UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

EFECTO DE E2 Y PROLAME SOBRE LA EXPRESIÓN DEL FACTOR NEUROTRÓFICO DERIVADO DEL CEREBRO EN UN MODELO ANIMAL DE MENOPAUSIA Y DEPRESIÓN

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A

JESSICA JOHANA FUENTES DÍAZ

TUTOR DE TESIS

OLIVIA TANIA HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ

Ciudad Universitaria, CD. MX. 2023

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

Índice

1. Agradecimientos…….. 4

2. *Resumen*……..…... 5
3. Antecedentes
3.1. Depresión
3.1.1. *Definición*…… 6
3.1.2. *Criterios diagnósticos*……... 6
3.1.3. *Prevalencia de la depresión*…… 7
3.1.4. *Tratamiento*…… 8
3.1.4.1. *Terapia de reemplazo con estrógenos*……... 9
3.2. *Neurobiología de la depresión*…….…... 10
3.2.1. *Estrés en el desarrollo del TDM*…….… 11
3.2.2. *Importancia del hipocampo en la patogenia del TDM*…….…... 12
3.2.3. Factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF)
3.2.3.1. *Síntesis de la proteína*…….……... 13
3.2.3.2. *Mecanismo de acción*…….……...… 15
3.2.4. *BDNF en el desarrollo del TDM*…….…….. 16
3.3. Modelos animales
3.3.1. *Modelo animal de depresión*……..…….… 18
3.3.2. Modelo animal de *menopausia*……..…….. 19
3.4. Estrógenos
3.4.1. *Síntesis de estrógenos*…….. 20
3.4.2. *Mecanismo de señalización*…….. 21
3.4.3. Estructura de los receptores a estrógenos..……..……... 22
3.4.4. Efecto antidepresivo de los estrógenos…….. 23
3.5. *17β-aminostrógenos*…….…….. 24

4. Planteamiento del problema……... 26

5. Hipótesis…….……... 26

6. Objetivos…….……... 26

7. Metodología
7.1. Diseño experimental…… 27
7.2. Animales…… 28
7.3. Ovariectomía…….. 29
7.4. Fármacos…….……... 29
7.5. Disección de cerebros…….. 29
7.6. Obtención de proteínas totales……... 30
7.7. Cuantificación de proteínas…… 30
7.8. Elaboración de concentrado de proteínas…… 31
7.9. Western blot……... 31

8. Resultados
8.1. Expresión de los precursores y de la forma madura de BDNF en el hipocampo…….. 32

8.2. Influencia de E2 y prolame sobre la expresión de preproBDNF, proBDNF y mBDNF en el DG…….. 34
8.3. Influencia de E2 y prolame sobre la expresión de preproBDNF, proBDNF y mBDNF en el CA3……..... 36

9. Discusión
9.1. Influencia del tiempo postovx sobre la expresión de las diferentes formas de BDNF…… 38
9.2. Influencia del tratamiento sobre la expresión de las diferentes formas de BDNF…… 40

10. Conclusiones…… 43

11. Apéndice (anexo)…….. 44

12. Referencias……..... 45

1. Agradecimientos

Con respeto y orgullo a la UNAM y a la Facultad de Química

Al *Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la Fuente Muñiz" (INPRFM)* por proporcionarme los materiales y las instalaciones bajo el proyecto institucional: NC143370.2

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por haberme otorgado una beca para la realización de este trabajo con clave del proyecto: 285181.

2. Resumen

La menopausia es la época de la vida de una mujer en la cual ocurre el cese de la menstruación y suele ocurrir naturalmente después de los 45 años. Estudios longitudinales muestran que las fluctuaciones de las hormonas ováricas que ocurren durante la transición menopaúsica se relacionan con el desarrollo del trastorno depresivo mayor (TDM). El uso de la terapia de restitución hormonal con estrógenos tiene beneficios sobre los síntomas relacionados con el estado de ánimo, estos beneficios dependen en gran medida de la edad a la que se administra el tratamiento, el tiempo de deprivación de estrógenos y el tipo de estrógenos a utilizar.

El *17β*- estradiol (E2), el estrógeno natural más potente y abundante del sexo femenino, produce efectos de tipo antidepresivo en la prueba de nado forzado (FST por sus siglas en inglés Forced Swimming Test) en varios modelos animales de roedores. Prolame, un estrógeno sintético que tiene acciones antitrombóticas también indujo efecto antidepresivo en ratas hembra adultas jóvenes ovariectomizadas (ovx).

El hipocampo es un componente importante del sistema límbico, es blanco de E2 y presenta una alta expresión de la proteína del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, por sus siglas en inglés: brain-derived neurotrophic factor). Los niveles séricos del BDNF se reducen en pacientes diagnosticados con TDM, lo que sugiere un papel en la fisiopatología de la depresión. Reportes de la literatura confirman que las acciones antidepresivas de E2 se relacionan con un incremento en la síntesis de BDNF cerebral y de su señalización a través del receptor TrkB. A la fecha, se desconoce en qué medida los efectos antidepresivos de prolame y E2 son mediados por la regulación del BDNF y sus precursores en el hipocampo.

El presente estudio tuvo por objetivo evaluar la expresión de las tres formas de BDNF (preproBDNF, proBDNF, mBDNF) en el cuerno de Ammon 3 (CA3) y el giro dentado (DG) del hipocampo, de ratas adultas jóvenes con 3 u 8 semanas después de realizarse la ovx, las cuales recibieron tratamiento subcrónico de E2 y prolame y fueron evaluadas en la FST. Nuestros resultados muestran un efecto diferencial de E2 y prolame que depende de la región del hipocampo y el tiempo postovx. Prolame, tiene un efecto mayor sobre la maduración de BDNF en la región del DG de ratas adultas jóvenes con 8 semanas postovx, mientras que E2 aumentó la expresión de mBDNF en la región del CA3 de ratas adultas jóvenes con 3 semanas postovx. Estos resultados muestran que, aunque conductualmente ambos estrógenos reducen la desesperanza en la FST, es posible que los mecanismos

moleculares mediante los cuales producen este efecto de tipo antidepresivo sean diferentes.

3. Antecedentes

3.1. Depresión

3.1.1. Definición

El trastorno depresivo mayor (TDM) es un trastorno del estado de ánimo frecuente que provoca síntomas graves que afectan cómo se siente la persona, cómo piensa y cómo maneja actividades diarias como dormir, comer o trabajar.

Las consecuencias de los síntomas pueden incluir: suicido, la incidencia y efectos adversos de enfermedades, la interrupción de las relaciones interpersonales, el abuso de sustancias y la pérdida de tiempo de trabajo (DSM-V).

La mayoría de los pacientes presentan una apariencia normal. En pacientes con síntomas más severos, se puede observar una disminución en el aseo y la higiene, así como un cambio en el peso. Los pacientes también pueden mostrar retraso psicomotor, aplanamiento o pérdida de reactividad en el afecto del paciente (es decir, expresión emocional) y agitación o inquietud psicomotora. (Halverson et al., 2020).

3.1.2. Criterios diagnósticos

Los criterios específicos del TDM referidos en el Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales V (DSM-5): al menos 5 de los siguientes síntomas deben haber estado presentes durante el mismo periodo de 2 semanas (y al menos 1 de los síntomas debe ser disminución del interés/placer o estado de ánimo deprimido):

- Estado de ánimo deprimido
- Disminución del interés o pérdida del placer en casi todas las actividades (anhedonia)
- Cambio significativo de peso o alteración del apetito
- Alteraciones del sueño (insomnio o hipersomnia)
- Agitación o retraso psicomotor
- Fatiga o pérdida de energía
- Sentimientos de inutilidad
- Disminución de la capacidad para pensar o concentrarse; indecisión
- Pensamientos recurrentes de muerte, ideación suicida recurrente sin un plan específico, o intento de suicidio o plan específico para suicidarse.

Los síntomas no son atribuibles a los efectos fisiológicos de una sustancia (ej. una droga de abuso, un medicamento) u otra condición médica.

Para diagnosticar el TDM existen instrumentos de detección de autoinforme o de uso exclusivo de los clínicos, entre los que se incluyen el Inventario de Depresión de Beck (BDI) y la Escala de Depresión de Hamilton (HDRS) respectivamente. La calificación de estos cuestionarios, junto con la apreciación del médico psiquiatra, dan soporte al diagnóstico y al pronóstico clínico.

El TDM es una enfermedad crónica y recurrente, que por su manejo complejo y a diferentes niveles terapéuticos, ocasiona recaídas que generan un costo alto en la calidad de vida de los pacientes, lo que sustenta su interés en la investigación de sus causas y tratamiento.

3.1.3. Prevalencia de la depresión

Los estudios epidemiológicos sugieren que existe una prevalencia aproximadamente del doble de padecer TDM entre las mujeres respecto a los hombres (Kessler et al., 2003). A su vez, entre personas con TDM, los episodios depresivos son más prolongados y recurrentes en mujeres que en hombres (Nolen-Hoeksema, 1987). De manera similar existe una mayor incidencia de los trastornos de ansiedad (ansiedad social, fobias, trastorno de estrés postraumático, trastorno de ansiedad general) en las mujeres en comparación con los hombres (Kessler et al., 1994; Breslau et al., 1995). Es muy frecuente que exista comorbilidad entre el TDM y alguna forma de ansiedad, lo que complejiza el tratamiento de la depresión. En conjunto, los hallazgos estadísticos sugieren mayor vulnerabilidad a la depresión en el sexo femenino.

La mayor vulnerabilidad de las mujeres a trastornos del estado de ánimo ocurre principalmente a partir de la pubertad y continúa hasta la mediana edad, lo que corresponde a la etapa reproductiva en mujeres (Kessler et.al.,1993) y la transición a la fase no reproductiva (Freeman et al., 2006). Por lo tanto, el riesgo de padecer depresión coincide con la aparición de fluctuaciones en los niveles de hormonas ováricas.

Aunque los factores genéticos, psicosociales y ambientales contribuyen claramente al riesgo de padecer TDM en un individuo, datos experimentales respaldan una influencia hormonal en la expresión de síntomas depresivos (Deecher et al., 2008).

Los cambios en el entorno hormonal afectan la susceptibilidad de una mujer a la depresión debido a las interacciones complejas entre las hormonas ováricas, neurotransmisores y receptores neurales. La investigación realizada por Woolley y colaboradores demostraron que las hormonas ováricas pueden alterar la plasticidad sináptica en ratas hembra a través

de la modulación de cambios en la excitabilidad neuronal (Woolley et al., 1990; Woolley y McEwen, 1993). Estos estudios han ayudado a comprender que la función neuronal es fluida y dinámica y está programada para responder a los cambios fisiológicos en las hormonas ováricas durante el período reproductivo, que se caracterizan por la liberación fásica de E2 y progesterona.

Como un ejemplo de la vulnerabilidad conferida por los cambios en las hormonas femeninas, en un subconjunto de mujeres, la capacidad de compensar las fluctuaciones de E2 y la disminución general de las hormonas ováricas, resulta en una mayor susceptibilidad a la depresión durante la transición a la menopausia (Soares y Zytek, 2008). Se cree que la aparición e intensidad de los síntomas vasomotores que ocurren durante la transición a la menopausia está directamente asociada con las fluctuaciones hormonales que se producen durante este período. Estos cambios hormonales contribuyen a la desregulación de los sistemas serotoninérgico y noradrenérgico involucrados en el estado de ánimo y el comportamiento (Rubinow et al., 1998; Barret-Connor et al., 1999).

Se ha propuesto la hipótesis de un efecto de encendido: las mujeres que experimentan un episodio depresivo durante una fase reproductiva (como el periodo premenstrual) podrían tener un mayor riesgo de desarrollar futuros episodios depresivos cuando enfrenten situaciones hormonales difíciles (Bloch et al., 2005; Stewart y Boydell, 1993). Sin embargo, la evidencia indica que el riesgo de desarrollar síntomas depresivos es mayor durante el periodo perimenopáusico o posmenopáusico en relación con la premenopausia (Bromberger et al.,2007, 2011; Freeman et al., 2006), incluso en ausencia de antecedentes de depresión (Cohen et al., 2006).

El proyecto de Salud de la Mujer en la Edad Media de Melbourne (MWMHP, por sus siglas en inglés) mostró que los cambios en los niveles de E2 o FSH se asocian significativamente con los síntomas depresivos (Ryan et al., 2009). Estos estudios sugieren que los trastornos del estado de ánimo que ocurren durante la transición menopáusica son causados por cambios en las hormonas ováricas (abstinencia o fluctuaciones) en lugar de una deficiencia prolongada de esteroides ováricos (Schmidt y Rubinow, 2009).

3.1.4. Tratamiento

En todas las poblaciones de pacientes, la combinación de medicación y psicoterapia generalmente proporciona la respuesta más rápida y sostenida.

Los medicamentos utilizados para el tratamiento de la depresión incluyen los siguientes:

- Inhibidores de la recaptura de serotonina (ISRS)

- Inhibidores de la recaptura de serotonina/norepinefrina (IRSN)
- Antidepresivos atípicos
- Antidepresivos tricíclicos (ATC)
- Inhibidores de la monoamino oxidasa (IMAO)
- Antagonistas de los receptores a N-metil-D-aspartato (NMDA)
- inhibidores de la recaptura de norepinefrina-dopamina (NDRI)

Dadas las características de la depresión femenina, el uso de la terapia con agentes hormonales también está indicada como coadyuvante para síntomas somáticos y psiquiátricos directamente relacionados con la supresión hormonal endógena. Para los pacientes con resistencia al tratamiento farmacológico existen opciones como la estimulación magnética transcraneal y la terapia electroconvulsiva, que se administran estrictamente en instalaciones clínicas.

3.1.4.1 Terapia de reemplazo con estrógenos (TRE)

Rasgon y colegas encontraron que las pacientes perimenopáusicas deprimidas, la administración durante 8 semanas de E2 mostraron una mejoría clínica medida por las puntuaciones de la HDRS, y que la administración de E2 puede aumentar la respuesta a los antidepresivos en pacientes que no habían respondido de manera favorable a los mismos (Rasgon et al., 2002). La adición de E2 a tratamientos antidepresivos también ha sido evaluada en otros estudios; por ejemplo, Morgan y colegas demostraron que la administración conjunta de 0.625 mg/día de E2 y un antidepresivo que tomaban mujeres entre los 40 y 60 años con diagnóstico previo de TDM, produjó una remisión de los síntomas de acuerdo con la HDRS (Morgan et al., 2005).Adicional a ello, se encontró que la administración de E2 solo o en combinación con un ISRS, fluvoxavina, disminuyó significativamente las puntuaciones de depresión autoevaluadas entre mujeres ooforectomizadas con síntomas depresivos (Nagata et al., 2005).

Actualmente la TRE es un tratamiento eficaz para los síntomas vasomotores y el síndrome genitourinario de la menopausia y se ha demostrado que previene la pérdida ósea y las fracturas; a menudo se agrega un progestágeno para proporcionar protección endometrial en mujeres con útero intacto. Datos recientes apoyan la idea de que cuando la TRE se inicia antes de los 60 años o dentro de los 10 años del inicio de la menopausia, la TRE tiene una relación beneficio/riesgo más favorable, pues reduce la mortalidad, el riesgo de enfermedad

coronaria, osteoporosis y demencia (Langer et al., 2021), periodo que se considera como ventana de oportunidad terapéutica.

3.2. Neurobiología de la depresión

La fisiopatología del TDM no se ha dilucidado por completo. La investigación ha implicado varios mecanismos alterados, incluidos los sistemas serotoninérgicos, noradrenérgicos, dopaminérgicos y glutamatérgicos, aumento de la inflamación, anomalías en el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA), cambios vasculares y disminución de la neurogénesis y neuroplasticidad. Sin embargo, estos hallazgos no están presentes en todos los pacientes, y los tratamientos que se dirigen directamente a esos mecanismos solo se han explorado parcialmente. El TDM es un trastorno extremadamente complejo, con varias etiologías, como son factores genéticos, epigéneticos y ambientales, que en conjunto conducen al desarrollo del trastorno (Dean y Keshavan, 2017).

Una hipótesis importante para la fisiopatología de la depresión es la hipótesis monoaminérgica, la cual postula que la depresión es causada por una alteración en los niveles de una o más de las monoaminas, incluidas la serotonina (5-HT), la norepinefrina (NE) y la dopamina (DA). La teoría surgió a partir de un hallazgo farmacológico durante la investigación con reserpina, la cual provocó depleción de monoaminas y en consecuencia se presentó TDM en pacientes que no padecían la enfermedad antes del tratamiento con reserpina. Esta hipótesis fue respaldada por el hallazgo de que los ATC y los IMAO provocan el aumento a corto plazo de las concentraciones sinápticas de monoaminas revirtiendo así algunos signos y síntomas del TDM (Celada, 1993; Baker et al., 1992).

El agotamiento de triptófano, un aminoácido esencial para la síntesis de 5-HT, induce síntomas depresivos en pacientes tratados con antidepresivos, aunque la depleción de triptófano no produjo un empeoramiento transitorio de los síntomas en pacientes deprimidos no tratados. Estos hallazgos indican que los niveles elevados de 5-HT son necesarios para los efectos de la medicación antidepresiva, aunque el agotamiento de la 5-HT por sí solo puede no ser suficiente para causar síntomas depresivos (Bell et al., 2001), lo que apoya la idea de una etiología multifactorial.

La NE también está involucrada en la regulación del estado de ánimo, como lo demuestra el hecho de que los medicamentos que inhiben la recaptura de NE, como los TCA, los IRSN, los NDRI y los que aumentan la secreción de NE, como la mirtazapina, son antidepresivos efectivos (Leonard, 2001). El papel de la NE es relevante para el sistema de alerta y la cognición. Los tratamientos antidepresivos que modulan a este neurotransmisor mejoran el

aprendizaje, la memoria y regulan el arousal en pacientes deprimidos, a través de una mejoría en la plasticidad neuronal y en la regulación del estrés.

Una vía encargada de la recompensa y la motivación es la vía mesolímbica, que consta de neuronas dopaminérgicas que se originan en el área tegmental ventral y se proyectan hacia el núcleo accumbens. Los agentes antidepresivos como el bupropión aumentan los niveles de DA en el cerebro proporcionando evidencia indirecta del papel de la DA en la regulación del estado de ánimo (Watt y Panksepp, 2009). Se ha demostrado que el estrés crónico provoca cambios neuroadaptativos en la vía mesolímbica dopaminérgica, y que estos cambios están implicados en la expresión alterada del BDNF y la neuroplasticidad (Nestler y Carlezon, 2006). Además de su conexión con el núcleo accumbens, las fibras dopaminérgicas inervan la corteza prefrontal (vía mesocorticolímbica), que participan en el control cognitivo través de regular la actividad de la amígdala y el hipocampo, y en las funciones ejecutivas del más alto nivel.

3.2.1. Estrés en el desarrollo del TDM

El estrés y el TDM están relacionados. Como evidencia se ha asociado que los eventos estresantes de la vida pueden precipitar episodios depresivos en personas vulnerables (Kendler et al.,1999) o que el estrés infantil en forma de abuso o negligencia aumenta el riesgo de padecer TDM en la vida adulta (Pechtel y Pizzagalli, 2011).

En roedores, el estrés crónico reduce transitoriamente el número de espinas dendríticas y ramas de las neuronas piramidales en CA3 (Conrad et al., 1999) y suprime la producción de nuevas neuronas granulares en la región del DG del hipocampo (Schoenfeld y Gould, 2012).

