indica en la siguiente tabla:

SECUENCIAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS		
Gen	Sentido	Antisentido
BAX	5'-GAGTCACAGTCGGATATCAG-3'	5'-AAGTAGAAGAGGGCAACCAC-3'
BCL2	5'-CTGTGGATGACTGAGTACCT-3'	5'-AGGTATGCACCCAGAGTGAT-3'
BAD	5'-ACATTCATCAGCAGGGACG-3'	5'-TCGAAAAGGGCTAAGCTCC-3'
PUMA	5'-CTGTGAAGAGCATATGAGCC-3'	5'- CAGATGAAGGTGAGGCAGG-3'
BIM	5'- GAGATACGGATTGCACAGGAG-3'	5'- CGGAAGATAAAGCGTAACAGTTG-3'
HPRT	5'-ATTCACCACCACCCTCTACA-3'	5'-GCTTGCAGACCACCACGTA-3'

Los resultados de la reacción en cadena de la polimerasa fueron detectados y cuantificados con *Maxima Green / ROX qPCR Master* (*Thermo Scientific*, *USA*) en una reacción con volumen final de 10  $\mu$ L conteniendo muestra (25 ng en 0.5  $\mu$ L de

cADN) y 0.5  $\mu$ M de cada oligonucleótido. La amplificación, fue realizada en un termociclador (*Bio-Rad, USA*) PCR CFX96, con ciclos de desnaturalización por 10 minutos a 95° C, seguidos por 40 ciclos de amplificación (10 segundos a 95° C, 30 segundos en la temperatura específica de apareamiento de oligonucleótidos, y 30 segundos a 72° C). Los datos de la reacción en cadena de la polimerasa fueron analizados por el método  $2^{-DDCT}$ , y los umbrales de los ciclos fueron normalizados al gen casero Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa (HPRT) utilizados para calcular el nivel de ARN mensajero de nuestro interés.

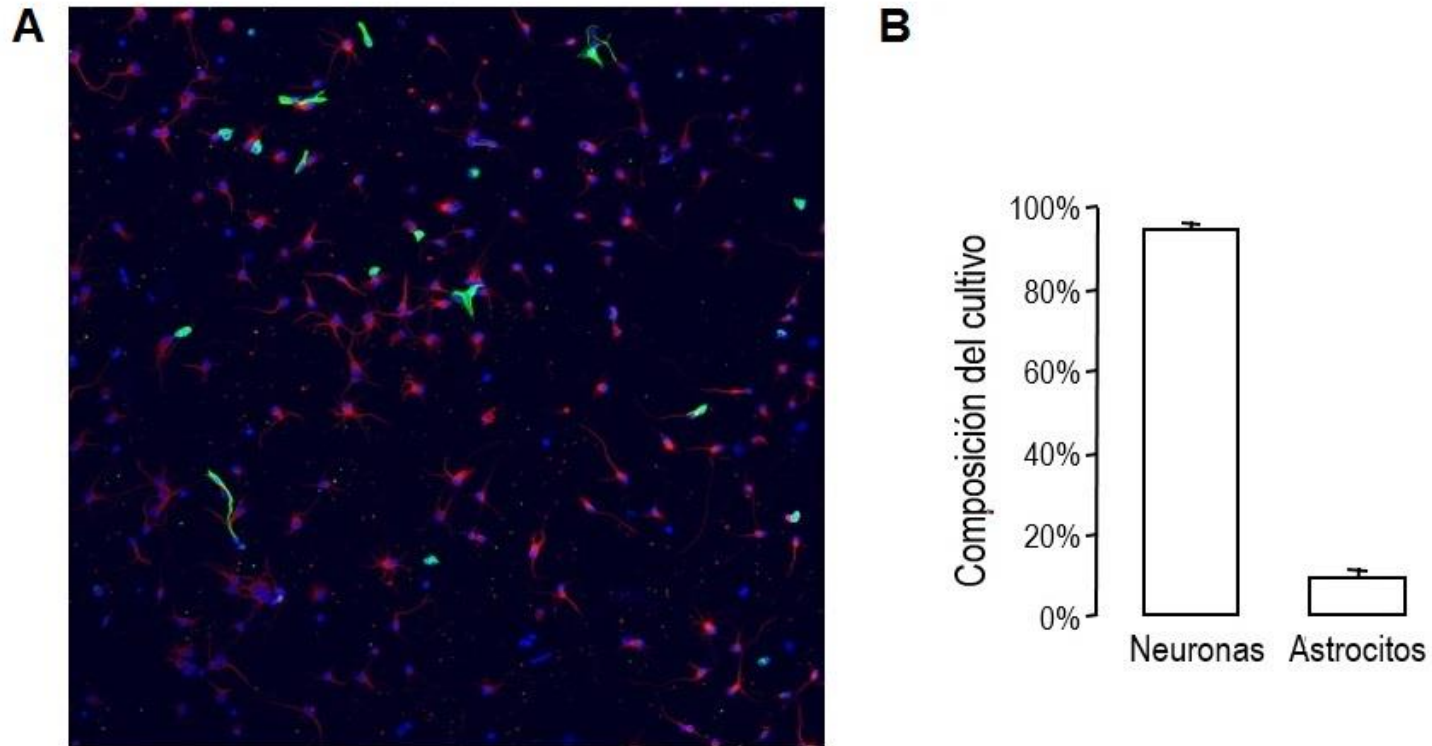
### **Análisis estadísticos.**

Los resultados se muestran como el promedio  $\pm$  error estándar de la media (E.E.M.); todos los datos mostraron distribución normal o igual varianza de acuerdo con las pruebas estadísticas de D'Agostino-Pearson ómnibus, y Levene, respectivamente. Las diferencias estadísticas fueron determinadas por análisis de varianza (ANOVA) seguida del análisis *post hoc*-Tukey (*GraphPad Prism Software, USA*). Las diferencias en las medias con  $p \leq 0.05$  fueron consideradas estadísticamente significativas.

## **Resultados.**

### **La caracterización de la composición de los cultivos primarios de neuronas del hipocampo.**

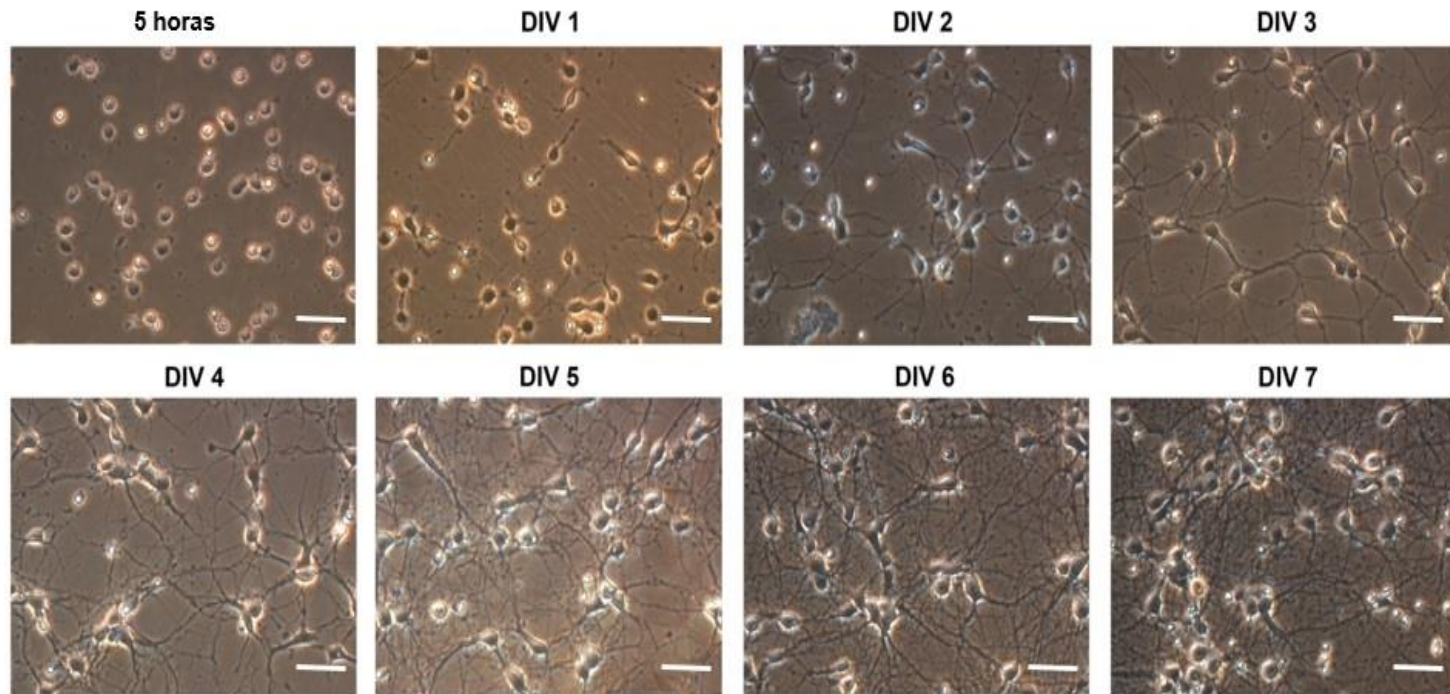
Para analizar la pureza de los cultivos primarios de neuronas del hipocampo y garantizar que el tipo neuronal es el blanco de las acciones de la vasoinhibina, determinamos la composición celular de los cultivos. Esto fue realizado a través de una inmunocitoquímica para  $\beta$ III-tubulina y para la proteína acídica fibrilar glial (GFAP, por sus siglas en inglés), marcadores específicos neuronales y astrogliales, respectivamente. Adicionalmente, los núcleos celulares fueron marcados con DAPI. Así pues, la inmunocitoquímica fue hecha al DIV 1 (**Fig. 1A**), momento en el que los tratamientos con vasoinhibina fueron realizados a los cultivos primarios. El uso de esta técnica nos permitió observar un alto porcentaje de células neuronales, por encima del 90 %, marcadas con  $\beta$ III-tubulina. Mientras que, menos del 10 % de las células, fueron observadas positivas para el marcaje de GFAP en nuestros cultivos (**Fig. 1B**).



