



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE PSICOLOGÍA

**“EFECTO DE LA PROLACTINA SOBRE EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN
CREB EN CULTIVOS PRIMARIOS DE NEURONAS HIPOCAMPALES ANTE
ESTRÉS EXCITOTOXICO”**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN PSICOLOGÍA

P R E S E N T A:
VALERIA RODRÍGUEZ CHÁVEZ

DIRECTOR : DR. MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES

REVISOR : DR. JAIME EDUARDO CALIXTO GONZALEZ

SINODALES : DR. ANTONIO PAULINO ZAINOS ROSALES

DR. HUGO SÁNCHEZ CASTILLO

DR. GABRIEL GUTIERREZ OSPINA



Ciudad Universitaria, CD.MX., 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

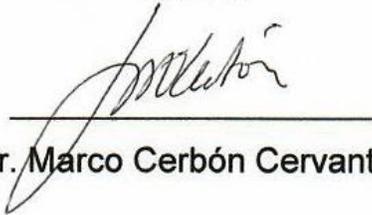
AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

La presente tesis de licenciatura se realizó en la Unidad de Investigación en Reproducción humana, Instituto Nacional de Perinatología, Facultad de Química, UNAM bajo la supervisión del Dr. Marco Cerbón Cervantes y la asesoría técnica de C. a Dra. Nadia Alejandra Rivero Segura.

Adicionalmente, agradezco a la Dra. Karina Jiménez Durán del Laboratorio de Microscopía Confocal de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAII) por su apoyo técnico durante las sesiones de microscopía confocal.

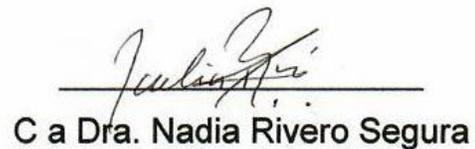
El presente proyecto fue financiado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-UNAM: IN216817) y el Programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado (PAIP-UNAM: S000-9108).

Asesor



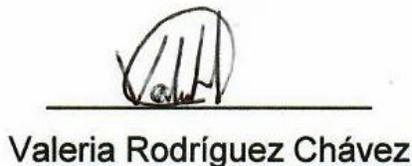
Dr. Marco Cerbón Cervantes

Asesor Técnico



C a Dra. Nadia Rivero Segura

Sustentante



Valeria Rodríguez Chávez

AGRADECIMIENTOS

A mis padres María Inés Chávez y Sergio Rodríguez quienes siempre han estado conmigo, sobre todo soportando mi forma de ser, que es tan distinta a la de ellos, me han brindado todo su amor, tiempo, comprensión, confianza y paciencia. Lo que me ha dado las bases para ser quien soy, apoyando cada decisión en mi vida y enseñándome a enfrentar las consecuencias de mis actos. Me han mostrado que siempre hay una salida y no se acaba el mundo por cualquier cosa. Además confían en que cumpliré todas mis metas.

A mi familia, que donde quiera que esté, sé que me está apoyando y me cuidan con el mismo cariño que en la tierra, mi abuelita Margarita, tía Juanita y mi abuelita Antonia.

A mis tíos, quienes me han brindado su tiempo y cariño, solo con escucharme sé que cuento con ustedes de forma incondicional, tío Juan que más bien eres mi abuelo, tío Migue, Chayo, tío Fer, tía Paty, tía Conchita y Lidia, han sido parte fundamental de mi vida, con todos he compartido logros y uno que otro mal momento.

A Isra y Gimbo, sigo su ejemplo y espero ser una motivación para: Viví, Nela, Diego y Arantza, es solo cuestión de perseverancia para lograr las metas propuestas.

A mis cómplices de vida, con cada uno he vivido cosas distintas y en tiempos distintos, pero todos ustedes han sido lo mejor que me pudo haber pasado y me sorprende lo diferentes que somos, pero no veo mi vida sin ustedes: Lore, Alyn, Humberto, Yunuen, Ana Karen y Yeni.

A las personas que han sido vitales en mi formación académica y titulación, que no han permitido que yo renuncie y deje todo a la deriva. Wendy gracias por tu tiempo y siempre estar ahí para escucharme, Omar por no dejarme sola cuando más lo necesitaba y creer en mí, Nadia por arriesgaste con una psicóloga, brindarme tu apoyo, comprensión y paciencia, con los tres comencé con una relación de compañeros de trabajo y acabe teniendo tres amigos incondicionales a los cuales les debo que haya logrado esta meta.

A todos los chicos del laboratorio 206, que me recibieron de la mejor forma y me integraron a su grupo, dándome su apoyo, comprendiendo que mi formación era distinta.

Agradezco al Dr. Marco Antonio Cerbón por permitirme estar en su laboratorio, confiando en mí sin conocerme y dándome todo el apoyo para concluir mi formación académica.

INDICE

I.	INTRODUCCIÓN	11
	a. Trastornos neurodegenerativos	11
	b. Excitotoxicidad	12
	c. Síntesis y efectos fisiológicos de la prolactina	12
	d. Receptores de prolactina (PRLRs)	14
	e. Vías de señalización inducidas por PRL	15
	f. Efectos de la PRL sobre el SNC	16
	g. Efecto de la PRL en el hipocampo durante el embarazo	17
	h. Neuroprotección en la lactancia	17
	i. Mecanismos moleculares de activación de CREB	21
	j. Genes asociados a CREB	22
II.	JUSTIFICACIÓN	23
III.	OBJETIVOS	24
	a. Objetivo General	24
	b. Objetivos Particulares	24
IV.	HIPÓTESIS	24
V.	VARIABLES DE TRABAJO	24
	a. Variable independiente	24
	b. Variable dependiente	25
	c. Variable no controladas:	25
VI.	MATERIAL Y MÉTODOS	26
	a. Cultivo primario de neuronas hipocampales de rata	26
	❖ Material para el cultivo celular	26
	❖ Técnica de cultivo celular	26
	❖ Tratamientos con glutamato y prolactina del cultivo celular	27
	b. Inmunocitoquímica de fluorescencia de cultivos primarios de hipocampo de rata	28
	❖ Material y reactivos para inmunocitoquímica	28
	❖ Técnica de inmunocitoquímica de fluorescencia	29

c.	Extracción y cuantificación de proteína de cultivos primarios de neuronas hipocampales de rata	29
❖	Material y reactivos para extracción	29
❖	Extracción de proteína.	30
❖	Cuantificación de proteínas totales	30
d.	Análisis de la expresión de proteica por la técnica de Western blot de cultivos primarios de hipocampo	30
❖	Material y reactivos para Western blot	30
❖	Procedimiento de la técnica Western blot	31
e.	Análisis estadístico	32
VII.	RESULTADOS	33
a.	La PRL no modifica la activación de CREB en los cultivos primarios de neuronas de hipocampo	33
b.	La PRL no modifica la expresión de la proteína de BDNF en los cultivos primarios de neuronas de hipocampo	35
c.	La PRL sobre activa la expresión de la proteína Bcl-2 en los cultivos primarios de neuronas de hipocampo	36
VIII.	DISCUSIÓN	37
IX.	CONCLUSIONES	41
X.	PERSPECTIVAS	42
XI.	REFERENCIAS	43

ABREVIATURAS

AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico
AK	Ácido kaínico
α	Alfa
AE	Aminoácidos excitatorios
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ANOVA	Análisis de varianza
AraC	Arabinocido de citosina
β	Beta
βA	Beta amiloide
cat.	Catálogo
°C	Centígrado
CTRL	Control
KCl	Cloruro de potasio
NaCl	Cloruro de sodio
EGR-1	Crecimiento temprano respuesta 1
EHHA	Eje Hipotalámico Hipofisario Adrenal
CREB	Elemento de respuesta AMPc factor de transcripción de unión a proteína
EA	Enfermedad de Alzheimer
EH	Enfermedad de Huntington
EP	Enfermedad de Parkinson
ELA	Esclerosis lateral amiotrofica
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
Fig	Figura
KH_2PO_4	Fosfato de potasio monobásico
PI3K	Fosfoinosítido cinasa 3
c-Fos	Fos proto-oncogén
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
g	Gramo
Glu	Glutamato

h	Horas
ICV	Intracerebral
JAK2	Janus cinasa 2
KDa	Kilodalton
TUNEL	Marcado de final de corte de dUTP de Terminal deoxinucleotidil transferasa
µg	Microgramo
µl	Microlitro
µM	Micromolar
mg	Miligramo
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
min	Minuto
ng	Nanogramo
NMDA	N-metil-D-aspartato
PFA	Paraformaldehído
PRL	Prolactina
PKA	Proteína cinasa A
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno
AKR	Receptor de Ácido kaínico
PRLRs	Receptores de prolactina
mGluR	Receptor metabotrópico de glutamato
RMN	Resonancia magnética nuclear
rpm	Revolución por minuto
SNC	Sistema nervioso central
MEIS1	Sitio de integración viral ecotrópico mieloide 1
STAT	Transductor de señal y activador de la transcripción
TN	Trastornos neurodegenerativos
USAI	Unidad de Servicios de Apoyo la Investigación y a la Industria (USAI)

RESUMEN

Las enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por la pérdida progresiva de las neuronas en áreas cerebrales específicas. Debido a que la capacidad para producir nuevas neuronas del sistema nervioso central (SNC) adulto es limitada, se requiere de alternativas que proporcionen neuroprotección en el SNC. Estudios realizados durante el embarazo y la lactancia *in vivo e in vitro*, han reportado que la hormona peptídica prolactina (PRL), es capaz de inducir neuroprotección ante el estrés excitotóxico en el SNC. Sin embargo, en la actualidad la información acerca de la regulación ejercida por la PRL sobre factores de transcripción implicados en la neuroprotección no se ha descrito completamente. Por ello, el presente proyecto se enfocó en describir el efecto de la PRL sobre el factor de transcripción CREB (elemento de respuesta a AMPc). Se emplearon cultivos primarios de neuronas hipocampales obtenidos de embriones de rata, los cultivos fueron divididos en cuatro tratamientos: Control (CTRL, solución salina), PRL (10 ng/ml), glutamato (Glu, 100 μ M) y PRL (10 ng/ml)+Glu (100 μ M) y se evaluó por medio de diversas técnicas de biología molecular: la translocación nuclear del factor transcripcional CREB por inmunocitoquímica de fluorescencia, la expresión de CREB total y su forma fosforilada p-CREB por Western Blot, asimismo, se evaluó la expresión de proteínas río abajo, de la vía asociada con la activación de CREB, BDNF y Bcl-2. De acuerdo con los resultados, observamos que la relación p-CREB/CREB, evaluada por Western Blot, no muestra cambios estadísticamente significativos entre los tratamientos. De igual forma también observamos, por inmunocitoquímica de fluorescencia que el tratamiento con PRL (10 ng/ml durante 72h) no induce la translocación al núcleo del factor de transcripción CREB. Concomitantemente, evaluamos la expresión proteica de BDNF y Bcl-2, ambas blancos directos de CREB. Los resultados sobre la expresión proteica de BDNF mostraron que el tratamiento con PRL, no modifica el contenido de ésta proteína, sin embargo en el tratamiento con Glu, el contenido disminuye significativamente con respecto al control. No obstante, la expresión de Bcl-2 en neuronas tratadas con PRL aumenta significativamente con respecto al control. En conjunto, nuestros resultados sugieren que PRL 10 ng/ml durante 72h, no induce la activación del

factor transcripcional CREB. Esto sugiere que PRL induce neuroprotección a través de otros mecanismos moleculares. Finalmente, con los resultados obtenidos el proyecto contribuirá al desarrollo de nuevas alternativas de neuroprotección ante el estrés excitotóxico.

I INTRODUCCIÓN

a. *Trastornos neurodegenerativos*

En la actualidad, el incremento en la esperanza de vida observado en los países industrializados ha sido acompañado de una marcada prevalencia de trastornos neurodegenerativos (TN) (Dong et al., 2009), los cuales están asociados con numerosas manifestaciones clínicas que tienen un importante impacto en la calidad de vida de los pacientes (Chekani et al., 2015).

