

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“EXPRESIÓN DEL RECEPTOR 5-HT<sub>5A</sub> EN EL  
HIPOCAMPO DURANTE EL CICLO ESTRAL DE  
LA RATA”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA**

**ALEJANDRO GONZÁLEZ TORRES**

**DIRIGIDA POR**

**Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA**

**SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2012**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“EXPRESIÓN DEL RECEPTOR 5-HT<sub>5A</sub> EN EL  
HIPOCAMPO DURANTE EL CICLO ESTRAL DE LA  
RATA”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA**

**ALEJANDRO GONZÁLEZ TORRES**

**DIRIGIDA POR**

**Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA**

**SINODALES**

**Dra. LAURA BERUMEN SEGURA.**  
DIRECTOR

---

**Dra. ANGELINA RODRÍGUEZ TORRES**  
SINODAL

---

**Dra. TERESA GARCÍA GASCA**  
SINODAL

---

**Dr. ERIC RAMÍREZ SALAZAR**  
SINODAL

---

**Dra. GUADALUPE GARCÍA ALCOCER**  
SINODAL

---

## ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Serotonina	1
1.1.1 Receptores para serotonina	2
1.2 Hipocampo	4
1.3 Ciclo estral	7
2. HIPÓTESIS	11
3. OBJETIVOS	12
3.1 General	12
3.2 Específicos	12
4. METODOLOGÍA	13
4.1 Materiales	13
4.1.1 Material biológico	13
4.1.2 Materiales y equipos	13
4.1.3 Reactivos	14
4.2 Métodos	15
4.2.1 Extracción de proteínas	15
4.2.2 Cuantificación de proteínas	15
4.2.3 Western blot	16
4.2.3.1 SDS-PAGE	16
4.2.3.2 Electrotransferencia de proteínas	17
4.2.3.3 Ensayo con quimioluminiscencia	18
4.3 Análisis estadístico	19
5. RESULTADOS	20

5.1 Curva de calibración	20
5.2 Cuantificación de proteínas	20
5.3 Western blot	21
5.4 Densitometría	21
6. DISCUSIÓN	23
7. CONCLUSIONES	27
8. BIBLIOGRAFÍA	28

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Características principales de las 7 familias de receptores para 5-HT	3
2	Preparación de diluciones para la curva de calibración	16
3	Concentración proteica de las muestras de hipocampo	21
4	Resultados de la prueba de Tukey	22

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Estructura química de la serotonina	1
2	Síntesis de serotonina a partir de triptófano	2
3	Hipocampo de rata	5
4	Ilustración esquemática de la vía trisináptica de la formación hipocámpica	7
5	Niveles hormonales durante el ciclo estral de la rata	8
6	Frotis vaginales de las distintas fases del ciclo estral	9
7	Curva de calibración	20
8	Fotografía del Western blot de 5-HT <sub>5A</sub>	21
9	Densitometría de la expresión de 5-HT <sub>5A</sub> durante el ciclo reproductivo	22

## RESUMEN

La 5-hidroxitriptamina (5-HT; serotonina) es un importante neurotransmisor monoamina con amplia participación en la fisiología. En los mamíferos se sintetiza principalmente en el intestino por las células cromafines y en el cerebro por grupos de células llamados núcleos del Rafé. La serotonina ejerce su función cuando se une a sus receptores específicos; existen al menos 14 diferentes receptores para serotonina divididos en siete familias (5-HT<sub>1-7</sub>), de los cuales el receptor 5-HT<sub>5A</sub> es de los menos comprendidos. La distribución de 5-HT<sub>5A</sub> en el cerebro ya ha sido reportada, encontrando una gran concentración en el hipocampo; dentro de las funciones relacionadas al hipocampo destaca el estado de ánimo, que también ha sido asociado a serotonina. Por otro lado, se sabe que la densidad de receptores 5-HT es regulada por las hormonas esteroideas que fluctúan durante el ciclo reproductivo. El objetivo de este trabajo fue evaluar la expresión del receptor 5-HT<sub>5A</sub> en el hipocampo durante el ciclo estral de la rata mediante western blot. Los resultados indican que existe una relación entre los niveles de hormonas esteroideas y los niveles de expresión de 5-HT<sub>5A</sub> en el hipocampo de rata debido a que los niveles de expresión del receptor mostraron los niveles más altos en las etapas del ciclo con mayor concentración de hormonas gonadales. Además, los resultados señalan que el 5-HT<sub>5A</sub> expresado en hipocampo está asociado al estado de ánimo ya que los niveles altos de expresión del receptor se encontraron en las fases del ciclo con menor incidencia de depresión y menor nivel de ansiedad.

## 1. ANTECEDENTES

### 1.1 Serotonina

La serotonina (5-hidroxitriptamina o 5-HT) (Figura 1) es un importante neurotransmisor monoamina con un gran rango de funciones.

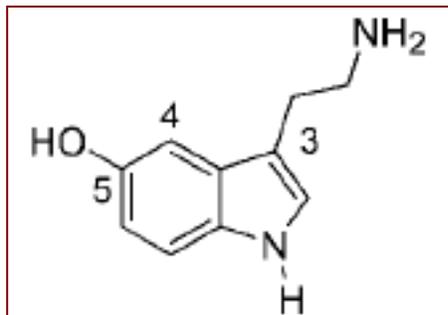


Figura 1. Estructura química de la serotonina (Nichols y Nichols, 2008).

En los mamíferos es sintetizada mayormente en el intestino por las células enterocromafines y es almacenada en las plaquetas; mientras que la serotonina que se encuentra en el cerebro es producida principalmente por grupos de células especializadas conocidas como núcleos del Rafé y que están localizados a través de toda la longitud del tronco encefálico (Nichols y Nichols, 2008).

La biosíntesis de serotonina se realiza a partir del aminoácido esencial L-triptófano, el cual atraviesa la barrera hematoencefálica por competencia de transporte con la tirosina. En la síntesis de la serotonina intervienen dos enzimas (Figura 2): la triptófano-hidroxilasa, que cataliza la conversión del triptófano en 5-hidroxitriptófano, y la DOPA-descarboxilasa, que convierte el compuesto anterior en serotonina (Pytliak y col., 2011).

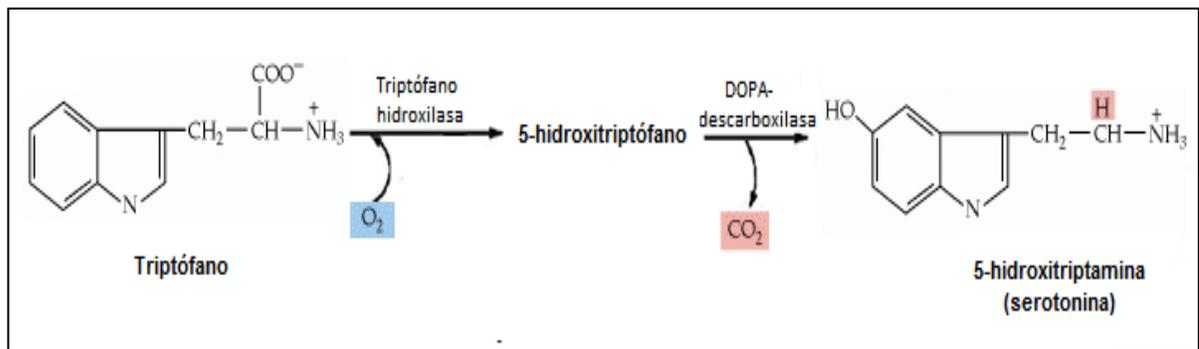


Figura 2. Síntesis de serotonina a partir de triptófano (Modificada de Purves y col., 2011).

Este neurotransmisor tiene una amplia participación en la fisiología, incluyendo función endocrina, cardiovascular, gastrointestinal y en el desarrollo; también interviene en la percepción sensorial y en comportamientos tales como la agresión, el apetito, el sexo, el sueño, el estado de ánimo, el dolor, la cognición y la memoria. La disfunción de la transmisión serotoninérgica ha sido asociada con desórdenes como la depresión, la ansiedad y la esquizofrenia (Filip y Bader, 2009). Los efectos de la 5-HT son mediados a través de sus receptores.