**Fig. 1. La composición celular de los cultivos primarios de neuronas del hipocampo.** A) Imagen representativa de la inmunocitoquímica para  $\beta$ III-tubulina (neuronas; rojo) y para GFAP (astrocitos; verde). B) Cuantificación del % de células positivas para  $\beta$ III-tubulina y para GFAP en el DIV 1. La microfotografía está compuesta de 16 campos capturados en *tile-scan* por microscopía confocal. Objetivo 25X, Zeiss LSM 780; Zeiss, Alemania.

## **El establecimiento y la estandarización de los cultivos primarios de las neuronas del hipocampo.**

Para evaluar los efectos de la vasoinhibina sobre las neuronas del SNC, establecimos como modelo experimental los cultivos primarios de neuronas del hipocampo. Primero evaluamos la viabilidad de los cultivos primarios de neuronas del hipocampo llevando a cabo el seguimiento del desarrollo del cultivo neuronal hipocampal, la aparición de neuritas y conexiones interneuronales, dentro un curso temporal desde las 5 horas después de sembradas y hasta el DIV 7 (**Fig. 2**). A las 5 horas después de sembradas las células observamos que carecían de proyecciones. Sin embargo, al DIV 1 ya se pudo observar hasta más de una pequeña neurita a partir de un solo soma neuronal. A partir del DIV 2 observamos un mayor número de neuritas por célula y con longitudes que hacían contacto con otras neuritas y con otras neuronas. En el DIV 5 observamos una red neurítica mejor constituida fortaleciendo el contacto entre neuritas, así como entre neuronas que parecería haber alcanzado la madurez al DIV 7, lo que, de acuerdo con la literatura, permitiría la comunicación celular. Además, a lo largo del curso temporal pareció mantenerse constante el número de células en cultivo. Y ya que, de acuerdo con los antecedentes, otro de nuestros principales intereses era evaluar los efectos de la vasoinhibina sobre el crecimiento neurítico, decidimos realizar tratamientos con la vasoinhibina al DIV 1.

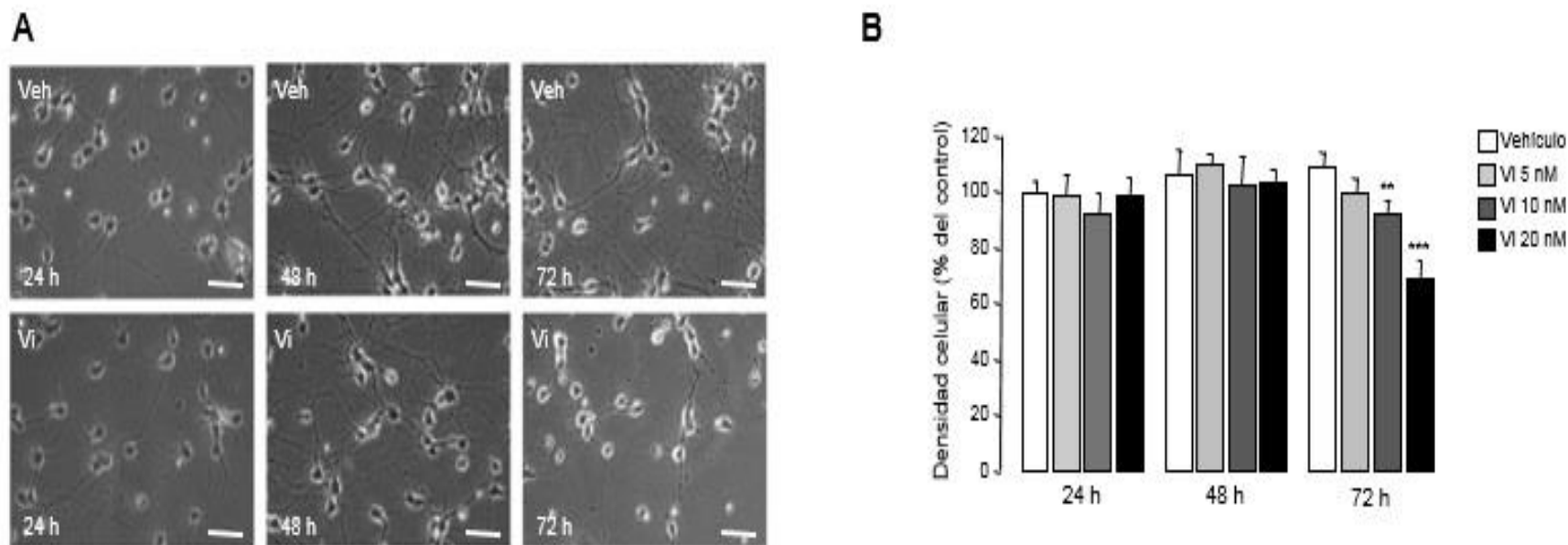


**Fig. 2. Curso temporal del cultivo primario de neuronas del hipocampo.** Imágenes representativas tomadas en campo claro de los cultivos primarios de neuronas del hipocampo desde las 5 horas después de sembradas y hasta el DIV 7. Barra de calibración, 150  $\mu$ m. Objetivo 20X, Olympus.

## **El análisis de los efectos de la vasoinhibina sobre la densidad celular en los cultivos primarios de neuronas del hipocampo.**

Para analizar los efectos de la vasoinhibina sobre la densidad celular, fueron cultivadas las neuronas primarias del hipocampo y tratadas con vehículo o con 5, 10 y 20 nM de vasoinhibina durante 24, 48 y 72 horas. Al término de estos tiempos las neuronas fueron fotografiadas en campo claro para contar las células y elucidar el efecto de disminución en la densidad de las células por condición (**Fig. 3A**). Los conteos a las 24 y 48 horas no revelaron cambios significativos en la densidad celular con ninguna concentración usada. Sin embargo, a las 72 horas de incubación, se observó una disminución significativa en la densidad celular con las concentraciones de 10 y 20 nM de vasoinhibina (**Fig. 3B**;  $P = 0.025$  y  $P = 0.001$ , respectivamente).