La FST, expone a los roedores a un estresor que estimula la activación del sistema nervioso simpático y el eje HHA (Kloet y Molendijk, 2016). Un estudio realizado por Freudenberg en ratones, demostró que la exposición de dos días a la FST da como resultado una reducción de los niveles de PSD-95, proteína que interactúa con los receptores AMPA (Freudenberg F., 2019). Wang y colaboradores mostraron resultados similares en ratas (Wang et al., 2015). Además, Estrada-Camarena y colaboradores comprobaron que el estrés agudo inducido por la FST en ratas hembra reduce la supervivencia de las células del hipocampo, además de aumentar los niveles de corticosterona en suero (Vega-Rivera et al., 2014). Estos estudios demuestran que la exposición a un estresor como lo es la inmersión en agua reduce la plasticidad neuronal en roedores.

Estudios en roedores, a los cuales se les extirpan los ovarios, demuestran un aumento de la inmovilidad en la FST que se revierte con el reemplazo de E2 (Bekku y Yoshimura, 2005). Estos fenotipos conductuales en animales también se acompañan de reducción en la neurogénesis (Galea et al., 2001, Green y Galea, 2008). Se ha demostrado que las fluctuaciones normales de E2 durante el ciclo estral en ratas provocan fluctuaciones en las espinas dendríticas (Woolley et al.,1990), así como en la densidad de la sinapsis en el hipocampo (Woolley y McEwen, 1993).

Diversas líneas de estudio se han enfocado en el papel del E2 en la generación de nuevas espinas dendríticas, tal es el caso de Hojo y colaboradores, los cuales demostraron que E2 induce un rápido aumento de las espinas dendríticas en las neuronas granulares de la región del DG (Hojo Y. et al., 2015). Así mismo, se ha encontrado que, en cultivos de neuronas de rata, el E2 produce un aumento del doble en la densidad de las espinas dendríticas (Segal y Murphy, 2001). Claramente, el E2 tiene un efecto sobre la expresión de las espinas dendríticas que puede estar relacionado con sus funciones en el hipocampo.

3.2.2. Importancia del hipocampo en la patogenia del TDM

El hipocampo deriva de la región medial del telencéfalo, forma parte del sistema límbico y tiene un papel importante en la adquisición del aprendizaje espacial y la consolidación de la memoria a largo y corto plazo. Anatómicamente, está organizado en el cuerno de Amón y el giro dentado; el complejo subicular, formado por el presubiculum, el subiculum y el parasubiculum; y la corteza entorrinal (Amaral et al., 1989; Lavenex et al., 2007). El cuerno de Amón está dividido en tres áreas: CA1, CA2 y CA3.

Se ha informado que el hipocampo dorsal es responsable del procesamiento cognitivo, como el aprendizaje espacial (Kim y Fanselow, 1992; Moser et al., 1993, 1995; McHugh et al., 2011; Bannerman et al., 2014), mientras que el hipocampo ventral está involucrado en el procesamiento emocional, como la ansiedad (Bannerman et al., 2003, 2004, 2014; McHugh et al., 2011). Se ha observado que la exposición al estrés crónico produce una disminución de la depresión a largo plazo (LTD) en el hipocampo ventral pero no en el dorsal, lo que revela un impacto del estrés crónico en esta región (Pinto et al., 2015).

Existe evidencia que indica que los pacientes deprimidos no tratados con antidepresivos tienen menor volumen hipocampal, número de células neuronales y gliales y tamaño celular reducido en comparación con controles sanos (Czéh et al., 2006). Adicionalmente, el grado de pérdida del volumen de materia gris del hipocampo está relacionada con la cronicidad

del paciente con TDM (Sheline et al., 1996; Roddy et al., 2019) y un volumen reducido del hipocampo se asocia con peores puntajes de depresión.

Estudios en roedores han proporcionado evidencia de que la baja tasa de neurogénesis provoca síntomas tipo depresivos en roedores (Wang et al., 2015; Revest et al., 2009). Otras líneas de investigación encuentran que la baja tasa de neurogénesis no es suficiente para inducir un fenotipo depresivo (Petrik et al., 2012). Sin embargo, la mayoría de los estudios coinciden en que la neurogénesis es esencial para observar los efectos conductuales de los antidepresivos (Santarelli et al., 2003; Hill et al., 2015). De hecho, la incapacidad de producir más neuronas parece hacer vulnerable al individuo a los efectos epigéneticos del estrés crónico y, posteriormente, al desarrollo de un fenotipo depresivo (Niklison-Chirou et al., 2020).

Un proceso involucrado en la pérdida neuronal es la disminución del BDNF, dado su papel en la maduración y diferenciación neuronal (Waterhouse et al., 2012) así como sus efectos neuroprotectores (Li et al., 2020), los bajos niveles de BDNF en el cerebro pueden afectar la viabilidad neuronal en el TDM.

3.2.3 Factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF)

3.2.3.1 Síntesis de la proteína

El BDNF es una proteína de señalización extracelular conocida por su papel predominante en el desarrollo del sistema nervioso, neurogénesis, neuroprotección, neurodegeneración (Mattson et al., 2004), plasticidad sináptica (Murray y Holmes, 2011) y resistencia al estrés neuronal (Marosi y Mattson, 2014). Su papel es fundamental en los mecanismos de aprendizaje y memoria (Bekinschtein et al., 2008). En el cerebro adulto, el BDNF promueve la regeneración de las neuronas sensoriales adultas (Lindsay, 1988), las células ganglionares de la retina (Thanos et al., 1989) y neuronas colinérgicas del prosencéfalo basal (Knusel et al., 1992; Morse et al., 1993) después de una lesión; así como la potenciación a largo plazo (LTP) en el hipocampo y otras regiones del cerebro.

El gen de BDNF tiene al menos 9 promotores distintos (Figura 1 A y B) que inician la transcripción de varios transcritos de ARNm, cada uno de los cuales contiene uno de los *ocho exones 5' no codificantes empalmados a un exón codificador 3' común (IX), que* codifica la secuencia pro-BDNF más un 3´UTR largo o corto (Figura 1C) (Aid et al. 2007).

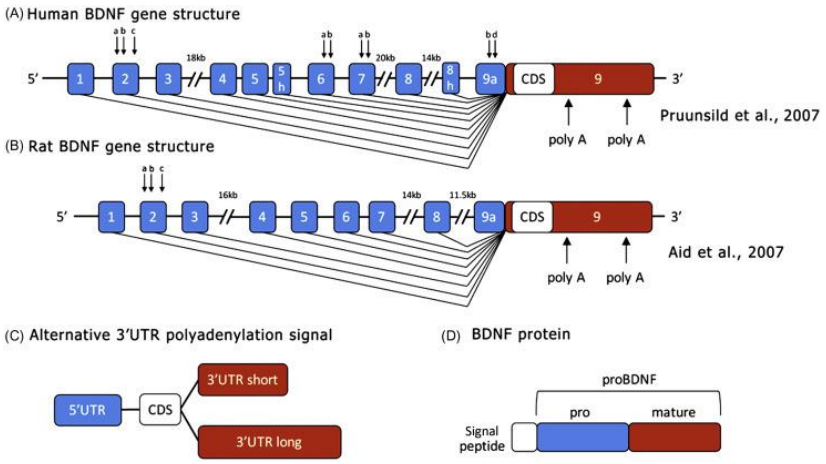

Figura 1. Esquema de la producción de transcritos del gen BDNF. La transcripción se inicia a partir de promotores que se encuentran hacia 5´- UTR individuales y se empalman con el exón IX de codificación común. Imagen tomada de Giannotti et al., 2017.

La síntesis y maduración de BDNF es un proceso de varias etapas que implica la formación de varias isoformas precursoras. La proteína BDNF se sintetiza y se pliega en el retículo endoplásmico como una forma precursora, preproBDNF (Foltran y Díaz 2016; Lu 2003). Tras la translocación al aparato de Golgi, la secuencia señal de la región previa se escinde, lo que da como resultado la formación de la isoforma precursora de proneutrofina de BDNF (proBDNF) de 32 kDa. Esta proteína consta de un pro-dominio N-terminal que facilita el tráfico intracelular y la secreción regulada además de un dominio C-terminal maduro (Mowla et al. 2001). El pro-BDNF intracelular puede tener tres destinos diferentes: 1) escisión intracelular y liberación de BDNF maduro (mBDNF; por sus siglas en inglés: mature brain-derived neurotrophic factor) (14 kDa); 2) secreción como pro-BDNF y escisión extracelular, o 3) secreción como pro-BDNF sin más modificaciones. La escisión proteolítica intracelular de pro-BDNF puede ocurrir en la red trans-Golgi por furina, para ser liberada constitutivamente, o en vesículas secretoras intracelulares por convertasas (p. ej. PC1) en la vía secretora regulada (Lu et al., 2005). El pro-BDNF también se puede escindir extracelularmente mediante una serina proteasa llamada plasmina que depende del activador tisular de plasminógeno (tPA) (Pang et al. 2004) y de las metaloproteasas de matriz 2 y 9 (Hwang et al. 2005).

En las células neuronales, tanto el pro-BDNF como el m-BDNF se liberan después de la despolarización de la membrana celular (Conner et al., 1997; Dieni et al., 2012). La proporción de pro-BDNF a m-BDNF varía entre etapas particulares del desarrollo cerebral y entre regiones. Se ha propuesto que m-BDNF y pro-BDNF existen en equilibrio y que la

interrupción del equilibrio contribuye potencialmente al desarrollo de la depresión. (Lu et al.,2005).

3.2.3.2 Mecanismo de acción

Las isoformas de BDNF interactúan con diferentes tipos de receptores; el pro-dominio de pro-BDNF interactúa con el receptor de sortilina, mientras que su dominio maduro, se une con el receptor de neutrofina p75 (p75NTR). El complejo de unión pro-BDNF/p75NTR/sortilina inicia una cascada de señalización que induce la activación de la cinasa amino terminal c-jun (JNK), el miembro A de la familia de genes homólogos de ras (RhoA) y el factor nuclear kappa B (NF-kB), lo que promueve procesos que conducen al desarrollo y supervivencia neuronal, pero también a la muerte celular programada (Figura 2, lado izquierdo). Por otro lado, la isoforma m-BDNF al unirse al receptor de tirosina cinasa (TrkB) inicia la dimerización y autofosforilación en los residuos de tirosina (Kaplan y Miller, 2000), que activa varias enzimas: vía fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K), proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) y fosfolipasa C (PLC-*γ). Las vías de señalización de* mBDNF-TrkB regulan múltiples eventos, como la apoptosis y la supervivencia de las neuronas, el crecimiento dendrítico, la maduración, el desarrollo de sinapsis, plasticidad sináptica dependiente de procesos de aprendizaje y memoria (Figura 2, lado derecho). De forma interesante, los receptores acoplados a proteínas G (GPCR) pueden regular la cascada de tirosina-cinasa aumentando la fosforilación de tirosina de las proteínas adaptadoras (Luttrell et al.,1999). De acuerdo con este mecanismo de señalización, la activación de GPCR puede promover la transactivación de los receptores TrkB en las neuronas del hipocampo desprovistas de BDNF (Lee y Chao,2001).

Aunque los receptores Trk se caracterizaron en un principio como "receptores de alta afinidad", más tarde se demostró que la unión de BDNF a TrkB es de baja afinidad y puede incrementarse mediante homodimerización de TrkB o asociación con p75 NTR (Chao, 2003). En reposo, ambos tipos de receptores tanto TrkB como p75NTR, se encuentran en la membrana de las vesículas intracelulares. La estimulación con Ca^{2+}, adenosín monofosfato cíclico (AMPc) o un impulso eléctrico inicia su transferencia y fusión con la membrana celular (Du et al., 2000, Meyer-Franke et al., 1998).

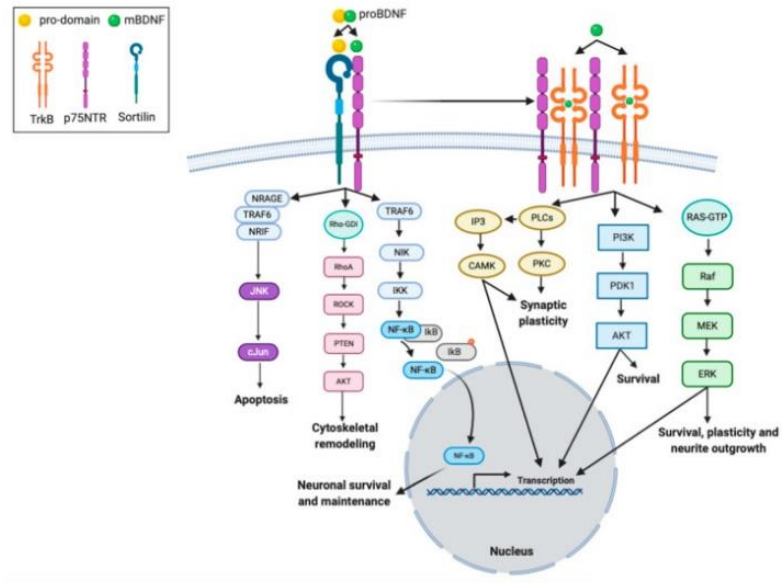

Figura 2. Cascadas de señalización intracelular activada por la interacción de isoformas de BDNF con sus receptores. Imagen tomada de Colucci-D'Amato et al., 2020

3.2.4. BDNF en el desarrollo del TDM

Varios estudios preclínicos en roedores demuestran que el DG es un componente esencial del circuito neural que media la respuesta antidepresiva. El tratamiento crónico con la mayoría de los antidepresivos (incluidos los ISRS) estimula la neurogénesis adulta en DG (Malberg et al., 2000, Wang et al., 2008). Además, las infusiones de BDNF en DG producen una respuesta conductual similar a la de los antidepresivos (Ganea et al., 2012, Shirayama et al., 2002). Adicionalmente se ha incluido el papel de CA3 en la acción antidepresiva; por ejemplo, se encontró una mejoría en la expresión de BDNF y una supresión de la apoptosis en neuronas de CA3 y CA1 con la inhibición del gen del receptor a prolactina (PRLR) en ratones con signos de depresión inducidos por estrés crónico moderado (CUMS, por sus siglas en inglés chronic mild stress) (Tian et al., 2019). Además, la administración de *benzoato de 17 β*-estradiol a ratas ovx sometidas a estrés, aumentó la proteina BDNF en CA3, (Franklin et al., 2006). En conjunto estos estudios demuestran que las regiones del DG y CA3 juegan un papel importante en el desarrollo del TDM. Además, los niveles de proteína BDNF son más altos en la proyección glutamatérgica de las células granulares de DG al hilio y el área CA3 (Conner et al., 1997; Yan et al., 1997).

Se ha demostrado que la fluoxetina aumenta la expresión del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de BDNF en la corteza prefrontal, el DG del hipocampo, el área tegmental ventral y el núcleo accumbens, zonas responsables del control cognitivo, el aprendizaje y la memoria, así como del circuito de recompensa que se relaciona con el desarrollo de la

anhedonia (Molteni et al.,2006). Los hallazgos de que la neurogénesis y la neuroplasticidad están involucradas en la respuesta antidepresiva han llevado a sugerir una hipótesis de las redes neuroplásticas en la depresión. Dado que el BDNF es un factor neurotrófico dependiente de la actividad, la hipótesis sugiere que los antidepresivos restablecen la neuroplasticidad en individuos deprimidos produciendo mejoría en su función neural y eventualmente favoreciendo su recuperación. Se propone que las monoaminas participan mediante el aumento en la plasticidad de las redes límbicas y corticales disfuncionales que permiten que un individuo se adapte a su entorno (Castrén, 2013).

mBDNF y proBDNF producen efectos opuestos en una variedad de procesos celulares (Lu et al., 2005). Por lo tanto, es probable que el equilibrio dinámico del sistema mBDNF-proBDNF desempeñe un papel en la regulación de la estructura y función del hipocampo y en el resultado neto de la conducta.

Estudios recientes han sugerido que la expresión de mBDNF está regulada negativamente mientras que proBDNF está expresado positivamente en pacientes con TDM y modelos animales de depresión inducida por estrés crónico. (Jiang et al., 2017; Yang et al., 2017; Zhao et al., 2017). Estos hallazgos indican que tanto mBDNF como el proBDNF pueden tener un papel funcional en la fisiopatología de los trastornos psiquiátricos, y la conversión de proBDNF en mBDNF podría estar regulada de manera anómala en condiciones de estrés.

El modelo CUMS dio como resultado un aumento en los niveles de proBDNF en cerebros de ratones, lo que coincide con lo reportado por Zhou y colaboradores (2013), quienes encontraron un aumento en los niveles séricos de proBDNF, sortilina y P75NTR en pacientes con TDM. La administración de fluoxetina a estos ratones revirtió el aumento de proBDNF inducido por CUMS, adicionalmente se demostró que CUMS elevaba los niveles de proBDNF, p75NTR y sortilina pero disminuye la expresión de TrkB en el CA3 del hipocampo (Bai et al., 2016). El estrés crónico puede causar disminución en la expresión de mBDNF en el hipocampo (McEwen et al., 2016) además de una reducción de TrkB (Bai et al., 2016), lo que sugiere que la señalización mBDNF/TrkB está alterada en el TDM; al respecto se ha demostrado que la infusión del inhibidor de TrkB de amplio espectro, K252a, bloquea los efectos de los antidepresivos, lo que sugiere que la señalización de mBDNF-TrkB es fundamental para la acción terapéutica de los antidepresivos (Shirayama et al., 2002).

La administración de corticosterona (CORT) a ratones durante 4 semanas (modelo de depresión) demostró una regulación al alza de proBDNF en hipocampo (Lin et al., 2022), lo

que es consistente con otros estudios en donde han encontrado un aumento de proBDNF, una disminución en los niveles de mBDNF y una relación mBDNF/proBDNF disminuida en el DG ventral de ratas después de la administración de 3 semanas de CORT en ratas (Li et al., 2019).

Lin y colaboradores (2022) encontraron que los niveles de proBDNF en cerebelo e hipotálamo se correlacionaron con puntuaciones de comportamiento similares a la ansiedad y la depresión, lo que indica que a mayores niveles de proBDNF, más evidente es la anomalía del estado de ánimo en ratones. Esto que sugiere que el proBDNF puede ser un factor en el endofenotipo del TDM modelado por estrés.

El estado hormonal puede influir en la expresión de mBDNF y/o de TrkB. Miranda y colaboradores, reportaron que las neuronas sintetizadoras de BDNF se encuentran co-localizadas con los receptores a estrógenos (RE) en el cerebro anterior (Miranda y Sohrabji, 1993). Así mismo, Gibbs demostró que en ratas hembra adultas gonadalmente intactas había fluctuaciones en los niveles de ARNm de BDNF en las regiones CA1, CA3 y CA4 del hipocampo a lo largo del ciclo estral (Gibbs, 1998). Además, los estudios en el hipocampo de rata hembra mostraron que la ovariectomía (ovx) disminuye los niveles de ARNm de BDNF (Singh et al.,1995).

Se sabe que E2 puede regular la transcripción de BDNF en el sistema nervioso debido a la presencia de un ERE canónico presente en el gen que codifica esta neurotrofina (Sohrabji et al., 1995). Además, existe una correlación entre las vías de transducción de señales y los factores implicados en los efectos del E2 y el mBDNF que parecen compartirse. Estos incluyen: la vía MAPK (Yamada et al., 2003; Singh et al., 1999), la vía PI3-K (Znamensky et al., 2003; Mizuno et al., 2003), Src/Fyn (Bi et al., 2000), Ca^{2+}/proteína cinasa II dependiente de calmodulina (CaMKII) (Sawai et al., 2002; Blanquet et al.,2003), y CREB (Ernfors y Bramham et al., 2003; McEwen, 2001).