### 1.1.1 Receptores para serotonina

Los receptores para serotonina han sido identificados en gran cantidad de mamíferos. La familia de receptores para serotonina es más grande que cualquier otra familia de los receptores acoplados a proteínas G. Hay estructuralmente al menos 14 diferentes receptores de 5-HT, los cuales han sido clasificados bioquímica y farmacológicamente en siete familias (5-HT<sub>1-7</sub>); el receptor 5-HT<sub>3</sub> es el único no acoplado a proteína G, ya que está asociado a un canal iónico (Cuadro 1). Una vez activado el receptor por el ligando, la serotonina, sufre cambios conformacionales y activa las cascadas de transducción de señales del interior celular (Nichols y Nichols, 2008).

Cuadro 1. Características principales de las 7 familias de receptores para 5-HT.

Familia	Subtipo	Vía de señalización	Expresión en el SNC	Efectos y funciones
5-HT <sub>1</sub>	5-HT <sub>1A</sub>	G <sub>i/o</sub> AC i	Extendida en el cerebro (principalmente en hipocampo, corteza y núcleo del Rafé)	Agresión, ansiedad, adicción, apetito, vómito, memoria, humor, respiración, sueño, conducta sexual, termorregulación
	5-HT <sub>1B</sub>	G <sub>i/o</sub> AC i	Extendida en el cerebro (principalmente en los ganglios basales y la corteza)	Agresión, ansiedad, aprendizaje, locomoción, adicción, memoria, humor, conducta sexual
	5-HT <sub>1D</sub>	G <sub>i/o</sub> AC i	Ganglios basales, hipocampo, corteza	Locomoción, ansiedad
	5-HT <sub>1E</sub>	G <sub>i/o</sub> AC i	Corteza, núcleo estriado, claustró	Memoria
	5-HT <sub>1F</sub>	G <sub>i/o</sub> AC i	Núcleo del Rafé dorsal, hipocampo, corteza, claustró, núcleo caudado, tronco encefálico	¿Locomoción? ¿Ansiedad?
5-HT <sub>2</sub>	5-HT <sub>2A</sub>	G <sub>q/11</sub> PCL e	Corteza, claustró, hipocampo, hipotálamo, ganglios basales	Ansiedad, apetito, adicción, cognición, imaginación, aprendizaje, memoria, humor, percepción, conducta sexual, sueño, termorregulación
	5-HT <sub>2B</sub>	G <sub>q/11</sub> PCL e	Cerebelo, área septal, hipotálamo, amígdalas	Ansiedad, apetito, sueño
	5-HT <sub>2C</sub>	G <sub>q/11</sub> PCL e	Plexos coroideos, corteza, hipocampo, amígdalas, núcleo estriado, sustancia negra	Ansiedad, apetito, adicción, locomoción, humor, comportamiento sexual, sueño
5-HT <sub>3</sub>	Pentámero de 5-HT <sub>3A, B, C, D, E</sub>	Canal iónico	Extendida en el cerebro (principalmente área postrema, núcleo del tracto solitario, complejo vagal dorsal, sistema límbico)	(5-HT <sub>3A, 3B</sub> ) Ansiedad, adicción, náuseas, vómito, aprendizaje, memoria, excitación neuronal
5-HT <sub>4</sub>	5-HT <sub>4</sub>	G <sub>S</sub> AC i	Ganglios basales, corteza, área septal, hipocampo	Ansiedad, apetito, aprendizaje, memoria, humor, respiración
5-HT <sub>5</sub>	5-HT <sub>5A</sub>	G <sub>i/o</sub> AC i	Hipocampo, hipotálamo, bulbo olfatorio, corteza, tálamo, núcleo estriado, puente de Varolio	Locomoción, sueño, ¿humor?
	5-HT <sub>5B</sub>	¿?	Habénula, hipocampo (roedores); Pseudogen en humanos	¿?
5-HT <sub>6</sub>	5-HT <sub>6</sub>	G <sub>S</sub> AC e	Extendida en cerebro (principalmente en núcleo estriado, amígdalas, hipocampo)	Ansiedad, cognición, aprendizaje, memoria, humor
5-HT <sub>7</sub>	5-HT <sub>7</sub>	G <sub>S</sub> AC e	Tálamo, hipocampo, corteza, amígdalas	Ansiedad, memoria, humor, respiración, sueño

Abreviaciones: AC, adenilato ciclasa; SNC, sistema nervioso central; PLC, fosfolipasa C; e, estimulación; i, inhibición; ¿?, falta de información (Filip y Bader, 2009; Pytliak y col., 2011).

La familia de receptores 5-HT<sub>5</sub> son quizá la menos estudiada de todas las familias de receptores para serotonina por lo que su función aún no es muy comprendida (Nichols y Nichols, 2008).

La familia de receptores 5-HT<sub>5</sub> consiste en dos miembros, designados como 5-HT<sub>5A</sub> y 5-HT<sub>5B</sub>. El receptor 5-HT<sub>5A</sub> ha sido identificado en rata, ratón y humano, mientras el 5-HT<sub>5B</sub> en humano es una proteína no funcional debido a la presencia de codones de término dentro de su secuencia genómica (Hannon y Hoyer, 2008).

El receptor 5-HT<sub>5A</sub> está formado por 357 aminoácidos y en el humano tiene una localización cromosomal 7q336.1 mientras que en la rata se encuentra en el cromosoma 4q11 (Hannon y Hoyer, 2008). Si bien la función de dicho receptor no está establecida, debido a su localización en el cerebro ha sido asociado potencialmente al control de los ritmos circadianos, al humor y a la función cognitiva. Aparentemente este receptor está acoplado a proteínas G<sub>i/o</sub> para inhibir la producción del AMPc, aunque la cascada de señalización no ha sido totalmente dilucidada. El receptor 5-HT<sub>5A</sub> muestra afinidad por la dietilamida de ácido lisérgico (LSD), el cual parece ser el principal agonista, y también por la 5-carboxamidotriptamina (5-CT) (Nichols y Nichols, 2008). A la fecha ha sido clonado a partir de ratón, rata, cerdo y humano (Thomas y col., 2006). La distribución de 5-HT<sub>5A</sub> ha sido reportada, siendo expresado en el cerebro con una concentración muy alta en el hipocampo (Pasqualetti y col., 1998; Olivier y col., 2000).

## 1.2 Hipocampo

El hipocampo es un área relacionada con la corteza cerebral que se ubica al interior del lóbulo temporal, en humanos mide aproximadamente de 2,5 a 4 cm de longitud anteroposterior; su nombre fue dado por el anatomista Giulio Cesare Aranzio debido a un gran parecido a la forma del caballito de mar o hipocampo, aunque este parecido sólo es típico en primates (Duvernoy, 2005). En los roedores, donde

se ha estudiado más extensamente, el hipocampo tiene forma de un par de plátanos unidos por el tallo (Espinosa, 2009).

El hipocampo es llamado a veces el “cornu Ammonis” (cuerno de Amón, abreviado CA). Lorente de Nó en 1934 definió subdivisiones del CA con base en tipo de células principales, a los patrones de distribución de las vías fibrosas y a la distribución del estrato piramidal. Las principales subdivisiones son denotadas como CA1, CA2 y CA3; generalmente CA2 y CA3 son considerados como una subregión (Figura 3) (Miles y Traub, 1991; Riddle, 2007).