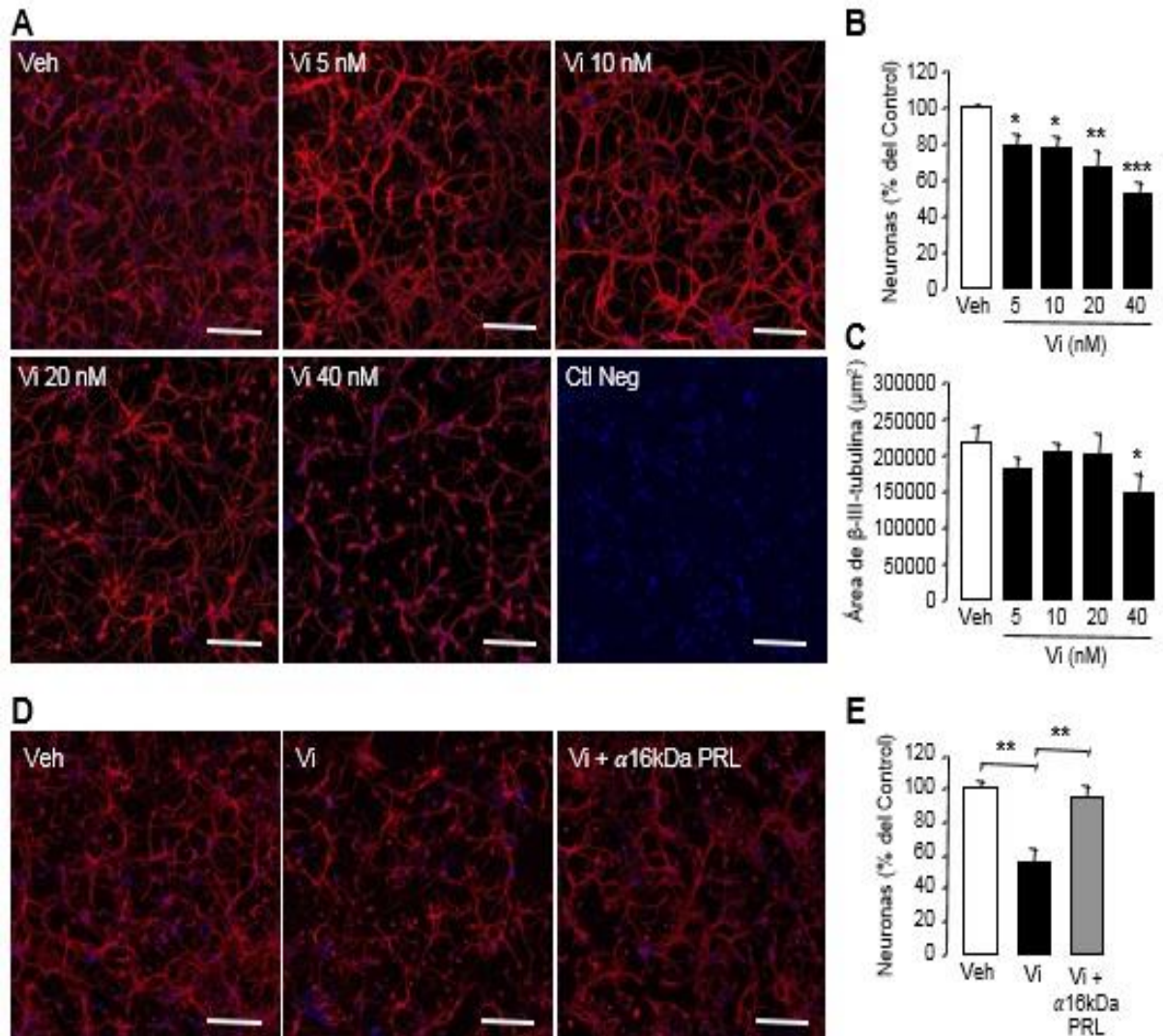


**Fig. 3. Los efectos de la vasoinhibina sobre la densidad celular en un curso temporal en los cultivos primarios de neuronas del hipocampo.** A) Imágenes representativas que muestran neuronas en campo claro después de 24, 48 y 72 horas de tratamiento con diferentes concentraciones de vasoinhibina (5, 10 y 20 nM). B) La cuantificación del porcentaje (%) de neuronas primarias del hipocampo disminuyó significativamente a las 72 h de incubación con Vi 10 nM (barra gris oscuro) y con Vi 20 nM (barra negra) comparado con el control (barra blanca). Los análisis estadísticos fueron realizados con *one-way ANOVA* (B,  $P = 0.0042$  y  $F = 2.871$ ) y la prueba *post hoc* de *Tukey*. Los valores son la media  $\pm$  E.E.M de triplicados de dos experimentos independientes. \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ . Cada microfotografía está capturada en microscopía de campo claro por contraste de fases. Barra de calibración, 150  $\mu$ m. Objetivo 20X, Olympus. Veh, vehículo; Vi, vasoinhibina.

## **El análisis de los efectos de la vasoinhibina sobre la densidad neuronal.**

Para explorar los efectos de la vasoinhibina sobre la densidad neuronal, las neuronas primarias del hipocampo fueron cultivadas y tratadas con vehículo o con diferentes concentraciones de vasoinhibina (5, 10, 20 o 40 nM) en el DIV 1. Después de 72 horas, se realizó una inmunocitoquímica para un marcador específico neuronal con núcleos teñidos con DAPI (**Fig. 4A**). Las imágenes procesadas de esta inmunocitoquímica mostraron que la vasoinhibina disminuyó significativamente la densidad de las neuronas del hipocampo de forma dependiente de la concentración y confirmó las observaciones realizadas en campo claro. La cuantificación de la densidad neuronal reveló la reducción en el porcentaje de núcleos celulares por área en las concentraciones de 5 ( $P = 0.014$ ), 10 ( $P = 0.013$ ), 20 ( $P = 0.004$ ) y 40 ( $P = 0.001$ ) nM de vasoinhibina con respecto a su control (**Fig. 4B**). Como indicador para analizar cambios en la formación de la red neurítica se realizó la cuantificación del área de  $\beta$ III-tubulina. Esta cuantificación arrojó como resultado la disminución significativa ( $P = 0.050$ ) del área de  $\beta$ III-tubulina solamente con la concentración de 40 nM de vasoinhibina (**Fig. 4C**), la concentración más alta de vasoinhibina utilizada. Para evaluar solamente la densidad neuronal y no los cambios en la conformación de la red neurítica, decidimos para los subsiguientes experimentos utilizar únicamente la concentración de 20 nM de vasoinhibina. La especificidad de la acción de la vasoinhibina reduciendo el número de neuronas fue verificado usando un anticuerpo capaz de secuestrar a la vasoinhibina (**Fig. 4D**;  $\alpha$ 16kDa PRL), previamente caracterizado (Dueñas et al., 1999). Este anticuerpo, efectivamente,

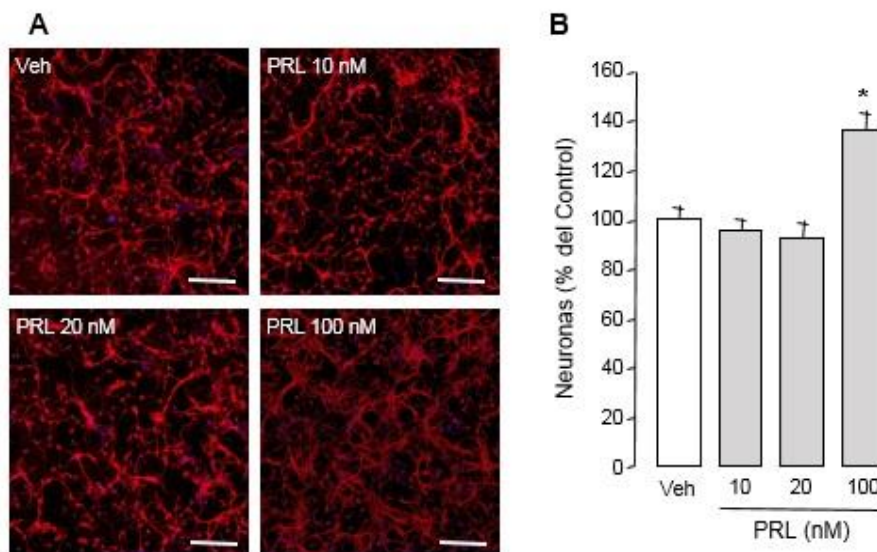
bloqueó la reducción del número neuronal mediada por la vasoinhibina (**Fig. 4E**;  $P = 0.008$  vs vasoinhibina).

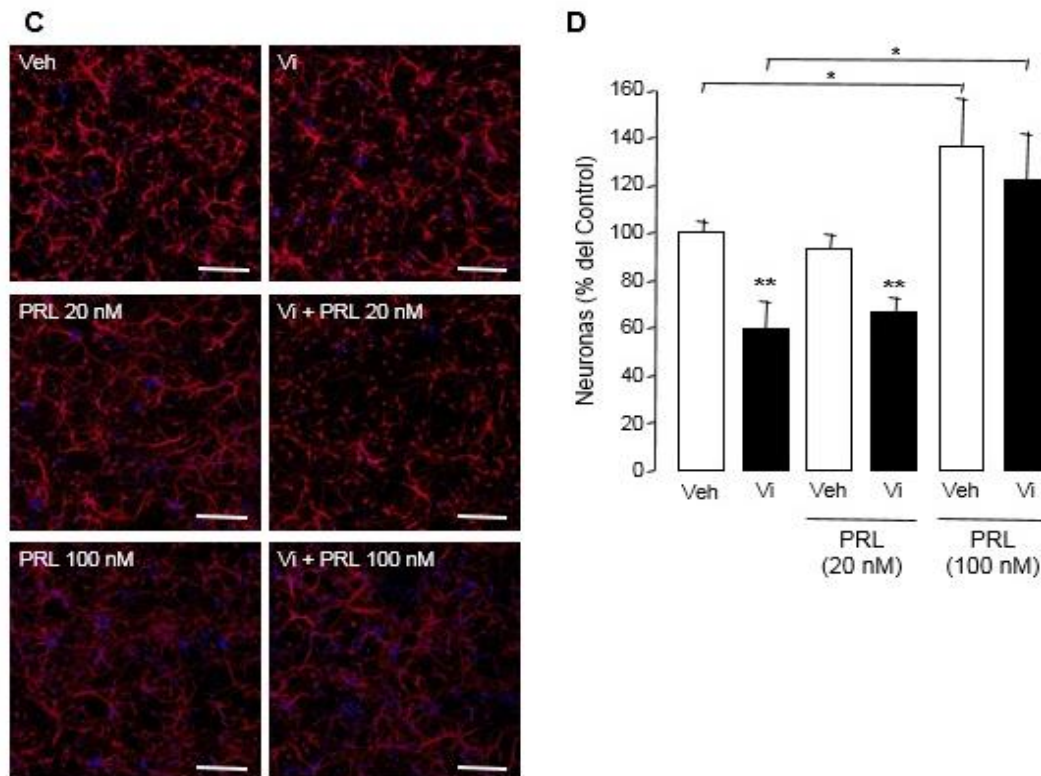


**Fig. 4. Los efectos de la vasoinhibina sobre la densidad celular en los cultivos primarios de neuronas del hipocampo.** A) Microfotografías representativas de la inmunocitoquímica para  $\beta$ III-tubulina (rojo; marcador neuronal) y núcleos (en azul) teñidos con DAPI en las neuronas primarias del hipocampo en el DIV 4, y 72 horas después del tratamiento con diferentes concentraciones de vasoinhibina (5, 10, 20 o 40 nM). Cada microfotografía está compuesta por 16 campos capturados por *tile-scan* en microscopía confocal. B) La cuantificación del porcentaje (%) de neuronas por área después del tratamiento con diferentes concentraciones de vasoinhibina (5, 10, 20 y 40 nM; barras negras) comparado con el control (barra blanca). C) Cuantificación del área de  $\beta$ III-tubulina ( $\mu\text{m}^2$ ) después del tratamiento con vasoinhibina (5, 10, 20 y 40 nM; barras negras) comparado con el control (barra blanca). D) Análisis de inmunofluorescencia para  $\beta$ III-tubulina (rojo) en las neuronas del hipocampo en cultivo primario tratadas con vehículo, vasoinhibina (20 nM) o vasoinhibina inmunosequestrada ( $\alpha$ 16kDa PRL) durante 72 h. Los núcleos celulares fueron teñidos con DAPI (azul). E) Cuantificación del porcentaje (%) de neuronas tras los efectos de la vasoinhibina (barra negra) y la vasoinhibina inmunosequestrada (barra gris;  $\alpha$ 16kDa PRL). B, C y E) Los análisis estadísticos fueron realizados con *one-way ANOVA* (B,  $P = 0.0001$  y  $F = 11.14$ ; C,  $P = 0.0882$  y  $F = 2.326$ ; E,  $P = 0.0017$  y  $F = 12.02$ ) y la prueba *post hoc* de *Tukey*. Los valores son la media  $\pm$  E.E.M de triplicados de 4 experimentos independientes. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.001$ ; \*\*\*  $p < 0.0001$ . Barra de calibración, 200  $\mu\text{m}$ . Objetivo 25X, Zeiss LSM 780; Zeiss, Alemania. Veh, vehículo; Vi, vasoinhibina; Ctl Neg, control negativo;  $\alpha$ 16kDa PRL,

## La PRL reduce la muerte celular basal e inducida por la vasoinhibina en los cultivos primarios de neuronas del hipocampo.