Los TN pertenecen a un grupo heterogéneo de enfermedades con distintos fenotipos clínicos y etiologías genéticas (Dong et al., 2009). Principalmente, se caracterizan por la pérdida gradual de poblaciones específicas de células neuronales y por la disfunción de proteínas tales como la Beta amiloide (β A) en la enfermedad de Alzheimer (EA), la Alfa-sinucleína (α -sinucleína) en la enfermedad de Parkinson (EP) y la SOD1 en la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) (Barnham et al., 2004; Chekani et al., 2016). Además, dentro de los TN más comunes en México, destacan la EA y la EP (Casamitjana et al., 2007; Weiner, 2010), mientras que en el resto mundo se incluyen también a la enfermedad de Huntington (EH) y la ELA dentro de los TN más frecuentes (Barnham et al., 2004; Dong et al., 2009).

El conocimiento de los mecanismos involucrados en el proceso neurodegenerativo y muerte celular es relevante para definir posibles blancos terapéuticos para los diversos trastornos (Hernández et al., 2015). Para evaluar este proceso se han empleado modelos *in vivo* e *in vitro*, que reproducen los principales procesos celulares de los TN agudos y crónicos (Choi, 1992; Hergovich et al., 2001; Hernandez et al., 2015).

En los últimos años, la investigación ha mostrado que los aminoácidos excitadores (AE) actúan como los principales neurotransmisores en la corteza cerebral y el hipocampo. Sin embargo, la constante estimulación del sistema de AE es perjudicial para el sistema nervioso central (SNC), ya que evidencia sustancial señala a la excitotoxicidad como un mecanismo fundamental involucrado en la degeneración neuronal (Choi, 1992; Dong et al., 2009).

b. Excitotoxicidad

La excitotoxicidad está implicada en múltiples afecciones neurológicas, incluyendo la epilepsia, los accidentes cerebrovasculares, así como en los TN (Dong et al., 2009).

El término excitotoxicidad fue utilizado originalmente por Olney et al., (1986) para referirse a la capacidad del glutamato (Glu) para destruir neuronas (Choi, 1992). Sin embargo, en la actualidad este término se refiere generalmente a la lesión y muerte de las neuronas, derivada de la exposición prolongada a Glu, neurotransmisores y aminoácidos excitadores (Dong et al., 2009; Hergovich et al., 2001). Dicha exposición induce la sobreactivación de los receptores neuronales glutamatérgicos, tales como: receptor del ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (AMPA), receptor de N-metil-D-aspartato (NMDAR) y ácido kaínico (AKR) (Hergovich et al., 2001; Mark et al., 2001). Su sobreactivación produce un incremento en la concentración intracelular de calcio que a su vez induce la activación de enzimas encargadas de la degradación de proteínas, membranas y ácidos nucleicos (Dong et al., 2009; Mark et al., 2001).

En éste sentido se ha reportado ampliamente que el Glu y el AK, son capaces de inducir muerte celular por apoptosis y necrosis en ambos modelos, *in vivo* e *in vitro* (Fujikawa et al. 2000; Vanoye et al., 2008). Respecto a la muerte por apoptosis inducida por ambos compuestos, se han reportado cambios en la expresión génica de la familia Bcl-2 (Rivero et al., 2017; Vanoye et al., 2008), la liberación de citocromo C de las mitocondrias y la activación de varios tipos de caspasas, tales como son caspasa -2, -3, -6, y -12 (Djebaïli et al., 2001; Rivero et al., 2017).

c. Síntesis y efectos fisiológicos de la prolactina

La prolactina (PRL) (Fig.1) pertenece a una familia de hormonas peptídicas que incluyen a la hormona del crecimiento y el lactógeno placentario (Walker et al., 2012). La PRL se caracteriza por ser una hormona sintetizada en el lóbulo anterior de la hipófisis, por células especializadas denominadas lactotropos, células que constituyen entre el 20-50% de las células de la hipófisis anterior (Ignacak et al., 2012; Méndez et al., 2005; Morales, 2011). Sin embargo, en otras células, tales

como linfocitos, fibroblastos de la piel, células de la próstata y células del tejido adiposo, se ha reportado la síntesis extrahipofisiaria de ésta hormona (Ignacak et al., 2012). No obstante, aunque la PRL extrahipofisiaria es idéntica en estructura a la de la hipófisis, se transcribe a partir de un promotor río arriba alternativo (Reem et al., 1999).

La principal función de la PRL es estimular la secreción de leche a través de la glándula mamaria, aunque también, se ha descrito que la PRL tiene acciones pleiotrópicas sobre la osmorregulación, el metabolismo y la regulación del sistema inmune adaptativo y del SNC (Ignacak et al., 2012; Morales, 2011; Nira et al., 2008). Asimismo, la influencia de la PRL en la reparación del SNC se ha discutido recientemente (Ignacak et al., 2012).

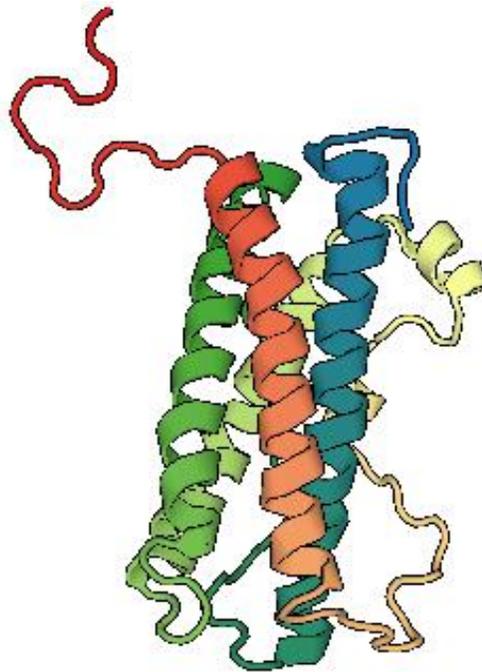


Fig. 1 Estructura en 3D de la prolactina humana determinada por espectroscopia de RMN (1RW5.pdb). Cuatro α -hélices conforman la proteína de la PRL (en colores). Obtenida del Protein Data Bank utilizando el software en línea VP (WebGL).

d. Receptores de prolactina (PRLRs)

Las acciones de la PRL son mediadas por los PRLRs (Fig. 2), los cuales son proteínas de membrana pertenecientes a la clase 1 de la superfamilia hematopoyetina de receptores de las citocinas (Torner et al., 2002; Vergara et al., 2016). Los receptores de este tipo son proteínas transmembranales de paso único que carecen de actividad de tirosina cinasa intrínseca y pueden ser fosforilados por las proteínas citoplasmáticas (Méndez et al., 2005; Nira et al., 2008). Los PRLRs, se componen de tres dominios: extracelular, transmembranal e intracelular (Freeman et al., 2000). Se han descritos tres principales isoformas transmenbranales de los PRLRs, la forma larga, la intermedia y la corta, las cuales sólo difieren en la longitud y la composición del dominio citoplásmico, (Ignacak et al., 2012; Torner et al, 2002). Los PRLRs se expresan en diversos tejidos, incluyendo la glándula mamaria, las gónadas, el hígado, el riñón, la glándula suprarrenal, el cerebro, el corazón, los pulmones, la glándula pituitaria, el útero, el músculo esquelético, la piel y las células del sistema inmune (Ignacak et al., 2012; Vergara et al., 2016).

Actualmente, también se ha reportado una isoforma soluble para este receptor, de la cual no se tienen reportes sobre sus funciones (Ignacak et al., 2012).

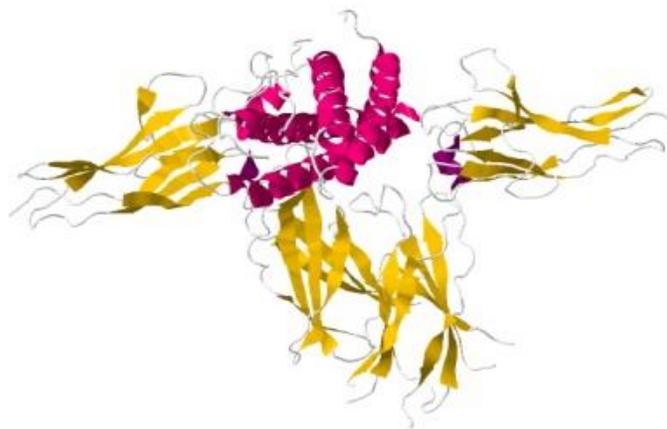


Fig. 2 Estructura 3D del receptor de prolactina por difracción de rayos X (3NPZ.pdb). Unión entre la PRL (rosa) y su receptor (amarillo) .Obtenida del Protein Data Bank utilizando el software en línea VP (WebGL).

e. Vías de señalización inducidas por PRL

La activación de los receptores de PRL inducida por su ligando, conlleva a su dimerización, después de ser fosforiladas, pueden formar homodímeros o heterodímeros (Ignacak et al., 2012; Nira et al., 2008). La formación de homodímeros de la isoforma larga conduce a la transducción de señales a través de la fosforilación de una tirosina cinasa, Janus cinasa 2 (JAK2) (Torner et al., 2002). La señalización a partir de Jak2, transductor de señal y activador de la transcripción STAT, que está constitutivamente asociado con el PRLR, se activa rápidamente después de la dimerización del receptor y fosforilación de los residuos de tirosina en el PRLR (Nira et al., 2008). Los dímeros STAT se translocan al núcleo, donde regulan la expresión de numerosos genes como β -caseína, β -lactoglobulina, proteína ácida de suero, factor regulador-1 de interferón. Asimismo, las tirosinas fosforiladas pueden servir como sitios de acoplamiento para las proteínas adaptadoras (Shc / Grb2 / SOS) que unen el receptor a la cascada de proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) (Ignacak et al., 2012; Nira et al., 2008).

La señalización Jak-Stat es la mejor caracterizada de las vías que la PRL activa (Fig. 3), sin embargo, también se ha descrito la activación de la proteína cinasa activada por MAPK y la fosfoinosítido cinasa 3 (PI3K). La activación de estas cascadas resultan en los puntos finales tales como la diferenciación, proliferación, supervivencia y la secreción (Nira et al., 2008).

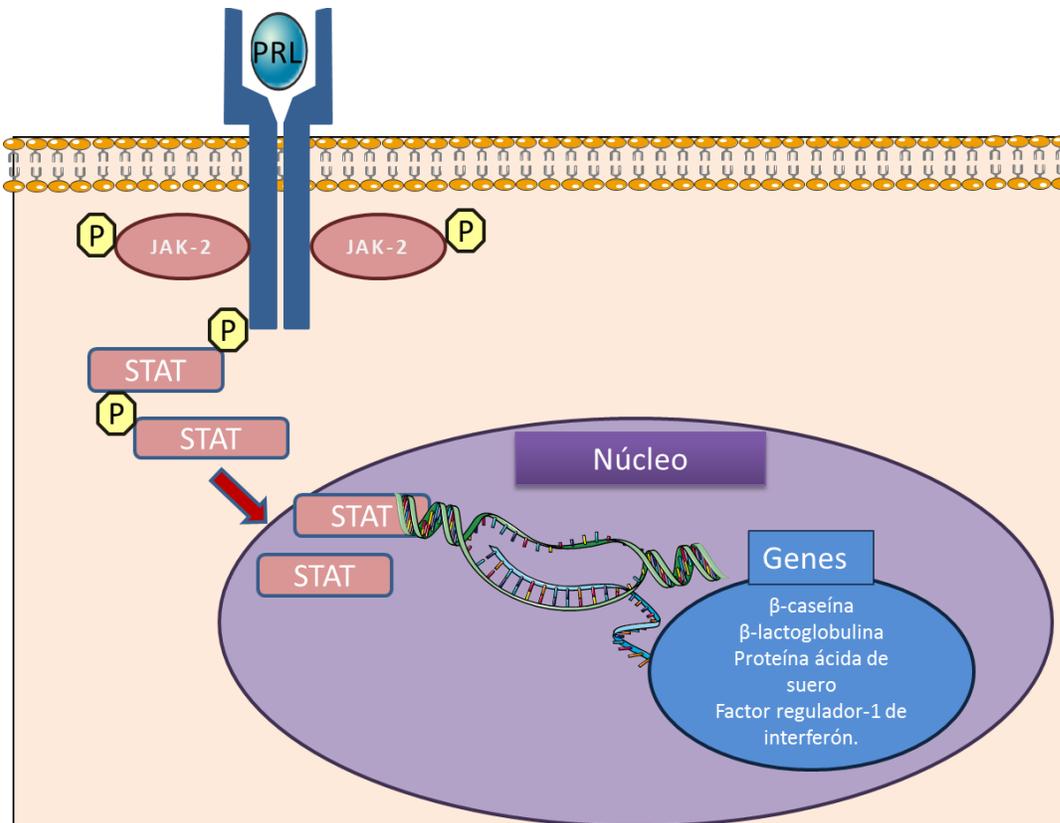


Fig. 3 Vía canónica de señalización inducida por prolactina y sus receptores. Los receptores de PRL acoplados a su ligando natural (PRL) inducen la activación de la vía JAK-STAT. Modificado de Ignacak et al. (2012).