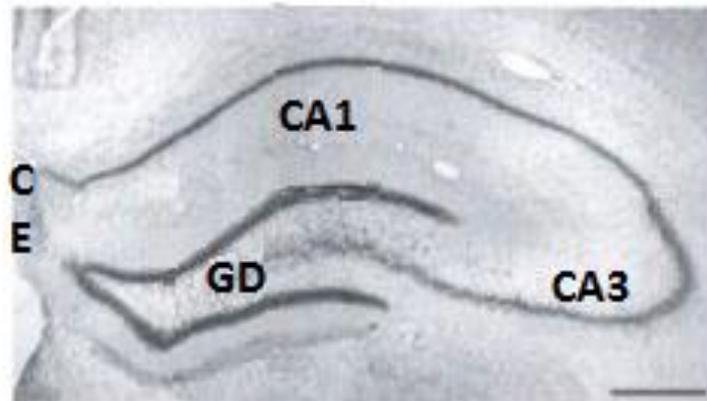


Figura 3. Hipocampo de rata. Fotomicrografía de bajo poder mostrando las principales regiones hipocámpicas. Abreviaciones: CE, Corteza entorrinal; GD, Giro dentado (Modificado de Riddle, 2007).

El hipocampo se encuentra en estrecha comunicación con diversas regiones de la corteza cerebral en lo que podría considerarse un sistema: la formación hipocámpica. En él se incluyen además del hipocampo (Figura 3), al giro de dentado (GD) y a la corteza entorrinal (CE) (Duvernoy, 2005).

Cada región de la formación hipocámpica está formada de una corteza de tres capas o estratos; en el hipocampo se han descrito los siguientes estratos celulares:

-Estrato polimorfo (estrato Oriens): es la zona más superficial y está constituido por neuronas cuyos axones no salen del hipocampo, sino que dichos axones arborizan alrededor de las células piramidales del segundo estrato en forma de canasto.

-Estrato molecular: tiene principalmente células de tipo granular.

-Estrato piramidal: constituido por células piramidales grandes y pequeñas, formando las primeras un estrato menos denso y ubicado en un nivel inferior mientras las segundas forman un estrato más superior y más denso. Solamente las neuronas de este estrato envían prolongaciones fuera del hipocampo, por lo que son las únicas neuronas que responden a los estímulos que llegan al hipocampo; las neuronas de los otros dos estratos dirigen sus axones a hacer sinapsis con las células piramidales, formando una especie de canasta a su alrededor cuyo papel es liberar inhibidores para controlar a las células piramidales (Matamala, 2009).

La formación hipocámpica presenta numerosas conexiones, principalmente indirectas, con muchas porciones de la corteza cerebral, así como con las estructuras basales del sistema límbico: la amígdala, el hipotálamo, el septum y los tubérculos mamilares. Casi cualquier tipo de experiencia sensitiva activa por lo menos parte del hipocampo, y a su vez el hipocampo distribuye las señales eferentes al tálamo anterior, al hipotálamo y a otras partes del sistema límbico. Una importante vía de comunicación es el trígono o vía trisináptica (Figura 4). Ésta interconecta a las subregiones de la formación hipocámpica de manera unidireccional. El flujo de información hacia la formación hipocámpica comienza con proyecciones de las capas I y II de la CE que van hacia las capas moleculares media y externa del GD; las células granulares del GD proyectan hacia CA3 por la vía de las fibras musgosas; las células piramidales de CA3 proyectan hacia CA1 por la vía colateral de Schaffer; finalmente, las células piramidales de CA1 proyectan de regreso a la CE. Además hay proyecciones de la CE directamente a CA3 y CA1 (Riddle, 2007).

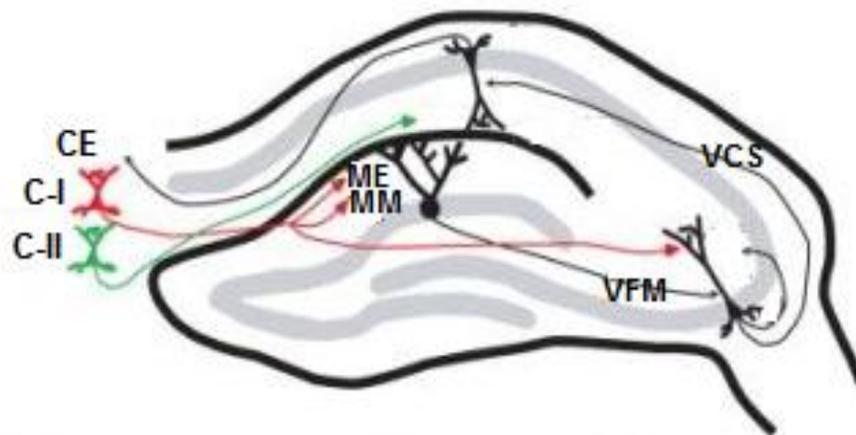


Figura 4. Ilustración esquemática de la vía trisináptica de la formación hipocámpica. Abreviaciones: CE, corteza entorrinal; C-I, capa I; C-II, capa II; ME, capa molecular externa; MM, capa molecular media; VFM, vía de las fibras musgosas; VCS, vía colateral de Schaffer (Modificado de Riddle, 2007).

Existen otras proyecciones al hipocampo como las abundantes proyecciones ascendentes del Rafé medio (Siegel y col., 1999). Si bien no todas las células de los núcleos del Rafé son serotoninérgicas, cerca del 70% de las células del Rafé medio sí lo son (Harising, 2006).

La densidad de los axones serotoninérgicos es más alta en CA3 mientras que la más baja se encuentra en el GD y en CA1 (Mamounas y col., 1991; Hensler, 2006). Las inervaciones de las vías serotoninérgicas y la presencia de diversos receptores para serotonina en esta parte del cerebro reflejan las funciones generales relacionadas a 5-HT, especialmente el estado de ánimo. Cambios en esta función hipocámpica han sido asociados a las fluctuaciones normales en la circulación de hormonas durante el ciclo reproductivo (Spencer y col., 2010).

### 1.3 Ciclo estral de la rata

La reproducción en la hembra se caracteriza por la repetición de períodos de actividad o de receptividad sexual y períodos de reposo. El ciclo sexual o estral se

define como el intervalo de tiempo existente desde el comienzo de un período de celo hasta el comienzo siguiente. La duración del ciclo estral difiere notablemente de una especie a otra y suele ser constante dentro de cada especie y raza, aunque con oscilaciones entre cada individuo (Caravaca, 2003).

La rata hembra tiene un ciclo estral de cuatro o cinco días, dependiendo del animal concreto y de las condiciones ambientales (Fernández, 1992), y se puede dividir en cuatro fases que se caracterizan por marcadas diferencias en los niveles plasmáticos de las hormonas reproductivas (Figura 5):

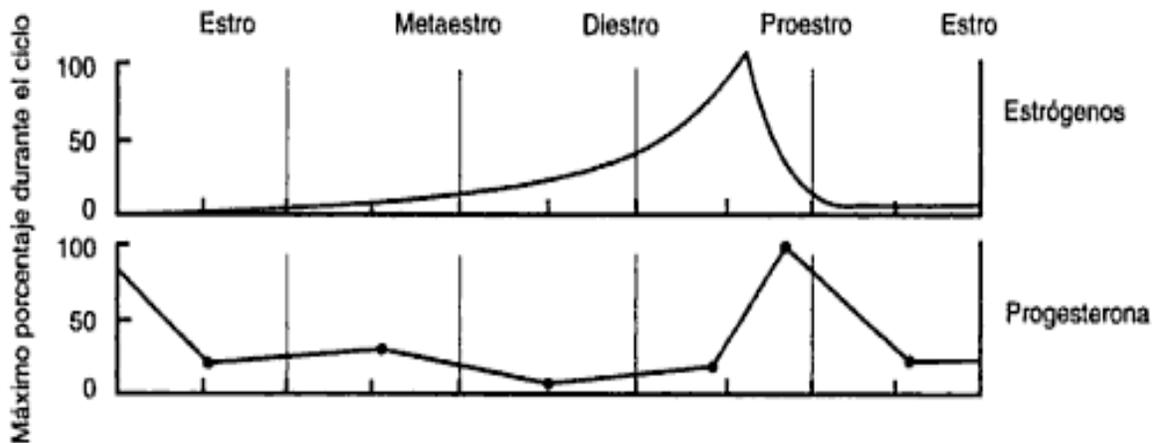


Figura 5. Niveles hormonales durante el ciclo estral de la rata. El incremento en los valores de las hormonas foliculoestimulante y luteinizante provoca la secreción de estrógenos y progesterona en el ovario (Hernández, 2002).