Investigamos también si la PRL afecta la densidad celular de los cultivos primarios de neuronas del hipocampo bajo condiciones basales (**Fig. 5A y 5B**), así como bajo la influencia de la vasoinhibina (20 nM; **Fig. 5C y 5D**). Los datos a partir de imágenes inmunofluorescentes mostraron que bajo condiciones basales la oPRL en una concentración de 100 nM no solo evitó el decremento espontáneo en el número de neuronas observado a las 72 h ( $P = 0.015$ ) sino que podría haber estimulado la proliferación celular en los cultivos primarios, aunque no mostró ningún efecto en las concentraciones de 10 y 20 nM (**Fig. 5B**). Además, la PRL bloqueó también el efecto deletéreo de la vasoinhibina sobre la densidad celular neuronal. La pérdida neuronal resultante del tratamiento con 20 nM de vasoinhibina fue revertida por la adición de 100 nM de PRL ( $P = 0.044$ ; **Fig. 5D**). Sin embargo, la PRL no fue capaz de revertir la disminución de la densidad neuronal inducida por 20 nM de vasoinhibina en una concentración equimolar (**Fig. 5D**).





**Fig. 5. Los efectos en la reducción de la muerte neuronal basal e inducida por la vasoinhibina luego de 72 h de incubación con la PRL.** A) Imágenes representativas de la inmunocitoquímica para  $\beta$ III-tubulina (rojo) y núcleos teñidos con DAPI (azul) en las neuronas primarias del hipocampo a las 72 horas después del tratamiento con concentraciones crecientes de PRL (10, 20 o 100 nM). Cada microfotografía está compuesta por 16 campos capturados por *tile-scan* en microscopía confocal. B) La cuantificación del porcentaje (%) de neuronas por área después del tratamiento con diferentes concentraciones de PRL (10, 20 y 100 nM; barras grises) comparado con el control (barra blanca). C) Análisis de inmunofluorescencia para  $\beta$ III-tubulina (rojo) y los núcleos teñidos con DAPI (azul) en las neuronas del hipocampo en cultivo primario tratadas con vehículo, vasoinhibina (20 nM), PRL (20 y 100 nM) o la combinación de vasoinhibina con las diferentes concentraciones de PRL durante 72 h. D) Cuantificación del porcentaje (%) de neuronas después de los tratamientos referidos. B y D) Los análisis estadísticos fueron realizados con *one-way ANOVA* (B,  $P = 0.0194$  y  $F = 3.904$ ; D,  $P = 0.0005$  y  $F = 5.802$ ) y la prueba *post hoc* de *Tukey*. Los valores son la media  $\pm$  E.E.M de triplicados de 4 experimentos independientes. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.001$ . Barra de calibración, 200  $\mu$ m. Objetivo 25X, Zeiss LSM 780; Zeiss, Alemania. Veh, vehículo; Vi, vasoinhibina; PRL, prolactina.

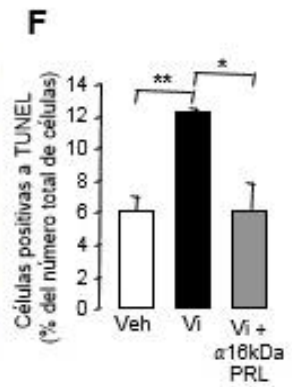
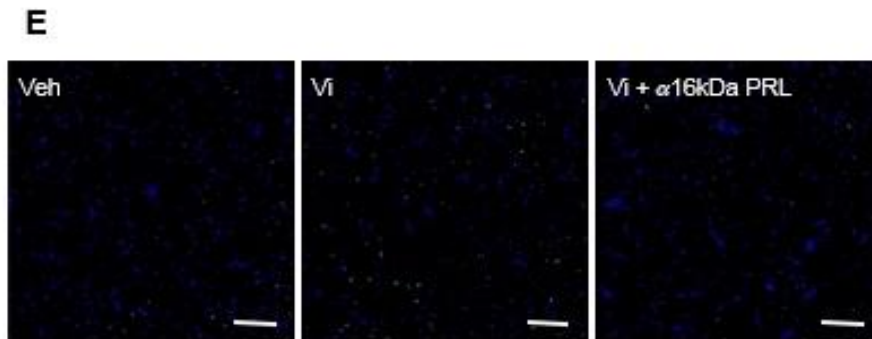
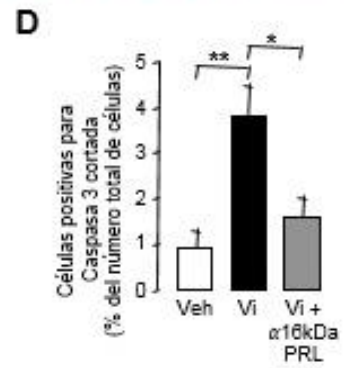
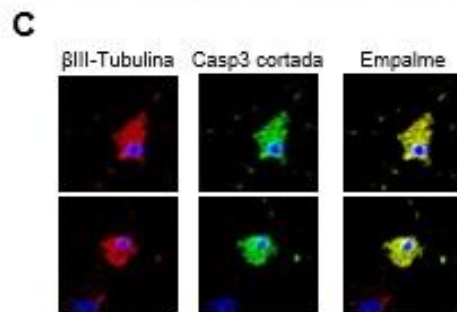
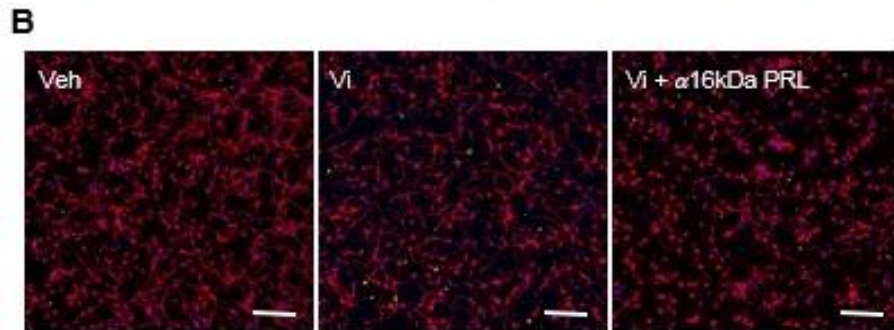
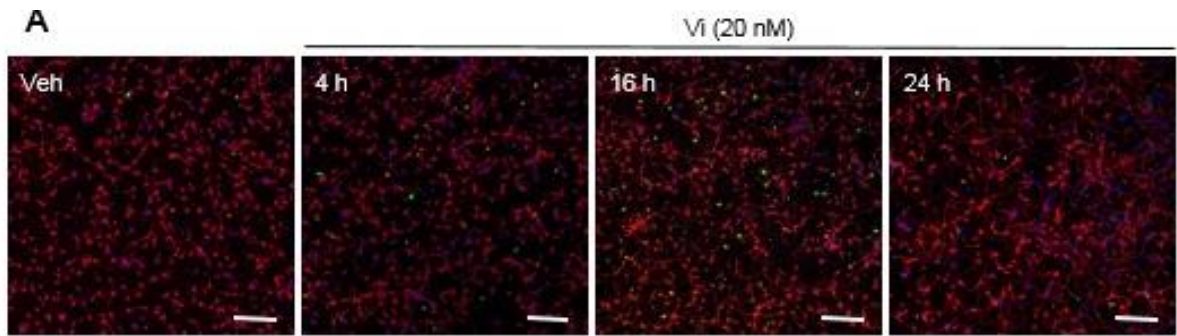
## **Los efectos de la vasoinhibina sobre la muerte por apoptosis de las neuronas del hipocampo en cultivo.**

De acuerdo con la muerte neuronal observada en respuesta a la vasoinhibina, nos preguntamos si estos hallazgos podrían estar siendo mediados por las acciones proapoptóticas de la vasoinhibina. Para determinar las acciones proapoptóticas de la vasoinhibina, las neuronas en cultivo fueron tratadas con el vehículo o la vasoinhibina, después de 4, 16 y 24 horas, se realizó una inmunocitoquímica para  $\beta$ III-tubulina y caspasa 3 cortada (**Fig. 6A**), forma activa de esta enzima proapoptótica. El análisis de las imágenes de esta inmunocitoquímica nos permitió la identificación de neuronas en apoptosis, de acuerdo con el doble marcaje positivo y la característica morfología apoptótica (**Fig. 6B y 6C**). La cuantificación mostró que a las 16 h se alcanzó un aumento significativo ( $P = 0.004$ ; **Fig. 6D**) de cuatro veces el % del número total de neuronas positivas para caspasa 3 cortada en los cultivos tratados con la vasoinhibina 20 nM comparado con el vehículo.