3.3. Modelos animales

3.3.1 Modelo animal de depresión.

Prueba de nado forzado (FST)

El paradigma FST fue establecido originalmente por Porsolt y colegas en 1977. La prueba se basa en la observación de que los roedores, cuando se les obliga a nadar en un espacio restringido (usualmente un cilindro de vidrio) del que no pueden escapar, finalmente cesarán los intentos aparentes de escapar y quedarán inmóviles, aparte de realizar

únicamente los movimientos necesarios para mantener la cabeza fuera del agua. La inmovilidad es una característica conductual fácilmente identificable, que refleja un estado de desesperanza y abandono ante una situación apremiante. Este paradigma tiene un fundamento similar al del paradigma de desesperanza aprendida, donde un solo evento de estrés agudo desencadena el déficit de la conducta que se acompaña por cambios neuroquímicos, celulares y moleculares similares a los experimentos por los pacientes deprimidos.

La conducta de desesperanza en la FST es la variable dependiente más importante en términos de que es disminuida por una variedad de agentes que son terapéuticamente efectivos en la depresión, así como por terapias antidepresivas no farmacológicas, tales como la estimulación magnética transcraneal y la terapia electroconvulsiva. En contraparte, fármacos como los antipsicóticos no producen reducción de la inmovilidad, en concordancia con su incapacidad de producir efectos antidepresivos. La FST se ha utilizado para probar el potencial antidepresivo de los fármacos durante décadas (Porsolt et al., 1977), que incluyen las hormonas esteroidales tales como los estrógenos (Lemini et al., 2013, 2016, Estrada- Camarena et al., 2004, 2008, Hernández-Hernández et al., 2022). La FST también es sensible a variables como el sexo, la edad, y la condición endocrina de los roedores, que afectan los niveles de inmovilidad.

Detke y colaboradores (1995) demostraron que los antidepresivos que inhiben la captación de NE o 5-HT en la FST producen distintos patrones de conductas activas, es decir, aquellas conductas que denotan esfuerzo o motivación para escapar del cilindro. Los inhibidores de NE como lo son la desipramina y maprotilina aumentan selectivamente la conducta de escalamiento, mientras que los ISRS como fluoxetina, sertralina y paroxetina aumentan selectivamente la natación (Detke et al., 1995). Esta característica se ha utilizado a nivel experimental para conocer el mecanismo de acción primario de fármacos nuevos, a nivel de regulación de las monoaminas.

3.3.2 Modelo animal de menopausia

Ovariectomia (ovx)

El uso de la ovx, es decir, la extirpación de ambos ovarios es el estándar de oro en el campo preclínico para evaluar los efectos de las hormonas gonadales en modelos animales. Por lo general, en este modelo quirúrgico de la menopausia, la extirpación bilateral de los ovarios se produce en animales sanos jóvenes que son reproductivamente competentes

(Brinton, 2005). Las intervenciones experimentales comienzan una vez que el E2 ha alcanzado un nivel bajo o no detectable en plasma, lo que generalmente ocurre dentro de 1 a 2 semanas; o bien inmediatamente después de la cirugía. La ovx modela con mayor precisión la menopausia quirúrgica en mujeres y es un modelo ideal para evaluar los efectos de la privación de hormonas gonadales y posterior tratamiento con hormonas exógenas en el cerebro y la periferia (Lemini et al., 2013; 2016; Estrada-Camarena et al., 2004; 2008; Hernández-Hernández et al., 2022). Si bien la extirpación de los ovarios permite a los investigadores el control para evaluar el impacto de hormonas particulares sin que el envejecimiento sea un factor de confusión, la edad a la que ocurre la ovx en roedores también puede resultar en efectos divergentes (Chakraborty y Gore., 2004; Diz-Chaves et al., 2012; Hernández-Hernández, et al., 2022).

3.4. Estrógenos

3.4.1 Síntesis de estrógenos

La síntesis de estrógenos en la mujer inicia en la pubertad, se vuelve irregular en la transición a la menopausia y disminuye dramáticamente en el periodo posmenopáusico. Hay tres formas principales de estrógenos fisiológicos en las mujeres: estrona (E1), E2 y estriol (E3). E2 es el principal producto de todo el proceso de biosíntesis y es el estrógeno más potente durante el periodo premenopáusico (Cui et al., 2013).

El principal sustrato para la biosíntesis de hormonas esteroides es el colesterol de la dieta, (Carr et al., 1982), el cual es convertido en hormonas esteroides de 21 carbonos (pregnanos, progestágenos), 19 carbonos (androstanos) y 18 carbonos (estranos).

La síntesis de estrógenos comienza con la translocación del colesterol en la membrana mitocondrial interna, se desconoce el mecanismo preciso por el cual el colesterol se transporta a la mitocondria; sin embargo, se cree que la proteína reguladora aguda esteroidogénica (StAR) actúa como una enzima transportadora (Miller, 2011; Stocco, 2001, Miller y Strauss, 1999). La expresión de StAR está controlada por un mecanismo que implica la unión de la LH a su receptor. En la membrana mitocondrial interna, el colesterol se convierte en pregnenolona (Belfiore et al.,1994). La pregnenolona actúa como precursor de todas las hormonas esteroides. Esta hormona puede difundir entre las células de la granulosa adyacentes y las células de la teca. La pregnenolona continua la conversión a androstenediona por las enzimas CYP17A1 (esteroide 17-*α*-hidroxilasa/17,20-*liasa) y 3β*-HSD *(3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa/Δ 5−4* isomerasa), vía dehidroepiandrosterona (DHEA) o bien la pregnenolona se puede convertir en progesterona que actúa como

precursor para la producción de androstenediona. La androstenediona puede convertirse en otros andrógenos, como testosterona y dihidrotestosterona, o difundir a las células de la granulosa a través de la lámina basal. En las células de la granulosa, la androstenediona se convierte en estrona mediante la enzima CYP19A1 (también conocida como aromatasa). *Luego, la estrona se convierte en estradiol por la enzima 17β-HSD (17β*-hidroxiesteroide deshidrogenasa); o bien, la testosterona que puede sintetizarse en las células de la granulosa o difundir desde las células de la teca, puede convertirse en estradiol mediante la enzima aromatasa. En las células de la granulosa, la expresión tanto de la aromatasa *como de la 17β*-HSD está controlada por la estimulación de la hormona foliculoestimulante (FSH) (Fuentes y Silveyra, 2019).

3.4.2 Mecanismo de señalización

La señalización de estrógenos está mediada principalmente por los receptores a estrógenos (RE) nucleares. Existen dos subtipos de RE, *el receptor a estrógenos alfa (REα) y el receptor a estrógenos beta (REβ), que actúan como factores de* transcripción de genes blanco. Los efectos de E2 también son mediados por receptores membranales como GPR30 (Maggiolini y Picard 2010; Levin 2009). Este tipo de receptores traducen las señales de E2 en una gran variedad de respuestas fisiológicas en varios órganos, los RE nucleares inician eventos biológicos, en horas o incluso días, mientras que los RE de membrana celular desencadenan una respuesta rápida en segundos (Roepke, et al., 2011)

Los RE nucleares son miembros de una super familia de factores de transcripción nucleares, que se caracterizan por la presencia de un dominio de unión al ADN que dirige al receptor a un elemento de respuesta a estrógenos (ERE). Todos los receptores de esteroides poseen un dominio de unión al ligando que, cuando está ocupado, produce un cambio conformacional que induce la dimerización del receptor (Le Dily y Beato., 2018). *Los RE activados forman homodímeros (ERα/ERα, ERβ/ERβ) o heterodímeros (ERα/ERβ)* que se translocan al núcleo, donde se unen a la cromatina en las secuencias ERE y/o las regiones 3´no traducidas (UTR) de los genes blanco (Klinge, 2001). Es importante reconocer que la composición de la secuencia intrínseca de los ERE puede alterar la afinidad del RE para unirse al ADN (Fuentes y Silveyra., 2019).

El E2 también puede regular la transcripción de varios genes que no contienen ERE en sus regiones promotoras, sin unión directa de los RE al ADN. En estos genes, los mecanismos por los cuales el E2 afecta *la expresión génica se conocen como "diafonía transcripcional"*. En estos mecanismos transcripcionales, los complejos de RE actúan a través de

interacciones proteína-proteína con otros factores de transcripción (Aranda y Pascual., 2001), los cuales se encuentran unidos a sus propios sitios de reconocimiento de ADN (Bjornstrom et al.,2005). Entre estos factores de transcripción se encuentran: a) la proteína específica 1 (Sp-1), la cual se une a regiones promotoras con sitios ricos en guanina y citosina (Bajic et al, 2003; O´Lone et al., 2004); b) la proteína activadora 1 (AP-1) (Gaub et al. 1990), la cual regula procesos celulares como la diferenciación celular, la proliferación y la apoptosis; c) el factor nuclear kB (NF-kB) y d) c-jun (Gottsch et al, 2009)

Un fenómeno interesante observado en muchas células es que los RE pueden activarse en ausencia de E2 u otros agonistas de los receptores (Bennesch y Picard., 2015). Esta activación de los RE es independiente del ligando y se desencadena principalmente por la fosforilación de residuos específicos (p. ej., serina y tirosina) en los propios receptores. Este mecanismo independiente requiere la acción de moléculas reguladoras necesarias para la fosforilación, como la proteína cinasa A (PKA), la proteína cinasa C (PKC), los componentes de la cascada de fosforilación de la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK), así como las citocinas inflamatorias (p.ej., interleucina 2, IL-2), moléculas de adhesión celular (p. ej., herregulina), reguladores del ciclo celular (p. ej., ciclinas A y D1) y factores de crecimiento peptídicos, incluidos el factor de crecimiento epidérmico (EGF), insulina, factor de crecimiento similar a insulina (IGF1) *y el factor de crecimiento transformante beta (TGFβ)* (Nilsson et al., 2001).

3.4.3 Estructura de los receptores a estrógenos

Los RE se localizan en muchos tipos de células. En el cerebro, los patrones de distribución espacio-temporal de los *REα y REβ son* distintos, en ciertas estructuras cerebrales puede haber colocalización de ambos subtipos de RE. El *REα es el subtipo más abundante en el* hipotálamo y la amígdala, regiones clave involucradas con el sistema neuroendocrino, y la regulación del sistema nervioso autónomo, así como las reacciones emocionales (Osterlund et al., *2000). Los niveles de REβ son más altos en el hipocampo, el claustro y la corteza* cerebral, y son más bajos en el hipotálamo (Shughrue et al., 1997). A pesar de tener funciones distintas dependiendo del tejido, se sabe que existe superposición funcional entre ambos receptores en varios tejidos, como en los ovarios, en donde ambos receptores son indispensables para la función ovárica normal; además la coordinación de ambos ejerce efectos cardioprotectores (Krege et al., 1998; Bocchinfuso et al., 1997).

Los *REα y REβ comparten una homología de secuencia significativa y cierta conservación* de la función del dominio. Aún con estas similitudes, los *REα y REβ son estructural y* funcionalmente distintos en muchos aspectos, tales como reconocimiento de ligandos, activación de receptores, reclutamiento de correguladores y de los conjuntos de genes a los que regulan de manera dependiente del tiempo y del tejido (Tsutsumi et al., 2008).

Las estructuras de los receptores, *REα (66kDa) y REβ (59kDa) están compuesta*s por varios dominios funcionales y tienen varias regiones estructurales en común (Schwabe y Teichmann, 2004). Los dominios principales son: dominio terminal (NTD), dominio de unión al ADN (DBD), dominio D que es una región bisagra y dominio de unión al ligando (LBD), este último contienen el área de unión a estrógenos, junto con sitios de unión para coactivadores y correpresores.

3.4.4 Efecto antidepresivo de estrógenos

Los estudios en animales de laboratorio han demostrado que el E2 tiene un impacto significativo en el estado de ánimo. Además, estos estudios también demuestran que el intervalo de tiempo en que se comienza a administrar el E2 y la edad son factores importantes para observar los efectos de tipo antidepresivo de esta hormona.

Al evaluar el efecto de la administración subaguda de E2 a ratas hembra adultas jóvenes, se demostró que la hormona reduce el comportamiento de inmovilidad en la FST (Estrada-Camarena et al., 2003). Además, la administración crónica y subcrónica de E2 a ratas hembra adultas jóvenes ovx sometidas a la FST reduce el comportamiento de tipo depresivo (Lemini et al., 2013; 2016). Adicionalmente, la administración aguda de E2 mediante cánula en el hipocampo de ratas adultas ovx, produce efectos de tipo antidepresivo al aumentar el nado en la FST (Walf y Frye, 2007).

El tratamiento crónico de E2 (1 mes), a ratas de edad avanzada (15-19 meses) reduce el comportamiento de tipo depresivo, sin embargo, 5 meses después de la ovx, fue ineficaz para producir dicho efecto (Walf et al.,2009). Además, la administración aguda de E2 a ratas adultas jóvenes con 3 meses después de la ovx, no logró producir efecto de tipo antidepresivo; sin embargo, al administrarse 1 o 3 semanas después de la ovx, se producía un claro efecto de tipo antidepresivo (Estrada-Camarena et al., 2008). Recientemente se ha reportado que en ratas adultas jóvenes el tratamiento con subcrónico con E2 a las 3 y 8 semanas postovx reduce la conducta de inmovilidad, no así para las 16 y 24 semanas postovx (Figura 3). Adicionalmente, se observó que el mismo régimen de tratamiento con

E2 a ratas de mediana edad no producía efecto de tipo antidepresivo a ningún tiempo postovx (Hernández-Hernández et al., 2022). Estos estudios respaldan la hipótesis de una ventana de oportunidad terapéutica. Así, el momento y la edad en el que se inicia la administración de E2 es crucial para observar los efectos benéficos.

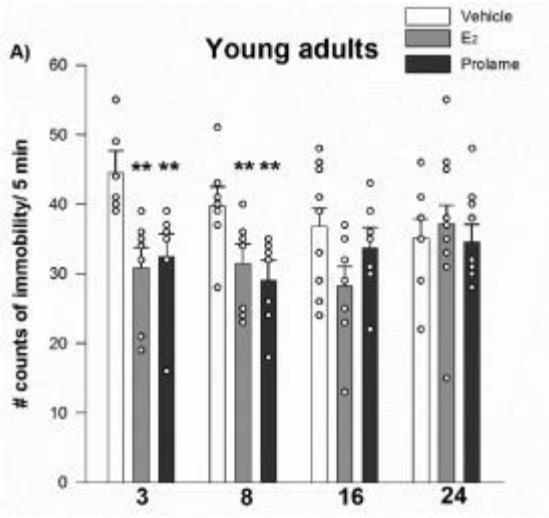

Figura 3. El tratamiento subcrónico con E2 a ratas adultas jóvenes sobre el comportamiento de inmovilidad en la FST. Imagen tomada de Hernández-Hernández et al., 2022

3.5. 17β-aminoestrógenos

LA TRE tiene múltiples beneficios en la salud de la mujer. Sin embargo, en animales y humanos, los niveles elevados de E2 circulante aumentan el riesgo de cáncer de mama o de endometrio y de eventos tromboembólicos (Farquhar et al., 2009; Narod, 2011; Liehr, 2000), en mujeres posmenopáusicas relativamente sanas el uso de la TRE durante 1 año aumenta el riesgo de un ataque cardiaco de 2 mujeres que lo padecen hasta aproximadamente 7 por cada 1000 y aumenta el riesgo de trombosis venosa de 2 mujeres que la padecen hasta aproximadamente 11 por cada 1000 (Marjoribanks et al., 2017), lo que limita su uso en poblaciones de alto riesgo para estas enfermedades.

Prolame *es un 17β*-aminoestrógeno sintético, análogo de E2 que comparte un perfil estrogénico, pero que produce efectos con menor potencia: disminuye la LH sérica, aumenta el peso uterino y produce cambios morfológicos endometriales en ratas ovx (Jaimez et al., 2000; Lemini et al., 2005[b]). Una característica por destacar es que prolame tiene la capacidad de afectar los tiempos de coagulación de la sangre en roedores, induciendo efectos anticoagulantes de larga duración, en contraste con el efecto

procoagulante de E2 (Lemini et al., 2005ª), lo que puede tener implicaciones para su uso en la TRE en mujeres con mayor riesgo de eventos tromboembólicos.

Prolame ha sido caracterizado farmacológicamente como un agonista parcial de los RE y no muestra actividad como antagonista de ninguno de los subtipos de RE (Jaimez et al.,2000; Lemini et al., 2005b). Además, estimula el comportamiento sexual femenino de una manera dependiente de la dosis (Lemini y Canchola, 2009).

La administración subcrónica de prolame (20-50 *µg/rata)* a ratas hembra ovx produce efecto antidepresivo similar a los efectos del E2 *(10 µg/rata)*, pues redujo la inmovilidad y aumentó la conducta de nado en la FST (Lemini et al., 2013), lo que sugiere una mejora en la neurotransmisión de la 5-HT, de acuerdo con lo reportado por Detke (1995). Sin embargo, no podemos descartar su acción sobre el sistema monoaminérgico pues un estudio posterior demostró que la administración crónica (26 días) de prolame (*60 µ*g/kg) en el mismo modelo, produjo una reducción de la inmovilidad y un aumento en la conducta de escalamiento, lo que sugiere una mejora en la neurotransmisión de NE.

Los tiempos postovx y la edad a la que se administra el tratamiento son factores importantes para observar el efecto antidepresivo de prolame. La administración subcrónica de prolame (60 *µg/kg*) a ratas jóvenes adultas y de mediana edad disminuyó la conducta de inmovilidad en la FST a las 3 y 8 semanas después de la ovx; sin embargo, en las hembras de mediana edad solo se observó el efecto en las hembras con 3 semanas de tiempo postovx (Hernández-Hernández et al., 2022). De este estudio destaca el hecho de que, el tratamiento de E2 *(30 µg/kg)*, no produjo disminución de la conducta de inmovilidad en ratas de mediana edad en ningún tiempo postovx. Los que sugiere que en el trastorno depresivo prolame podría tener ventajas terapéuticas en condiciones endocrinas en las que E2 ya no es efectivo.

Toda la evidencia sugiere que prolame puede ser considerado como un estrógeno con propiedades pro-sexuales, anticoagulantes, estrogénicas, ansiolíticas y antidepresivas, lo que sugiere su potencial como tratamiento en mujeres con trastornos somáticos y mentales, relacionados con la privación de estrógenos, especialmente para aquellas que sufren condiciones asociadas con el aumento de la coagulación. Adicionalmente se ha demostrado que los efectos en la proliferación de células de cáncer de mama humano MCF-7, son menores (reducción de la mitad) en comparación con E2, lo que sugiere que prolame podría producir menos efectos adversos en el tejido mamario (Lemini et al., 2017).

4. Planteamiento del problema

Se ha reportado que E2 y prolame inducen un efecto de tipo antidepresivo en ratas hembra con 3 y 8 semanas postovx, pero no en tiempos postovx más prolongados (Hernández-Hernandez et al., 2022), sugiriendo que hay una ventana de oportunidad terapéutica para los efectos de estos estrógenos. Además, se conoce que BDNF es un gen blanco de E2 (Sohrabii et al., 1995), adicionalmente, se ha demostrado que el BDNF puede mediar la acción terapéutica de los antidepresivos (Berton y Nestler 2006; Martinowich et al., 2008). Sin embargo, no existen estudios que analicen la regulación del contenido de la proteína de preproBDNF y proBDNF por E2 y prolame. Por lo tanto, es este trabajo se determinó la regulación de preproBDNF proBDNF y mBDNF por E2 y prolame en CA3 y DG del hipocampo ventral ratas hembra jóvenes adultas con 3 y 8 semanas de tiempo postovx evaluadas en la FST. Los resultados de este estudio tienen implicaciones, en principio para explicar las acciones antidepresivas de los estrógenos asociadas a la edad y el tiempo postovx, así como para apoyar la terapéutica de depresión en la mujer ampliando la información de los fármacos que son efectivos para tratar la depresión en la menopausia.