Las fases del ciclo reproductivo son (Figura 6):

-Proestro. Bajo la influencia de la FSH (hormona estimulante del folículo), una serie de folículos ováricos crecen rápidamente aumentando también la secreción de estrógenos. El útero se va engrosando progresivamente. La mucosa vaginal sufre varias mitosis, apareciendo células epiteliales nucleadas en el frotis. Duración aproximada de esta fase, 16 horas.

-Estro. La secreción de estrógenos alcanza su nivel máximo inhibiendo la liberación de FSH y aumentando la de LH (hormona luteinizante), lo cual produce la ovulación. El útero permanece ensanchado. Tras las numerosas mitosis que sufre la mucosa vaginal, aparecen células epiteliales degeneradas, con forma poligonal, cornificadas y sin núcleo o con núcleo eosinófilo. Duración aproximada, 20 horas.

-Metaestro. Se forma en el ovario el cuerpo lúteo, responsable de la secreción de elevados niveles de progesterona, característico de esta fase. La mucosa vaginal entra en regresión y es invadida por leucocitos, también se encuentran en el frotis células queratinizadas. Duración aproximada, 10 horas.

-Diestro. Si no ha habido fecundación, durante esta fase se produce la regresión del cuerpo lúteo y disminuyen los niveles de estrógenos y progesterona. Como consecuencia, el útero se hace pequeño y poco contráctil. La mucosa vaginal es muy delgada y los leucocitos que emigran a través de ella constituyen la mayoría de las células del frotis vaginal; también se encuentran algunas células epiteliales nucleadas (Figura 6). Duración aproximada, 2 días y medio (Armengol, 1995).

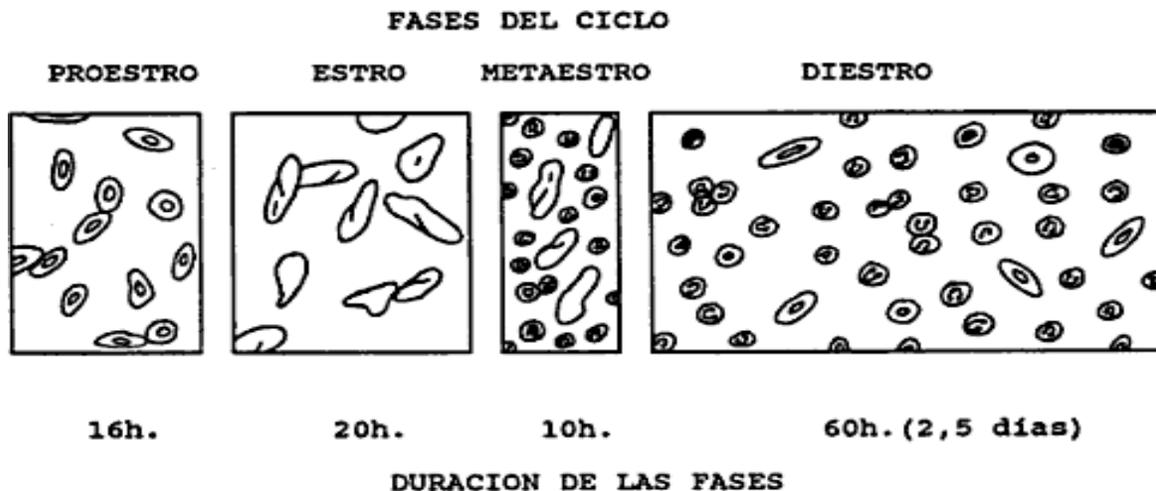


Figura 6. Frotis vaginales de las distintas fases del ciclo estral (Rodríguez, 1993).

Así pues, la causa fisiológica básica del ciclo estral está en la liberación periódica de hormonas esteroideas que determinarán los cambios en el aparato reproductor. Dichas hormonas tienen efectos moduladores en la síntesis y liberación de varios neurotransmisores tales como serotonina (Schmidt y col., 2009; Inagaki y col., 2010) y afectan la transmisión serotoninérgica ya que regulan la densidad de receptores 5-HT en las membranas plasmáticas de las neuronas (Biegon y McEwen, 1982; Zheng, 2009).

## **2. HIPOTÉISIS**

La expresión del receptor 5-HT<sub>5A</sub> en el hipocampo se ve alterada por los cambios en los niveles de hormonas esteroideas durante el ciclo estral.

### **3. OBJETIVOS**

#### 3.1 General

Evaluar la expresión del receptor 5-HT<sub>5A</sub> en el hipocampo en las distintas fases del ciclo estral mediante Western blot.

#### 3.2 Específicos

- Analizar la relación de la expresión de 5- HT<sub>5A</sub> en el hipocampo con cada una de las etapas del ciclo estral.
- Analizar la relación de la expresión del receptor 5-HT<sub>5A</sub> en el hipocampo con la fluctuación en los niveles de hormonas esteroideas.

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1 Materiales

#### 4.1.1 Material biológico

Se utilizaron ratas adulto hembra Spague-Dawley con un peso de 200-250 g. Se les proporcionó alimento y agua *ad libitum*, se mantuvieron en un ambiente controlado de ciclos luz/oscuridad 12h/12h, con temperatura ambiente de 28° C y humedad de 5% en condiciones sanitarias adecuadas.

Cada grupo experimental consistió de tres ratas las cuales fueron monitoreadas mediante frotis vaginales para determinar por citología la fase del ciclo estral en la que se encontraban. Se decapitó un grupo en cada una de las distintas fases, previa administración de pentobarbital de sodio (40mg/Kg) como anestésico. Después se obtuvo el cerebro y mantuvo a -70 °C hasta su procesamiento.

La manipulación y decapitación de las ratas se realizaron conforme a la ley federal de sanidad animal (2007) y a las prácticas éticas actuales.

#### 4.1.2 Materiales y equipos

Tubos Eppendorf 1.5 mL

Tubos Falcon 50 mL

Recipiente con hielo

Agitador Vortex

Puntas para micropipeta

Micropipetas 10, 20 y 200 µL

Celdas para espectrofotómetro

Guantes de Látex

Microcentrifuga

Plato Caliente

Papel filtro Whatman No. 1

Membranas

Equipo para SDS-PAGE Bio-Rad

Equipo para electrotransferencia Bio-Rad

Placas fotográficas para revelado

Densitómetro Bio-Rad

Hypercassette para revelado

#### 4.1.3 Reactivos

Agua destilada

Solución estándar de BSA

Reactivo de Bradford Bio-Rad

Cloruro de sodio

Fostato monopotásico

Fosfato disódico

Tris(hidroximetil)aminometano (Tris)

Glicerol

$\beta$ -mercaptoetanol

N,N,N',N'-tetrametiletenodiamina (TEMED)

Poliacrilamida

Bisacrilamida

Persulfato de Amonio

Dodecilsulfato sódico (SDS)

Glicina

Azul de bromofenol

Metanol

Luminol

Revelador

Fijador

Leche descremada para bloqueo Bio-Rad

## 4.2 Métodos

### 4.2.1 Extracción de proteínas

Una vez que se obtuvo el tejido de interés (hipocampo), se pesó y se agregaron 5 mL de amortiguador de extracción (50 mM Tris-HCl pH 9.0-9.5) por cada gramo de tejido.

El tejido se homogenizó en un politrón durante 30 segundos en posición '5'. Se adicionaron los inhibidores de proteasas. La extracción se completó durante dos horas a 4 °C, con agitación magnética (en un recipiente de hielo). Concluidas las dos horas se centrifugó 15 minutos a 10,000 rpm en una microcentrifuga.

### 4.2.2 Cuantificación de proteínas

Después de obtener los homogenizados de hipocampo, se realizó una cuantificación de proteína total contenida en las muestras utilizando el ensayo para proteínas Bio-Rad basado en el método de Bradford (Bio-Rad, 2005).