En paralelo, para confirmar si la observación en la disminución en la densidad celular en los cultivos neuronales era debida a las acciones proapoptóticas de la vasoinhibina, hicimos los tratamientos con el vehículo o la vasoinhibina 20 nM, y adicionalmente, con vasoinhibina inmunosequestrada ( $\alpha$ 16kDa PRL) como experimento de pérdida de función. Luego de 24 horas de incubación con la vasoinhibina, realizamos el ensayo de TUNEL (**Fig. 6E**). El análisis de las imágenes mostró que la vasoinhibina incrementó significativamente ( $P = 0.006$ ; **Fig. 6F**) el porcentaje de neuronas positivas para TUNEL por área comparado con el vehículo.

La especificidad de los efectos de la vasoinhibina fue mostrada nuevamente con el uso del  $\alpha$ 16kDa PRL. La coincubación de las neuronas con la vasoinhibina inmunosequestrada bloqueó los efectos de fragmentación del ADN inducidos por la vasoinhibina ( $P = 0.047$ ; **Fig. 6F**).

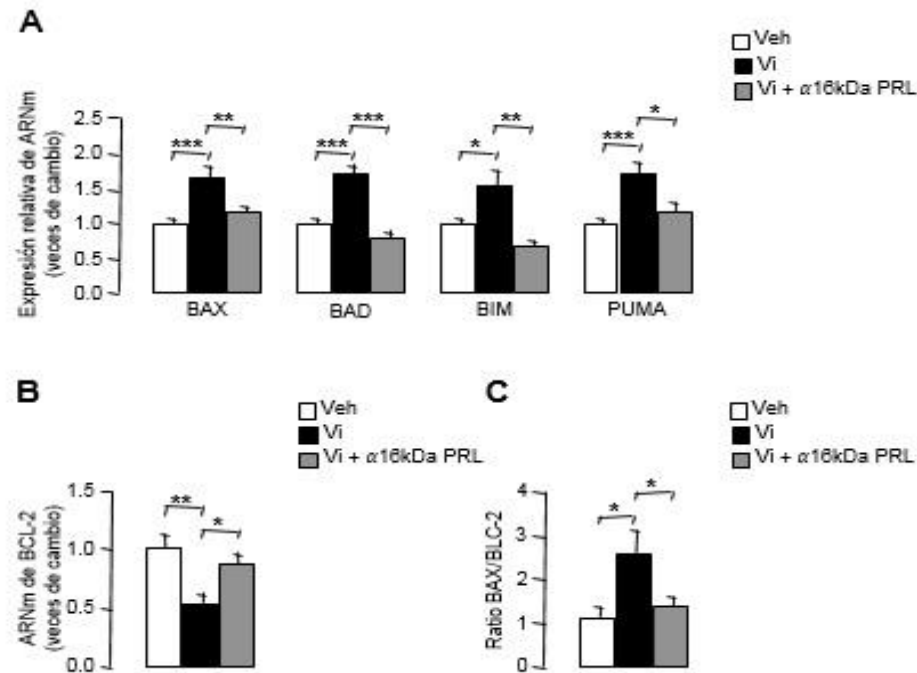




**Fig. 6. Los efectos de la vasoinhibina sobre la muerte por apoptosis en los cultivos primarios de neuronas del hipocampo.** A) Imágenes representativas de la inmunocitoquímica para  $\beta$ III-tubulina (rojo) y para caspasa 3 cortada (forma activa de esta enzima proapoptótica; verde), con los núcleos teñidos con DAPI (azul) en los cultivos incubados con el vehículo y con la vasoinhibina (20nM) durante 4, 16 y 24 h. B) El análisis de inmunofluorescencia para  $\beta$ III-tubulina (rojo) y para caspasa 3 cortada (verde) con los núcleos teñidos con DAPI (azul) en cultivos incubados con el vehículo, la vasoinhibina (20nM) y la vasoinhibina inmunosecuesturada ( $\alpha$ 16kDa PRL) durante 16 h. C) La identificación de las neuronas en apoptosis a través de la colocalización de ambos marcadores, neuronal y caspasa 3 activa (amarillo) en un aumento de la imagen. D) La cuantificación del % de células positivas para caspasa 3 cortada a las 16 h de tratamiento con la vasoinhibina (barra negra) respecto a su control (barra blanca) y respecto a la vasoinhibina inmunosecuesturada ( $\alpha$ 16kDa PRL; barra gris). E) Imágenes representativas que muestran las células positivas para TUNEL (verde) y los núcleos celulares teñidos con DAPI (azul), después de 24 horas de tratamiento con la vasoinhibina 20 nM. F) La cuantificación del porcentaje (%) de neuronas primarias del hipocampo positivas para TUNEL por área en respuesta a el vehículo (barra blanca), la vasoinhibina 20 nM (barra negra) o la vasoinhibina inmunosecuesturada ( $\alpha$ 16kDa PRL; barra gris). D y F) Los análisis estadísticos fueron realizados con *one-way ANOVA* (D,  $P = 0.0043$  y  $F = 8.233$ ; F,  $P = 0.0068$  y  $F = 7.292$ ) y la prueba *post hoc* de *Tukey*. Los valores son la media  $\pm$  E.E.M de triplicados de 4 experimentos independientes. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.001$ . Cada microfotografía está compuesta de 16 campos capturados en *tile-scan* por microscopía confocal. La barra de calibración, 200  $\mu$ m. Objetivo 25X, Zeiss LSM 780; Zeiss, Alemania. Veh, vehículo; Vi, vasoinhibina; Casp3, caspasa 3;  $\alpha$ 16kDa PRL, anticuerpo policlonal levantado contra vasoinhibina; TUNEL, *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*.

## Los efectos de la vasoinhibina sobre la expresión génica de las neuronas del hipocampo en cultivo primario.

Para determinar la posible vía de señalización apoptótica siendo activada por la vasoinhibina, evaluamos cambios en la expresión de algunos genes proapoptóticos por RT qPCR. Las neuronas fueron tratadas con el vehículo, la vasoinhibina 20 nM o la vasoinhibina inmunosequestrada. Luego de 24 horas de tratamiento con la vasoinhibina, las muestras procesadas fueron analizadas. El análisis de estas muestras mostró que la vasoinhibina incrementa la expresión de algunas proteínas proapoptóticas implicadas en la vía intrínseca, tales como BAD, BAX, BIM y PUMA comparado con sus respectivos controles ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ ,  $p < 0.041$  y  $p < 0.001$ , respectivamente; **Fig. 7A**) y comparado con la vasoinhibina inmunosequestrada ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.008$ ,  $p < 0.007$  y  $p < 0.028$ , respectivamente; **Fig. 7A**). Asimismo, la vasoinhibina mostró disminuir la expresión de la proteína antiapoptótica BCL-2 comparado con el control ( $p < 0.010$ ; **Fig. 7B**) y comparado con la vasoinhibina inmunosequestrada ( $p < 0.048$ ; **Fig. 7B**). Además, en la razón BAX/BCL-2 (**Fig. 7C**), que es indicativa de apoptosis incrementada, se observó un aumento debido a que los niveles de BAX aumentaron y los de BCL-2 disminuyeron.



**Fig. 7. Los cambios en la expresión génica en respuesta a la vasoinhibina.** Los cultivos primarios de neuronas del hipocampo fueron tratados con el vehículo (control; barras blancas), la vasoinhibina (20 nM; barras negras) o la vasoinhibina inmunosecuestada ( $\alpha$ 16kDa PRL; barras grises) durante 24 h y la expresión relativa del ARNm de proteínas relacionadas a la vía intrínseca de la apoptosis de la familia BCL-2 fue medida. La cuantificación de los cambios en la expresión del ARNm de algunos genes A) proapoptóticos como BAX, BAD, BIM y PUMA y de la proteína B) antiapoptótica BCL-2, así como la C) ratio Bax/Bcl-2 fueron analizados por RT qPCR. Los análisis estadísticos fueron realizados con *one-way ANOVA* (BAX,  $P = 0.0001$  y  $F = 14.76$ ; BAD,  $P = 0.0001$  y  $F = 17.90$ ; BIM,  $P = 0.0046$  y  $F = 6.269$ ; PUMA,  $P = 0.0001$  y  $F = 12.23$ ; BCL-2,  $P = 0.0125$  y  $F = 5.038$ ; Ratio BAX/BCL-2,  $P = 0.048$  y  $F = 3.72$  y la prueba *post hoc* de *Tukey*. Los valores son la media  $\pm$  E.E.M de triplicados de 4 experimentos independientes. \*  $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.001$ ; \*\*\* $p < 0.0001$ . Veh, vehículo; Vi, vasoinhibina;  $\alpha$ 16kDa PRL, anticuerpo policlonal levantado contra vasoinhibina.



## **Discusión.**

Interesantemente, algunos autores han mostrado una relación entre los comportamientos de ansiedad y depresión con el impedimento de la señalización de factores de crecimiento (51,52) y la muerte de neuronas del hipocampo (53–56). Nuestros resultados, y la administración intracerebral de vasoinhibina con la subsecuente inducción de comportamientos de ansiedad y depresión (21) sugieren que la vasoinhibina podría actuar como un regulador local de la función neuronal en el SNC más allá de las células endoteliales. Los efectos regulatorios de la vasoinhibina sobre el sistema nervioso han llegado a ser el objeto de investigación de estudios recientes (18,19). Este reciente interés es el resultado de los hallazgos acumulados que muestran la influencia de las hormonas sobre el cerebro para modular la función neural y, en consecuencia, modular los patrones de comportamiento (77). Sin embargo, se desconoce si la vasoinhibina actúa directamente sobre las neuronas del SNC. El presente estudio apoya el papel de la vasoinhibina en la regulación de las neuronas del SNC. Nuestros resultados muestran que las neuronas del hipocampo son células blanco de las acciones proapoptóticas de la vasoinhibina, induciéndoles la muerte celular por apoptosis vía la familia de proteínas BCL-2. Este estudio es la primera evidencia de que la vasoinhibina tiene un efecto directo sobre las neuronas del SNC.