5. Hipótesis

BDNF es un gen blanco de E2 y su regulación positiva se relaciona con la acción antidepresiva de la hormona. A su vez prolame produce efecto antidepresivo similar a E2; por lo tanto, se espera que el tratamiento con E2 o prolame regulen positivamente la expresión de la proteína mBDNF y de preproBDNF, pero que disminuya la expresión de proBDNF en el hipocampo de ratas hembra adultas jóvenes ovx después de evaluarlas en la FST. Dado que los efectos antidepresivos de E2 y prolame se pierden en un periodo de hipoestrogenismo a largo plazo, se espera que en las hembras tratadas con E2 o prolame con el tiempo postovx más prolongado, ocurra una regulación a la baja de la expresión de mBDNF y un aumento de proBDNF.

6. Objetivos

Objetivo general

Determinar el efecto de prolame y E2 sobre la expresión hipocampal de BDNF y de sus precursores en ratas evaluadas en un modelo de menopausia y depresión.

Objetivos Particulares

- Conocer el efecto de prolame y E2 sobre la regulación transcripcional y traduccional de mBDNF, preproBDNF y proBDNF en el hipocampo ventral en las regiones CA3 y DG de ratas hembra jóvenes adultas ovx, evaluadas en la prueba de nado forzado.
- Determinar la influencia de los tiempos postovx sobre la regulación de BDNF y de sus precursores por prolame y E2 en ratas hembra jóvenes adultas ovx sometidas a la prueba de nado forzado.

7. Metodología

7.1 Diseño experimental

Para determinar el efecto de E2 y prolame sobre la expresión de BDNF y de su precursor, se formaron grupos independientes de ratas hembra adultas jóvenes ovx, que recibieron uno de los siguientes tratamientos: E2 *(30 µg/kg); prolame (60 µg/kg)*; o aceite de maíz como vehículo (1 ml/Kg) una vez al día. Un grupo de ratas fue evaluado en la prueba de nado forzado a las 3 semanas después de la cirugía siendo: vehículo (n=4), E2 (n= 4) y prolame (n=4); otro grupo de ratas fue evaluado en la misma prueba 8 semanas después de la cirugía siendo: vehículo (n=4), E2 (n=4) y prolame (n=4).

Cuarenta y ocho horas antes de la FTS, los tratamientos se inyectaron por vía subcutánea durante 3 días, una vez al día: la primera inyección se aplicó inmediatamente después de finalizar la pre-prueba (sesión de nado de 15 min), la segunda inyección 24 horas después de la pre-prueba y la última inyección 5 horas antes de la sesión de prueba (sesión de nado de 5 min). Las dosis y los esquemas de tratamiento de E2 y prolame se seleccionaron en función de sus efectos similares a los antidepresivos reportados en ratas hembra con tres semanas de después de la ovx (Lemini et al., 2013).

Las ratas fueron evaluadas en la FST y 30 minutos después se les realizó la eutanasia por decapitación para obtener los cerebros.

Los cerebros fueron extraídos, mantenidos en hielo seco y almacenados en cajas Petri de 60 x15mm en el ultracongelador a -80°C, para continuar con los procesos experimentales que se describen en la figura 4 y en la siguiente sección.

Es importante mencionar que los resultados conductuales no forman parte de los objetivos planteados; sin embargo, dicha información se integrará a la interpretación de los resultados obtenidos.

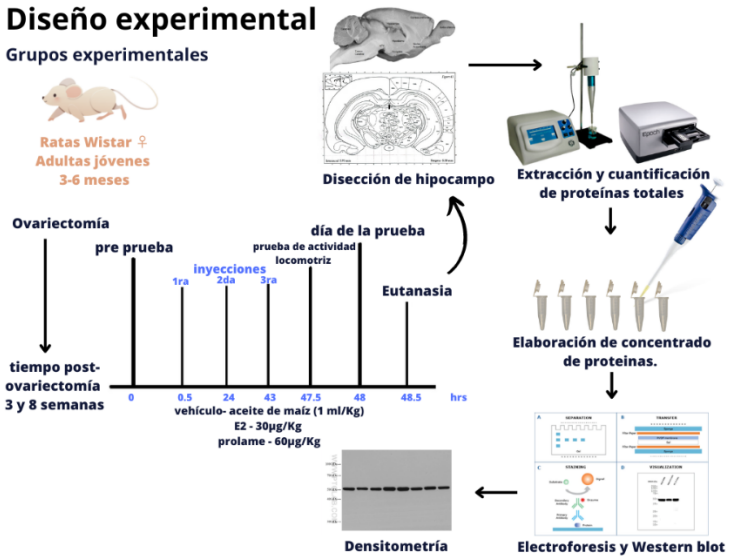

Figura 4. Representación esquemática del protocolo experimental. Grupos independientes de ratas adultas jóvenes tratadas con el vehículo (aceite de maíz)*, E2(30 µg/kg) o prolame (60 µg/kg) fueron* inyectadas tres y ocho semanas después de la ovariectomía. Los tratamientos fueron administrados vía subcutánea iniciando inmediatamente después de finalizar la pre-prueba. La última inyección fue administrada 5 horas antes de la prueba.
Una vez obtenidas las muestras de cerebro, se procedió a adicionar buffer RIPA para la extracción de las proteínas totales, después de la lisis, se procedió a la cuantificación y a la elaboración de un concentrado de las proteínas. Las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida al 4% y 12% y se procedió a hacer una electroforesis. Se continuó con el procedimiento hasta completar el Western blot. Los datos densitométricos se analizaron empleando el sofware Image Lab.

7.2 Animales

Ratas hembra Wistar adultas jóvenes (3 meses; vírgenes) se obtuvieron del bioterio del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz. Los animales se alojaron, de cuatro a cinco por jaula, en una habitación en condiciones de ciclo invertido de luz/oscuridad (12/12h; la luz se encendió a las 22:00 h) y una temperatura ambiente controlada de 23 ± 2°C, con acceso agua y comida ad libitum a lo largo de los experimentos. Todos los procedimientos se realizaron bajo la Norma Oficial Mexicana para el cuidado y manejo de animales (NOM-062-ZOO-1999) y aprobados por el Comité de Ética Institucional local. Se hizo todo lo posible para minimizar el número de animales utilizados y el dolor que se les pudiera ocasionar.

7.3 Ovariectomía

Las ratas (n=24) fueron ovariectomizadas bilateralmente bajo anestesia con 2,2,2-tribromoetanol (Fluka, 200mg/kg, ip) disuelto con 8% de etanol y en solución salina al 0.9% en condiciones asépticas. La arteria ovárica se ligó bilateralmente para cortar los ovarios y evitar el sangrado. El músculo y la piel fueron suturados y limpiados con solución aséptica (Yodo povidona, Germisin, Farmacéuticos Altamirano de México, SA de CV). Posteriormente, las ratas se devolvieron a sus jaulas de origen para recuperarse durante 3 y 8 semanas antes del tratamiento. Como cuidados post-operatorios, las ratas recibieron un antiinflamatorio no esteroideo (ibuprofeno, Bestafen, 20 mg/Kg/día).

7.4 Fármacos

Prolame 17β-(3-hidroxi-1-propilamino)-1,3,5(10)-estratrien-3-ol se sintetizó a partir de estrona. El proceso detallado de la síntesis de prolame se ha descrito en Fernández et al., 1985. El prolame se sometió a una prueba de pureza química utilizando métodos analíticos (MP, TLC) y espectroscópicos (IR, NMR, MS), en comparación con muestras de *autenticación. E2 (3,17β*-dihidroxi-1,3,5(10)-estratrieno) se adquirió de Sigma-Aldrich (St.Louis MO, EE. UU.). Para esta tesis, el prolame fue proporcionado por la Dra. Cristina Lemini Guzmán de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, quién realizó la síntesis y determinación de la pureza del producto. E2 y prolame se disolvieron en aceite de maíz (Mazola, México) antes de su administración. Estas soluciones se prepararon recientemente antes de los experimentos.

7.5 Disección de cerebro

Los cerebros de rata se montaron en un criostato Microm™ HM525, usando un medio de inclusión Tissue -Tek OCT (Sakura) a -21°C y se realizaron cortes coronales de hipocampo de 100µm empleando el atlas de cerebro de rata de Paxinos y Watson (1997) con coordenadas para el hipocampo ventral: interaural (4.20, 3.80, 3.70, 3.40, 3.20 y 2.96 mm) y Bregma (-4.80, -5.20, -5.30, -5.60, -5.80 y -6.04 mm). Se obtuvieron muestras bilaterales de tejido de las regiones CA3 y DG ventral como describe Palkovits (1983) empleando un punch brain de 1.25 mm (Electron Microscopy sciences Cat. #57401). Las muestras de cada región se recolectaron en tubos para microcentrífuga de 1.5 mL y se almacenaron a -80°C.

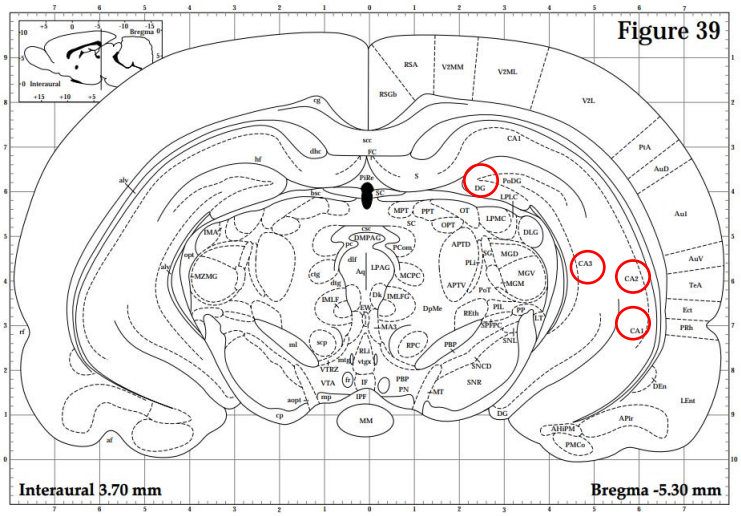

Figura 5. Representación esquemática de una sección coronal de cerebro de rata (Figura 39 de Paxinos y Watson, 1997). Los círculos rojos indican el área del hipocampo ventral tomada para el análisis de Western blot por medio de un punch brain de 1.25 mm.

7.6 Obtención de proteínas totales

Al tejido obtenido se le adicionó 200 µL de buffer RIPA (apéndice) que contenía inhibidores de proteasas (cOmplete^{TM}, Roche Ref. 046893). Posteriormente, el DG y CA3 se lisaron haciendo uso del equipo Omni Sonic Ruptor 400^{TM} a una potencia del 30%, empleando de 10 a 13 pulsos con duración de 2 segundos por pulso.

Las muestras se dejaron reposar 30 minutos en hielo para posteriormente centrifugarlas a 14,000 rpm a 4°C por 25 minutos.

7.7 Cuantificación de proteínas

Para la cuantificación de las proteínas se empleó el espectrofotómetro para microplacas Epoch^{TM} Biotek donde se cuantificaron por cuadruplicado cada una de las muestras en el Take3^{TM} empleando 2µL por microspot. Las muestras se mantuvieron en hielo en todo momento para evitar la degradación de las proteínas. De los resultados obtenidos se realizó un promedio y la desviación estándar cuidando que la diferencia entre los resultados no fuera mayor a 1 para evitar errores de exactitud en la cuantificación. Finalmente se obtuvo la cantidad de proteína contenida en cada muestra tomando en cuenta el volumen de buffer RIPA empleado.

7.8 Elaboración de concentrado de proteínas

Posterior a la cuantificación se realizaron los concentrados de proteínas adicionando una cantidad equivalente de proteína (150 µg por tubo) de 4 muestras independientes para el mismo tratamiento y tiempo postovx. Las muestras se almacenaron en el ultracongelador a -80°C para su posterior uso.

7.9 Western blot

BDNF

Se depositaron 150 µg de proteínas totales en los pozos del gel y se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 4% y 12% a 80V durante 2 horas.

Los geles se transfirieron a membranas de floruro de polivinilideno (Biorad Cat.162-0177) en una cámara semihúmeda con buffer de transferencia (Biorad Cat.1610734) a 15V durante 1 hora, al finalizar la transferencia se lavaron con agua destilada y se dejaron secar. Las membranas se bloquearon con leche descremada al 5% (Biorad, Cat. 1706404) en PBS 1X y Tween 20 al 0.1% durante 1 hora a temperatura ambiente; posteriormente se incubaron toda una noche a 4°C con anticuerpo primario para BDNF (1:500, 3 mg/mL Invitrogen Cat. MA5-35595) en PBS 1X. Después, se dejaron reposando durante 1 hora a temperatura ambiente y posteriormente se lavaron 3 veces durante 7 minutos con PBS 1X y tween 20 al 0.1%. A continuación, se incubaron con anticuerpo secundario goat anti-rabbit (1:5000, Santa Cruz Biotechnology cat. sc-2004) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las bandas se visualizaron en el fotodocumentador de Biorad Universal Hood II™ empleando luminol (Santa Cruz, SC-2048).

Alfa-tubulina

Una vez revelada la proteína BDNF, se procedió a lavar la membrana 2 veces con solución stripping durante 10 minutos, 2 veces con PBS 1X durante 10 minutos y 2 veces con PBS 1X + Tween 20 0.1% durante 5 minutos. Después, se bloquearon con leche descremada al 5% (Biorad, Cat. 1706404) en PBS 1X + Tween 20 0.1% durante 1 hora a temperatura ambiente; luego, se incubaron 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpo primario para *α*-tubulina (1:10,000 Sigma Aldrich Cat. 3873s). A continuación, se lavaron 3 veces durante 5 minutos con PBS 1X + Tween 20 0.1%, para posteriormente incubar con su respectivo anticuerpo secundario goat anti-mouse (1:10,000, Santa Cruz Biotechnology cat. SC2005) durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente se hicieron 3 lavados durante 15 minutos con PBS 1X + tween 20 0.1%. Las bandas se visualizaron en el fotodocumentador de Biorad Universal Hood II™.

Análisis de Resultados

Las muestras obtenidas del DG y el área CA3 del hipocampo (n=48) fueron analizadas individualmente considerando la región cerebral, el tratamiento y tiempo postovx. Los datos obtenidos individualmente tuvieron una alta variabilidad, por lo que se procedió a hacer una mezcla (pool) de la proteína obtenida a partir de 4 individuos por grupo. Estas muestras fueron analizadas considerando las variables independientes de región cerebral, tratamiento y tiempo postovx.

Los datos obtenidos mediante densitometría se normalizaron con los valores de *α*-tubulina dividiendo el valor del volumen de la banda de BDNF sobre el volumen de *α*-tubulina para cada tratamiento, región y tiempo postovx. Posteriormente, se consideró la banda obtenida para la proteína preproBDNF como el 100% del BDNF y a partir de ahí se calculó el porcentaje que correspondía a cada isoforma proBDNF y mBDNF, de tal manera que la suma de las 3 proteínas resultó en el 100%, obteniendo así el porcentaje de expresión.

Para obtener el porcentaje de cambio de cada una de las isoformas se emplearon los valores de vehículo de 3 semanas postovx como control y a partir de estos valores, se calculó el cambio en cada una de las isoformas.

8 Resultados

8.1 Expresión de los precursores y de la forma madura de BDNF en el hipocampo.

En la figura 6 se ilustran los resultados del % de expresión de las tres isoformas de BDNF en el DG (A) y la región CA3 (B) del hipocampo. Observamos que la forma predominante de BDNF es el preproBDNF, seguido de proBDNF y mBDNF.

En la región del DG de ratas con 3 semanas postovx (Figura 6A, lado izquierdo) observamos que en las muestras de ratas tratadas con E2 y prolame predominan las formas preproBDNF y proBDNF. Para las 8 semanas (Figura 6A, lado derecho) observamos que las muestras de las ratas tratadas con E2 y prolame estimulan un cambio en la proporción de proBDNF y mBDNF, siendo el tratamiento con prolame el que estimula mayormente el cambio en la forma mBDNF con respecto a vehículo de 8 semanas postovx.

En la región del CA3 de ratas con 3 semanas postovx (Figura 6B, lado izquierdo) observamos que los tratamientos con E2 y prolame producen una mayor proporción de las formas proBDNF y mBDNF con respecto a vehículo de 3 semanas postovx. A las 8 semanas

postovx observamos un aumento de la isoforma preproBDNF con ambos tratamientos. Sin embargo, el tratamiento con prolame mantiene niveles bajos de proBDNF (Figura 6B, lado derecho).

En la figura 6C podemos apreciar la señal obtenida de cada muestra de la proteína de interés y sus diferentes formas, así como el control de carga, a partir de la cual se obtuvieron los datos para densitometría.

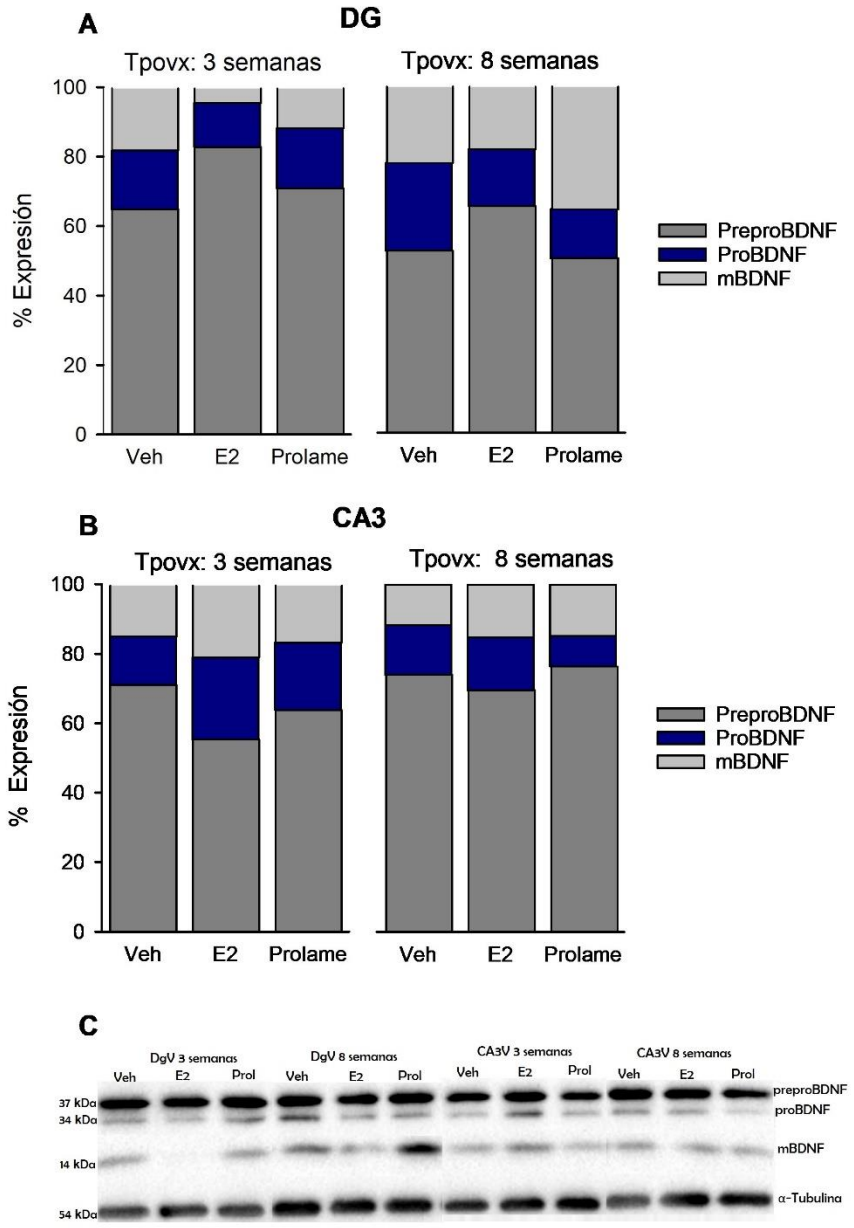

Figura 6. Porcentaje de expresión de BDNF en hipocampo. Los datos obtenidos mediante *densitometría fueron normalizados a α*-tubulina. La suma de los precursores más la forma madura de BDNF para cada región y tiempo postovariectomía dan 100%. **A.** Porcentaje de expresión de los precursores y la forma madura de BDNF en DG. **B.** Porcentaje de expresión de los precursores y la forma madura en CA3. **C**. Expresión de preproBDNF, proBDNF, mBDNF en el hipocampo. Imagen representativa de la mezcla de 4 muestras individuales para DG o CA3 en ratas con 3 y 8 semanas postovariecomía.