f. Efectos de la PRL sobre el SNC

La PRL, ha sido recientemente identificada como un neuropéptido del cerebro (Cabrera et al., 2017; Torner et al., 2009) debido a que se han observado neuronas sintetizadoras, inmunoreactividad y sitios de unión a PRL en varias regiones del cerebro (Cabrera et al., 2017; Torner et al., 2002), no obstante, aún no está completamente caracterizada, como para distinguirla de la hipófisis anterior (Torner et al., 2002). Además, numerosos estudios sobre la localización, producción de PRL y sus receptores en el cerebro se han restringido a las mujeres, en parte debido a la participación significativa de la prolactina en las funciones reproductivas.

g. Efecto de la PRL en el hipocampo durante el embarazo

Durante el embarazo ocurren cambios hormonales que desempeñan un papel crítico en la alteración de los sistemas fisiológicos y neuroendocrinos maternos para facilitar el desarrollo fetal y preparar a la madre para el parto y la lactancia. Dentro de estos cambios se encuentra la creciente secreción de estrógenos que estimula el crecimiento y la proliferación de los lactótrofos; como resultado, la secreción de PRL aumenta. En mujeres embarazadas la glándula hipofisaria duplica su tamaño, y la PRL segregada prepara la glándula mamaria para la lactancia posparto (Ignacak et al., 2012). En este sentido se ha reportado que durante el embarazo y la lactancia, las concentraciones de PRL aumentan hasta 6 veces en el flujo sanguíneo (Freeman et al., 2000). Múltiples estudios realizados en ratas al final de embarazo, han documentado la existencia de neuroplasticidad en el hipocampo, aumentando la cantidad de espinas dendríticas, induciendo neurogénesis del bulbo olfatorio (Torner et al., 2009) y mejorando significativamente el aprendizaje y la memoria dependiente de esta estructura (Morales, 2011). Por otro lado, en el período de periparto, que comienza en la mitad del embarazo y continúa durante la lactancia, se han reportado diversos cambios endocrinos y conductuales. Dentro de ellos se han observado patrones en el comportamiento materno asociados con acicalamiento y protección de las crías (Nira et al., 2008), la cognición, la estabilidad postural, control de la motricidad fina, alteración del estado de ánimo (Wise et al., 2001) y la reducción de la ansiedad (Torner et al., 2002). Con respecto a los mecanismos neuronales de estas adaptaciones se ha descrito el papel regulador de hormonas peptídicas como: PRL y oxitocina, sobre el eje Hipotalámico Hipofisario Adrenal (EHHA) (Morales, 2011; Nira et al., 2008; Torner et al., 2009).

h. Neuroprotección en la lactancia

La lactancia se asocia con un aumento en los niveles de PRL, oxitocina, progesterona y glucocorticoides, no obstante, recientes estudios indican que la pronunciada fluctuación de hormonas durante la lactancia, puede tener un papel en la neuroprotección del hipocampo materno (Tejadilla et al., 2010).

Diversas evidencias muestran que una de las acciones de la PRL sobre el SNC, es la neuroprotección ante el estrés excitotóxico inducido por AK y Glu. De forma general, se ha sugerido que los mecanismos propuestos para la acción neuroprotectora de PRL incluyen cambios en la neurotransmisión, efectos anti-apoptóticos y la regulación de factores neurotróficos, entre otros (Morales, 2011; Tejadilla et al., 2010). Sin embargo, recientes estudios han demostrado en un modelo *in vitro* que la neuroprotección inducida por PRL ante el estrés excitotóxico está asociada a la activación de los PRLRs expresados en estas neuronas (Vergara et al., 2016). Además en este mismo modelo se ha demostrado que la activación de los PRLRs induce la subsecuente sobreexpresión de Bcl-2, proteína implicada en la supresión de la apoptosis (Rivero et al., 2017), asimismo, utilizando el mismo modelo fue evaluada la viabilidad celular usando un ensayo de MTT (Vergara et al., 2016) y de igual forma, Rivero et al (2017) evaluó el efecto de Glu por un marcado de final de corte de dUTP de terminal deoxinucleotidil transferasa (TUNEL, por sus siglas en inglés) y ensayo de Ltd demostrando que la PRL reduce el componente apoptótico.

De la misma forma, Vanoye et al. (2008) en un estudio *in vivo* demostró que Bcl-2 inhibe el daño celular inducido por AK en CA1 en el hipocampo, corteza cerebral y corteza piriforme en un modelo de rata lactante. Sin embargo, la capacidad neuroprotectora desplegada por PRL varía dependiendo del área del hipocampo y del estado fisiológico del animal, siendo el área CA3 del hipocampo de las ratas lactantes la más sensible al daño excitotóxico (Tejadilla et al 2010).

A continuación, se presenta dos tablas en donde se resumen los efectos inducidos por PRL sobre el SNC:

Tabla 1. Efecto de la PRL en el SNC en modelos in vivo

Diseño experimental	Efecto	Referencia
Tratamiento crónico de la PRL (5 días), sobre los parámetros de estrés conductual (laberinto elevado en cruz) y neuronal en ratas núbiles.	Estado de hiperprolactinemia resulta en la reducción de la activación neuronal dentro del hipotálamo, en respuesta a un factor de estrés agudo.	(Donner et al., 2007)
Comparación del daño celular inducido 24 h después de una sola administración sistémica de AK en las regiones CA1, CA3 y CA4 del hipocampo de ratas en la última semana de lactancia y la fase de diestro.	Efectos neuroprotectores de la lactancia contra el daño excitotóxico de AK en el hipocampo dorsal de la rata.	(Vanoye et al., 2008)
Daño inducido por AK intracerebral (ICV) en el hipocampo (CA1, CA2 y CA3) de ratas núbiles y lactantes 24 o 72 h después de ICV.	El AK induce menos daño en el cerebro de la rata lactante que en la rata en diestro.	(Cabrera et al., 2009)
Administración periférica repetida de PRL a ratones adultos (6 semanas) durante las primeras 2 semanas de estrés crónico (restricción de 4 h durante 21 días).	La PRL protege la neurogénesis en el giro dentado de ratones con estrés crónico y promueve el destino neural.	(Torner et al., 2009)

Tratamiento con PRL durante 4 días, daño celular inducido por AK en las zonas CA1, CA3 y CA4 del hipocampo de ratas hembra intactas y ovariectomizadas (OVX).	PRL sistémica tiene efectos preventivos contra el daño excitotóxico del hipocampo de las ratas y estos efectos son independientes de las hormonas ováricas.	(Tejadilla, Cerbón, & Morales, 2010)
---	---	--------------------------------------

Tabla 2. Efecto de la PRL en modelos *in vitro*

Cultivo	Efecto	Referencia
Neuroesferas de ratón de 14 días de gestación y 2 días posnatal.	PRL exógena estimula las células precursoras del hipocampo.	(Walker et al., 2012)
Cultivo primario de neuronas de hipocampo de rata.	PRL ejerce efectos neuroprotectores contra la excitotoxicidad, mediados por su receptor.	(Vergara et al., 2016)
Cultivo primario de neuronas de hipocampo de rata.	La activación de los PRLs induce la subsecuente sobre expresión de Bcl-2.	(Rivero et al., 2017)

i. Mecanismos moleculares de activación de CREB

Existen numerosas líneas de evidencia que indican que el adenosina monofosfato cíclico (AMPc) es un regulador positivo de la proliferación de lactotrofos hipofisario y media la acción de las hormonas hipotalámicas sobre la proliferación, a través de la regulación mediada por la proteína cinasa A (PKA), los factores de crecimiento hipofisario intrínsecos y su cascada de cinasas de señalización, la MAPK, son otros reguladores importantes de la proliferación de lactotrofos. Sin embargo el papel del factor de transcripción proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc (CREB) en la regulación de las funciones de los lactotrofos es desconocido (Ishida et al., 2007).

En el SNC, CREB es uno de los factores de transcripción temprana, se expresa en casi todas las células del cerebro, además, su activación está asociada a su fosforilación inducida por el incremento de AMPc. Por otro lado la fosforilación de CREB afecta a la expresión de numerosos genes neuronales y proteínas asociados principalmente al aprendizaje y memoria dependiente de hipocampo (Li et al., 2015; Lopez de Armentia et al., 2007; Wang et al., 2016). Sin embargo, a pesar de la evidencia de la capacidad de CREB para modular la excitabilidad neuronal, el mecanismo de cómo se produce este es aún desconocido (Yu et al., 2016).

CREB es una proteína de 43 KDa, que se activa a través de la fosforilación en la serina 133 en respuesta a una variedad de señales de estrés celular (Ishida et al., 2007; Xia et al., 2016), además está implicado en la activación de la proteína cinasa 2 activada por MAPK, las cinasas dependientes de calcio / calmodulina y la proteína cinasa B / Akt. Debido a que múltiples vías de señalización conducen a la fosforilación de CREB, se sugiere que CREB es una molécula convergente para regular funciones celulares esenciales tales como proliferación, diferenciación y supervivencia celular (Ishida et al., 2007).

j. *Genes asociados a CREB*

Como se ha mencionado anteriormente CREB está asociado con múltiples funciones celulares, incluyendo la proliferación celular, la supervivencia, la apoptosis, la diferenciación, el metabolismo, la hematopoyesis, la respuesta inmune y la actividad neuronal, a través de la inducción de la transcripción de genes, tales como c-Fos, sitio de integración viral ecotrópico mieloide 1 (MEIS1, por sus siglas en ingles), ciclinas, el crecimiento temprano respuesta 1 (EGR-1) , BDNF y Bcl-2 (Xia et al., 2016).

Las proteínas Bcl-2 y BDNF son relevantes, debido a que las proteínas de la familia Bcl-2 son los principales reguladores del proceso apoptótico (Gross et al., 2017) y en estudios *in vivo* e *in vitro* se ha visto que la PRL induce su sobreexpresión de la proteína en neuronas del hipocampo (Rivero et al., 2017; Vanoye et al., 2008). De la misma forma, se ha demostrado que el BDNF promueve la supervivencia de neuronas hipocampales cultivadas bajo condiciones excitotóxicas, donde la muerte celular se produce por apoptosis (Almeida et al., 2005).

Sin embargo, se desconoce el efecto de PRL sobre CREB en el SNC (Fig. 4).