Los estudios previos para evaluar los efectos de la vasoinhibina sobre células neuronales fueron realizados en cultivos de neuronas periféricas, y mostraron que la vasoinhibina promueve la atrofia neuronal y la pérdida celular (18,19). Para

elucidar si estas acciones de la vasoinhibina u otras ocurren en las neuronas del SNC nosotros utilizamos cultivos primarios de neuronas del hipocampo, una conveniente y bien establecida aproximación para estudiar el papel de diferentes factores sobre las neuronas del SNC. La vasoinhibina redujo la sobrevivencia de las neuronas primarias del hipocampo en una concentración en la cual en neuronas periféricas solamente bloquea el crecimiento neurítico (18). Solamente con una concentración cuatro veces mayor que la dosis efectiva en neuronas periféricas observamos una reducción en el área de neuritas de las neuronas del hipocampo. Esta reducción podría deberse al grado de daño o por un efecto independiente sobre el crecimiento neurítico, puesto que si la viabilidad celular está comprometida todos los procesos celulares colapsan (78). Esta diferencia en la respuesta y sensibilidad a la vasoinhibina entre neuronas centrales y neuronas periféricas podría ser explicada por la diferencia en especie y estadio de desarrollo de los animales de los cuales las neuronas fueron aisladas, es decir, las neuronas fetales podrían ser más susceptibles que las neuronas de recién nacidos. Otra importante diferencia es que los efectos de la vasoinhibina sobre las neuronas periféricas ocurrieron a través del antagonismo funcional de la vasoinhibina sobre la señalización activada por un factor de crecimiento utilizado como co-tratamiento (18). Mientras que, en este trabajo se muestran los efectos proapoptóticos de la vasoinhibina sobre las células neuronales de forma directa, por supuesto, sin perder de vista la presencia de los factores de crecimiento en el medio suplementado que permiten la sobrevivencia y el mantenimiento de los cultivos primarios neuronales.

Hay evidencia convincente de que la muerte celular de poblaciones neuronales postmitóticas en el SNC ocurre por apoptosis (79). Los datos indicaron que la vaso inhibina tuvo una acción proapoptótica en las neuronas primarias del hipocampo. Lo que coincide con las acciones proapoptóticas de la vaso inhibina previamente descritas en la regresión vascular de los vasos hialoideos en ratas neonatas (11), la muerte dependiente del estradiol en los lactotrófos de la adenohipófisis (12) y en las células endoteliales de los capilares cerebrales y de la vena umbilical humana (9), así como en las células endoteliales de los capilares de la corteza adrenal de bovino en donde induce activación de apoptosis dependiente de caspasas (10). El bloqueo de la función de ERK 1 / 2 y AKT en las neuronas del hipocampo, promueve citotoxicidad acompañada de la activación de la caspasa 3 (80). Nuestros resultados, también fueron consistentes con la activación de la caspasa 3 como reveló el doble marcaje positivo en la inmunocitoquímica para caspasa 3 cortada y para  $\beta$ III-tubulina. Asimismo, los cambios en la expresión de algunas proteínas proapoptóticas de la familia BCL-2 fueron observados en respuesta a la vaso inhibina.

La apoptosis neuronal inducida por la vaso inhibina es disparada por la vía intrínseca. La vaso inhibina incrementa la expresión de BAD, BAX, BIM y PUMA, genes de proteínas proapoptóticas de la familia BCL-2 las cuales son llaves reguladoras de la apoptosis neuronal (81). La inducción de la apoptosis intrínseca en neuronas es enteramente dependiente de la expresión y activación de BAX (82). BAX es inhibido mediante las interacciones con los miembros antiapoptóticos de la familia BCL-2, tal como BCL-2, cuya expresión es reducida en respuesta a la



vasoinhibina. BAD, BIM y PUMA son proteínas con solo el dominio BH3 que inducen apoptosis por causar desinhibición de BAX. Particularmente, BIM y PUMA tienen una potencia relativamente alta en términos de inducción de la apoptosis comparados con otras proteínas con solo el dominio BH3, debido a su unión con alta afinidad a todas las proteínas antiapoptóticas BCL-2. En contraste, los niveles de BCL-2 y de BAX no fueron afectados por el tratamiento con vasoinhibina en las células endoteliales de los capilares del cerebro bovino, sin embargo, en estas células la vasoinhibina estimula la conversión de BCL- XL a su forma proapoptótica BCL- XS, un mecanismo que no fue evaluado en este trabajo.

Por otra parte, la vasoinhibina por sí misma no induce muerte celular en las neuronas del sistema nervioso periférico (SNP), solamente evita la sobrevivencia inducida por el NGF (19). Esta discrepancia en el efecto de la vasoinhibina en la sobrevivencia celular en estos dos modelos de neuronas en desarrollo podría deberse a que la regulación de la apoptosis es diferente en el SNP y en el SNC. La vía apoptótica en el SNP en desarrollo es bien sabido que se regula por factores tróficos derivados del blanco, tales como el NGF, que mantiene la sobrevivencia de las neuronas, lo cual contrarresta la propensión interna a morir (83). En contraste, las neuronas del SNC en el desarrollo no dependen de un solo factor de crecimiento para su sobrevivencia y las señales implicadas en la regulación de la apoptosis no están totalmente esclarecidas. Por lo tanto, estos hallazgos sugieren que la vasoinhibina podría ser una de esas señales implicadas en la regulación de la apoptosis en el SNC en desarrollo.

La expresión de la PRL en diferentes estructuras cerebrales como el hipotálamo, la corteza y el hipocampo ha sido ampliamente discutida (84,85). La PRL puede cruzar la barrera hematoencefálica a través de un mecanismo mediado por su receptor en las células de los plexos coroideos (35) así como puede cruzar la barrera hematoencefálica a través de un mecanismo no determinado pero independiente del RPRL (36). La PRL en el cerebro ha mostrado proteger a las neuronas del hipocampo contra la excitotoxicidad a través del RPRL (40). La señalización activada por el RPRL en el cerebro ocurre principalmente a través de tres rutas; MAPK, STAT y PI3K (86,87). Se sabe que la vasoinhibina antagoniza las acciones en pro de la sobrevivencia, las acciones proliferativas y las acciones tróficas de algunos factores de crecimiento, interfiriendo con estas mismas vías (4–6). También es conocido que la vasoinhibina puede interferir con estas vías de activación en las células endoteliales (13–17) y en células neuronales (18,19). Aunque la naturaleza del (los) receptor (es) de vasoinhibina no es completamente conocida, se conoce que las acciones de la vasoinhibina no son mediadas por el RPRL (20). Las acciones opuestas mostradas entre la PRL y la vasoinhibina, la incierta naturaleza del receptor de vasoinhibina (5,88,89) y si las neuronas del sistema nervioso central son células blanco de las acciones de la vasoinhibina hacen interesante conocer mejor el papel de las vasoinhibinas en el cerebro. Estas consistencias podrían sugerir que el eje PRL / vasoinhibina (89) podría estar activo en el SNC, así como ha sido propuesto en el sistema vascular, donde ambas hormonas presentan efectos opuestos entre ellas (88).

Estos hallazgos muestran claramente que la vasoinhibina actúa directamente sobre las neuronas del hipocampo induciendo la apoptosis. Sin embargo, si estos efectos de la vasoinhibina pueden ocurrir *In vivo*, queda pendiente por estudiarse, así como permanece por elucidarse la posible significancia fisiológica que pueda tener. Asimismo, será necesaria una extensa investigación para entender los mecanismos y las implicaciones patofisiológicas de la vasoinhibina en el SNC.

## Literatura citada

1. Ge G, Fernandez CA, Moses MA, Greenspan DS. Bone morphogenetic protein 1 processes prolactin to a 17-kDa antiangiogenic factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 12 de junio de 2007;104(24):10010-5.
2. Macotela Y, Aguilar MB, Guzmán-Morales J, Rivera JC, Zermeño C, López-Barrera F, et al. Matrix metalloproteases from chondrocytes generate an antiangiogenic 16 kDa prolactin. *J Cell Sci*. 1 de mayo de 2006;119(Pt 9):1790-800.
3. Piwnica D, Touraine P, Struman I, Tabruyn S, Bolbach G, Clapp C, et al. Cathepsin D Processes Human Prolactin into Multiple 16K-Like N-Terminal Fragments: Study of Their Antiangiogenic Properties and Physiological Relevance. *Molecular Endocrinology*. 1 de octubre de 2004;18(10):2522-42.
4. Clapp C, Aranda J, González C, Jeziorski MC, M de la Escalera G. Vasoinhibins: endogenous regulators of angiogenesis and vascular function. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. octubre de 2006;17(8):301-7.
5. Clapp C, Thebault S, Macotela Y, Moreno-Carranza B, Triebel J, Martínez de la Escalera G. Regulation of Blood Vessels by Prolactin and Vasoinhibins. En: Diakonova, PhD M, editor. *Recent Advances in Prolactin Research* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2015 [citado 24 de mayo de 2019]. p. 83-95. Disponible en: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-12114-7\\_4](http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-12114-7_4)
6. Clapp C, Thebault S, Jeziorski MC, Martínez De La Escalera G. Peptide hormone regulation of angiogenesis. *Physiol Rev*. octubre de 2009;89(4):1177-215.
7. Corbacho AM, Martínez De La Escalera G, Clapp C. Roles of prolactin and related members of the prolactin/growth hormone/placental lactogen family in angiogenesis. *J Endocrinol*. mayo de 2002;173(2):219-38.
8. Tabruyn SP, Nguyen N-Q-N, Cornet AM, Martial JA, Struman I. The antiangiogenic factor, 16-kDa human prolactin, induces endothelial cell cycle arrest by acting at both the G0-G1 and the G2-M phases. *Mol Endocrinol*. julio de 2005;19(7):1932-42.
9. Martini JF, Piot C, Humeau LM, Struman I, Martial JA, Weiner RI. The antiangiogenic factor 16K PRL induces programmed cell death in endothelial cells by caspase activation. *Mol Endocrinol*. octubre de 2000;14(10):1536-49.
10. Tabruyn SP, Sorlet CM, Rentier-Delrue F, Bours V, Weiner RI, Martial JA, et al. The antiangiogenic factor 16K human prolactin induces caspase-dependent apoptosis by a mechanism that requires activation of nuclear factor-kappaB. *Mol Endocrinol*. septiembre de 2003;17(9):1815-23.