Se prepararon 4 diluciones por triplicado de una proteína estándar (BSA - 0.1 µg/mL) a partir de la cual se elaboró la curva de calibración, las diluciones se prepararon como se muestra en el Cuadro 4. El rango lineal del ensayo para BSA es de 1.2 a 10 µg/mL. El colorante empleado es una solución ácida de azul brillante de Coomassie (contiene colorante, ácido fosfórico y metanol).

Cuadro 2. Preparación de diluciones para la curva de calibración.

TUBOS	BSA µg/mL	Estándar BSA (0.1 µg/mL)	H <sub>2</sub> O	Reactivo de Bradford Bio-Rad
Blanco	0	0	800	200
1	2.5	25	775	200
1	2.5	25	775	200
2	5	50	750	200
2	5	50	750	200
3	10	100	700	200
3	10	100	700	200
4	20	200	600	200
4	20	200	600	200

Para la cuantificación de proteínas de las muestras, se midió 800 µL de cada muestra y se agregó 200 µL de colorante a cada una. La cuantificación se realizó en ensayos por triplicado y la muestra se diluyó diluida 1:10. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente por lo menos 5 minutos y su absorbancia fue leída a 595 nm.

Con la absorbancia obtenida y haciendo uso de la curva de calibración que fue elaborada, se obtuvo la concentración de proteínas en las muestras.

#### 4.2.3 Western blot

##### 4.2.3.1 SDS-PAGE

A partir de las concentraciones obtenidas se realizaron las diluciones de las muestras para llevar a cabo la separación de proteínas mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). Se calculó el volumen necesario para tener 50 µg de proteína en cada pozo; este volumen se

completó con el amortiguador de la muestra para tener 15  $\mu$ L en los pozos. Posteriormente, las muestras se hirvieron durante 5 minutos.

Se trabajó con geles de poliacrilamida al 10% en condiciones reductoras. Se utilizaron peines de 15 pozos en los cuales se colocaron las muestras (15  $\mu$ L) y los marcadores de peso molecular (10  $\mu$ L) dispuestos en los pozos de cada extremo.

Las muestras se corrieron con un voltaje constante de 100 V los primeros 20 minutos y 150 V durante el tiempo necesario para que la muestra llegara hasta el final del gel.

#### 4.2.3.2 Electrotransferencia de proteínas

Una vez separadas las macromoléculas en función de su diferente peso molecular se transfirieron del gel a una membrana de nitrocelulosa. Al aplicar un campo eléctrico (200 mA por 1 hora), las proteínas migran fuera del gel de poliacrilamida hacia la superficie de la membrana donde quedan fuertemente adheridas, por lo que el patrón de proteínas que se tenía en el gel de poliacrilamida no cambia al ser transferido a la membrana.

Posteriormente, se realizaron tres lavados de 10 minutos en PBS 1X para retirar los restos de poliacrilamida y después se bloqueó la membrana para evitar la unión inespecífica a su superficie de los anticuerpos utilizados para la detección de la proteína de interés. La membrana se dejó durante una hora en leche (Bio-Rad) preparada al 3% en PBS 1X. Después del bloqueo se realizaron otros tres lavados en PBS 1X.

En el siguiente paso, se dejó incubando toda la noche al anticuerpo primario diluido 1:1000 en leche al 1% en PBS 1X. Los anticuerpos utilizados eran policlonales hechos en conejo de la marca Santa Cruz para 5-HT<sub>5A</sub> (Lote No. H1705). Transcurrido este tiempo se hicieron tres lavados en PBS 1X, para después dejar

incubando el anticuerpo secundario (hecho en cabra y conjugado con peroxidasa) durante 2 horas en una dilución 1:2000. Por último se hicieron otros tres lavados en PBS 1X para proceder al ensayo con quimioluminiscencia.

Para actina, que serviría como control, se utilizó un anticuerpo conjugado directamente con peroxidasa (Lote No. C1505) hecho en cabra en una dilución 1:500. Al ser directo, después de incubar 2 horas con éste anticuerpo se procedió a lavar 3 veces en PBS 1X y después se realizó la detección con quimioluminiscencia.

#### 4.2.3.3 Ensayo con quimioluminiscencia

El ensayo con quimioluminiscencia (ECL) se realizó en un cuarto totalmente oscuro. Se prepararon las siguientes diluciones: fijador 35 mL a 160 mL H<sub>2</sub>O destilada y 35 mL de revelador a 160 mL de H<sub>2</sub>O destilada.

Se midieron volúmenes iguales (8 mL de c/u) de las soluciones 1 y 2 del kit para ECL, se mezclaron y las membranas se sumergieron 1 minuto en dicha mezcla. Se utilizaron placas de revelado KODAK BIOMAX y la lámina para KODAK ADJUSTABLE SAFELIGHT LAMP.

Se presionó la membrana de nitrocelulosa contra la placa de revelado en el HYPERCASSETTE durante un minuto. Luego se tomó la placa con las pinzas y se sumergió en el revelador, después en el fijador y por último se enjuagó con agua; debe sumergirse un minuto en cada una. Después del enjuague se obtiene como resultado placas con patrones de bandeo. Estas bandas fueron evaluadas por medio de un análisis densitométrico con el software Quantity One 4.6.2 de Bio-Rad.

### 4.3 Análisis estadístico

Para la comparación del estudio densitométrico de la expresión del receptor en cada una de las etapas del ciclo estral, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey para determinar diferencias significativas considerando una  $p < 0.01$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Curva de calibración

Se realizó una curva de calibración con BSA (Figura 7) para calcular la concentración proteica de las extracciones de hipocampo.

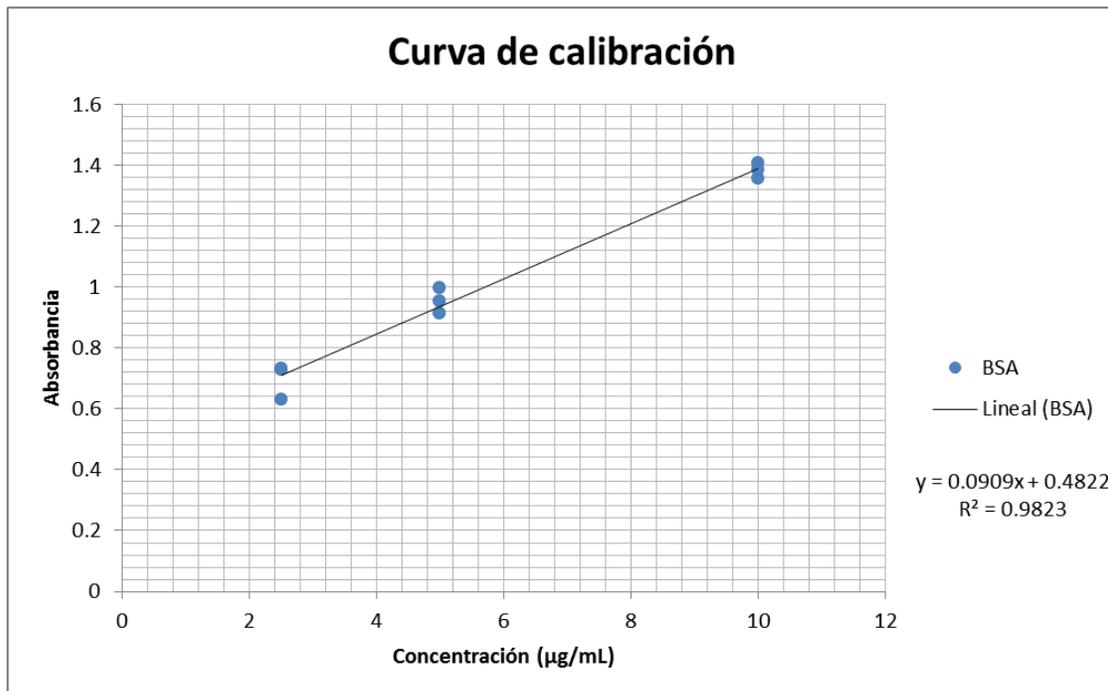


Figura 7. Curva de calibración. Se empleó BSA como patrón para la realización de la curva que sirvió para la posterior cuantificación de proteínas

### 5.2 Cuantificación de proteínas

Después de realizar la curva de calibración con BSA, se calculó la concentración de diluciones 1:10 de los extractos proteicos de hipocampo. En el cuadro 3 se muestran las concentraciones obtenidas.