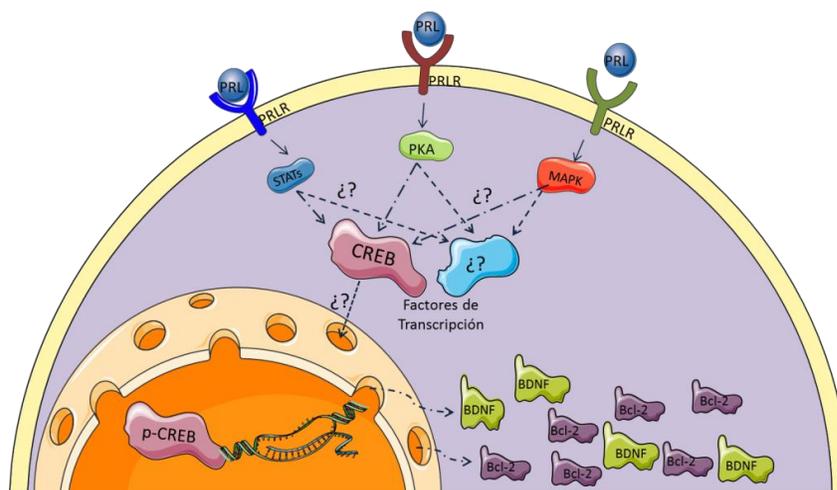


Fig. 4 Mecanismo molecular sugerido implicado en el efecto de la PRL sobre el factor transcripción CREB en cultivos primarios de neuronas hipocampales. Modificado de Rivero et al.(2017)

II. JUSTIFICACIÓN

El conocimiento de los mecanismos involucrados en el proceso neurodegenerativo y muerte celular es relevante para definir posibles blancos terapéuticos (Hernández et al., 2015). Por ello, se han empleado modelos *in vivo* e *in vitro*, que reproducen las principales características de los TN (Choi, 1992; Hergovich et al., 2001; Hernandez et al., 2015) los cuales han contribuido significativamente en el establecimiento de posibles nuevos tratamientos contra estas enfermedades. Sin embargo, escasos son los estudios que han demostrado tener éxito en la clínica.

De acuerdo con la literatura, se ha demostrado que el estrés excitotóxico, característico de los TN, conduce a la muerte neuronal a través de ambas vías, necrosis y apoptosis (Almeida et al., 2005; Ankarcrona et al., 1995; Fujikawa et al., 2000; Mehta et al., 2013; Nakai et al., 2000; Wang et al., 2008). Por otro lado, se ha reportado que la PRL, induce efectos sobre el SNC destacando el efecto neuroprotector ante el estrés excitotóxico (Rivero et al., 2017; Tejadilla et al., 2010; Torner et al., 2002; Vanoye et al., 2008; Vergara et al., 2016). Sin embargo, los mecanismos moleculares implicados en el efecto de la PRL para contrarrestar el daño por estrés excitotóxico, no se han descrito completamente. Con base en lo anterior, el presente estudio está enfocado en describir el efecto de la PRL sobre el factor transcripcional CREB y sus proteínas blanco, principalmente asociadas con sobrevivencia celular, en cultivos primarios de células hipocampales expuesta ante el estrés excitotóxico.

III. OBJETIVOS

a. Objetivo General

Determinar el efecto de la prolactina sobre la activación del factor de transcripción CREB y sus proteínas blanco Bcl-2 y BDNF en cultivos primarios de neuronas hipocampales ante excitotoxicidad.

b. Objetivos Particulares

- Inducir daño excitotóxico con Glu en cultivos primarios de neuronas hipocampales.
- Tratar los cultivos primarios de neuronas de hipocampo con PRL.
- Evaluar la translocación de CREB al núcleo.
- Evaluar el efecto de PRL sobre la expresión de proteínas asociadas a CREB: BDNF y Bcl-2.

IV. HIPÓTESIS

Si ante el estrés excitotóxico la PRL induce la activación del factor transcripcional CREB en cultivos primarios de neuronas hipocampales de rata, entonces habrá una sobreexpresión de las proteínas Bcl-2 y BDNF.

V. VARIABLES DE TRABAJO

a. Variable independiente:

- En cultivo primario de neuronas de hipocampo de rata se administró una dosis única de PRL 10ng/ml a los grupos PRL y PRL+Glu.
- En cultivo primario de neuronas de hipocampo de rata se indujo excitotoxicidad con una dosis única de Glu 100µM a los grupos PRL+Glu y Glu.

b. Variable dependiente:

- Por medio de Western blot se determinó la expresión de la proteína de CREB y p-CREB en los cultivos primarios de neuronas de hipocampo de rata en los grupos CTRL, PRL, PRL+Glu y Glu.
- Determinación cualitativa de la translocación de p-CREB en cultivos primarios en los grupos CTRL, PRL, PRL+Glu y Glu a través de inmunocitoquímica de fluorescencia
- Por medio de Western blot se determinó la expresión de proteína antiapoptótica Bcl-2 en los cultivos primarios de neuronas de hipocampo de rata en los grupos CTRL, PRL, PRL+Glu y Glu.
- Por medio de Western blot se determinó la expresión de la proteína BDNF en los cultivos primarios de neuronas de hipocampo de rata en los grupos CTRL, PRL, PRL+Glu y Glu.

c. Variable no controladas:

- Cantidad de embriones por rata. 9-13
- Conducta de rata gestante.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

a. Cultivo primario de neuronas hipocampales de rata

❖ Material para el cultivo celular

- AraC (2mg/10 ml, #cat.1768, Sigma-Aldrich, USA).
- Azul de Tripano (#cat. T8154, Sigma-aldrich, USA).
- Campana de flujo laminar horizontal.
- Cubreobjetos redondos de 18 mm.
- DNAsa al 0.52% (#cat. AMPD1, Sigma-Aldrich, USA).
- Incubadora a 37°C, 5% CO₂, en condiciones de humedad constante.
- Inhibidor de Tripsina al 0.8% (#cat. R007100, Gibco).
- Medio neurobasal suplementado con una mezcla al 50% de B27, 0.5 mM de glutamina y 20µg/ml de gentamicina, sin antioxidantes (#cat. 10888022, Gibco).
- Navaja de bisturí.
- Placas de 6 pozos (Corning, #Cat.3506).
- Poli-L-lisina (5 µg/ml) (P4707, Sigma-Aldrich, USA).
- Se utilizaron cultivos primarios de neuronas hipocampales de rata Wistar.
- Solución Ringer-Krebs (#cat. K4002, Sigma-Aldrich, USA).
- Tripsina al 0.8% (#cat, 17075029, Gibco).

❖ Técnica de cultivo celular

Se utilizaron cultivos primarios de neuronas hipocampales obtenidas de embriones de rata Wistar de 17-18 días de gestación de acuerdo al protocolo descrito por Hernández et al. (2005). De cada rata gestante se obtuvieron de 10-12 embriones, los cuales fueron decapitados y se les extrajo el cerebro, se separaron los lóbulos y con ayuda de un microscopio estereoscópico y micropinzas de disección se aisló el hipocampo de la corteza cerebral. Posteriormente, los hipocampos se disgregaron mecánicamente con ayuda de una navaja para bisturí, posteriormente el homogenado resultante fue resuspendido en una solución Riger-Krebs

enriquecida con Tripsina (0.8% v/v) a 37°C durante 10 min. Posteriormente la actividad de la tripsina se inhibió con un inhibidor de tripsina al 0.8% y DNAsa al 0.52%. La suspensión fue centrifugada a 5000 rpm durante 1 min, se decantó el sobrenadante y homogenado se resuspendió en medio Neurobasal enriquecido con suplemento B-27 bajo en antioxidantes 0.2% v/v. Finalmente, se determinó viabilidad celular por exclusión con Azul de Tripiano y las células se sembraron a una densidad 2×10^6 en placas de 6 pozos tratadas con poli-L-lisina (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante 24 h). El cultivo celular se mantuvo a 37°C con 5% de CO_2 en una atmósfera húmeda (Fig. 5).

Los cultivos primarios de neuronas hipocampales se dividieron en cuatro grupos: un control (CTRL, tratado con solución salina 0.9% NaCl) y tres tratamientos: PRL (10 ng/ml), Glu (100 μM) y PRL+Glu (10 ng/mL+100 μM).

❖ Tratamientos con glutamato y prolactina del cultivo celular

- Día 1: Cultivo celular primario de neuronas hipocampales con medio neurobasal suplementado.
- Día 4: Una vez que las células neuronas hipocampales fueron sembradas en las placas de 6 pozos tratadas con poli-L-lisina se les realizó cambio de medio, que consiste en retirar 500 μl de medio a cada caja de cultivo y se adicionan 600 μl de medio fresco suplementado y AraC al 2mg/10 ml para evitar la proliferación de las células gliales y así garantizar que el cultivo es puro de neuronas hipocampales.
- Día 8: Se realizó cambio de medio y los grupos PRL y PRL+Glu, se trataron con una dosis única de PRL 10ng/ml.
- Día 10: Se indujo excitotoxicidad con Glu 100 μM , durante 24 h a los grupos PRL+Glu y Glu.
- Día 11: Los 4 grupos (CTRL; PRL; PRL+Glu; Glu) estaban listos para continuar con los procesos de inmunocitoquímica de fluorescencia y extracción de proteína de acuerdo al procedimiento que se deseó emplear.

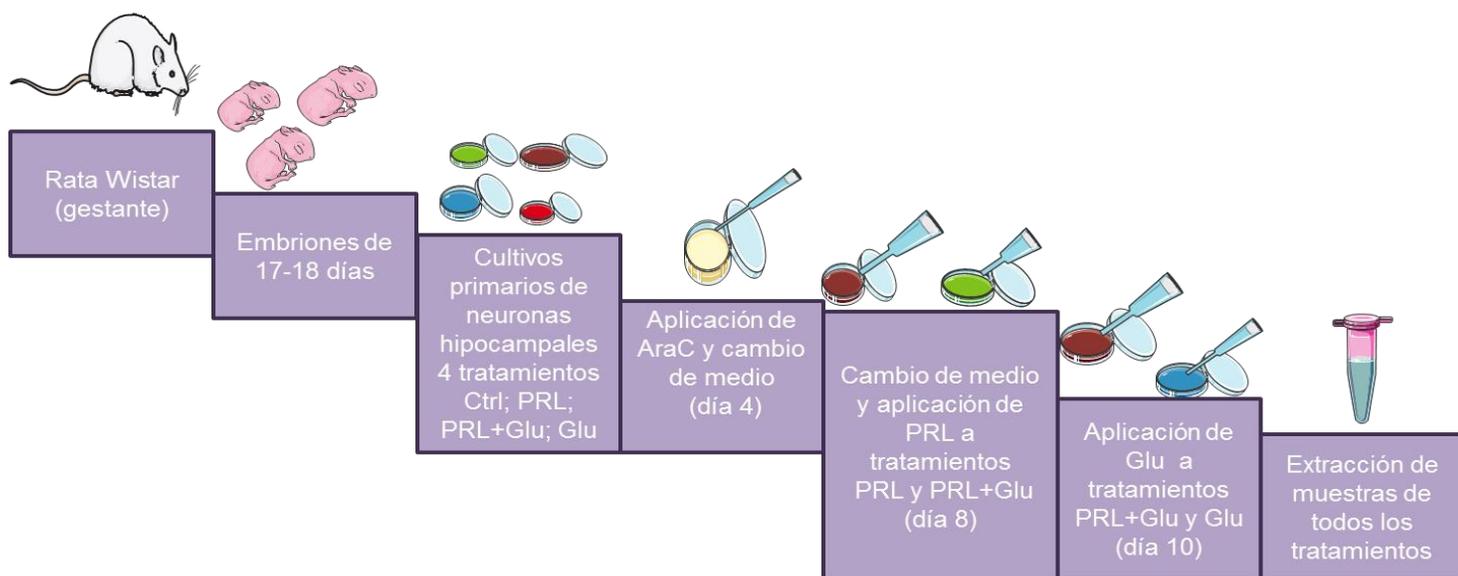


Fig. 5 Cultivo primario de neuronas hipocampales de rata

b. Inmunocitoquímica de fluorescencia de cultivos primarios de hipocampo de rata

❖ Material y reactivos para inmunocitoquímica

- Anticuerpos primarios: CREB (#cat.sc-271, Santa Cruz Biotechnology, CA, EU).
- Anticuerpos secundarios: anti-conejo (#cat. **sc-2372**, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA).
- Buffer PBS 10X: 40.0g NaCl (58.44g/ mol), 1.0gKCl (74.56g/mol), 1.2g KH_2PO_4 (136.09g/mol) y 8.9g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (177.99g/mol) ajustado a pH: 7.4.
- Cubreobjetos redondos 18 mm.
- Dako (Nº de catálogo S2003).
- Marcador de núcleos Hoechst 12 ng/ml (#cat. 200908, Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA).
- Microscopio confocal Olympus RV 1000 de la Unidad de Servicios de Apoyo la Investigación y a la Industria (USAI).
- PFA al 4% pH 7.4 (#cat. 158127, Sigma-Aldrich, USA).
- Portaobjetos.
- Suero fetal Bovino (#cat. 10082139, Gibco).
- Triton X -100 al .0.5 %.
- Tween 20 (BIO-RAD).