8.2 Influencia de E2 y prolame sobre la expresión de preproBDNF, proBDNF y mBDNF en el DG

El análisis densitométrico nos permitió obtener información sobre cuanto varía una isoforma con cada tratamiento (% de cambio) respecto a un control, que en este caso fue el vehículo de 3 semanas postovx.

Los datos muestran que el tratamiento con E2 en la región del DG de ratas con 3 semanas postovx (Figura A, lado izquierdo) disminuye los niveles de preproBDNF (-14.37%) comparados contra vehículo de 3 semanas postovx. De igual forma observamos una disminución inducida por E2 en los niveles de proBDNF (-36.12%) (Figura 7B, lado izquierdo) y de mBDNF (-78.5%) (Figura 7C, lado izquierdo). Prolame también induce una disminución en los niveles de mBDNF (-30.19%) (Figura 7C, lado izquierdo) comparados contra vehículo de 3 semanas postovx.

A las 8 semanas postovx observamos una disminución en los niveles de preproBDNF con el tratamiento de E2 (-37.07%) y prolame (-24.32%) (Figura 7A, lado derecho) comparados con vehículo de 3 semanas postovx. De manera similar los niveles de proBDNF también se ven disminuidos con los tratamientos de E2 (-39.4%) y prolame (-36.20%) (Figura 7B, lado derecho). Finalmente, el tratamiento con prolame aumentó los niveles de mBDNF (+48.09%) (Figura 7C, lado derecho).

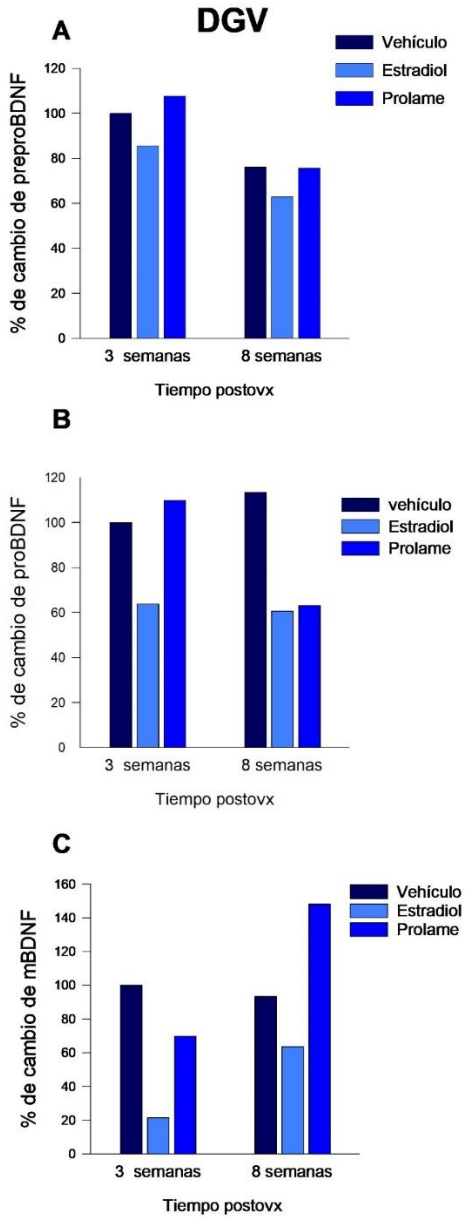

Figura 7. Niveles relativos de preproBDNF, proBDNF y mBDNF en el DG ventral (DGV) expresados como porcentaje de cambio. El tratamiento con prolame induce menores niveles de proBDNF y un aumento en los niveles de mBDNF a las 8 semanas postovx, comparado contra vehículo de 3 semanas postovx. Los valores densitométricos de todos los Western blot se normalizaron a alfa-tubulina, el valor densitométrico obtenido del vehículo a las 3 semanas para cada región se tomó como el 100% para calcular el porcentaje de cambio.

8.3 Influencia de E2 y prolame sobre la expresión de preproBDNF, proBDNF y mBDNF en CA3

El tratamiento con E2 a ratas con 3 semanas postovx aumentó los niveles de preproBDNF (+20.82%) a diferencia del tratamiento con prolame, el cual indujo una disminución (-35.76%) (Figura 8A, lado izquierdo).

Los niveles de proBDNF aumentaron con el tratamiento de E2 (+105.81%), contrario a lo observado con el tratamiento con prolame, el cual indujo una disminución en los niveles de proBDNF(-10.15%) (Figura 8B, lado izquierdo).

Finalmente, el tratamiento con E2 aumentó los niveles de mBDNF (+69.34%), mientras que prolame indujo una disminución (-28.12%) (Figura 8C, lado izquierdo).

A las 8 semanas postovx, observamos que los niveles de preproBDNF disminuyen con los tratamientos de E2 (-5.28%) y prolame (-29.18%) (Figura 8A, lado derecho) comparados con vehículo de 3 semanas postovx. Los niveles de proBDNF también disminuyen únicamente con el tratamiento con prolame (-55.42%) (Figura 8B, lado derecho).

El tratamiento con E2 disminuyó los valores de mBDNF (-5.88%) al igual que prolame (-30.05%) (Figura 8C, lado derecho) comparado con vehículo de 3 semanas postovx.

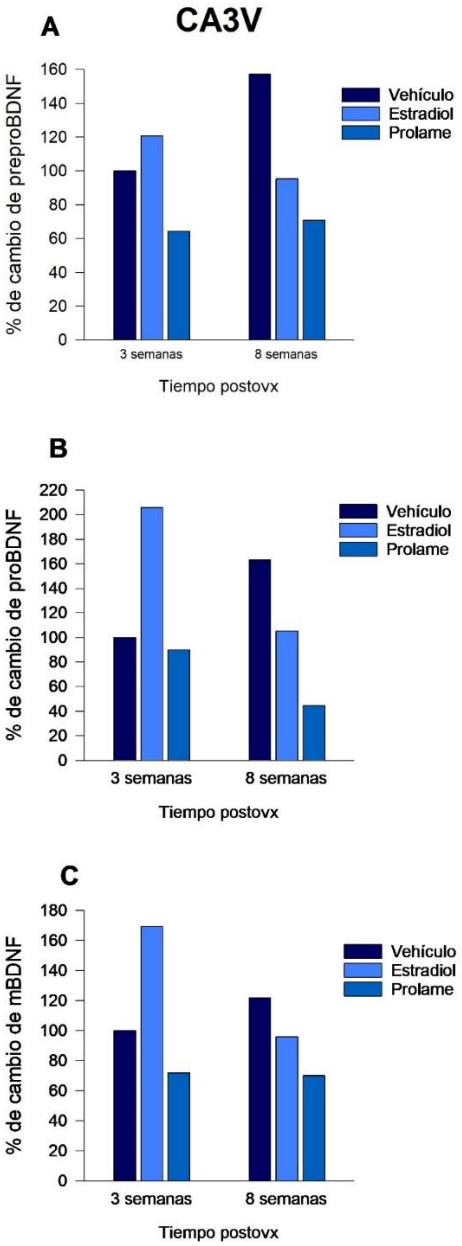

Figura 8. Niveles relativos de preproBDNF, proBDNF y mBDNF en el CA3 ventral (CA3V) expresados como porcentaje de cambio. El tratamiento con E2 induce mayores niveles de preproBDNF, proBDNF y mBDNF a las 3 semanas postovx comparado contra vehículo; efecto que disminuye a las 8 semanas postovx. Los valores densitométricos de todos los western blot se normalizaron a alfa-tubulina, el valor densitométrico obtenido del vehículo a las 3 semanas para cada región se tomó como el 100% para calcular el porcentaje de cambio

Tabla 1. Expresión de preproBDNF, proBDNF y mBDNF en relación con la expresión de vehículo de 3 semanas postovx. Los datos obtenidos se expresaron como porcentaje de cambio tomando en cuenta la expresión de vehículo de 3 semanas postovx para DG y para CA3.

Región	DGV						CA3					
Tpovx	*3 semanas*			*8 semanas*			*3 semanas*			*8 semanas*		
Tratamiento	*Veh*	*E2*	*Prol*	*Veh*	*E2*	*Prol*	*Veh*	*E2*	*Prol*	*Veh*	*E2*	*Prol*
preproBDNF (%)	100	85.63	107.66	76.18	62.96	75.68	100	120.82	64.24	157.13	95.28	70.82
proBDNF (%)	100	63.88	109.87	113.54	60.60	63.20	100	205.81	89.85	163.00	105.02	44.58
mBDNF (%)	100	21.50	69.81	93.33	63.56	148.09	100	169.34	71.871	121.72	95.88	69.95

9. Discusión

9.1 Influencia del tiempo postovx sobre la expresión de las diferentes formas de BDNF.

Cada vez hay más pruebas de la asociación entre el BDNF y los trastornos del estado de ánimo, que son sustentadas estudios clínicos y preclínicos. La literatura informa un nivel sérico menor de mBDF y mayores niveles de proBDNF en pacientes con TDM (Yoshida et al., 2012; Zhou et al., 2013). Shirayama y colaboradores (2015) también han reportado que las ratas sometidas al modelo de indefensión aprendida muestran una reducción de mBDNF y un aumento de proBDNF en la región medial de la corteza prefrontal y en el núcleo accumbens.

Se ha sugerido que la relación proporcional de mBDNF y proBDNF puede reflejar el metabolismo de BDNF, además de servir como índice que refleja las diferentes funciones biológicas de mBDNF y proBDNF en el cerebro (Ilchibaeva et al., 2015), ya que cada una de estas proteínas se une a su receptor especifico, mediando respuestas que son independientes e incluso divergentes. En apoyo a esta idea, se ha demostrado que en pacientes femeninas con depresión la expresión del trkB y mBDNF disminuyó en suero y linfocitos; así mismo, se ha observado que tanto proBDNF como p75NTR y sortilina aumentan (Zhou et al., 2013). El estudio sugiere que las vías de señalización mBDNF/trkB y proBDNF/p75NTR/sortilina podrían estar implicadas en la patogenia de la depresión. Se ha propuesto que mBDNF y proBDNF existen en equilibrio y que la interrupción del equilibrio, como ocurre en situaciones de estrés inescapable, contribuye potencialmente al desarrollo de la depresión (Lu et al., 2005). Por lo tanto, la escisión de proBDNF es importante para mantener un equilibrio entre BDNF maduro y proBDNF y las funciones en las que participan (Lu et al., 2005; Martinowich et al., 2007; Yang et al., 2009).

La proteína de BDNF presenta varias formas precursoras, primero se sintetiza como preproBDNF, después se escinde a proBDNF, para finalmente transformarse en mBDNF. El porcentaje de expresión nos revela las isoformas predominantes después del tratamiento para poder sugerir si existe mayor síntesis de la proteína o mayor maduración de la proteína (Figura 6). Consideramos al proBDNF como una isoforma de transición entre la síntesis y la maduración, que además tiene acciones per se sobre la plasticidad (Lee et al., 2001; Dincheva et al., 2016).

Nuestros resultados revelan que existen cambios en las proporciones de las diferentes formas de BDNF de acuerdo con la región cerebral, el tratamiento y el tiempo postovx. El tratamiento con prolame en la región del DG de ratas con 3 semanas postovx produjo una disminución en los niveles de mBDNF (-30.19%) (Figura 7C, lado izquierdo), mientras los niveles de proBDNF se mantienen similares a los de vehículo (Figura 7B, lado izquierdo), contrario a lo observado a las 8 semanas postovx, donde se observa que el tratamiento fue capaz de reducir los niveles de proBDNF (-36.20%) (Figura 7B, lado derecho) y aumentar los niveles de mBDNF (+48.09%) (Figura 7C, lado derecho). Los resultados conductuales ya reportados por Hernández-Hernández y colaboradores (2022) muestran que el tratamiento con prolame reduce las cuentas de inmovilidad en la FST a las 3 (~32 cuentas en 5 min) y 8 semanas (~29 cuentas en 5 min) postovx comparadas contra vehículo contra vehículo de 3 semanas (~44 cuentas en 5 min) y 8 semanas (~40 cuentas en 5 min). Estos resultados nos indican que el efecto de tipo antidepresivo de prolame permanece aún a las 8 semanas postovx.

De acuerdo con nuestros resultados podemos observar que en ese tiempo postovx, los niveles de mBDNF aumentan en el DG. No podemos asegurar que un menor número de cuentas en el comportamiento de inmovilidad este directamente relacionado con el aumento en los niveles de mBDNF, pero es posible que los mayores niveles de mBDNF en el DG tengan un papel en la conducta.

Por otro lado, observamos que el tratamiento con E2 a las 3 semanas postovx produjo un aumento en los niveles de preproBDNF en el área CA3 del hipocampo (+20.82%) (Figura 8A, lado izquierdo), así como un aumento de proBDNF (+105.81%) (Figura 8B, lado izquierdo) y mBDNF (+69.34%) (Figura 8C, lado izquierdo). Este comportamiento fue totalmente distinto a lo que se encontró a las 8 semanas postovx, tiempo al que observamos una disminución en los niveles de preproBDNF (-5.28%) (Figura 8A, lado derecho), un aumento en los niveles de proBDNF (+5.02%) (Figura 8B, lado derecho) y una disminución en los niveles de mBDNF (-5.88%) (Figura 8C, lado derecho). Los resultados conductuales

revelan que el tratamiento con E2 reduce las cuentas de inmovilidad en la FST a las 3 (~30 cuentas en 5 min) y 8 (~33 cuentas en 5 min) semanas postovx comparado contra vehículo de 3 semanas (~44 cuentas en 5 min) y 8 semanas (~40 cuentas en 5 min). Estos resultados muestran que el tratamiento con E2 mantiene el efecto de tipo antidepresivo a las 8 semanas postovx. Nuestros hallazgos muestran que, a ese tiempo postovx existe una disminución en los niveles de mBDNF y preproBDNF y un aumento en los niveles de proBDNF. Se desconoce si la magnitud de los efectos podría ser relacionada directamente con el aumento en el número de cuentas de la conducta de inmovilidad a las 8 semanas postovx.

En resumen, los resultados parecen apoyar la idea de que los cambios más relevantes fueron producidos por E2 en el área CA3 en el tiempo de 3 semanas postovx, mientas los efectos de prolame fueron más notables en el DG a las 8 semanas postovx.

Aunque no es posible relacionar de forma directa los niveles de BDNF con los cambios en la conducta (efectividad del tratamiento), los hallazgos de este experimento molecular y las características farmacológicas de los estrógenos utilizados (Jaimez et al., 2000) sugieren que prolame y E2 podrían seguir mecanismos que no siempre son iguales incluso dentro del mismo hipocampo.

9.2 Influencia del tratamiento sobre la expresión de las diferentes formas de BDNF

En la región de CA3, el tratamiento con E2 modifica los contenidos de las isoformas proBDNF y mBDNF ya que produce mayor presencia de éstos (Figura 6B), indicando que probablemente la maduración de la proteína se ve favorecida. Se ha observado que en el área CA3 hay una mayor expresión de la proteína BDNF en células piramidales (secretoras de glutamato) comparado con la región del DG. Se ha demostrado que el gen de BDNF tiene un ERE en el exón IX que es reconocido por un RE activado por E2 (Sohrabji et al., 1995). Este mecanismo de activación transcripcional mediada por RE requiere la expresión colocalizada de RE dentro de las células productoras de BDNF. Al respecto se ha demostrado que existe una *colocalización de REα con* BDNF en células piramidales del área CA3 (Solum y Handa, 2002).

Scharfman y colaboradores (2003), informaron una alta inmunorreactividad de BDNF en las regiones CA3 y CA1 durante el proestro y la mañana del estro en relación con el metaestro o los animales ovx. Adicionalmente se ha observado que el aprendizaje se potencia durante el proestro, aunque no en todas las condiciones (Rubinow et al., 2004). Los cambios en el hipocampo que se han informado antes de la ovulación se han atribuido al E2, porque el E2

circulante alcanza su punto máximo en la mañana del proestro, y la administración de E2 a ratas ovx imita algunos de los efectos (Singh et al, 1995; Smith y Woolley, 2004; Sohrabji et al., 1995). De manera interesante en ratas hembra adultas se observa un 50% más de células proliferantes y menos células apoptóticas en el DG durante la fase de proestro en comparación con ratas macho o ratas hembra adultas en la etapa de estro o diestro (cuando los niveles de E2 son mucho más bajos) (Tanapat et al., 1999). Si bien, se ha confirmado que los niveles fisiológicos de E2 durante el proestro son suficientes para afectar la función del hipocampo, también se ha demostrado que el aumento de E2 por encima del rango fisiológico en la mañana del proestro (>15 µg/kg) aumenta aún más la actividad de las células piramidales en el área CA3 (Scharman et al., 2007).

De manera similar los niveles de ARNm de trkB en el hipocampo aumentan después del tratamiento crónico con E2 (Pan et al., 2010) y los niveles de trkB en el estrato radiatum de CA3 fluctúan a lo largo del ciclo estral y son más altos en proestro (Spencer et al., 2008). Estos estudios sugieren que en la región de CA3, los niveles altos de E2 durante el ciclo estral, así como el tratamiento con E2 puede llegar a inducir la síntesis de preproBDNF que posteriormente culmina con la maduración de la proteína, así como la síntesis de su receptor lo que favorecería una mejor señalización de BDNF en el hipocampo.

Aún no está claro como E2 puede inducir la maduración de la proteína BDNF en hipocampo, pero Hwang y colaboradores (2006) reportaron que los macrófagos J774A tratados con E2 aumentaron la liberación de MMP9 correspondiente a un aumento de la expresión de anexina II (ANXII), la cual facilita la interacción entre el activador tisular de t-PA y el plasminógeno con la posterior activación de plasmina (Brownstein et al., 2004). La plasmina sirve como activador fisiológico que, convierte proMMP9 en MMP9 (Cesarman et al., 1994, Brobrownstein et al., 2001). En conjunto, esta información apoya la idea de que E2 puede influir en la maduración de la proneutrofina al inducir la expresión de enzimas como la MMP9 que escinden proBDNF a mBDNF.

Por último, se ha demostrado que prolame interactúa con los RE con una menor afinidad que como lo hace E2 (Jaimez et al., 2000). Estudios recientes han demostrado que prolame también es capaz de unirse al receptor de membrana acoplado a proteína G para estrógenos (GPER1) de manera similar a E2 (Segovia-Mendoza et al., 2022), lo que ampliaría las posibilidades de acción de prolame y E2 sobre genes y proteínas blanco.