Cuadro 3. Concentración proteica de las muestras de hipocampo.

Muestra	$\mu\text{g}/\mu\text{L}$
Proestro	$2.67 \pm 0.23$
Estro	$3.46 \pm 0.35$
Metaestro	$2.28 \pm 0.20$
Diestro	$2.84 \pm 0.24$

## 5.2 Western blot

El análisis de la expresión del receptor  $5\text{-HT}_{5A}$  se obtuvo mediante la técnica de Western blot (Figura 8). Se muestra una imagen representativa de 5 experimentos. Para la toma de las imágenes se empleó un densitómetro Bio-Rad.

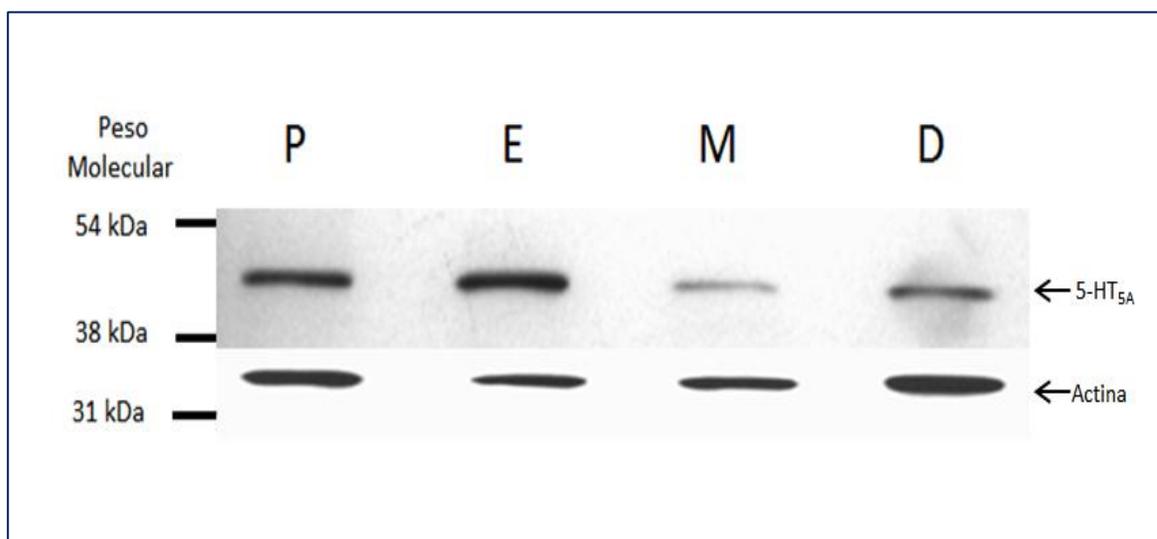


Figura 8. Fotografía del Western blot de  $5\text{-HT}_{5A}$ . Abreviaciones: P, proestro; E, estro; M, metaestro; D, diestro; kDa, kiloDalton.

## 5.3 Densitometría

Para realizar las densitometrías (Figura 9) se utilizó el programa Quantity-One de Bio-Rad y el análisis estadístico (Cuadro 4) se elaboró con el programa Origin 8.6. Para calcular las UADO se normalizó usando como referencia el nivel mínimo de expresión del receptor  $5\text{-HT}_{5A}$ .

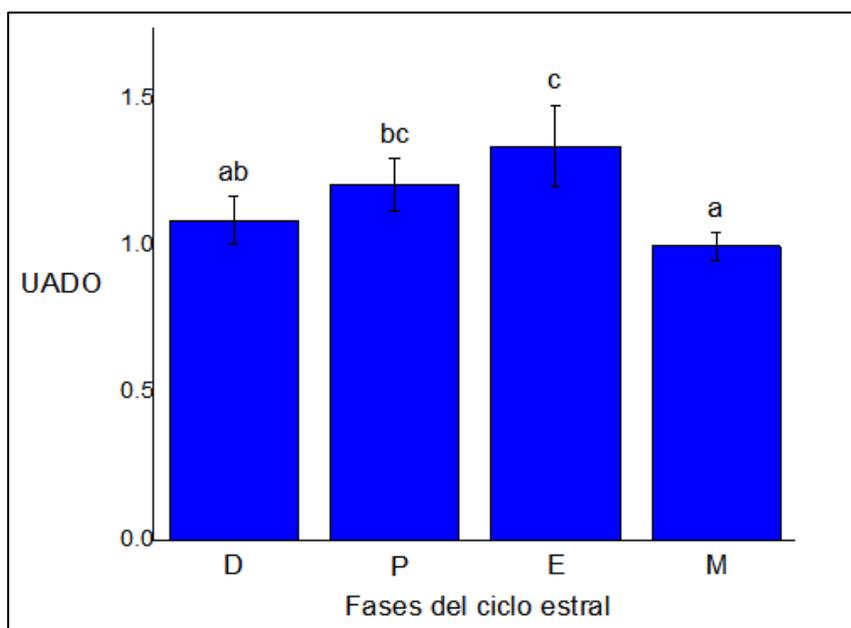


Figura 9. Densitometría de la expresión de 5-HT<sub>5A</sub> durante el ciclo reproductivo. Abreviaciones: P, proestro; E, estro; M, metaestro; D, diestro; UADO: unidades arbitrarias de densidad óptica; las barras de error indican la desviación estándar.

En la etapa de estro se observó el valor más alto con al menos un 25% más de expresión con respecto a diestro y metaestro, fases en las que se obtuvo la menos expresión.

Cuadro 4. Resultados de la prueba de Tukey.

	DP	EEP	Valor de q	Probabilidad	Alfa	Sig.	LIC	LSC
P D	0.12086	0.04484	3.8118	0.0516	0.01	0	-0.03047	0.27219
E D	0.2519	0.04484	7.94474	1.89E-05	0.01	1	0.10057	0.40323
E P	0.13104	0.04484	4.13294	0.03057	0.01	0	-0.02029	0.28237
M D	-0.08888	0.04484	2.80335	0.21576	0.01	0	-0.24021	0.06245
M P	-0.20974	0.04484	6.61515	2.83E-04	0.01	1	-0.36107	-0.05841
M E	-0.34078	0.04484	10.74809	4.01E-08	0.01	1	-0.49211	-0.18945

Sig. igual a 1 indica que la diferencia de promedios es significativa en nivel de 0.01; Sig. igual a 0 indica que la diferencia de promedios no es significativa en nivel de 0.01. Abreviaciones: DP, diferencia de promedios; EE, error estándar del promedio; Sig., significancia; LCL, límite inferior de control; LSC, límite superior de control.

## 6. DISCUSIÓN

A través de la técnica de Western blot se obtuvieron bandas de un peso entre 38 y 54 KDa, lo cual indica que las bandas corresponden al receptor 5-HT<sub>5A</sub> debido a que en ratas se ha demostrado que el peso molecular de dicho receptor es de  $\approx$ 41 kDa (Dutton y col., 2008).