❖ Técnica de inmunocitoquímica de fluorescencia

Las células previamente tratadas (CTRL; PRL; PRL+Glu; Glu) y colocadas sobre cubre objetos redondos dentro de las plazas de 6 pozos se fijaron con PFA al 4% durante 15 min a 4°C, posteriormente se lavaron con PBS 1X (dilución del Buffer PBS 10X), a continuación se realizaron tres lavados de 10 min con Triton X-100 al .0.5 % con PBS 1X. Finalmente, se bloqueó las uniones inespecíficas de proteínas de las células con una solución al 10 % de suero fetal bovino y PBS 1X +Tween al 0.05% durante 1 h a 4°C. A continuación se retiró la solución de bloqueo y se incubó con el anticuerpo primario CREB, preparado en solución de bloqueo durante 24 h, después se realizaron tres lavados de 10 min de PBS +Tween 20 al 0.05% y se incubó con los anticuerpos secundarios que corresponden, a continuación se efectuó tres lavados con PBS + Tween al 0.05%, para finalmente incubar con Hoechst 12 ng/ml durante 5 min, nuevamente tres lavados con PBS +Tween y una vez con PBS 1X y se montan las muestras sobre porta objetos fijándolas con Dako. Finalmente, las muestras se analizaron por microscopia confocal con longitudes de onda de 405,473, 559 se utilizó un láser de argón de la unidad de servicios y apoyo para la industria y la investigación (USAII, Facultad de Química, UNAM).

c. Extracción y cuantificación de proteína de cultivos primarios de neuronas hipocampales de rata

❖ Material y reactivos para extracción

- Buffer de lisis RIPA (PBS 1x pH 7.2, IGEPAL 1%, SDS 25% y deoxicolato de sodio 0.05%) suplementado con inhibidor de proteasas MiniComplete (Roche).
- Espectrofotómetro (Epoch, Bio Tek Winooski, VT, EE.UU).
- Kit REagent protein Assay BIO-RAD (#cat. 500-0116), 250 ml de REAGENT A, solución alcalina de tartrate de cobre, 2000 ml de REAGENT B, dilución del reactivo de Forlin, 5ml de REAGENT S.
- Placas de 96 pozos de 200 ml.
- Tubos eppendorf (650 µl, 1.5ml, 2ml).

❖ Extracción de proteína.

Las proteínas se extrajeron del cultivo celular de neuronas hipocampales de rata con los tratamientos (CTRL; PRL; PRL+Glu; Glu) al día 11, se incubaron con 30µl de buffer de lisis RIPA, durante 5 minutos a 4°C y se homogeneizaron mecánicamente con ayuda del sonicador. Posteriormente, las muestras se colocaron en tubos eppendorf de 1.5ml y se calentaron a 80°C por 10 min (resuspendiendo las muestras cada de 5 min), después se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 minutos a 4°C, el botón celular se descartó y se recuperó el sobrenadante el cual contiene las proteínas de cada tratamiento. Las muestras obtenidas se guardaron a -70°C hasta su posterior utilización.

❖ Cuantificación de proteínas totales

Las proteínas de los 4 grupos (CTRL; PRL; PRL+Glu; Glu) obtenidas fueron cuantificadas por el método de Lowry modificado por Noble et al. (2009). Descrito de manera breve se realizó de la siguiente manera. Se colocan las muestras de proteína en placas de 96 pozos se realiza una curva estándar con concentraciones conocidas de una proteína de albumina (0, 2, 4, 8, 12 y 16 µg/µl), de acuerdo a los datos del fabricante del Kit (REagent protein Assay), se agrega en cada pozo de la placa de 96, 17 µl de agua Milli-Q, 3µl de proteína dependiendo del tratamiento (CTRL; PRL; PRL+Glu; Glu), 200µl de solución B del Kit y 25µl de la solución C del Kit, la cual está conformada por 1µl de la solución A más 20µl de la solución S. A continuación se deja la placa de 96 pozos preparada agitándose durante 15 minutos, finalmente se leyó la placa a una longitud de onda de 750 nm. Las muestras fueron tratadas del mismo modo con lo cual se pudo determinar la concentración de proteína total presente en las muestras.

d. Análisis de la expresión de proteica por la técnica de Western blot de cultivos primarios de hipocampo

❖ Material y reactivos para Western blot

- Anticuerpos primarios (Bcl-2 (#cat sc-7382), CREB (#cat sc-271), P-CREB (#cat.7978), BDNF (#cat 710306), β-actina (#cat.sc-47777),

Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (#cat.47724)) Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA.

- anticuerpos secundarios anti-ratón, anti-conejo, anti-cabra Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA.
- Buffer de carga (Azul de Coomasie y β -mercaptoetanol 5%).
- Equipo de electroforesis (BioRad, CA, USA).
- Leche libre de grasa.
- Membranas de transferencia Hybond™ ECL™ de Amershan Bioicencias y membranas Immobilon™ P de Millipore.
- Scanner LI-COR, the C-DiGit Chemiluminescent Western Blot Scanner, Nebraska USA.
- Solución amortiguadora de corrida: 25 mM de Tris Base, 150 mM de glicina.
- Solución de poliacrilamida al 13% BIO-RAD Cat#161-0156.
- Solución de quimioluminiscencia BIO-RAD.
- Solución TBS 1X (Tris-HCl 5M pH 7.5 y NaCl 1.5 M).
- Tubos eppendorf (650 μ l, 1.5ml, 2ml).
- Tween 20, BIO-RAD.

❖ Procedimiento de la técnica western blot

De las proteínas de células neuronales de hipocampo de los cuatro grupos (CTRL; PRL; PRL+Glu; Glu) que fueron extraídas y cuantificadas que se encontraban en los tubos eppendorf 1.5ml, se utilizaron 40 μ g/ μ l de proteína total diluida en buffer de carga y se desnaturalizaron a 80°C por 5min. La proteína fue cargada en geles de poliacrilamida al 12% en un equipo de electroforesis, por 120 minutos a 65 y 85 V en una solución amortiguadora de corrida.

La transferencia de proteínas se realizó en una cámara húmeda a 90 V por 120 min, sobre una membrana de transferencia y se bloquearon en una solución TBS1X + y Tween- 20 (1l: 1 ml) con leche libre de grasa al 20% durante una hora. Posteriormente, se agregaron los anticuerpos primarios (Bcl-2, CREB, F-CREB, BDNF, β -actina, GAPDH) y se incubaron por 24 h a temperatura ambiente en

agitación. Se retiró el exceso del anticuerpo primario de las membranas con una solución de TBS 1X con Tween 20 con recambio del amortiguador de TBS+ Tween 20 cada 10 minutos, 3 veces. A continuación, las membranas se incubaron 24 horas con un anticuerpo secundario anticuerpos secundarios anti-ratón, anti-conejo, anti-cabra, correspondiente a temperatura ambiente y en agitación (14-16 rpm), el exceso de anticuerpo secundario se retiró realizando tres lavados con una solución de TBS+Tween durante 10 minutos cada uno.

Finalmente se revelaron las membranas tratadas en un scanner LI-COR con una solución de quimioluminiscencia (BIO-RAD). Posteriormente, se procedió a realizar la densitometría de las proteínas con el software Image Studio Digital Ver 4.0.

e. Análisis estadístico

Todos los datos fueron analizados por el software Graphpad Prism1 (RRID: SCR_002798) se realizó la prueba de Kruskal-Wallis para muestras no paramétricas con el propósito de comparar el efecto entre grupos, seguida de una prueba Dunns post hoc. Los valores se expresan como la media \pm desviación estándar. Se consideró una significancia estadística de $p \leq 0.05$.

VII. RESULTADOS

a. La PRL no modifica la activación de CREB en los cultivos primarios de neuronas de hipocampo

Se determinó la expresión de CREB total y la forma fosforilada p-CREB (activa) (Fig. 7) en los diferentes tratamientos: CTRL (solución salina); PRL (10 ng/ml); PRL (10 ng/ml)+Glu (100 μ M); Glu (100 μ M). En la Fig. 6 se describe los resultados de la expresión de estas proteínas por medio de Western blot y como se puede identificar, el análisis densitométrico del contenido de p-CREB / CREB no muestran diferencias estadísticamente significativas, entre los tratamientos.

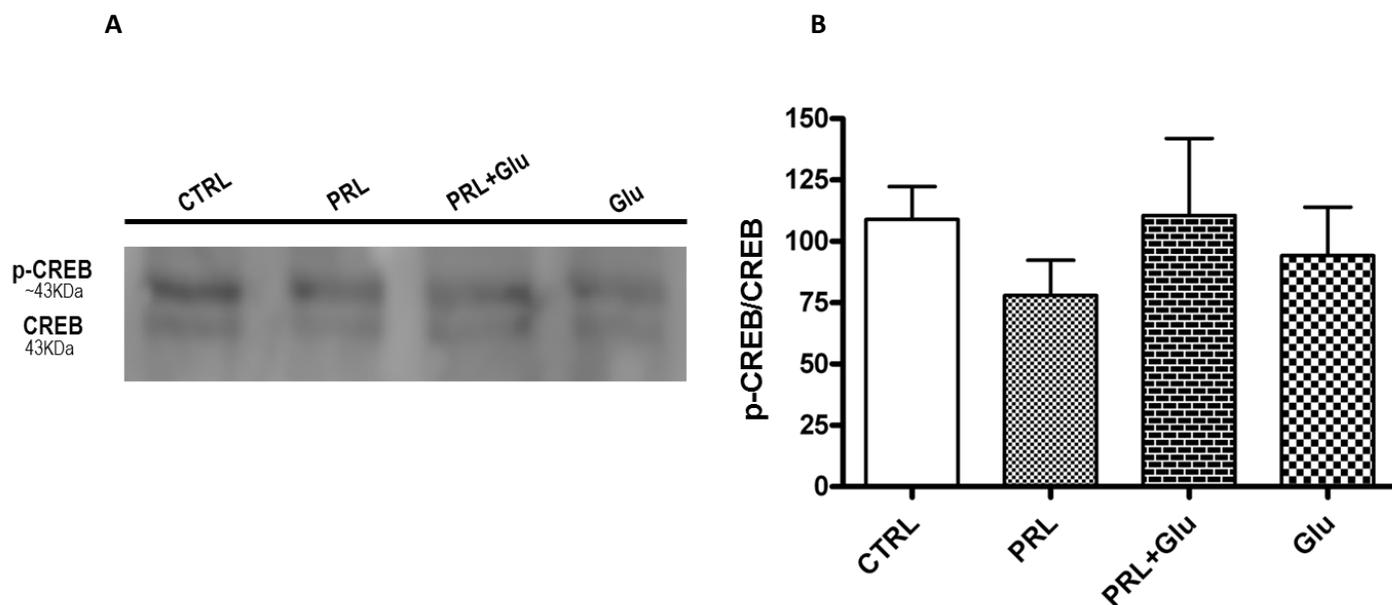


Fig. 6 Los tratamientos no modificaron la relación CREB/p-CREB en cultivos primarios de neuronas hipocampales de rata. Imagen representativa del Western Blot para la expresión de p-CREB y CREB (A). Análisis densitométrico de la relación p-CREB/CREB (B). Los datos fueron analizados por la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de una prueba Dunns post hoc. $p \leq 0.05$, $n=3$.