El tratamiento con E2 reveló una mayor presencia de las isoformas preproBDNF y proBDNF en DG de ratas a las 3 semanas postovx, que se sigue observando a las 8 semanas postovx (Figura 6A), estos aumentos son probablemente un reflejo de la regulación de la

transcripción de BDNF. Análisis futuros de los niveles de ARNm de BDNF podría ayudarnos a confirmar dicha hipótesis. Si bien E2 puede inducir la transcripción del gen de BDNF a través de un ERE, se necesita una colocalización del RE con células productoras de BDNF; sin embargo, en la región del DG aún no se ha demostrado esta colocalización, pero se ha propuesto un mecanismo alternativo mediante el cual E2 regula la transcripción de este gen, que involucra la inhibición de interneuronas GABAérgicas, estas neuronas inhibitorias *que expresan REβ o REα* (de acuerdo al tipo de célula) son activadas por E2 y se encargan de inervar células excitatorias que expresan BDNF. Los altos niveles de E2 reducen los niveles corticales de GABA, lo que presumiblemente libera la inhibición de las neuronas que expresan BDNF, lo que lleva a una mayor expresión de esta neutrofina (Blurton-Jones y Tuszynski, 2006). En apoyo a esta idea Weiland y colaboradores (1997) al estudiar el hipocampo han demostrado que existen células inmunoreactivas para el RE en mayor proporción en el hilio del DG.

Se ha observado un efecto diferencial de E2 que depende de la región y del tiempo postovx. Jezierski y Sohrabji (2001) demostraron que los estrógenos aumentaban los niveles de BDNF en el bulbo olfatorio de animales adultos jóvenes; sin embargo, en animales senescentes el E2 disminuye significativamente la expresión de BDNF. En la región del prosencéfalo basal, el tratamiento con E2 en animales senescentes disminuyó la expresión del BDNF, contrario a lo observado en animales adultos jóvenes. Lo que sugiere que los efectos de E2 sobre BDNF son complejos y dependen de la región del cerebro y la edad.

En ratas con 3 semanas postovx y tratadas con prolame, se encontró una mayor proporción de las isoformas preproBDNF y proBDNF en la región del DG (Fig. 6A), de igual manera se observan estos resultados en la región de CA3 a las 8 semanas postovx, lo que sugiere que el aumento en estas proteínas probablemente es reflejo de que se indujo la transcripción del gen BDNF.

Aunque, se desconoce si prolame comparte con BDNF las mismas vías de transducción de señales, se puede especular que al ser una molécula con estructura similar al E2 podría regular la transcripción del gen BDNF por los mismos mecanismos que E2.

El tratamiento con prolame a ratas con 8 semanas postovx en la región del DG reveló una mayor presencia de las isoformas proBDNF y mBDNF (Fig. 6A), este incremento que se observa en las proteínas probablemente sea el reflejo de una mayor maduración de la proteína. Desconocemos los mecanismos por los que prolame podría incidir en los procesos de maduración. Sugerimos que puede ser a través de la modulación de enzimas relacionadas con el proceso de maduración del BDNF, como se ha observado con la

administración de compuestos con acciones antidepresivas. Al respecto, Zhang y colaboradores (2018) encontraron que la administración de ketamina a ratas sometidas al modelo de CUMS poseía efectos de tipo antidepresivo debido al aumento de tPA y un consecuente aumento de mBDNF, así como una disminución de proBDNF. Esto sugiere que las enzimas intracelulares y extracelulares que escinden el proBDNF a mBDNF son cruciales en las enfermedades neurodegenerativas incluido el TDM (Zhou et al., 2013). Aun no hay estudios para conocer si prolame puede inducir la expresión de enzimas que participan en la maduración de proBDNF o si el efecto que ejerce sobre la maduración de la proteína este correlacionado con alguna de las vías de transducción de señales de BDNF, por tal motivo se requiere investigar los efectos de prolame.

Los resultados en el presente estudio tienen implicaciones para otras variables asociadas a la respuesta antidepresiva a las TRE. Al evaluar los efectos tipo antidepresivos de prolame, se encontró que el tiempo postovx y la edad son importantes para observar dichos efectos, ya que, en ratas hembra de mediana edad, a las 3 semanas postovx, prolame produce efecto antidepresivo a diferencia de E2 el cual no ejerció este efecto en ratas de mediana edad a ningún tiempo postovx (Hernández-Hernández et al., 2022). Estas observaciones sugieren que prolame es capaz de ejercer efectos tipo antidepresivos en ratas con mayor tiempo postovx y mayor edad, esto abriría una oportunidad a la propuesta de prolame como una terapia de restitución hormonal con mayores ventajas terapéuticas. Es posible que las diferencias en los cambios moleculares provocados por E2 y prolame en distintas áreas del hipocampo modulen sus acciones antidepresivas asociadas a la duración del hipoestrogenismo, lo que apoyaría la idea de prolame como una terapia de reemplazo hormonal con ventajas.

10. Conclusión

Los tratamientos subcrónicos con E2 y prolame regularon positivamente la expresión de mBDNF en ratas adultas jóvenes expuestas a un estresor (FST) que se sabe está asociado con el desarrollo de signos de tipo depresivo. Lo que sugiere que ambos estrógenos participan en la maduración de este factor neurotrófico en el hipocampo, una acción que aparentemente es modulada por el tipo de estrógeno y por la duración del hipoestrogenismo.

Los efectos de E2 y prolame a nivel hipocampal mostraron similitudes y divergencias relacionadas con la región analizada. En la región CA3 de ratas con hipoestrogenismo de

3 semanas el tratamiento con E2 incrementa la síntesis y maduración del BDNF, mientras que prolame produjo el efecto contrario sobre ambos procesos en los dos tiempos postovx. En la región del DG se observó que a menor tiempo de hipoestrogenismo (3 semanas) los tratamientos de E2 o prolame favorecen la síntesis de la proteína del BDNF. Con hipoestrogenismo más prolongado (8 semanas) observamos una disminución de la síntesis del BDNF con el tratamiento de E2 y un aumento en la maduración del BDNF con prolame. Los hallazgos en conjunto indican que E2 y prolame producen efectos de tipo antidepresivo y modulan de manera tejido especifica la síntesis y maduración del BDNF; sugerimos que estos efectos son mediados por diferentes mecanismos de acción.

11. Apéndice (anexo)

Buffer RIPA

se pesaron 0.88 g de cloruro de sodio (NaCl), 0.15 g de EDTA ($C_{10}H_{16}N_2O_8$), 1g de desoxicolato de sodio ($C_{24}H_{39}NaO_4$), 0.10 g de SDS, posteriormente se adicionaron 2.5 ml de Tris- HCl 1M pH 7.6, 1 ml de Tris x-100 al 1% y se aforó con agua destilada hasta los 100 mL.

Buffer de transferencia

Para preparar 1L de buffer de transferencia se adicionaron 100 mL de tris/glicina 10x (Biorad, cat. 1610710), 700 mL de agua destilada y 200 mL de metanol (Sigma Aldrich lot. 52BE1530v), este último se adiciona hasta su uso.

PBS 1X

Para preparar 1L de PBS 1X se pesaron 8 g de NaCl, 0.2 g de KCl, 1.44 g de Na2HPO4 y 0.24 g de KH2PO4, se disolvieron con 800 mL de agua destilada y se ajustó el pH a 7.4, para finalmente aforar a 1000 mL.

PBS 1X + tween 20 0.1%

Para preparar 1L, se midieron 800 mL de PBS 1X y se adicionaron 1000 µL de tween 20 (Santa Cruz Biotechnology, cat. sc29113c) con cuidado para no formar burbujas, finalmente se aforó a 1 L.

Stripping solutión

Para preparar 1L de stripping se pesaron 15 g de glicina, 1 g de SDS y se disolvieron en 800 mL de agua destilada, se adicionaron 10 mL de tween 20% (Santa Cruz Biotechnology, cat. sc29113c) y se ajustó el pH a 2.2. Finalmente se aforó a 1L.

Solución de bloqueo

Se midieron 10 mL de PBS + tween 20 0.1% y se le adicionaron 0.5 g de leche sin grasa (Biorad, cat. 1706404), finalmente se integró mediante agitación con un vortex.

Gel separador

Para preparar 1 gel separador al 12% (5 mL) se adicionaron 1.7 mL de agua miliQ, 2 mL de acrilamida/bis 30% (Biorad, cat. 1610158), 1.25 de buffer separador (Biorad, cat.1610798), 50 µL de SDS al 10% (Biorad cat. 1610416) y al final 25 µL de persulfato de amonio al 10% preparado al momento (Biorad, cat. 1610700) y 2.5 µL de TEMED (Biorad, cat. 1610801).

Gel concentrador

Para preparar 1 gel concentrador al 4% (2.5 mL) se adicionaron 1.525 mL de agua miliQ, 0.325 mL de acrilamida/bis 30% (Biorad, cat. 1610158), 0.625 mL del buffer concentrador (Biorad, cat. 1610799), 0.025 mL de SDS (Biorad cat. 1610416 y finalmente 12.5 µL de persulfato de amonio al 10% preparado al momento (Biorad, cat. 1610700) y 2.5 µL de TEMED (Biorad, cat. 1610801).

12. Referencias

Aid, T., Kazantseva, A., Piirsoo, M., Palm, K., & Timmusk, T. (2007). Mouse and rat BDNF gene structure and expression revisited. Journal of neuroscience research, 85(3), 525–535. https://doi.org/10.1002/jnr.21139

Amaral, D. G., & Witter, M. P. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. Neuroscience, 31(3), 571–591. https://doi.org/10.1016/0306-4522(89)90424-7

American Psychiatric Association (2014). Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales (DSM-5). (5th ed,155-168 pp). Editorial Médica Panamericana

Aranda, A., & Pascual, A. (2001). Nuclear hormone receptors and gene expression, Physiological reviews, 81(3), 1269–1304. https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.3.1269

Bai, Y. Y., Ruan, C. S., Yang, C. R., Li, J. Y., Kang, Z. L., Zhou, L., Liu, D., Zeng, Y. Q., Wang, T. H., Tian, C. F., Liao, H., Bobrovskaya, L., & Zhou, X. F. (2016). ProBDNF Signaling Regulates Depression-Like Behaviors in Rodents under Chronic Stress. Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology, 41(12), 2882–2892. https://doi.org/10.1038/npp.2016.100

Bajic, V. B., Tan, S. L., Chong, A., Tang, S., Ström, A., Gustafsson, J. A., Lin, C. Y., & Liu, E. T. (2003). Dragon ERE Finder version 2: A tool for accurate detection and analysis of estrogen response elements in vertebrate genomes. Nucleic acids research, 31(13), 3605–3607. https://doi.org/10.1093/nar/gkg517

Baker, G. B., Coutts, R. T., McKenna, K. F., & Sherry-McKenna, R. L. (1992). Insights into the mechanisms of action of the MAO inhibitors phenelzine and tranylcypromine: a review. Journal of psychiatry & neuroscience : JPN, 17(5), 206–214.

Bannerman D. M., Grubb M., Deacon R. M., Yee B. K., Feldon J., Rawlins J. N. (2003). Ventral hippocampal lesions affect anxiety but not spatial learning. Behav. Brain Res. 139, 197–213. 10.1016/s0166-4328(02)00268-1

Bannerman D. M., Rawlins J. N., McHugh S. B., Deacon R. M., Yee B. K., Bast T., et al. (2004). Regional dissociations within the hippocampus—memory and anxiety. Neurosci. Biobehav. Rev. 28, 273–283. 10.1016/j.neubiorev.2004.03.004

Bannerman, D. M., Sprengel, R., Sanderson, D. J., McHugh, S. B., Rawlins, J. N., Monyer, H., & Seeburg, P. H. (2014). Hippocampal synaptic plasticity, spatial memory and anxiety. Nature reviews. Neuroscience, 15(3), 181–192. https://doi.org/10.1038/nrn3677.

Barrett-Connor, E., Von Mühlen, D. G., & Kritz-Silverstein, D. (1999). Bioavailable testosterone and depressed mood in older men: the Rancho Bernardo Study. The Journal of clinical endocrinology and metabolism, 84(2), 573–577. https://doi.org/10.1210/jcem.84.2.5495

Bekinschtein, P., Cammarota, M., Izquierdo, I., & Medina, J. H. (2008). BDNF and memory formation and storage. The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry, 14(2), 147–156. https://doi.org/10.1177/1073858407305850

Bekku, N., & Yoshimura, H. (2005). Animal model of menopausal depressive-like state in female mice: prolongation of immobility time in the forced swimming test following ovariectomy. Psychopharmacology, 183(3), 300–307. https://doi.org/10.1007/s00213-005-0179-0

Belfiore, C. J., Hawkins, D. E., Wiltbank, M. C., & Niswender, G. D. (1994). Regulation of cytochrome P450scc synthesis and activity in the ovine corpus luteum. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology, 51(5-6), 283–290. https://doi.org/10.1016/0960-0760(94)90041-8

Bell, C., Abrams, J., & Nutt, D. (2001). Tryptophan depletion and its implications for psychiatry. British Journal of Psychiatry, 178(5), 399-405. doi:10.1192/bjp.178.5.399

Bennesch MA, & Picard D (2015). Minireview: Tipping the balance: ligand-independent activation of steroid receptors. Mol Endocrinol, 29(3), 349–363.

Berton, O., & Nestler, E. J. (2006). New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. Nature reviews. Neuroscience, 7(2), 137–151. https://doi.org/10.1038/nrn1846

Bi, R., Broutman, G., Foy, M. R., Thompson, R. F., & Baudry, M. (2000). The tyrosine kinase and mitogen-activated protein kinase pathways mediate multiple effects of estrogen in hippocampus. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 97(7), 3602–3607. https://doi.org/10.1073/pnas.97.7.3602

Björnström L, & Sjöberg M (2005). Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. Mol Endocrinol, 19(4), 833–842

Blanquet, P. R., Mariani, J., & Derer, P. (2003). A calcium/calmodulin kinase pathway connects brain-derived neurotrophic factor to the cyclic AMP-responsive transcription factor in the rat hippocampus. Neuroscience, 118(2), 477–490. https://doi.org/10.1016/s0306-4522(02)00963-6

Bloch, M., Rotenberg, N., Koren, D., & Klein, E. (2005). Risk factors associated with the development of postpartum mood disorders. Journal of affective disorders, 88(1), 9–18. https://doi.org/10.1016/j.jad.2005.04.007

Blurton-Jones, M., & Tuszynski, M. H. (2006). Estradiol-induced modulation of estrogen receptor-beta and GABA within the adult neocortex: a potential transsynaptic mechanism for estrogen modulation of BDNF. The Journal of comparative neurology, 499(4), 603–612. https://doi.org/10.1002/cne.21122

Bocchinfuso, W. P., & Korach, K. S. (1997). Mammary gland development and tumorigenesis in estrogen receptor knockout mice. Journal of mammary gland biology and neoplasia, 2(4), 323–334. https://doi.org/10.1023/a:1026339111278

Breslau, N., Schultz, L., & Peterson, E. (1995). Sex differences in depression: a role for preexisting anxiety. Psychiatry research, 58(1), 1–12. https://doi.org/10.1016/0165-1781(95)02765-o

Brinton R. D. (2005). Investigative models for determining hormone therapy-induced outcomes in brain: evidence in support of a healthy cell bias of estrogen action. Annals of the New York Academy of Sciences, 1052, 57–74. https://doi.org/10.1196/annals.1347.005

Bromberger, J. T., Matthews, K. A., Schott, L. L., Brockwell, S., Avis, N. E., Kravitz, H. M., Everson-Rose, S. A., Gold, E. B., Sowers, M., & Randolph, J. F., Jr (2007). Depressive symptoms during the menopausal transition: the Study of Women's Health Across the Nation (SWAN). Journal of affective disorders, 103(1-3), 267–272. https://doi.org/10.1016/j.jad.2007.01.034

Bromberger JT, Kravitz HM, Chang Y-F, Cyranowski JM, Brown C, Matthews KA (2011). Major depression during and after the men*opausal transition: Study of Women's Health Across the Nation (SWAN). Psychol Med.* 41(9):1879–88

Brownstein, C., Falcone, D. J., Jacovina, A., & Hajjar, K. A. (2001). A mediator of cell surface-specific plasmin generation. Annals of the New York Academy of Sciences, 947, 143–156.

Brownstein, C., Deora, A. B., Jacovina, A. T., Weintraub, R., Gertler, M., Khan, K. M., Falcone, D. J., & Hajjar, K. A. (2004). Annexin II mediates plasminogen-dependent matrix invasion by human monocytes: enhanced expression by macrophages. Blood, 103(1), 317–324. https://doi.org/10.1182/blood-2003-04-1304

Carr, B. R., MacDonald, P. C., & Simpson, E. R. (1982). The role of lipoproteins in the regulation of progesterone secretion by the human corpus luteum. Fertility and sterility, 38(3), 303–311. https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)46511-8

Castrén E. (2013). Neuronal network plasticity and recovery from depression. JAMA psychiatry, 70(9), 983–989. https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2013.1

Celada, P., & Artigas, F. (1993). Monoamine oxidase inhibitors increase preferentially extracellular 5-hydroxytryptamine in the midbrain raphe nuclei. A brain microdialysis study in the awake rat. Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology, 347(6), 583–590. https://doi.org/10.1007/BF00166940

Cesarman, G. M., Guevara, C. A., & Hajjar, K. A. (1994). An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator (t-PA). II. Annexin II-mediated enhancement of t-PA-dependent plasminogen activation. The Journal of biological chemistry, 269(33), 21198–21203.