11. Dueñas Z, Rivera JC, Quiróz-Mercado H, Aranda J, Macotela Y, Montes de Oca P, et al. Prolactin in eyes of patients with retinopathy of prematurity: implications for vascular regression. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. julio de 2004;45(7):2049-55.
12. Ferraris J, Radl DB, Zárate S, Jaita G, Eijo G, Zaldivar V, et al. N-terminal prolactin-derived fragments, vasoinhibins, are proapoptotic and antiproliferative in the anterior pituitary. *PLoS ONE*. 2011;6(7):e21806.
13. D'Angelo G, Struman I, Martial J, Weiner RI. Activation of mitogen-activated protein kinases by vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in capillary endothelial cells is inhibited by the antiangiogenic factor 16-kDa N-terminal fragment of prolactin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 3 de julio de 1995;92(14):6374-8.
14. D'Angelo G, Martini JF, Iiri T, Fantl WJ, Martial J, Weiner RI. 16K human prolactin inhibits vascular endothelial growth factor-induced activation of Ras in capillary endothelial cells. *Mol Endocrinol*. mayo de 1999;13(5):692-704.
15. García C, Aranda J, Arnold E, Thébault S, Macotela Y, López-Casillas F, et al. Vasoinhibins prevent retinal vasopermeability associated with diabetic retinopathy in rats via protein phosphatase 2A-dependent eNOS inactivation. *Journal of Clinical Investigation* [Internet]. 1 de mayo de 2008 [citado 1 de abril de 2019]; Disponible en: <http://www.jci.org/articles/view/34508>
16. Gonzalez C, Corbacho AM, Eiserich JP, Garcia C, Lopez-Barrera F, Morales-Tlalpan V, et al. 16K-prolactin inhibits activation of endothelial nitric oxide synthase, intracellular calcium mobilization, and endothelium-dependent vasorelaxation. *Endocrinology*. diciembre de 2004;145(12):5714-22.
17. Thebault S, González C, García C, Zamarripa DA, Nava G, Vaca L, et al. Vasoinhibins Prevent Bradykinin-Stimulated Endothelial Cell Proliferation by Inactivating eNOS via Reduction of both Intracellular Ca<sup>2+</sup> Levels and eNOS Phosphorylation at Ser1179. *Pharmaceuticals*. 20 de julio de 2011;4(7):1052-69.
18. Castillo X, Melo Z, Varela-Echavarría A, Tamariz E, Aroña RM, Arnold E, et al. Vasoinhibin Suppresses the Neurotrophic Effects of VEGF and NGF in Newborn Rat Primary Sensory Neurons. *Neuroendocrinology*. 2018;106(3):221-33.
19. Melo Z, Castillo X, Moreno-Carranza B, Ledesma-Colunga MG, Arnold E, López-Casillas F, et al. Vasoinhibin Suppresses Nerve Growth Factor-Induced Differentiation and Survival of PC12 Pheochromocytoma Cells. *Neuroendocrinology*. 15 de mayo de 2019;1-13.
20. Clapp C, Weiner RI. A specific, high affinity, saturable binding site for the 16-kilodalton fragment of prolactin on capillary endothelial cells. *Endocrinology*. marzo de 1992;130(3):1380-6.

21. Zamorano M, Ledesma-Colunga MG, Adán N, Vera-Massieu C, Lemini M, Méndez I, et al. Prolactin-derived vasoinhibins increase anxiety- and depression-related behaviors. *Psychoneuroendocrinology*. junio de 2014;44:123-32.
22. Koizumi M, Horiguchi K, Tomita Y, Kato Y, Harigaya T. Prolactin gene expression in the mouse nipple. *J Reprod Dev*. diciembre de 2003;49(6):465-72.
23. Kurtz A, Bristol LA, Tóth BE, Lazar-Wesley E, Takács L, Kacsóh B. Mammary epithelial cells of lactating rats express prolactin messenger ribonucleic acid. *Biol Reprod*. mayo de 1993;48(5):1095-103.
24. Markoff E, Barry S, Handwerger S. Influence of osmolality and ionic environment on the secretion of prolactin by human decidua in vitro. *J Endocrinol*. enero de 1982;92(1):103-10.
25. Nevalainen MT, Valve EM, Ingleton PM, Nurmi M, Martikainen PM, Harkonen PL. Prolactin and prolactin receptors are expressed and functioning in human prostate. *J Clin Invest*. 15 de febrero de 1997;99(4):618-27.
26. Richards RG, Hartman SM. Human dermal fibroblast cells express prolactin in vitro. *J Invest Dermatol*. junio de 1996;106(6):1250-5.
27. Cabrera-Reyes EA, Limón-Morales O, Rivero-Segura NA, Camacho-Arroyo I, Cerbón M. Prolactin function and putative expression in the brain. *Endocrine*. 1 de agosto de 2017;57(2):199-213.
28. Grattan DR. 60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: The hypothalamo-prolactin axis. *J Endocrinol*. agosto de 2015;226(2):T101-122.
29. Owerbach D, Rutter WJ, Cooke NE, Martial JA, Shows TB. The prolactin gene is located on chromosome 6 in humans. *Science*. 15 de mayo de 1981;212(4496):815-6.
30. Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly PA. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev*. junio de 1998;19(3):225-68.
31. Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev*. octubre de 2000;80(4):1523-631.
32. Marano RJ, Ben-Jonathan N. Minireview: Extrapituitary prolactin: an update on the distribution, regulation, and functions. *Mol Endocrinol*. mayo de 2014;28(5):622-33.

33. Abramicheva PA, Smirnova OV. Prolactin Receptor Isoforms as the Basis of Tissue-Specific Action of Prolactin in the Norm and Pathology. *Biochemistry Mosc.* abril de 2019;84(4):329-45.
34. Clapp C, Torner L, Gutierrez-Ospina G, Alcantara E, Lopez-Gomez FJ, Nagano M, et al. The prolactin gene is expressed in the hypothalamic-neurohypophyseal system and the protein is processed into a 14-kDa fragment with activity like 16-kDa prolactin. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 25 de octubre de 1994;91(22):10384-8.
35. Walsh RJ, Slaby FJ, Posner BI. A receptor-mediated mechanism for the transport of prolactin from blood to cerebrospinal fluid. *Endocrinology.* mayo de 1987;120(5):1846-50.
36. Brown RSE, Wyatt AK, Herbison RE, Knowles PJ, Ladyman SR, Binart N, et al. Prolactin transport into mouse brain is independent of prolactin receptor. *FASEB J.* febrero de 2016;30(2):1002-10.
37. Vermani B, Mukherjee S, Kumar G, Patnaik R. Prolactin attenuates global cerebral ischemic injury in rat model by conferring neuroprotection. *Brain Inj.* 15 de abril de 2020;34(5):685-93.
38. Tejadilla D, Cerbón M, Morales T. Prolactin reduces the damaging effects of excitotoxicity in the dorsal hippocampus of the female rat independently of ovarian hormones. *Neuroscience.* 1 de septiembre de 2010;169(3):1178-85.
39. Rivero-Segura NA, Flores-Soto E, García de la Cadena S, Coronado-Mares I, Gomez-Verjan JC, Ferreira DG, et al. Prolactin-induced neuroprotection against glutamate excitotoxicity is mediated by the reduction of [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> overload and NF-κB activation. *PLoS ONE.* 2017;12(5):e0176910.
40. Vergara-Castañeda E, Grattan DR, Pasantes-Morales H, Pérez-Domínguez M, Cabrera-Reyes EA, Morales T, et al. Prolactin mediates neuroprotection against excitotoxicity in primary cell cultures of hippocampal neurons via its receptor. *Brain Res.* 1 de abril de 2016;1636:193-9.
41. Rivero-Segura NA, Coronado-Mares MI, Rincón-Heredia R, Pérez-Torres I, Montiel T, Pavón N, et al. Prolactin prevents mitochondrial dysfunction induced by glutamate excitotoxicity in hippocampal neurons. *Neurosci Lett.* 14 de 2019;701:58-64.
42. Triebel J, Robles JP, Zamora M, Martínez de la Escalera G, Bertsch T, Clapp C. Regulator of Angiogenesis and Vascular Function: A 2019 Update of the Vasoinhibin Nomenclature. *Front Endocrinol (Lausanne)* [Internet]. 10 de abril de 2019 [citado 24 de junio de 2019];10. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6467929/>