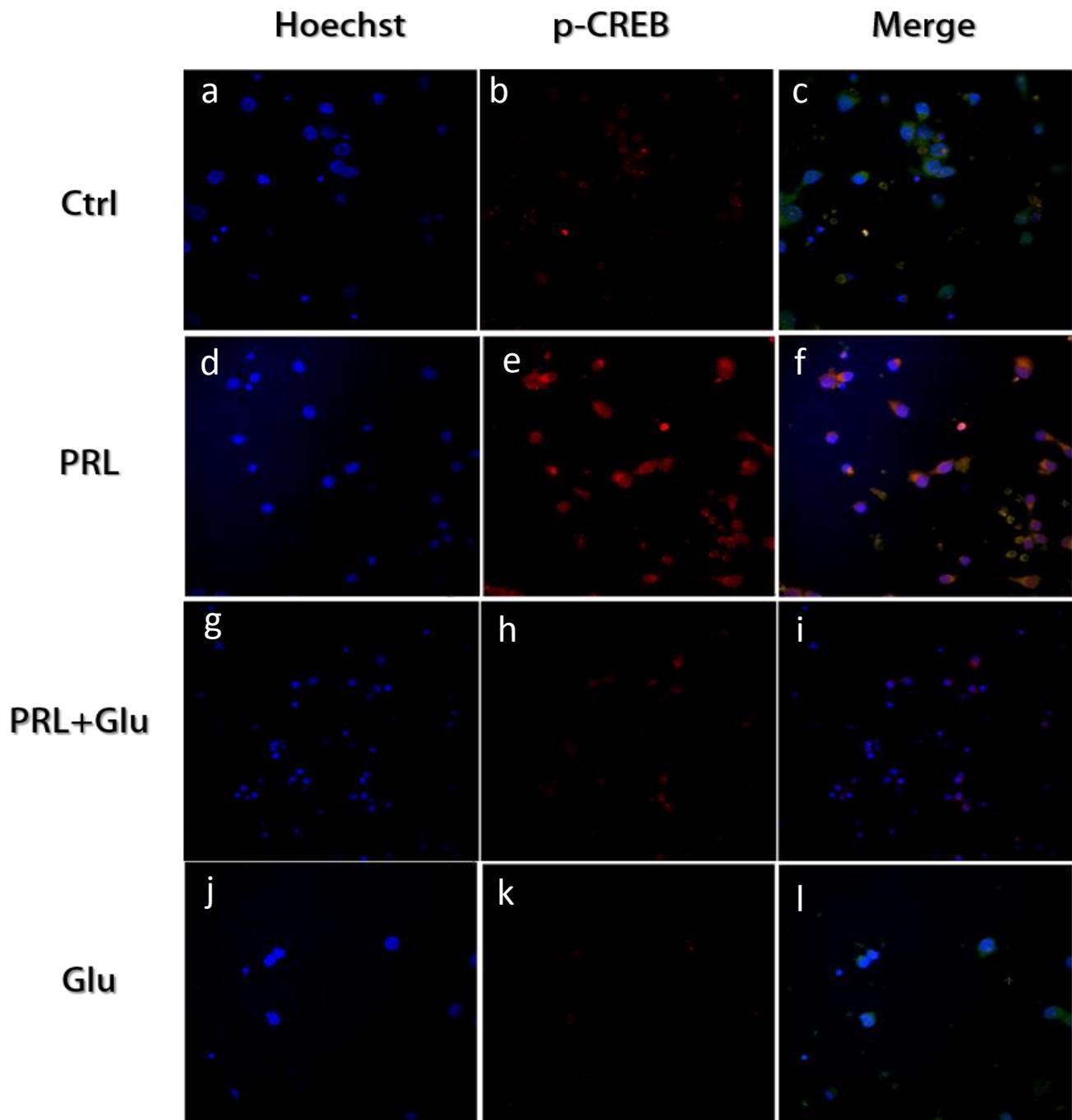


Fig. 7 Inmunocitoquímica de fluorescencia sobre la expresión de p-CREB en los cultivos primarios de neuronas de hipocampo. Imágenes representativas de neuronas de los cultivos primarios los cuales se dividieron en 4 tratamientos (CTRL; PRL; PRL+Glu; Glu) procesados para revelar la expresión de p-CREB (rojo) y núcleos (azul). Plano sencillo de reconstrucción en plano Z con microscopia con focal, aumento 40x.

b. La PRL no modifica la expresión de la proteína de BDNF en los cultivos primarios de neuronas de hipocampo

El efecto de la PRL sobre CREB en una proteína que se expresa río abajo, se determinó por medio de Western blot para evaluar la expresión de la proteína de BDNF en los 4 tratamientos: CTRL (solución salina); PRL (10 ng/ml); PRL (10 ng/ml); +Glu (100 μ M); Glu (100 μ M). En la Fig. 8 se observa la expresión de la proteína de BDNF en comparación con su control de carga GAPDH. Se determinó por densitogramas la cantidad de proteína presente en cada tratamiento. Con base en el análisis estadístico, se observó que hay una diferencia significativa en los tratamientos CTRL y PRL con respecto al tratamiento de Glu.

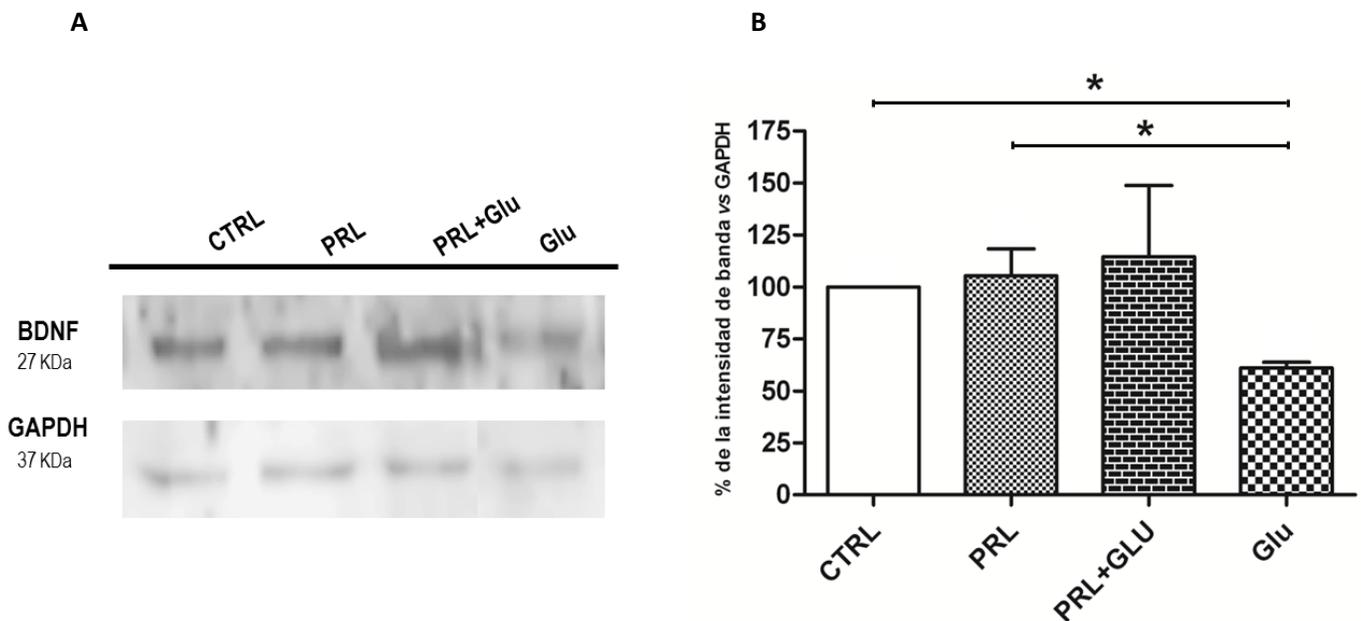


Fig. 8 La PRL no modifica la expresión de BDNF. Imagen representativa del Western blot para la expresión de BDNF y el control de carga GAPDH (A). Análisis densitométrico de BDNF y su control de carga (B). Los datos fueron analizados por la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de una prueba Dunns post hoc. $p \leq 0.05$, $n=3$.

c. La PRL sobre activa la expresión de la proteína Bcl-2 en los cultivos primarios de neuronas de hipocampo

Continuando con el análisis de la expresión de las proteínas río debajo de CREB, se realizó Western blot para determinar la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 en los diferentes tratamientos: CTRL (solución salina); PRL (10 ng/ml); PRL (10 ng/ml); +Glu (100 μ M); Glu (100 μ M). En la Fig. 9 se observa la expresión la proteína de Bcl-2 en comparación con su control de carga β -actina. Se determinó por densitogramas la cantidad de proteína presente en cada tratamiento. Con base en el análisis estadístico se observa que hay una sobreexpresión de la proteína Bcl-2 en los tratamiento PRL y PRL+Glu. Asimismo se observa un decremento en el tratamiento de Glu con respecto al CTRL. Por lo anterior, se encontró diferencias significativas entre los tratamientos PRL, PRL+Glu con respecto a Glu.

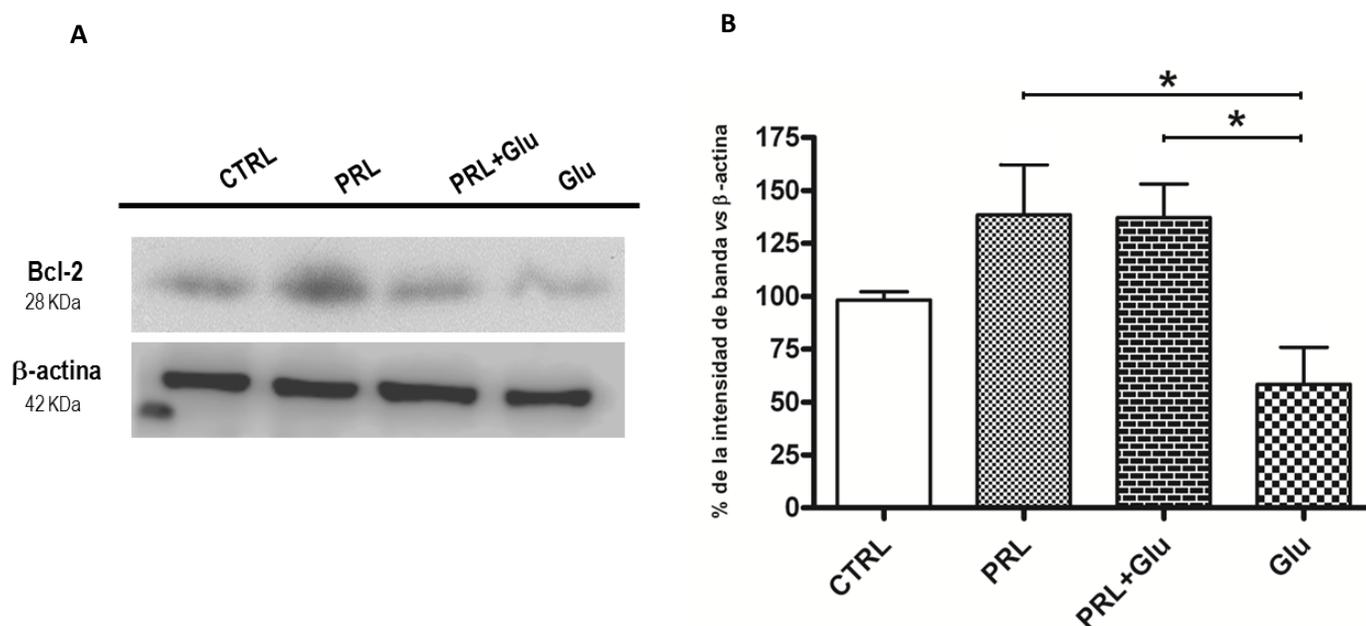


Fig. 9 La PRL induce sobreexpresión de Bcl-2. Imagen representativa del Western blot para la expresión de Bcl-2 y el control de carga β -actina (A). Análisis densitométrico de Bcl-2 y su control de carga (B). Los datos fueron analizados por la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de una prueba Dunns post hoc. $p \leq 0.05$, $n=5$.

VIII. DISCUSIÓN

Los trastornos neurodegenerativos se caracterizan por la pérdida gradual de poblaciones específicas de células neuronales en el SNC (Dong et al., 2009). Además, los TN están asociados con numerosas manifestaciones clínicas que tienen un impacto importante en la calidad de vida de los pacientes (Chekani et al., 2016).

En la actualidad se ha demostrado que la sobreactivación de los AE, es perjudicial para el SNC debido a que provoca el incremento intracelular de calcio que induce la activación de enzimas que degradan proteínas, membranas y ácidos nucleicos (Dong et al., 2009). Consecuentemente se ha documentado a la excitotoxicidad como un mecanismo fundamental involucrado en la degeneración neuronal (Choi, 1992; Dong et al., 2009).