Chakraborty, T. R., & Gore, A. C. (2004). Aging-related changes in ovarian hormones, their receptors, and neuroendocrine function. Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.), 229(10), 977–987. https://doi.org/10.1177/153537020422901001

Chao M. V. (2003). Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. Nature reviews. Neuroscience, 4(4), 299–309. https://doi.org/10.1038/nrn1078

Cohen, L. S., Soares, C. N., Vitonis, A. F., Otto, M. W., & Harlow, B. L. (2006). Risk for new onset of depression during the menopausal transition: the Harvard study of moods and cycles. Archives of general psychiatry, 63(4), 385–390. https://doi.org/10.1001/archpsyc.63.4.385

Colucci-D'Amato, L., Speranza, L., y Volpicelli, F. (2020). Neurotrophic Factor BDNF, Physiological Functions and Therapeutic Potential in Depression, Neurodegeneration and Brain Cancer. International journal of molecular sciences, 21(20), 7777. https://doi.org/10.3390/ijms21207777

Conner, J. M., Lauterborn, J. C., Yan, Q., Gall, C. M., & Varon, S. (1997). Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: evidence for anterograde axonal transport. The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience, 17(7), 2295–2313. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-07-02295.1997

Conrad, C. D., LeDoux, J. E., Magariños, A. M., & McEwen, B. S. (1999). Repeated restraint stress facilitates fear conditioning independently of causing hippocampal CA3 dendritic atrophy. Behavioral neuroscience, 113(5), 902–913. https://doi.org/10.1037//0735-7044.113.5.902

Cui, J., Shen, Y., & Li, R. (2013). Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain. Trends in molecular medicine, 19(3), 197–209. https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.12.007

Czéh, B., Simon, M., Schmelting, B., Hiemke, C., & Fuchs, E. (2006). Astroglial plasticity in the hippocampus is affected by chronic psychosocial stress and concomitant fluoxetine treatment. Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology, 31(8), 1616–1626. https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300982

Dean, J., & Keshavan, M. (2017). The neurobiology of depression: An integrated view. Asian journal of psychiatry, 27, 101–111. https://doi.org/10.1016/j.ajp.2017.01.025

Deecher, D., Andree, T. H., Sloan, D., & Schechter, L. E. (2008). From menarche to menopause: exploring the underlying biology of depression in women experiencing hormonal changes. Psychoneuroendocrinology, 33(1), 3–17. https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2007.10.006

Detke, M. J., Rickels, M., & Lucki, I. (1995). Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. Psychopharmacology, 121(1), 66–72. https://doi.org/10.1007/BF02245592

Dieni, S., Matsumoto, T., Dekkers, M., Rauskolb, S., Ionescu, M. S., Deogracias, R., Gundelfinger, E. D., Kojima, M., Nestel, S., Frotscher, M., & Barde, Y. A. (2012). BDNF and its pro-peptide are stored in presynaptic dense core vesicles in brain neurons. The Journal of cell biology, 196(6), 775–788. https://doi.org/10.1083/jcb.201201038

Dincheva, I., Lynch, N. B., & Lee, F. S. (2016). The Role of BDNF in the Development of Fear Learning. Depression and anxiety, 33(10), 907–916. https://doi.org/10.1002/da.22497

Diz-Chaves, Y., Kwiatkowska-Naqvi, A., Von Hülst, H., Pernía, O., Carrero, P., & Garcia-Segura, L. M. (2012). Behavioral effects of estradiol therapy in ovariectomized rats depend on the age when the treatment is initiated. Experimental gerontology, 47(1), 93–99. https://doi.org/10.1016/j.exger.2011.10.008

Du, J., Feng, L., Yang, F., & Lu, B. (2000). Activity- and Ca (2+)-dependent modulation of surface expression of brain-derived neurotrophic factor receptors in hippocampal neurons. The Journal of cell biology, 150(6), 1423–1434. https://doi.org/10.1083/jcb.150.6.1423

Ernfors, P., & Bramham, C. R. (2003). The coupling of a trkB tyrosine residue to LTP. Trends in neurosciences, 26(4), 171–173. https://doi.org/10.1016/S0166-2236(03)00064-X

Estrada-Camarena, E., Fernández-Guasti, A., & López-Rubalcava, C. (2003). Antidepressant-like effect of different estrogenic compounds in the forced swimming test. Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology, 28(5), 830–838. https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300097

Estrada-Camarena, E., Fernández-Guasti, A., & López-Rubalcava, C. (2004). Interaction between estrogens and antidepressants in the forced swimming test in rats. Psychopharmacology, 173(1-2), 139–145. https://doi.org/10.1007/s00213-003-1707-4

Estrada-Camarena, E., Rivera, N. M., Berlanga, C., & Fernández-Guasti, A. (2008). Reduction in the latency of action of antidepressants by 17 beta-estradiol in the forced swimming test. Psychopharmacology, 201(3), 351–360. https://doi.org/10.1007/s00213-008-1291-8

Farquhar, C., Marjoribanks, J., Lethaby, A., Suckling, J. A., & Lamberts, Q. (2009). Long term hormone therapy for perimenopausal and postmenopausal women. The Cochrane database of systematic reviews, (2), CD004143. https://doi.org/10.1002/14651858.CD004143.pub3

Foltran, R. B., & Diaz, S. L. (2016). BDNF isoforms: a round trip ticket between neurogenesis and serotonin? Journal of neurochemistry, 138(2), 204–221. https://doi.org/10.1111/jnc.13658

Franklin, T. B., & Perrot-Sinal, T. S. (2006). Sex and ovarian steroids modulate brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein levels in rat hippocampus under stressful and non-stressful conditions. Psychoneuroendocrinology, 31(1), 38–48. https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2005.05.008

Freeman EW, Sammel MD, Lin H, Nelson DB (2006). Associations of hormones and menopausal status with depressed mood in women with no history of depression. Arch Gen Psychiatry. 63(4): 375.

Freudenberg F. (2019). Quantitative analysis of Gria1, Gria2, Dlg1 and Dlg4 expression levels in hippocampus following forced swim stress in mice. Scientific reports, 9(1), 14060. https://doi.org/10.1038/s41598-019-50689-w

Fuentes, N., & Silveyra, P. (2019). Estrogen receptor signaling mechanisms. Advances in protein chemistry and structural biology, 116, 135–170. https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2019.01.001

Ganea, K., Menke, A., Schmidt, M. V., Lucae, S., Rammes, G., Liebl, C., Harbich, D., Sterlemann, V., Storch, C., Uhr, M., Holsboer, F., Binder, E. B., Sillaber, I., & Müller, M. B. (2012). Convergent animal and human evidence suggests the activin/inhibin pathway to be involved in antidepressant response. Translational psychiatry, 2(10), e177. https://doi.org/10.1038/tp.2012.104

Gaub, M. P., Bellard, M., Scheuer, I., Chambon, P., & Sassone-Corsi, P. (1990). Activation of the ovalbumin gene by the estrogen receptor involves the fos-jun complex. Cell, 63(6), 1267–1276. https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90422-b

Giannotti, G., Scherer, J., Caffino, L., Ornell, F., Fumagalli, F., y von Diemen, L. (2017). Brain-Derived Neurotrophic Factor in Cocaine Withdrawal. In The Neuroscience of Cocaine (pp. 555-564). Academic Press.

Gibbs R. (1998). Levels of trkA and BDNF mRNA, but not NGF mRNA, fluctuate across the estrous cycle and increase in response to acute hormone replacement. Brain Res, 787, 259–268.

Gottsch, M. L., Navarro, V. M., Zhao, Z., Glidewell-Kenney, C., Weiss, J., Jameson, J. L., Clifton, D. K., Levine, J. E., & Steiner, R. A. (2009). Regulation of Kiss1 and dynorphin gene expression in the murine brain by classical and nonclassical estrogen receptor pathways. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 29(29), 9390–9395. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0763-09.2009

Hojo, Y., Munetomo, A., Mukai, H., Ikeda, M., Sato, R., Hatanaka, Y., Murakami, G., Komatsuzaki, Y., Kimoto, T., & Kawato, S. (2015). Estradiol rapidly modulates spinogenesis in hippocampal dentate gyrus: Involvement of kinase networks. Hormones and behavior, 74, 149–156. https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2015.06.008

Hwang, J. J., Park, M. H., Choi, S. Y., & Koh, J. Y. (2005). Activation of the Trk signaling pathway by extracellular zinc. Role of metalloproteinases. The Journal of biological chemistry, 280(12), 11995–12001. https://doi.org/10.1074/jbc.M403172200

Hwang, J., Hodis, H. N., Hsiai, T. K., Asatryan, L., & Sevanian, A. (2006). Role of annexin II in estrogen-induced macrophage matrix metalloproteinase-9 activity: the modulating effect of statins. Atherosclerosis, 189(1), 76–82. https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2005.11.026

Ilchibaeva, T. V., Kondaurova, E. M., Tsybko, A. S., Kozhemyakina, R. V., Popova, N. K., & Naumenko, V. S. (2015). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its precursor (proBDNF) in genetically defined fear-induced aggression. Behavioural brain research, 290, 45–50. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.04.041

Jaimez, R., Cooney, A., Jackson, K., Lemus, A. E., Lemini, C., Cárdenas, M., García, R., Silva, G., & Larrea, F. (2000). In vivo estrogen bioactivities and in vitro estrogen receptor binding and transcriptional activities of anticoagulant synthetic

Jezierski, M. K., & Sohrabji, F. (2001). Neurotrophin expression in the reproductively senescent forebrain is refractory to estrogen stimulation. Neurobiology of aging, 22(2), 309–319. https://doi.org/10.1016/s0197-4580(00)00230-x

Jiang, H., Chen, S., Li, C., Lu, N., Yue, Y., Yin, Y., Zhang, Y., Zhi, X., Zhang, D., & Yuan Y. (2017). The serum protein levels of the tPA-BDNF pathway are implicated in depression and antidepressant treatment. Translational psychiatry, 7(4), e1079. https://doi.org/10.1038/tp.2017.43

Kaplan, D. R., & Miller, F. D. (2000). Neurotrophin signal transduction in the nervous system. Current opinion in neurobiology, 10(3), 381–391. https://doi.org/10.1016/s0959-4388(00)00092-1

Kendler, K. S., Gardner, C. O., & Prescott, C. A. (1999). Clinical characteristics of major depression that predict risk of depression in relatives. Archives of general psychiatry, 56(4), 322–327. https://doi.org/10.1001/archpsyc.56.4.322

Kessler, R. C., McGonagle, K. A., Swartz, M., Blazer, D. G., & Nelson, C. B. (1993). Sex and depression in the National Comorbidity Survey. I: Lifetime prevalence, chronicity and recurrence. Journal of affective disorders, 29(2-3), 85–96. https://doi.org/10.1016/0165-0327(93)90026-g

Kessler, R. C., McGonagle, K. A., Nelson, C. B., Hughes, M., Swartz, M., & Blazer, D. G. (1994). Sex and depression in the National Comorbidity Survey. II: Cohort effects. Journal of affective disorders, 30(1), 15–26. https://doi.org/10.1016/0165-0327(94)90147-3

Kessler R. C. (2003). Epidemiology of women and depression. Journal of affective disorders, 74(1), 5–13. https://doi.org/10.1016/s0165-0327(02)00426-3

Kim, J. J., & Fanselow, M. S. (1992). Modality-specific retrograde amnesia of fear. Science (New York, N.Y.), 256(5057), 675–677. https://doi.org/10.1126/science.1585183

Klinge C. M. (2001). Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. Nucleic acids research, 29(14), 2905–2919. https://doi.org/10.1093/nar/29.14.2905

Kim, E. J., Pellman, B., & Kim, J. J. (2015). Stress effects on the hippocampus: a critical review. Learning & memory (Cold Spring Harbor, N.Y.), 22(9), 411–416. https://doi.org/10.1101/lm.037291.114

Knüsel, B., Beck, K. D., Winslow, J. W., Rosenthal, A., Burton, L. E., Widmer, H. R., Nikolics, K., & Hefti, F. (1992). Brain-derived neurotrophic factor administration protects basal forebrain cholinergic but not nigral dopaminergic neurons from degenerative changes after axotomy in the adult rat brain. The Journal of

neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 12(11), 4391–4402. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.12-11-04391.1992

Krege, J. H., Hodgin, J. B., Couse, J. F., Enmark, E., Warner, M., Mahler, J. F., Sar, M., Korach, K. S., Gustafsson, J. A., & Smithies, O. (1998). Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 95(26), 15677–15682. https://doi.org/10.1073/pnas.95.26.15677

Lavenex, P., Banta Lavenex, P., & Amaral, D. G. (2007). Postnatal development of the primate hippocampal formation. Developmental neuroscience, 29(1-2), 179–192. https://doi.org/10.1159/000096222

Le Dily, F., & Beato, M. (2018). Signaling by Steroid Hormones in the 3D Nuclear Space. International journal of molecular sciences, 19(2), 306. https://doi.org/10.3390/ijms19020306

Lee, F. S., & Chao, M. V. (2001). Activation of Trk neurotrophin receptors in the absence of neurotrophins. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 98(6), 3555–3560. https://doi.org/10.1073/pnas.061020198

Lemini, C., Franco, Y., Avila, M. E., & Jaimez, R. (2005a). Contrasting effects of estradiol and 17 beta-aminoestrogens on blood clotting time in rats and mice. European journal of pharmacology, 510(3), 229–233. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.01.027

Lemini, C., Franco, Y., Avila, M. E., & Jaimez, R. (2005b). Estrogenic effects of 17 beta-aminoestrogens assessed in uteri of rats and mice. European journal of pharmacology, 510(3), 235–239. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.01.028

Lemini, C., & Canchola, E. (2009). Induction of sexual behavior in female rats by the 17beta-aminoestrogens prolame, butolame and pentolame. Proceedings of the Western Pharmacology Society, 52, 39–42.

Lemini, C., Cruz-López, B., & Martínez-Mota, L. (2013). Participation of estrogen receptors in the antidepressant-like effect of prolame on the forced swimming test. Pharmacology, biochemistry, and behavior, 103(3), 659–665. https://doi.org/10.1016/j.pbb.2012.11.004

Lemini, C., García-Albor, E., Cruz-López, B., Matamoros-Trejo, G., & Martínez-Mota, L. (2016). Differential effect *of the 17β*-aminoestrogens prolame, butolame and pentolame in anxiety and depression models in rats. Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry, 64, 102–108. https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.07.013

Lemini, C., Estela Avila, M., Medina, M., Sánchez, C., Figueroa, A., García-Mondragón, M. J., Vargas-Vázquez, A., & Jiménez-Orozco, A. (2017). *Proliferative Properties of 17β*-aminoestrogens in MCF-7 Human Breast Cancer Cells. Basic & clinical pharmacology & toxicology, 120(3), 235–242. https://doi.org/10.1111/bcpt.12674

Leonard B. E. (2001). Stress, norepinephrine and depression. Journal of psychiatry & neuroscience: JPN, 26 (Suppl), S11–S16.

Levin E. R. (2009). Plasma membrane estrogen receptors. Trends in endocrinology and metabolism: TEM, 20(10), 477–482. https://doi.org/10.1016/j.tem.2009.06.009

Li, J., Chen, J., Ma, N., Yan, D., Wang, Y., Zhao, X., Zhang, Y., & Zhang, C. (2019). Effects of corticosterone on the expression of mature brain-derived neurotrophic factor (mBDNF) and proBDNF in the hippocampal dentate gyrus. Behavioural brain research, 365, 150–156. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.03.010

Li, W., Ye, A., Ao, L., Zhou, L., Yan, Y., Hu, Y., Fang, W., & Li, Y. (2020). Protective Mechanism and Treatment of Neurogenesis in Cerebral Ischemia. Neurochemical research, 45(10), 2258–2277. https://doi.org/10.1007/s11064-020-03092-1

Liehr J. G. (2000). Is estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen?. Endocrine reviews, 21(1), 40–54. https://doi.org/10.1210/edrv.21.1.0386

Lin, L., Herselman, M. F., Zhou, X. F., & Bobrovskaya, L. (2022). Effects of corticosterone on BDNF expression and mood behaviours in mice. Physiology & behavior, 247, 113721. https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2022.113721

Lindsay R. (1998) Nerve growth factors (NGF, BDNF) enhance axonal regeneration but are not required for survival of adult sensory neurons. J. Neurosci. 8:2394–2405.

Lu B. (2003). Pro-region of neurotrophins: role in synaptic modulation. Neuron, 39(5), 735–738. https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00538-5

Lu, B., Pang, P. T., & Woo, N. H. (2005). The yin and yang of neurotrophin action. Nature reviews. Neuroscience, 6(8), 603–614. https://doi.org/10.1038/nrn1726

Luttrell, L. M., Daaka, Y., & Lefkowitz, R. J. (1999). Regulation of tyrosine kinase cascades by G-protein-coupled receptors. Current opinion in cell biology, 11(2), 177–183. https://doi.org/10.1016/s0955-0674(99)80023-4

Maggiolini, M., & Picard, D. (2010). The unfolding stories of GPR30, a new membrane-bound estrogen receptor. The Journal of endocrinology, 204(2), 105–114. https://doi.org/10.1677/JOE-09-0242

Malberg, J. E., Eisch, A. J., Nestler, E. J., & Duman, R. S. (2000). Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 20(24), 9104–9110. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-24-09104.2000

Marjoribanks, J., Farquhar, C., Roberts, H., Lethaby, A., & Lee, J. (2017). Long-term hormone therapy for perimenopausal and postmenopausal women. The Cochrane database of systematic reviews, 1(1), CD004143. https://doi.org/10.1002/14651858.CD004143.pub5

Marosi, K., & Mattson, M. P. (2014). BDNF mediates adaptive brain and body responses to energetic challenges. Trends in endocrinology and metabolism: TEM, 25(2), 89–98. https://doi.org/10.1016/j.tem.2013.10.006

Martinowich, K., Manji, H., & Lu, B. (2007). New insights into BDNF function in depression and anxiety. Nature neuroscience, 10(9), 1089–1093. https://doi.org/10.1038/nn1971

Martinowich, K., & Lu, B. (2008). Interaction between BDNF and serotonin: role in mood disorders. Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology, 33(1), 73–83. https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301571

Mattson, M. P., Maudsley, S., & Martin, B. (2004). BDNF and 5-HT: a dynamic duo in age-related neuronal plasticity and neurodegenerative disorders. Trends in neurosciences, 27(10), 589–594. https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.08.001

McEwen B. S. (2001). Invited review: Estrogens effects on the brain: multiple sites and molecular mechanisms. Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985), 91(6), 2785–2801. https://doi.org/10.1152/jappl.2001.91.6.2785

McEwen, B. S., Nasca, C., & Gray, J. D. (2016). Stress Effects on Neuronal Structure: Hippocampus, Amygdala, and Prefrontal Cortex. Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology, 41(1), 3–23. https://doi.org/10.1038/npp.2015.171

McHugh, S. B., Fillenz, M., Lowry, J. P., Rawlins, J. N., & Bannerman, D. M. (2011). Brain tissue oxygen amperometry in behaving rats demonstrates functional dissociation of dorsal and ventral hippocampus during spatial processing and anxiety. The European journal of neuroscience, 33(2), 322–337. https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07497.