Como control de referencia se utilizó una cuantificación basada en Bradford y posteriormente como instrumento alterno se empleó la actina, considerando la variabilidad en sus niveles de expresión a través del ciclo estral. El empleo de un control interno o de referencia (conocidos también como genes “housekeeping”) tiene la finalidad de hacer preciso y fiable el análisis de expresión proteica de un gen debido a que corrige errores técnicos como diferencias en la carga proteica o la variación de la eficiencia de la transferencia (Ferguson y col., 2008); en este trabajo el control de carga proteica fue la cuantificación basada en Bradford. Asimismo cada vez crece más la evidencia que los “housekeeping” comúnmente usados (por ejemplo gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa,  $\beta$ -actin,  $\beta$ -tubulina y hipoxantina guanina fosforribosil transferasa) pueden ser controles internos inadecuados ya que que bajo ciertas condiciones fisiológicas se genera una variación en la expresión de las proteínas de referencia (Jonge y col., 2007). En células de hipocampo, se ha demostrado que el estradiol regula la remodelación de actina y la densidad de las dendritas (Spencer y col., 2008); como consecuencia de que estas últimas expresan gran cantidad de actina, los niveles expresión de actina cambian durante el ciclo reproductivo, observándose los más altos en proestro y diestro (Sà y Madeira, 2011), un patrón similar al observado para actina en el trabajo experimental. Esta variabilidad en el control interno podría enmascarar diferencias en la expresión proteica entre muestras (Jonge y col., 2007), lo que limitó el uso de actina para normalización en este trabajo y entonces se recurrió al nivel mínimo de expresión del receptor para la normalización. Si bien se han propuesto controles de referencia más estables como las proteínas ribosomales S13, L27, S20 y L30

(Ferguson y col., 2008), aún es necesario establecer un verdadero control interno para el estudio de expresión de proteínas durante el ciclo estral.

Por otra parte, en los resultados de este trabajo se observó un aumento progresivo en la expresión de 5-HT<sub>5A</sub>. La expresión mínima del receptor se presentó en el metaestro, fase en la cual el estradiol alcanza su nivel mínimo, mientras que la mayor expresión de 5-HT<sub>5A</sub> se obtuvo en proestro y estro, fases caracterizadas por niveles relativamente altos de estrógenos y progesterona (Scharfman y col., 2007; Sà y Madeira, 2011). Lo anterior sugiere que las secreciones hormonales de los ovarios podrían modular la expresión del receptor 5-HT<sub>5A</sub> durante el ciclo estral. Esto concuerda con lo reportado acerca de la regulación de la densidad de los receptores serotoninérgicos mediada por hormonas esteroideas (Berumen y col., 2011); de éstas, una que podría efectuar dicha acción moduladora es un estrógeno: el estradiol sérico, que es el principal estrógeno bioactivo bajo la mayoría de condiciones fisiológicas (Schafman y MacLusky, 2008). El estradiol actúa a través de al menos tres diferentes receptores a estrógenos (ER): ER alfa, ER beta y el receptor acoplado a proteína G GPR30 (Gupta y col., 2011). El estradiol tendría efectos sobre las neuronas serotoninérgicas y el hipocampo debido a que ahí se expresan los clásicos ER alfa y beta, además de expresar también el GPR30 que ofrece un modelo alternativo a la señalización clásica por estrógenos (Hazell y col., 2009; Spencer y col., 2011).

Aunque la mayoría de estudios se han enfocado en estrógenos y se sabe poco del papel de la progesterona, es probable que esta última regule también la expresión del receptor 5-HT<sub>5A</sub> debido a que los clásicos receptores nucleares A y B de progesterona son expresados en hipocampo. Se sabe que en roedores, las acciones iniciadas por el estradiol pueden ser potenciadas por la subsecuente elevación de niveles de progesterona (Scharfman y col., 2008; Díaz y col., 2009; Gupta y col., 2011). Esto explicaría por qué en estro se observó la mayor expresión del receptor 5-HT<sub>5A</sub>, dado que el nivel más alto de estradiol se alcanza en proestro pero la progesterona alcanza su máximo nivel al final del proestro y comienzos del

estro. No se debe descartar precursores de hormonas esteroideas (como la pregnelona, la androstenediona y la dehidroepiandrosterona) que son activos biológicamente y que podrían participar en la regulación de la expresión del receptor 5-HT<sub>5A</sub> (Saurab y col., 2011). Papageorgiou y Deneff reportaron en 2007 que en agregados de células pituitarias el estradiol incrementa la expresión de mRNA de 5-HT<sub>5A</sub>, aunque la respuesta a estradiol es diferente según el área cerebral por lo que son necesarios los estudios en hipocampo.

Los cambios mostrados en la expresión del receptor 5-HT<sub>5A</sub> en hipocampo parecen estar relacionados con las fluctuaciones hormonales el ciclo reproductivo, estas a su vez tienen efectos en los sitios donde se expresa los receptores a tales hormonas, como en el hipocampo. Una función generalmente asociada a la formación hipocámpica es el estado de ánimo (Spencer y col., 2011); el cual muestra cambios durante la fluctuación de hormonas esteroideas ováricas del ciclo menstrual. El receptor 5-HT<sub>5A</sub> es un receptor a serotonina, la cual también ha sido asociada al estado de ánimo (Filip y Bader, 2009). Los resultados muestran que en hipocampo la expresión del receptor aumenta en fases del ciclo como proestro y estro, en las cuales los niveles hormonales son altos y hay disminución en la incidencia de depresión y se presentan bajos niveles de ansiedad en ratas. En ratas ovariectomizadas con inyección secuencial de estrógenos y progesterona hubo reducción en niveles de ansiedad y depresión similares a los encontrados en animales de fases proestro y estro; en estudios clínicos se ha demostrado que hay un incremento en niveles de ansiedad y mayor incidencia de depresión durante los días posteriores a la menstruación cuando las concentraciones de hormonas gonadales son bajas (Paredes-López y Estrada-Orihuela, 2008). Además, algunos cambios relacionados con el estado de ánimo que ocurren durante el periodo menstrual han sido atribuidos a la disminución en niveles de progesterona y su metabolito alopregnanolona (Scharfman y col., 2008). Si bien se conocen algunas vías activadas por las hormonas gonadales en el cerebro, falta esclarecer las vías de señalización a través de las cuales actúan las hormonas esteroideas para regular la expresión de 5-HT<sub>5A</sub> en el hipocampo. Además se debe evaluar la

sensibilidad de la formación hipocámpica para activar vías de señalización en concentraciones fisiológicas de hormonas gonadales circulantes. Investigaciones de la sensibilidad del hipocampo y de receptores para 5-HT<sub>5A</sub> al ciclo estral sería relevante para desórdenes neurológicos y psiquiátricos relacionados con el ciclo menstrual, tales como la depresión y el síndrome premenstrual.

Por lo tanto, los resultados sugieren que los cambios en la expresión del receptor 5-HT<sub>5A</sub> se deben a las fluctuaciones en la concentración de hormonas esteroideas como el estradiol y la progesterona. A su vez, dichos cambios en la expresión del receptor para serotonina 5-HT<sub>5A</sub> en el hipocampo de la rata estarían asociados a los cambios en el estado de ánimo, función relacionada al hipocampo y a la serotonina.

## 7. CONCLUSIONES

- La expresión del 5-HT<sub>5A</sub> en hipocampo se modificó a través el ciclo estral de la rata.
- Los resultados señalaron que en metaestro ocurre la expresión más baja y aumenta hasta alcanzar los niveles de expresión más altos en proestro y estro.
- Los niveles más altos de expresión 5-HT<sub>5A</sub> se observaron en las fases del ciclo con los niveles más altos de hormonas y viceversa, esto indica que la expresión del 5-HT<sub>5A</sub> en el hipocampo es favorecida por la secreción de las hormonas ováricas.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

**Armengol J.** Bases experimentales para el estudio del sistema nervioso. Sevilla: Secretariado de la Universidad de Sevilla, **1995**; vol. 2: 235-236.

**Berumen LC, Sánchez-Ramos MA, García-Servín M, Martínez-Torres A, Rodríguez A, García-Alcocer G.** Effects of estradiol on 5-HT<sub>5A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptor immunolabeling in rat hippocampus. Journal Life Science. **2011**; 34: 359-365.

**Biegon A, McEwen B.** Modulation by estradiol of serotonin receptors in brain. Journal Neuroscience. **1982**; 2: 199-205.

Bio-Rad. Bio-Rad protein assay. Bulletin-9004 [serie en internet] 2005 [consultado 2011 noviembre 10]; 1-20. Disponible en: <http://www.bio-rad.com/prd/es/MX/adirect/biorad?ts=1&cmd=BRCatgProductDetail&vertical=LSR&catID=d4d4169a-12e8-4819-8b3e-ccab019c6e13>

**Caravaca R.** Bases de la reproducción animal. Sevilla: Secretariado de publicaciones de la Universidad de Sevilla, **2003**: 65-66.