Por lo anterior, se han utilizado modelos *in vivo* e *in vitro* para el conocimiento de los mecanismos involucrados en el proceso neurodegenerativo con el propósito de definir posibles blancos terapéuticos para los TN (Hergovich et al., 2001; Hernandez et al., 2015). No obstante, hoy en día ningún enfoque terapéutico es capaz de modular o evitar el deterioro (Morales, 2011).

En este sentido, existen numerosos artículos que señalan el efecto neuroprotector de la PRL ante el estrés excitotóxico inducido por Glu y AK *in vivo* e *in vitro* en neuronas del hipocampo (Cabrera et al., 2009; Morales, 2011; Rivero et al., 2017; Tejadilla et al., 2010; Vanoye et al., 2008; Vergara et al., 2016). Asimismo, estudios recientes han demostrado que la activación de los PRLRs (Vergara et al., 2016) expresados en estas neuronas induce la sobreexpresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 (Rivero et al., 2017). Sin embargo, no se ha profundizado en la investigación sobre la regulación ejercida por la PRL sobre factores de transcripción implicados en la neuroprotección ante el estrés excitotóxico.

Por otra parte, se ha demostrado que CREB modula la excitabilidad en mamíferos (Yu et al., 2016). Asimismo la fosforilación de CREB afecta a la expresión de numerosos genes neurales y proteínas entre los que encuentra la proteína Bcl- 2 y BDNF (Wang et al., 2016; Xia et al., 2016) los cuales se ha reportado están

implicados en la regulación de la apoptosis y neuroprotección en neuronas del hipocampo en modelos *in vitro* (Almeida et al., 2005; Rivero et al., 2017) e *in vivo* (Vanoye- et al., 2008). Pese a la evidencia de la capacidad de CREB para modular la excitabilidad neuronal, el mecanismo de cómo se produce este es aún desconocido (Yu et al., 2016).

Por ello, el presente trabajo describe el efecto de la PRL sobre la activación del factor de transcripción CREB y dos proteínas río abajo, BDNF y Bcl-2, en cultivos primarios de células hipocampales de rata.

De acuerdo al objetivo planteado, primero se abordó la translocación nuclear del factor transcripcional CREB en los tratamientos: CTRL, PRL, PRL+Glu, por medio de inmunocitoquímica de fluorescencia (Fig. 7) para observar la presencia de la forma activa de CREB (p-CREB). Al mismo tiempo, se realizó Western blot para evaluar por medio del análisis densitométrico la expresión de la proteína de CREB y p-CREB en los cuatro tratamientos, después se calculó el cociente de p-CREB / CREB en cada uno de ellos, de acuerdo con lo reportado por Fijał et al. (2015). Posteriormente, con base en el análisis estadístico no se muestra diferencias estadísticamente significativas entre los 4 tratamientos con respecto al control (Fig. 6). La cual indica que el tratamiento con PRL 10 ng/ml durante 72 h no induce la activación de CREB en neuronas del hipocampo. Sin embargo, aunque no hay cambios estadísticamente significativos entre los tratamientos, se observa en la en la Fig. 6 que el tratamiento con Glu muestra una tendencia a aumentar la relación p-CREB / CREB. Estos resultados no son diferentes a lo reportado anteriormente donde se ha reportado que Glu regula la capacidad de excitabilidad neuronal por medio de la sobreactivación de los NMDAR en el hipocampo, principalmente consolidando procesos de memoria y aprendizaje (Bernabeu et al., 1997; Wang et al., 2016), a través de la regulación de la expresión de genes asociados a procesos de memoria mediante la activación del factor de transcripción CREB (Alberini, 2009; Deisseroth et al., 1998).

Por otra parte CREB es un importante regulador de la expresión génica en el SNC (Yu et al., 2016), entre las proteínas reguladas río abajo se encuentran BDNF (Li

et al., 2015; Tabuchi, 2008) y Bcl-2 (Yu et al., 2016), las cuales han sido asociadas a neuroprotección en el hipocampo en modelos *in vivo* (Vanoye et al., 2008) e *in vitro* (Almeida et al., 2005; Rivero et al., 2017).

Con base en esta información se evaluó la expresión de BDNF en los tratamientos CTRL, PRL, PRL+Glu y Glu, los resultados sobre la expresión de proteína de BDNF mostraron que el tratamiento con PRL 10 ng/ml durante 72h no modifica el contenido de ésta proteína en comparación con el tratamiento CTRL. Sin embargo en el tratamiento con Glu, el contenido disminuye significativamente con respecto a los tratamientos CTRL y PRL (Fig. 8). Por ello se sugiere que la PRL no genera inducción de BDNF en los cultivos primarios de neuronas de hipocampo. Sin embargo, el resultado del tratamiento con Glu es similar al encontrado por Almeida et al. (2005) quienes reportaron neuroprotección por BDNF en cultivo de neuronas hipocampales en condiciones excitotóxicas debido a que regula las defensas antioxidantes en las neuronas.

Finalmente, conforme a diversos estudios. Se ha reportado el efecto neuroprotector de la PRL en cultivos primarios de neuronas de hipocampo por la inducción de la proteína antiapoptótica Bcl-2 (Rivero et al., 2017; Vanoye et al., 2008a) la cual también es un gen blanco río abajo de CREB (Xia et al., 2016).

Se determinó la expresión de la proteína Bcl-2, en los tratamientos CTRL; PRL; PRL+Glu; Glu. En la Fig. 9 se observa que la expresión de Bcl-2 aumenta significativamente en los tratamiento PRL y PRL+Glu con respecto a los tratamientos CTRL y Glu, de forma similar a lo reportado por Rivero et al. (2017) quienes se demostraron que la PRL previene la excitotoxicidad de Glu así como una acción antiapoptótica por Bcl-2. Por lo que se sugiere que la inducción de la sobreexpresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 por PRL es debido a otros mecanismos moleculares.

En resumen, en el SNC la PRL no muestra un efecto sobre CREB en un cultivo de neuronas hipocampales (Fig. 10) después de 72 h de su aplicación, por lo que se sugiere que el efecto neuroprotector de la PRL ante excitotoxicidad reportado en modelos *in vivo* e *in vitro* en estudios previos (Cabrera et al., 2009; Mehta et al.,

2013; Morales, 2011; Rivero et al., 2017; Tejadilla et al., 2010; Vanoye et al., 2008; Vergara et al., 2016) es debido a su interacción con otros mecanismos moleculares.

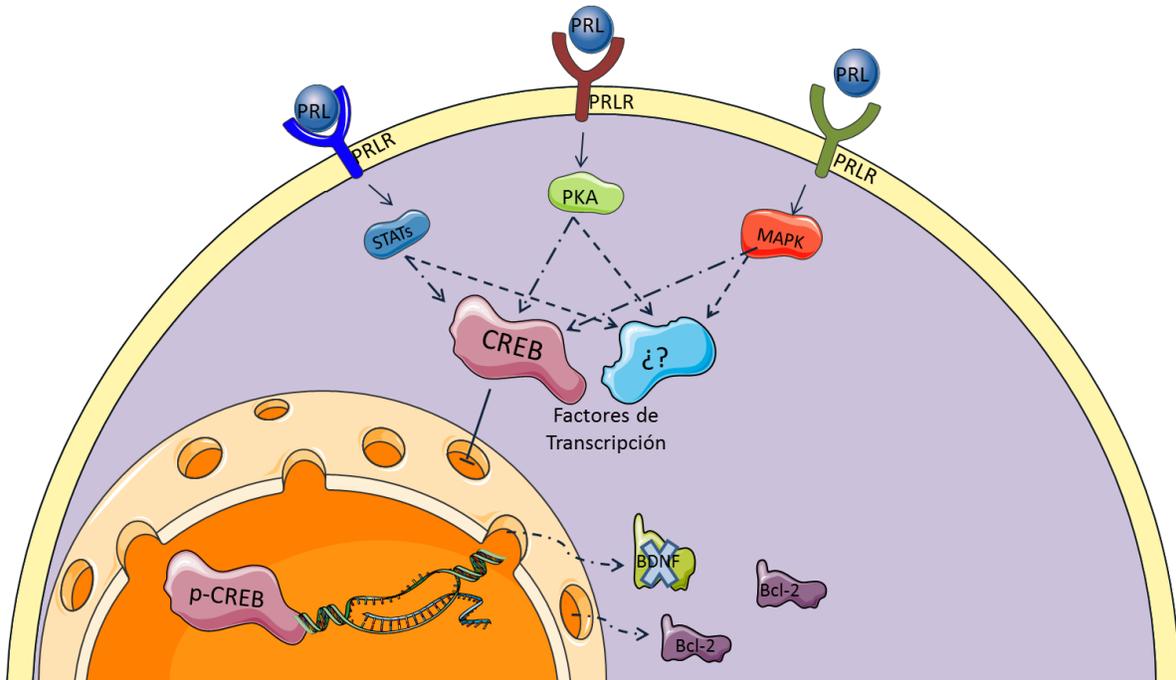


Fig. 10 Mecanismos molecular sugerido implicado en el efecto de la PRL sobre el factor transcripción CREB en cultivos primarios de neuronas hipocámpicas.

IX. CONCLUSIONES

De acuerdo con nuestros resultados, se sugiere que el tratamiento con PRL no induce la activación del factor de transcripción CREB, ni la expresión del factor trófico BDNF, en cultivos primarios de neuronas hipocampales. Sin embargo nuestros resultados revelaron que el tratamiento con PRL sobreexpresa el contenido de la proteína antiapoptótica de Bcl-2. Probablemente, los mecanismos moleculares por los que PRL induce neuroprotección ante estrés excitotóxico están asociados con otras vías de señalización, incluso con algunos otros factores de transcripción involucrados con la expresión de las proteínas pertenecientes a la familia de Bcl-2.

No obstante, es posible que la activación de las proteínas evaluadas ocurra a diferentes tiempos. A través de otros mecanismo moleculares inducidos por otros factores de transcripción.

X. PERSPECTIVAS

- Evaluar el efecto del tratamiento con PRL sobre CREB, durante tiempos cortos en cultivos primarios de neuronas hipocampales.
- Evaluar el efecto de PRL con otros factores de transcripción.
- Analizar el efecto de PRL sobre CREB en neuronas de hipocampo en un modelo *in vivo*.

XI. REFERENCIAS

- Alberini, C. M. (2009). Transcription Factors in Long-Term Memory and Synaptic Plasticity. *Physiological Reviews*, 89 (1), 121 LP-145. Recuperado a partir de <http://physrev.physiology.org/content/89/1/121.abstract>
- Almeida, R. D., Manadas, B. J., Melo, C. V., Gomes, J. R., Mendes, C. S., Graos, M. M. y Duarte, C. B. (2005). Neuroprotection by BDNF against glutamate-induced apoptotic cell death is mediated by ERK and PI3-kinase pathways. *Cell Death Differ*, 12 (10), 1329–1343. Recuperado a partir de <http://dx.doi.org/10.1038/sj.cdd.4401662>
- Ankarcrona, M., Dygbukt, J. M., Bonfoco, E., Zhivotovsky, B., Orrenius, S., Lipton, S. A. y Nicotera, P. (1995). Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron*, 15 (4), 961–973.
- Barnham, K. J., Masters, C. L. y Bush, A. I. (2004). Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat Rev Drug Discov*, 3 (3), 205–214. Recuperado a partir de <http://dx.doi.org/10.1038/nrd1330>
- Bernabeu, R., Bevilaqua, L., Ardenghi, P., Bromberg, E., Schmitz, P., Bianchin, M. y Medina, J. H. (1997). Involvement of hippocampal cAMP/cAMP-dependent protein kinase signaling pathways in a late memory consolidation phase of aversively motivated learning in rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94 (13), 7041–7046.
- Cabrera-Reyes, E. A., Limón-Morales, O., Rivero-Segura, N. A., Camacho-Arroyo, I. y Cerbón, M. (2017). Prolactin function and putative expression in the brain. *Endocrine*. <http://doi.org/10.1007/s12020-017-1346-x>
- Cabrera, V., Cantú, D., Ramos, E., Vanoye-Carlo, A., Cerbón, M. y Morales, T. (2009). Lactation is a natural model of hippocampus neuroprotection against excitotoxicity. *Neuroscience Letters*, 461 (2), 136–139. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.neulet.2009.06.017>
- Casamitjana, C., García, S., Méndez, A. Z., Salazar, M. H. y Cervantes, J. H. (2007). Calidad de vida en pacientes con enfermedad de Parkinson y estimulación cerebral profunda. *Medicina Interna de Mexico*, 23 (1), 7–14.