Meyer-Franke, A., Wilkinson, G. A., Kruttgen, A., Hu, M., Munro, E., Hanson, M. G., Jr, Reichardt, L. F., & Barres, B. A. (1998). Depolarization and cAMP elevation rapidly recruit TrkB to the plasma membrane of CNS neurons. Neuron, 21(4), 681–693. https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80586-3

Miller, W. L., & Strauss, J. F., 3rd (1999). Molecular pathology and mechanism of action of the steroidogenic acute regulatory protein, StAR. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology, 69(1-6), 131–141. https://doi.org/10.1016/s0960-0760(98)00153-8

Miller W. L. (2011). Role of mitochondria in steroidogenesis. Endocrine development, 20, 1–19. https://doi.org/10.1159/000321204

Miranda, R. C., Sohrabji, F., & Toran-Allerand, C. D. (1993). Presumptive Estrogen Target Neurons Express mRNAs for both the Neurotrophins and Neurotrophin Receptors: A Basis for Potential Developmental Interactions of Estrogen with the Neurotrophins. Molecular and cellular neurosciences, 4(6), 510–525. https://doi.org/10.1006/mcne.1993.1063

Mizuno, M., Yamada, K., Takei, N., Tran, M. H., He, J., Nakajima, A., Nawa, H., & Nabeshima, T. (2003). Phosphatidylinositol 3-kinase: a molecule mediating BDNF-dependent spatial memory formation. Molecular psychiatry, 8(2), 217–224. https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001215

Molteni, R., Calabrese, F., Bedogni, F., Tongiorgi, E., Fumagalli, F., Racagni, G., & Riva, M. A. (2006). Chronic treatment with fluoxetine up-regulates cellular BDNF mRNA expression in rat dopaminergic regions. The international journal of neuropsychopharmacology, 9(3), 307–317. https://doi.org/10.1017/S1461145705005766

Morgan, M. L., Cook, I. A., Rapkin, A. J., & Leuchter, A. F. (2005). Estrogen augmentation of antidepressants in perimenopausal depression: a pilot study. The Journal of clinical psychiatry, 66(6), 774–780. https://doi.org/10.4088/jcp.v66n0617

Morse, J. K., Wiegand, S. J., Anderson, K., You, Y., Cai, N., Carnahan, J., Miller, J., DiStefano, P. S., Altar, C. A., & Lindsay, R. M. (1993). Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) prevents the degeneration of medial septal cholinergic neurons following fimbria transection. The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience, 13(10), 4146–4156. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.13-10-04146.1993

Moser E., Moser M. B., Andersen P. (1993). Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions. J. Neurosci. 13, 3916–3925

Moser M. B., Moser E. I., Forrest E., Andersen P., Morris R. G. (1995). Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 92, 9697–9701. 10.1073/pnas.92.21.9697

Mowla, S. J., Farhadi, H. F., Pareek, S., Atwal, J. K., Morris, S. J., Seidah, N. G., & Murphy, R. A. (2001). Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. The Journal of biological chemistry, 276(16), 12660–12666. https://doi.org/10.1074/jbc.M008104200

Murray, P. S., & Holmes, P. V. (2011). An overview of brain-derived neurotrophic factor and implications for excitotoxic vulnerability in the hippocampus. International journal of peptides, 2011, 654085. https://doi.org/10.1155/2011/654085

Murphy, D. D., & Segal, M. (1996). Regulation of dendritic spine density in cultured rat hippocampal neurons by steroid hormones. The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience, 16(13), 4059–4068. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-13-04059.1996

Nagata, H., Nozaki, M., & Nakano, H. (2005). Short-term combinational therapy of low-dose estrogen with selective serotonin re-uptake inhibitor (fluvoxamine) for oophorectomized women with hot flashes and depressive tendencies. The journal of obstetrics and gynaecology research, 31(2), 107–114. https://doi.org/10.1111/j.1447-0756.2005.00254.x

Narod S. A. (2011). Hormone replacement therapy and the risk of breast cancer. Nature reviews. Clinical oncology, 8(11), 669–676. https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2011.110

Nestler, E. J., & Carlezon, W. A., Jr (2006). The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. Biological psychiatry, 59(12), 1151–1159. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2005.09.018

Niklison-Chirou, M. V., Agostini, M., Amelio, I., & Melino, G. (2020). Regulation of Adult Neurogenesis in Mammalian Brain. International journal of molecular sciences, 21(14), 4869. https://doi.org/10.3390/ijms21144869

Nilsson, S., Mäkelä, S., Treuter, E., Tujague, M., Thomsen, J., Andersson, G., Enmark, E., Pettersson, K., Warner, M., & Gustafsson, J. A. (2001). Mechanisms of estrogen action. Physiological reviews, 81(4), 1535–1565. https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.4.1535

Nolen-Hoeksema, S. (1987). Sex differences in unipolar depression: evidence and theory. Psychological bulletin, 101(2), 259.

O'Lone, R., Frith, M. C., Karlsson, E. K., & Hansen, U. (2004). Genomic targets of nuclear estrogen receptors. Molecular endocrinology (Baltimore, Md.), 18(8), 1859–1875. https://doi.org/10.1210/me.2003-0044

Osterlund, M. K., Gustafsson, J. A., Keller, E., & Hurd, Y. L. (2000). Estrogen receptor beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid (mRNA) expression within the human forebrain: distinct distribution pattern to ERalpha mRNA. The Journal of clinical endocrinology and metabolism, 85(10), 3840–3846. https://doi.org/10.1210/jcem.85.10.6913

Rasgon, N. L., Altshuler, L. L., Fairbanks, L. A., Dunkin, J. J., Davtyan, C., Elman, S., & Rapkin, A. J. (2002). Estrogen replacement therapy in the treatment of major depressive disorder in perimenopausal women. The Journal of clinical psychiatry, 63 Suppl 7, 45–48.

Revest, J. M., Dupret, D., Koehl, M., Funk-Reiter, C., Grosjean, N., Piazza, P. V., & Abrous, D. N. (2009). Adult hippocampal neurogenesis is involved in anxiety-related behaviors. Molecular psychiatry, 14(10), 959–967. https://doi.org/10.1038/mp.2009.15

Roddy, D. W., Farrell, C., Doolin, K., Roman, E., Tozzi, L., Frodl, T., O'Keane, V., & O'Hanlon, E. (2019). The Hippocampus in Depression: More Than the Sum of Its Parts? Advanced Hippocampal Substructure Segmentation in Depression. Biological psychiatry, 85(6), 487–497. https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2018.08.021

Roepke, T. A., Ronnekleiv, O. K., & Kelly, M. J. (2011). Physiological consequences of membrane-initiated estrogen signaling in the brain. Frontiers in bioscience (Landmark edition), 16(4), 1560–1573. https://doi.org/10.2741/3805

Rubinow, D. R., Schmidt, P. J., & Roca, C. A. (1998). Estrogen-serotonin interactions: implications for affective regulation. Biological psychiatry, 44(9), 839–850. https://doi.org/10.1016/s0006-3223(98)00162-0

Rubinow, M. J., Arseneau, L. M., Beverly, J. L., & Juraska, J. M. (2004). Effect of the estrous cycle on water maze acquisition depends on the temperature of the water. Behavioral neuroscience, 118(4), 863–868. https://doi.org/10.1037/0735-7044.118.4.863

Ryan, J., Burger, H. G., Szoeke, C., Lehert, P., Ancelin, M. L., Henderson, V. W., & Dennerstein, L. (2009). A prospective study of the association between endogenous hormones and depressive symptoms in postmenopausal women. Menopause (New York, N.Y.), 16(3), 509–517. https://doi.org/10.1097/gme.0b013e31818d635f

Santarelli, L., Saxe, M., Gross, C., Surget, A., Battaglia, F., Dulawa, S., Weisstaub, N., Lee, J., Duman, R., Arancio, O., Belzung, C., & Hen, R. (2003). Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. Science (New York, N.Y.), 301(5634), 805–809. https://doi.org/10.1126/science.1083328

Sawai, T., Bernier, F., Fukushima, T., Hashimoto, T., Ogura, H., & Nishizawa, Y. (2002). Estrogen induces a rapid increase of calcium-calmodulin-dependent protein kinase II activity in the hippocampus. Brain research, 950(1-2), 308–311. https://doi.org/10.1016/s0006-8993(02)03186-4

Scharfman, H. E., Mercurio, T. C., Goodman, J. H., Wilson, M. A., & MacLusky, N. J. (2003). Hippocampal excitability increases during the estrous cycle in the rat: a potential role for brain-derived neurotrophic factor. The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience, 23(37), 11641–11652. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-37-11641.2003

Scharfman, H. E., Hintz, T. M., Gomez, J., Stormes, K. A., Barouk, S., Malthankar-Phatak, G. H., McCloskey, D. P., Luine, V. N., & Maclusky, N. J. (2007). Changes in hippocampal function of ovariectomized rats after sequential low doses of estradiol to simulate the preovulatory estrogen surge. The European journal of neuroscience, 26(9), 2595–2612. https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05848.x

Schmidt, P. J., & Rubinow, D. R. (2009). Sex hormones and mood in the perimenopause. Annals of the New York Academy of Sciences, 1179, 70–85. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04982.x

Schoenfeld, T. J., & Gould, E. (2012). Stress, stress hormones, and adult neurogenesis. Experimental neurology, 233(1), 12–21. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.01.008

Segal, M., & Murphy, D. (2001). Estradiol induces formation of dendritic spines in hippocampal neurons: functional correlates. Hormones and behavior, 40(2), 156–159. https://doi.org/10.1006/hbeh.2001.1688

Segovia-Mendoza, M., Mirzaei, E., Prado-Garcia, H., Miranda, L. D., Figueroa, A., & Lemini, C. (2022). The *Interplay of GPER1 with 17β*-Aminoestrogens in the Regulation of the Proliferation of Cervical and Breast Cancer Cells: A Pharmacological Approach. International journal of environmental research and public health, 19(19), 12361. https://doi.org/10.3390/ijerph191912361

Sheline, Y. I., Wang, P. W., Gado, M. H., Csernansky, J. G., & Vannier, M. W. (1996). Hippocampal atrophy in recurrent major depression. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 93(9), 3908–3913. https://doi.org/10.1073/pnas.93.9.3908

Shirayama, Y., Chen, A. C., Nakagawa, S., Russell, D. S., & Duman, R. S. (2002). Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 22(8), 3251–3261. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-08-03251.2002

Shirayama, Y., Yang, C., Zhang, J. C., Ren, Q., Yao, W., & Hashimoto, K. (2015). Alterations in brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its precursor proBDNF in the brain regions of a learned helplessness rat model and the antidepressant effects of a TrkB agonist and antagonist. European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology, 25(12), 2449–2458. https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2015.09.002

Shughrue, P. J., Lane, M. V., & Merchenthaler, I. (1997). Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. The Journal of comparative neurology, 388(4), 507–525. https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9861(19971201)388:4<507: aid-cne1>3.0.co;2-6

Singh M., E.M. Meyer, J.W. Simpkins. (1995). The effects of ovariectomy and estradiol replacement on brain-derived neurotrophic factor messenger ribonucleic acid expression in cortical and hippocampal brain regions of female Sprague–Dawley rats, Endocrinology 136 (5), 2320–2324

Singh, M., Sétáló, G., Jr, Guan, X., Warren, M., & Toran-Allerand, C. D. (1999). Estrogen-induced activation of mitogen-activated protein kinase in cerebral cortical explants: convergence of estrogen and neurotrophin signaling pathways. The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience, 19(4), 1179–1188. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-04-01179.1999

Smith, S. S., & Woolley, C. S. (2004). Cellular and molecular effects of steroid hormones on CNS excitability. Cleveland Clinic journal of medicine, 71 Suppl 2, S4–S10. https://doi.org/10.3949/ccjm.71.suppl_2.s4

Soares CN, Zitek B. (2008) Reproductive hormone sensitivity and risk for depression across the female life cycle: a continuum of vulnerability? J Psychiatry Neurosci.33(4):331-43.

Sohrabji F, Miranda R, Toran-Allerand C. (1995) Identification of a putative estrogen response element in the gene coding for BDNF. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:11110–11114.

Solum, D. T., & Handa, R. J. (2002). Estrogen regulates the development of brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein in the rat hippocampus. The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience, 22(7), 2650–2659. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-07-02650.2002

Spencer, J. L., Waters, E. M., Milner, T. A., & McEwen, B. S. (2008). Estrous cycle regulates activation of hippocampal Akt, LIM kinase, and neurotrophin receptors in C57BL/6 mice. Neuroscience, 155(4), 1106–1119. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.05.049

Stewart, D. E., & Boydell, K. M. (1993). Psychologic distress during menopause: associations across the reproductive life cycle. International journal of psychiatry in medicine, 23(2), 157–162. https://doi.org/10.2190/026V-69M0-C0FF-7V7Y

Stocco D. M. (2001). StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis. Annual review of physiology, 63, 193–213. https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.63.1.193

Palkovits M. (1983). Punch sampling biopsy technique. Methods in enzymology, 103, 368–376. https://doi.org/10.1016/s0076-6879(83)03025-6

Pan, M., Li, Z., Yeung, V., & Xu, R. J. (2010). Dietary supplementation of soy germ phytoestrogens or estradiol improves spatial memory performance and increases gene expression of BDNF, TrkB receptor and synaptic factors in ovariectomized rats. Nutrition & metabolism, 7, 75. https://doi.org/10.1186/1743-7075-7-75

Pang, P. T., Teng, H. K., Zaitsev, E., Woo, N. T., Sakata, K., Zhen, S., Teng, K. K., Yung, W. H., Hempstead, B. L., & Lu, B. (2004). Cleavage of proBDNF by tPA/plasmin is essential for long-term hippocampal plasticity. Science (New York, N.Y.), 306(5695), 487–491. https://doi.org/10.1126/science.1100135

Pechtel, P., & Pizzagalli, D. A. (2011). Effects of early life stress on cognitive and affective function: an integrated review of human literature. Psychopharmacology, 214(1), 55–70. https://doi.org/10.1007/s00213-010-2009-2

Petrik, D., Lagace, D. C., & Eisch, A. J. (2012). The neurogenesis hypothesis of affective and anxiety disorders: are we mistaking the scaffolding for the building?. Neuropharmacology, 62(1), 21–34. https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.09.003

Pinto, V., Costa, J. C, Morgado, P., Mota, C., Miranda, A., Bravo, F. V., Oliveira, T. G., Cerqueira, J. J., & Sousa, N. (2015). Differential impact of chronic stress along the hippocampal dorsal-ventral axis. Brain structure & function, 220(2), 1205–1212. https://doi.org/10.1007/s00429-014-0713-0

Porsolt, R. D., Le Pichon, M., & Jalfre, M. (1978). Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. Nature, 266(5604), 730–732. https://doi.org/10.1038/266730a0

Tanapat, P., Hastings, N. B., Reeves, A. J., & Gould, E. (1999). Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 19(14), 5792–5801. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-14-05792.1999

Thanos, S., Bähr, M., Barde, Y. A., & Vanselow, J. (1989). Survival and Axonal Elongation of Adult Rat Retinal Ganglion Cells. The European journal of neuroscience, 1(1), 19–26. https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1989.tb00770.x

Tian, R. H., Bai, Y., Li, J. Y., & Guo, K. M. (2019). Reducing PRLR expression and JAK2 activity results in an increase in BDNF expression and inhibits the apoptosis of CA3 hippocampal neurons in a chronic mild stress model of depression. Brain research, 1725, 146472. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.146472

Tsutsumi, S., Zhang, X., Takata, K., Takahashi, K., Karas, R. H., Kurachi, H., & Mendelsohn, M. E. (2008). Differential regulation of the inducible nitric oxide synthase gene by estrogen receptors 1 and 2. The Journal of endocrinology, 199(2), 267–273. https://doi.org/10.1677/JOE-07-0292

Vega-Rivera, N. M., Fernández-Guasti, A., Ramírez-Rodríguez, G., & Estrada-Camarena, E. (2014). Forced swim and chronic variable stress reduced hippocampal cell survival in OVX female rats. Behavioural brain research, 270, 248–255. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.05.033

Walf, A. A., & Frye, C. A. (2006). A review and update of mechanisms of estrogen in the hippocampus and amygdala for anxiety and depression behavior. Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology, 31(6), 1097–1111. https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301067.

Walf, A. A., & Frye, C. A. (2007). Administration of estrogen receptor beta-specific selective estrogen receptor modulators to the hippocampus decrease anxiety and depressive behavior of ovariectomized rats. Pharmacology, biochemistry, and behavior, 86(2), 407–414. https://doi.org/10.1016/j.pbb.2006.07.003

Walf, A. A., Paris, J. J., & Frye, C. A. (2009). Chronic estradiol replacement to aged female rats reduces anxiety-like and depression-like behavior and enhances cognitive performance. Psychoneuroendocrinology, 34(6),909–916.https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2009.01.004

Wang, H., Warner-Schmidt, J., Varela, S., Enikolopov, G., Greengard, P., & Flajolet, M. (2015). Norbin ablation results in defective adult hippocampal neurogenesis and depressive-like behavior in mice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 112(31), 9745–9750. https://doi.org/10.1073/pnas.1510291112

Wang, J. W., David, D. J., Monckton, J. E., Battaglia, F., & Hen, R. (2008). Chronic fluoxetine stimulates maturation and synaptic plasticity of adult-born hippocampal granule cells. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 28(6), 1374–1384. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3632-07.2008

Wang, Y., Ma, Y., Hu, J., Cheng, W., Jiang, H., Zhang, X., Li, M., Ren, J., & Li, X. (2015). Prenatal chronic mild stress induces depression-like behavior and sex-specific changes in regional glutamate receptor expression patterns in adult rats. Neuroscience, 301, 363–374. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.06.008

Waterhouse, E. G., An, J. J., Orefice, L. L., Baydyuk, M., Liao, G. Y., Zheng, K., Lu, B., & Xu, B. (2012). BDNF promotes differentiation and maturation of adult-born neurons through GABAergic transmission. The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience, 32(41), 14318–14330. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0709-12.2012

Watt, D. F., & Panksepp, J. (2009). Depression: An evolutionarily conserved mechanism to terminate separation distress? A review of aminergic, peptidergic, and neural network perspectives. Neuropsychoanalysis, 11(1), 7–51. https://doi.org/10.1080/15294145.2009.10773593

Woolley, C. S., Gould, E., Frankfurt, M., & McEwen, B. S. (1990). Naturally occurring fluctuation in dendritic spine density on adult hippocampal pyramidal neurons. The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience, 10(12), 4035–4039. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.10-12-04035.1990

Woolley, C. S., & McEwen, B. S. (1993). Roles of estradiol and progesterone in regulation of hippocampal dendritic spine density during the estrous cycle in the rat. The Journal of comparative neurology, 336(2), 293–306. https://doi.org/10.1002/cne.903360210

Yamada, K., & Nabeshima, T. (2003). Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes. Journal of pharmacological sciences, 91(4), 267–270. https://doi.org/10.1254/jphs.91.267

Yan, Q., Rosenfeld, R. D., Matheson, C. R., Hawkins, N., Lopez, O. T., Bennett, L., & Welcher, A. A. (1997). Expression of brain-derived neurotrophic factor protein in the adult rat central nervous system. Neuroscience, 78(2), 431–448. https://doi.org/10.1016/s0306-4522(96)00613-6

Yang, B., Ren, Q., Zhang, J. C., Chen, Q. X., & Hashimoto, K. (2017). Altered expression of BDNF, BDNF pro-peptide and their precursor proBDNF in brain and liver tissues from psychiatric disorders: rethinking the brain-liver axis. Translational psychiatry, 7(5), e1128. https://doi.org/10.1038/tp.2017.95

Yang, J., Siao, C. J., Nagappan, G., Marinic, T., Jing, D., McGrath, K., Chen, Z. Y., Mark, W., Tessarollo, L., Lee, F. S., Lu, B., & Hempstead, B. L. (2009). Neuronal release of proBDNF. Nature neuroscience, 12(2), 113–115. https://doi.org/10.1038/nn.2244

Yoshida, T., Ishikawa, M., Niitsu, T., Nakazato, M., Watanabe, H., Shiraishi, T., Shiina, A., Hashimoto, T., Kanahara, N., Hasegawa, T., Enohara, M., Kimura, A., Iyo, M., & Hashimoto, K. (2012). Decreased serum levels of mature brain-derived neurotrophic factor (BDNF), but not its precursor proBDNF, in patients with major depressive disorder. PloS one, 7(8), e42676. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042676

Zhang, F., Luo, J., & Zhu, X. (2018). Ketamine ameliorates depressive-like behaviors by tPA-mediated conversion of proBDNF to mBDNF in the hippocampus of stressed rats. Psychiatry research, 269, 646–651. https://doi.org/10.1016/j.psychres.2018.08.075

Zhao, G., Zhang, C., Chen, J., Su, Y., Zhou, R., Wang, F., Xia, W., Huang, J., Wang, Z., Hu, Y., Cao, L., Guo, *X., Yuan, C., Wang, Y., Yi, Z., Lu, W., Wu, Y., Wu, Z., Hong, W., Peng, D., … Fang, Y. (2017). Ratio of mBDNF* to proBDNF for Differential Diagnosis of Major Depressive Disorder and Bipolar Depression. Molecular neurobiology, 54(7), 5573–5582. https://doi.org/10.1007/s12035-016-0098-6

Zhou, L., Xiong, J., Lim, Y., Ruan, Y., Huang, C., Zhu, Y., Zhong, J. H., Xiao, Z., & Zhou, X. F. (2013). Upregulation of blood proBDNF and its receptors in major depression. Journal of affective disorders, 150(3), 776–784. https://doi.org/10.1016/j.jad.2013.03.002

Znamensky, V., Akama, K. T., McEwen, B. S., & Milner, T. A. (2003). Estrogen levels regulate the subcellular distribution of phosphorylated Akt in hippocampal CA1 dendrites. The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience, 23(6), 2340–2347. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-06-02340.2003