43. Cruz-Soto ME, Cosío G, Jeziorski MC, Vargas-Barroso V, Aguilar MB, Cárabez A, et al. Cathepsin D Is the Primary Protease for the Generation of Adenohypophyseal Vasoinhibins: Cleavage Occurs within the Prolactin Secretory Granules. *Endocrinology*. diciembre de 2009;150(12):5446-54.
44. Green DR, Llambi F. Cell Death Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. diciembre de 2015 [citado 17 de febrero de 2020];7(12). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4665079/>
45. Clapp C, Martial JA, Guzman RC, Rentier-Delure F, Weiner RI. The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. *Endocrinology*. septiembre de 1993;133(3):1292-9.
46. Khurana S, Liby K, Buckley AR, Ben-Jonathan N. Proteolysis of human prolactin: resistance to cathepsin D and formation of a nonangiostatic, C-terminal 16K fragment by thrombin. *Endocrinology*. septiembre de 1999;140(9):4127-32.
47. Robles JP, Zamora M, Velasco-Bolom JL, Tovar M, Garduño-Juárez R, Bertsch T, et al. Vasoinhibin comprises a three-helix bundle and its antiangiogenic domain is located within the first 79 residues. *Sci Rep*. 20 de noviembre de 2018;8(1):17111.
48. Bajou K, Herkenne S, Thijssen VL, D'Amico S, Nguyen N-Q-N, Bouché A, et al. PAI-1 mediates the antiangiogenic and profibrinolytic effects of 16K prolactin. *Nat Med*. julio de 2014;20(7):741-7.
49. Morohoshi K, Mochinaga R, Watanabe T, Nakajima R, Harigaya T. 16 kDa vasoinhibin binds to integrin alpha5 beta1 on endothelial cells to induce apoptosis. *Endocrine Connections*. mayo de 2018;7(5):630-6.
50. Torner L, Toschi N, Pohlinger A, Landgraf R, Neumann ID. Anxiolytic and anti-stress effects of brain prolactin: improved efficacy of antisense targeting of the prolactin receptor by molecular modeling. *J Neurosci*. 1 de mayo de 2001;21(9):3207-14.
51. Fournier NM, Duman RS. Role of vascular endothelial growth factor in adult hippocampal neurogenesis: implications for the pathophysiology and treatment of depression. *Behav Brain Res*. 14 de febrero de 2012;227(2):440-9.
52. Torner L, Karg S, Blume A, Kandasamy M, Kuhn H-G, Winkler J, et al. Prolactin prevents chronic stress-induced decrease of adult hippocampal neurogenesis and promotes neuronal fate. *J Neurosci*. 11 de febrero de 2009;29(6):1826-33.
53. Brown ES, Rush AJ, McEwen BS. Hippocampal remodeling and damage by corticosteroids: implications for mood disorders. *Neuropsychopharmacology*. octubre de 1999;21(4):474-84.



54. Cha J, Greenberg T, Song I, Blair Simpson H, Posner J, Mujica-Parodi LR. Abnormal hippocampal structure and function in clinical anxiety and comorbid depression. *Hippocampus*. mayo de 2016;26(5):545-53.
55. Cole J, Costafreda SG, McGuffin P, Fu CHY. Hippocampal atrophy in first episode depression: a meta-analysis of magnetic resonance imaging studies. *J Affect Disord*. noviembre de 2011;134(1-3):483-7.
56. Sapolsky RM. The possibility of neurotoxicity in the hippocampus in major depression: a primer on neuron death. *Biol Psychiatry*. 15 de octubre de 2000;48(8):755-65.
57. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. agosto de 1972;26(4):239-57.
58. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. junio de 2007;35(4):495-516.
59. Kerr JFR. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology*. 27 de diciembre de 2002;181-182:471-4.
60. Kaczanowski S. Apoptosis: its origin, history, maintenance and the medical implications for cancer and aging. *Phys Biol*. 11 de 2016;13(3):031001.
61. Marchetti P, Castedo M, Susin SA, Zamzami N, Hirsch T, Macho A, et al. Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis. *J Exp Med*. 1 de septiembre de 1996;184(3):1155-60.
62. Peter ME, Heufelder AE, Hengartner MO. Advances in apoptosis research. *Proc Natl Acad Sci USA*. 25 de noviembre de 1997;94(24):12736-7.
63. Geng H-X, Li R-P, Li Y-G, Wang X-Q, Zhang L, Deng J-B, et al. 14,15-EET Suppresses Neuronal Apoptosis in Ischemia-Reperfusion Through the Mitochondrial Pathway. *Neurochem Res*. octubre de 2017;42(10):2841-9.
64. Hiramane C. [Definition and morphological features of apoptosis]. *Rinsho Byori*. mayo de 1997;45(5):459-69.
65. Buss RR, Sun W, Oppenheim RW. Adaptive roles of programmed cell death during nervous system development. *Annu Rev Neurosci*. 2006;29:1-35.
66. Benn SC, Woolf CJ. Adult neuron survival strategies--slamming on the brakes. *Nat Rev Neurosci*. septiembre de 2004;5(9):686-700.
67. Mattson MP. Neuronal life-and-death signaling, apoptosis, and neurodegenerative disorders. *Antioxid Redox Signal*. diciembre de 2006;8(11-12):1997-2006.

68. Maino B, Papparone S, Severini C, Ciotti MT, D'agata V, Calissano P, et al. Drug target identification at the crossroad of neuronal apoptosis and survival. *Expert Opin Drug Discov.* marzo de 2017;12(3):249-59.
69. Shamas-Din A, Kale J, Leber B, Andrews DW. Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1 de abril de 2013;5(4):a008714.
70. Mattson MP. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol.* noviembre de 2000;1(2):120-9.
71. Arifin WN, Zahiruddin WM. Sample Size Calculation in Animal Studies Using Resource Equation Approach. *Malays J Med Sci.* octubre de 2017;24(5):101-5.
72. Beaudoin Iii GMJ, Lee S-H, Singh D, Yuan Y, Ng Y-G, Reichardt LF, et al. Culturing pyramidal neurons from the early postnatal mouse hippocampus and cortex. *Nature Protocols.* septiembre de 2012;7(9):1741-54.
73. Galfione M, Luo W, Kim J, Hawke D, Kobayashi R, Clapp C, et al. Expression and purification of the angiogenesis inhibitor 16-kDa prolactin fragment from insect cells. *Protein Expression and Purification.* 1 de abril de 2003;28(2):252-8.
74. Dueñas Z, Torner L, Corbacho AM, Ochoa A, Gutiérrez-Ospina G, López-Barrera F, et al. Inhibition of Rat Corneal Angiogenesis by 16-kDa Prolactin and by Endogenous Prolactin-like Molecules. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1 de octubre de 1999;40(11):2498-505.
75. Adán N, Guzmán-Morales J, Ledesma-Colunga MG, Perales-Canales SI, Quintanar-Stéphano A, López-Barrera F, et al. Prolactin promotes cartilage survival and attenuates inflammation in inflammatory arthritis. *J Clin Invest.* 3 de septiembre de 2013;123(9):3902-13.
76. Arnold E, Thébault S, Aroña RM, Martínez de la Escalera G, Clapp C. Prolactin mitigates deficiencies of retinal function associated with aging. *Neurobiology of Aging.* enero de 2020;85:38-48.
77. de Moura AC, Lazzari VM, Becker RO, Gil MS, Ruthschilling CA, Agnes G, et al. Gene expression in the CNS of lactating rats with different patterns of maternal behavior. *Neuroscience Research.* 1 de octubre de 2015;99:8-15.
78. Fricker M, Tolkovsky AM, Borutaite V, Coleman M, Brown GC. Neuronal Cell Death. *Physiol Rev.* 01 de 2018;98(2):813-80.
79. Uo T, Kinoshita Y, Morrison RS. Neurons exclusively express N-Bak, a BH3 domain-only Bak isoform that promotes neuronal apoptosis. *J Biol Chem.* 11 de marzo de 2005;280(10):9065-73.

80. Hao T, Rockwell P. Signaling through the vascular endothelial growth factor receptor VEGFR-2 protects hippocampal neurons from mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*. octubre de 2013;63:421-31.
81. Akhtar RS, Ness JM, Roth KA. Bcl-2 family regulation of neuronal development and neurodegeneration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 1 de marzo de 2004;1644(2):189-203.
82. Kudo W, Lee H-P, Smith MA, Zhu X, Matsuyama S, Lee H-G. Inhibition of Bax protects neuronal cells from oligomeric A $\beta$  neurotoxicity. *Cell Death Dis*. 17 de mayo de 2012;3:e309.
83. Oppenheim RW. Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci*. 1991;14:453-501.
84. Ben-Jonathan N, Mershon JL, Allen DL, Steinmetz RW. Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocr Rev*. diciembre de 1996;17(6):639-69.
85. Torner L. Actions of Prolactin in the Brain: From Physiological Adaptations to Stress and Neurogenesis to Psychopathology. *Front Endocrinol [Internet]*. 30 de marzo de 2016 [citado 24 de mayo de 2019];7. Disponible en: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fendo.2016.00025/abstract>
86. Carretero J, Sánchez-Robledo V, Carretero-Hernández M, Catalano-Iniesta L, García-Barrado MJ, Iglesias-Osma MC, et al. Prolactin system in the hippocampus. *Cell Tissue Res*. enero de 2019;375(1):193-9.
87. Furigo IC, Ramos-Lobo AM, Frazão R, Donato J. Brain STAT5 signaling and behavioral control. *Mol Cell Endocrinol*. 15 de 2016;438:70-6.
88. Struman I, Bentzien F, Lee H, Mainfroid V, D'Angelo G, Goffin V, et al. Opposing actions of intact and N-terminal fragments of the human prolactin/growth hormone family members on angiogenesis: an efficient mechanism for the regulation of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 16 de febrero de 1999;96(4):1246-51.
89. Triebel J, Bertsch T, Bollheimer C, Rios-Barrera D, Pearce CF, Hübner M, et al. Principles of the prolactin/vasoinhibin axis. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 15 de noviembre de 2015;309(10):R1193-203.