- Chekani, F., Bali, V. y Aparasu, R. R. (2016). Quality of life of patients with Parkinson's disease and neurodegenerative dementia: A nationally representative study. *Research in Social and Administrative Pharmacy*, 12 (4), 604–613. <http://doi.org/10.1016/j.sapharm.2015.09.007>
- Choi, D. W. (1992). Excitotoxic cell death. *Journal of Neurobiology*, 23 (9), 1261–1276. <http://doi.org/10.1002/neu.480230915>
- Deisseroth, K., Heist, E. K. y Tsien, R. W. (1998). Translocation of calmodulin to the nucleus supports CREB phosphorylation in hippocampal neurons. *Nature*, 392 (6672), 198–202. Recuperado a partir de <http://dx.doi.org/10.1038/32448>
- Djebaïli, M., Lerner-Natoli, M., Pascale, M., Baille, V., Bockaert, J. y Rondouin, G. (2001). Molecular events involved in neuronal death induced in the mouse hippocampus by in-vivo injection of kainic acid. *Molecular Brain Research*, 93 (2), 190–198. [http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0169-328X\(01\)00197-8](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0169-328X(01)00197-8)
- Dong, X., Wang, Y. y Qin, Z. (2009). Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacologica Sinica*, 30 (4), 379–387. <http://doi.org/10.1038/aps.2009.24>
- Donner, N., Bredewold, R., Maloumy, R. y Neumann, I. D. (2007). Chronic intracerebral prolactin attenuates neuronal stress circuitries in virgin rats. *European Journal of Neuroscience*, 25 (6), 1804–1814. <http://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05416.x>
- Fijał, K., Nowak, E., Leśkiewicz, M., Budziszewska, B. y Filip, M. (2015). Working memory deficits and alterations of ERK and CREB phosphorylation following withdrawal from cocaine self-administration. *Pharmacological Reports*, 67 (5), 881–889. <http://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pharep.2015.01.013>
- Freeman, M. E., Kanyicska, B., Lerant, A. y Nagy, G. (2000). Prolactin: Structure, Function, and Regulation of Secretion. *Physiological Reviews*, 80 (4), 1523 LP-1631. Recuperado a partir de <http://physrev.physiology.org/content/80/4/1523>.
- Fujikawa, D. G., Shinmei, S. S. y Cai, B. (2000). Kainic acid-induced seizures produce necrotic, not apoptotic, neurons with internucleosomal DNA cleavage: implications for programmed cell death mechanisms. *Neuroscience*, 98 (1),

- 41–53. [http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0306-4522\(00\)00085-3](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0306-4522(00)00085-3)
- Gross, A. y Katz, S. G. (2017). Non-apoptotic functions of BCL-2 family proteins. *Cell Death & Differentiation*.
- Hergovich, N., Singer, E., Agneter, E., Eichler, H. G., Graselli, U., Simhandl, C. y Jilma, B. (2001). Comparison of the Effects of Ketamine and Memantine on Prolactin and Cortisol Release in Men: A Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Trial. *Neuropsychopharmacology*, 24 (5), 590–593. Recuperado a partir de [http://dx.doi.org/10.1016/S0893-133X\(00\)00194-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0893-133X(00)00194-9)
- Hernandez-Baltazar, D., Zavala-Flores, L. M. y Villanueva-Olivo, A. (2015). El modelo de 6-hidroxidopamina y la fisiopatología parkinsoniana: nuevos hallazgos en un viejo modelo. *Neurología*. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.nrl.2015.06.011>
- Hernández-Fonseca, K. y Massieu, L. (2005). Disruption of endoplasmic reticulum calcium stores is involved in neuronal death induced by glycolysis inhibition in cultured hippocampal neurons. *Journal of Neuroscience Research*, 82 (2), 196–205. <http://doi.org/10.1002/jnr.20631>
- Ignacak, A., Kasztelnik, M., Sliwa, T., Korbut, R. A., Rajda, K. y Guzik, T. J. (2012). Prolactin—not only lactotrophin. A “new” view of the “old” hormone. *J Physiol Pharmacol*, 63 (5), 435–443.
- Ishida, M., Mitsui, T., Yamakawa, K., Sugiyama, N., Takahashi, W., Shimura, H. y Arita, J. (2007). Involvement of cAMP response element-binding protein in the regulation of cell proliferation and the prolactin promoter of lactotrophs in primary culture. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism*, 293 (6), E1529 LP-E1537. Recuperado a partir de <http://ajpendo.physiology.org/content/293/6/E1529>.
- Li, Q.-Q., Shi, G.-X., Yang, J.-W., Li, Z.-X., Zhang, Z.-H., He, T. y Liu, C.-Z. (2015). Hippocampal cAMP/PKA/CREB is required for neuroprotective effect of acupuncture. *Physiology & Behavior*, 139, 482–490. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.12.001>
- Lopez de Armentia, M., Jancic, D., Olivares, R., Alarcon, J. M., Kandel, E. R. y Barco, A. (2007). cAMP Response Element-Binding Protein-Mediated Gene

- Expression Increases the Intrinsic Excitability of CA1 Pyramidal Neurons. *The Journal of Neuroscience*, 27 (50), 13909 LP-13918. Recuperado a partir de <http://www.jneurosci.org/content/27/50/13909.abstract>
- Mark, L. P., Prost, R. W., Ulmer, J. L., Smith, M. M., Daniels, D. L., Strottmann, J. M. y Hacein-Bey, L. (2001). Pictorial Review of Glutamate Excitotoxicity: Fundamental Concepts for Neuroimaging. *American Journal of Neuroradiology*, 22 (10), 1813–1824. Recuperado a partir de <http://www.ajnr.org/content/22/10/1813.short>
- Mehta, A., Prabhakar, M., Kumar, P., Deshmukh, R. y Sharma, P. L. (2013). Excitotoxicity: Bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. *European Journal of Pharmacology*, 698 (1), 6–18. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.10.032>
- Méndez, I., Cariño, C. y Díaz, L. (2005). La prolactina en el sistema inmunológico: aspectos de síntesis y efectos biológicos. *Revista de investigación clínica*, 57 (3), 447–456.
- Morales, T. (2011). Recent findings on neuroprotection against excitotoxicity in the hippocampus of female rats. *Journal of neuroendocrinology*, 23 (11), 994–1001.
- Nakai, M., Qin, Z., Chen, J., Wang, Y. y Chase, T. N. (2000). Kainic Acid-Induced Apoptosis in Rat Striatum Is Associated with Nuclear Factor-κB Activation. *Journal of neurochemistry*, 74 (2), 647–658.
- Nira, B. J., LaPensee, C. R. y LaPensee, E. W. (2008). What Can We Learn from Rodents about Prolactin in Humans? *Endocrine Reviews*, 29 (1), 1–41. <http://doi.org/10.1210/er.2007-0017>
- Noble, J. E. y Bailey, M. J. A. (2009). Chapter 8 Quantitation of Protein. En R. R. B. and M. P. D. B. T.-M. in *Enzymology. Guide to Protein Purification, 2nd Edition* (463) 73–95. Academic Press. [http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63008-1](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63008-1)
- Olney, J. W., Price, M. T., Samson, L. y Labruyere, J. (1986). The role of specific ions in glutamate neurotoxicity. *Neuroscience letters*, 65 (1), 65–71.
- Reem, G. H., Ray, D. W. y Davis. (1999). The human prolactin gene upstream

- promoter is regulated in lymphoid cells by activators of T-cells and by cAMP. *Journal of Molecular Endocrinology*, 22 (3), 285–292. <http://doi.org/10.1677/jme.0.0220285>
- Rivero-Segura, N. A., Flores-Soto, E., García de la Cadena, S., Coronado-Mares, I., Gomez-Verjan, J. C., Ferreira, D. G. y Cerbón, M. (2017). Prolactin-induced neuroprotection against glutamate excitotoxicity is mediated by the reduction of $[Ca^{2+}]_i$ overload and NF- κ B activation. *PLOS ONE*, 12 (5), e0176910. Recuperado a partir de <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176910>
- Tabuchi, A. (2008). Synaptic Plasticity-Regulated Gene Expression: a Key Event in the Long-Lasting Changes of Neuronal Function. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 31 (3), 327–335. <http://doi.org/10.1248/bpb.31.327>
- Tejadilla, D., Cerbón, M. y Morales, T. (2010). Prolactin reduces the damaging effects of excitotoxicity in the dorsal hippocampus of the female rat independently of ovarian hormones. *Neuroscience*, 169 (3), 1178–1185. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.05.074>
- Torner, L., Karg, S., Blume, A., Kandasamy, M., Kuhn, H.-G., Winkler, J. y Neumann, I. D. (2009). Prolactin Prevents Chronic Stress-Induced Decrease of Adult Hippocampal Neurogenesis and Promotes Neuronal Fate. *Journal of Neuroscience*, 29 (6), 1826–1833. <http://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3178-08.2009>
- Torner, L. y Neumann, I. D. (2002). The Brain Prolactin System: Involvement in Stress Response Adaptations in Lactation. *Stress*, 5 (4), 249–257. <http://doi.org/10.1080/1025389021000048638>
- Vanoye-Carlo, A., Morales, T., Ramos, E., Mendoza-Rodríguez, A. y Cerbón, M. (2008). Neuroprotective effects of lactation against kainic acid treatment in the dorsal hippocampus of the rat. *Hormones and Behavior*, 53 (1), 112–123. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.yhbeh.2007.09.004>
- Vergara-Castañeda, E., Grattan, D. R., Pasantes-Morales, H., Pérez-Domínguez, M., Cabrera-Reyes, E. A., Morales, T. y Cerbón, M. (2016). Prolactin mediates neuroprotection against excitotoxicity in primary cell cultures of hippocampal neurons via its receptor. *Brain research*, 1636, 193–199.

- Walker, T. L., Vukovic, J., Koudijs, M. M., Blackmore, D. G., Mackay, E. W., Sykes, A. M. y Bartlett, P. F. (2012). Prolactin Stimulates Precursor Cells in the Adult Mouse Hippocampus. *PLoS ONE*, 7 (9), e44371. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0044371>
- Wang, H. y Peng, R.-Y. (2016). Basic roles of key molecules connected with NMDAR signaling pathway on regulating learning and memory and synaptic plasticity. *Military Medical Research*, 3 (1), 26. <http://doi.org/10.1186/s40779-016-0095-0>
- Wang, Y., Han, R., Liang, Z.-Q., Wu, J.-C., Zhang, X.-D., Gu, Z.-L. y Qin, Z.-H. (2008). An autophagic mechanism is involved in apoptotic death of rat striatal neurons induced by the non-N-methyl-D-aspartate receptor agonist kainic acid. *Autophagy*, 4 (2), 214–226.
- Weiner, M. F. (2010). *Manual de enfermedad de Alzheimer y otras demencias*. Nageen Prakshan Pvt Ltd.
- Wise, P. M., Dubal, D. B., Wilson, M. E., Rau, S. W. y Liu, Y. (2001). Estrogens: trophic and protective factors in the adult brain. *Frontiers in neuroendocrinology*, 22 (1), 33–66. <http://doi.org/10.1006/frne.2000.0207>
- Xia, H., Gong, Z., Lian, Y., Zhou, J. y Wang, X. (2016). Gene Expression Profile Regulated by CREB in K562 Cell Line. *Transplantation Proceedings*, 48 (6), 2221–2234. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2016.04.023>
- Yu, X.-W., Oh, M. M. y Disterhoft, J. F. (2016). CREB, cellular excitability, and cognition: Implications for aging. *Behavioural Brain Research*, 1–6. <http://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.07.042>