**Diaz R, Thompson RF, Foy MR, Wang JM, Finch C, Morgan TE.** Progesterone receptors: form and function in brain. Front Neuroendocrinol. **2008**; 29: 313-339.

**Dutton A, Massoura A, Dover T, Andrews N, Barnes N.** Identification and functional significance of N-glycosylation of the 5-HT<sub>5A</sub> receptor. Neurochemistry International. **2008**; 52: 419-425.

**Duvernoy H.** The human hippocampus. 3a. edición. Berlín: Springer-Verlag, **2005**.: 7-26.

**Espinosa A.** El estrés crónico como elemento potenciador de la degeneración de las neuronas del hipocampo inducida por inflamación. Sevilla: CSI-F Enseñanza Sevilla. **2009**: 11-12.

**Ferguson** RE, Carroll HP, Harris A, Maher ER, Selby PJ, Banks RE. Housekeeping proteins: a preliminary study illustrating some limitations as useful references in protein expression studies. *Proteomics*. **2005**; 5: 566-571.

**Fernandez** G. Changes in burying behavior during the estrous cycle: effect of estrogen and progesterone. *Psychoneuroendocrinology*. **1992**; 17: 681-689.

**Filip** M, Bader M. Overview on 5-HT receptors and their role in physiology and pathology of the central nervous system. *Pharmacological Reports*. **2009**; 61: 761-777.

**Gupta** S, McCarson KE, Welch KMA, Berman NEJ. Mechanisms of pain modulation by sex hormones in migraine. *Headache*. **2011**; 51:905-922.

**Hannon** J, Hoyer D. Molecular biology of 5-HT receptors. *Behavioural Brain Research*. **2008**; 195: 198-213.

**Harising** L. The pharmacology of the neurochemical transmission in the midbrain raphe nuclei of the rat. *Current Neuropharma*. **2006**; 4: 313–339.

**Hazell** GGJ, Yao ST, Roper JA, Prossnitz ER, O'Carroll AN, Lolait SJ. Localisation of GPR30, a novel G protein-coupled oestrogen receptor, suggests multiple functions in rodent brain and peripheral tissues. *J Endocrinol*. **2009**; 202: 223-236.

**Hensler** J. Serotonergic modulation of the limbic system. *Neuroscience Biobehav Rev*. **2006**; 30: 203-214.

**Hernández** M. Motivación animal y humana. México, D.F: El Manual Moderno, **2002**: 137.

Honorable Cámara de Diputados. Ley federal de sanidad animal. DOF [serie en internet] 2007 [consultados 2011 agosto 15]; 1-56. Disponible en: <http://www.diputados.gob.mx/LeyesBiblio/ref/lfsa.htm>

**Inagaki** T, Gautreaux C, Luine V. Acute estrogen treatment facilitates recognition memory consolidation and alters monoamine levels in memory-related brain areas. *Horm Behav.* **2010**; 58: 415-426.

**Jonge** HJM, Fehrmann RSN, Bont ESJ, Hofstra RW, Gerbens F. Evidence based selection of housekeeping genes. *PLoS ONE.* **2007**; 9: 898.

**Mamounas** L, Mullen C, O'Hearn E, Molliver M. Dual serotonergic projections to forebrain in the rat: morphologically distinct 5-HT axon terminals exhibit differential vulnerability to neurotoxic amphetamine derivatives. *Journal Comp Neurol.* **1991**; 314: 558-586.

Matamala F. Apuntes de neuroanatomía UFRO. [monografía de internet]. Temuco: Universidad de la Frontera, 2009 [consultado 2011 noviembre 15]. Disponible en: <http://www.med.ufro.cl/Recursos/neuroanatomia/index.htm>.

**Miles** R, Traub R. Neural networks of the hippocampus. Nueva York: Cambridge University Press, **1991**: 1-5.

**Nichols** D, Nichols C. Serotonin receptors. *Chemical Reviews.* **2008**; 108: 1614-1641.

**Oliver** K, Kinsey A, Wainwright A, Sirinathsinghji D. Localization of 5-HT<sub>5A</sub> receptor-like immunoreactivity in the rat brain. *Brain Research.* **2000**; 867: 131-142.

**Papageorgiou** A, Deneff D. Estradiol induces expression of 5-hydroxytryptamine (5-HT) 4, 5-HT<sub>5</sub>, and 5-HT<sub>6</sub> receptor messenger ribonucleic acid in rat anterior pituitary cell aggregates and allows prolactin release via the 5-HT<sub>4</sub> receptor. *Endocrinology.* **2007**; 148: 1384-1395.

**Paredes-López** O, Estrada-Orihuela S. Aportaciones científicas y humanísticas mexicanas en el siglo XX. México: Academia Mexicana de Ciencias, **2008**: 210-212.

**Pasqualetti M, Ori M, Nardi I, Castagna M, Cassano G, Marazziti D.** Distribution of the 5-HT<sub>5A</sub> serotonin receptor mRNA in the human brain. *Molecular Brain Research*. **1998**; 56: 1- 8.

**Purves D, Augustine G, Fitzpatrick D.** Neuroscience. 2a. edición. Durham: Sinauer Associates, **2001**: 105.

**Pytliak M, Vargobá V, Mechírová V, Felsöci M.** Serotonin receptors-from molecular biology to clinical applications. *Physiol Res*. **2011**; 60: 15-25.

**Riddle D.** Brain aging: models, methods and mechanisms. Boca Raton: CRC Press, **2007**: 20-45.

**Sà S, Madeira MD.** Sex steroid hormones regulate the expression of growth-associated protein 43, microtubule-associated protein 2, synapsin 1 and actin in the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *J Mol Neurosci*. **2011**; 1007: 547-555.

**Saurabh G, McCarson KE, Welch KMA, Berman N.** Mechanisms of pain modulation by sex hormones in migraine. *Headache*. **2011**; 51: 905-922.

**Scharfman H, Hintz T, Gomez J, Stormes K, Barouk S, Malthankar G, McClosjey D.** Changes in hippocampal function of ovariectomized rats after sequential low doses of estradiol to stimulate the preovulatory estrogen surge. *Eur J Neuroscience*. **2007**; 26: 2595-2612.

**Scharfman H, MacLusky N.** Estrogen-growth factor interactions and their contributions to neurobiological disorders. *Headache*. **2008**; 48: 77-89.

**Schmidt P, Rubinow D.** Sex hormones and mood in the perimenopause. *Ann N Y Acad Sci*. **2009**; 1179: 70-85.

**Siegel G, Agranoff B, Albers R.** Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects. 6a. edición. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, **1999**: 40-55.

**Spencer** J, Waters E, Milner T, Lee F. BDNF variant Val66Met interacts with estrous cycle in the control of hippocampal function. *Neuroscience*. **2010**; 107: 4395–4400.

**Spencer** JL, Waters EM, Romero RD, Wood GE, Miler TA, McEwen BS. Undercovering the mechanism of estrogen effects on hippocampal function. *Frontiers in Neurosci*. **2008**; 29: 219-237.

**Spencer-Segal** JL, Tsuda MC, Mattei L, Waters EM, Romeo RD, Milner TA, McEwen BS, Ogawa S. Estradiol acts via estrogen receptors alpha and beta on pathways important for synaptic plasticity in the mouse hippocampal formation. *Neuroscience*. **2011**; 35: 101-113.

**Thomas** D, Soffin E, Roberts C, Kew J, De la Flor R, Dawson L. SB-699551-A a novel 5-HT<sub>5A</sub> receptor-selective antagonist, enhances 5-HT neuronal function. *Neuropharmacology*. **2006**; 51: 566-577.

**Zheng** P. Neuroactive steroid regulation of neurotransmitter release in the CNS: action, mechanism and possible significance. *Progress in Neurobiology*. **2009**; 89: 134-152.