



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

**ESTUDIO DE VÍAS DE SEÑALIZACIÓN ACTIVADAS POR
PROLACTINA (PRL) EN NEURONAS HIPOCAMPALES DE RATA**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

GLADYS MOLINA SALINAS

TUTOR

DR. MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES
FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ TUTORAL

DR. JULIO EDUARDO ROQUE MORÁN ANDRADE
INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR
DR. ÁNGEL ALFONSO ZARAIN HEZBERG
FACULTAD DE MEDICINA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX. JULIO DE 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Publicaciones

1. Ramos-Martínez E, Ramos-Martínez I, **Molina-Salinas G**, Zepeda-Ruiz W, Cerbon M. 2020. The role of prolactin in central nervous system inflammation. *Rev. Neurosci.* 1;32(3): 323-340. doi: 10.1515/revneuro-2020-0082
2. **Molina-Salinas, G.**, Rivero-Segura, N.A., Cabrera-Reyes, E.A., Rodríguez-Chávez, V., Langley, E., Cerbon, M., 2021. Decoding signaling pathways involved in prolactin-induced neuroprotection: A review. *Front. Neuroendocrinol.* 61, 100913. doi.org/10.1016/j.yfrne.2021.100913
3. Rodríguez-Chávez V, Morán J, **Molina-Salinas G**, Zepeda-Ruiz W, Rodríguez MC, Picazo O, Cerbon M. 2021. Participation of Glutamatergic Ionotropic Receptors in Excitotoxicity: The Neuroprotective Role of Prolactin. *Neuroscience.* 1; 461:180-193. doi: 10.1016/j.neuroscience.2021.02.027
4. **Molina-Salinas G**, Rodríguez-Chávez V, Langley E and Cerbon M. 2023. Prolactin-induced neuroprotection against excitotoxicity is mediated via PI3K/AKT and GSK3 β /NF- κ B in primary cultures of hippocampal neurons. *Peptides.* 166. doi.org/10.1016/j.peptides.2023.171037
5. V Rodríguez-Chávez; **G Molina-Salinas**; E Flores-Soto, L. D Martínez-Razo; L. M Montaña Ramírez, M Cerbon. 2023. Prolactin neuroprotective effect against glutamatergic excitotoxicity is mediated by a reduction in intracellular Ca²⁺ concentration in hippocampal neurons. *Neuroscience letters.* doi: 10.1016/j.neulet.2023.137344

Abreviaturas:

Ab: Anticuerpo

AK: Ácido kaínico

AKT: Proteína cinasa B

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

Bcl-2: Proteína de linfoma de células B

EA: Enfermedad de Alzheimer

E2:17 β -estradiol

FC: Fold Change / veces de cambio

GFAP: Proteína ácida glial fibrillar

Glu:Glutamato

Hprt: Hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa

JAK2: Proteína Janus cinasa 2

MAPK: Proteína cinasa activadora de mitógeno

NF- κ B: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

Nrf2: Factor nuclear relacionado con el factor eritroide 2

OVX: Ovariectomizadas

PI3K: Fosfatidilinositol 3-cinasa

PRL: Prolactina

PRLR: Receptor de Prolactina

RT-qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real con transcriptasa reversa

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa

DE: Desviación estándar

SNC: Sistema Nervioso Central

STAT5: Transductor de señal y activador transcripcional 5

TIDA: neuronas dopaminérgicas tuberoinfundibulares

TG: neurona trigeminal

Abstract

Prolactin (PRL) is a polypeptide hormone that has been reported to play a significant role in neuroprotection against neuronal excitotoxicity produced by glutamate (Glu) or kainic acid (KA) in both, *in vitro* and *in vivo* models. However, the molecular mechanisms involved in PRL's neuroprotective effects in the hippocampus have not been completely elucidated. The aim of the present study was to assess the signaling pathways involved in PRL neuroprotection against excitotoxicity. Primary rat hippocampal neuronal cell cultures were used to assess PRL-induced signaling pathway activation. The effects of PRL on neuronal viability, as well as its effects on activation of key regulatory pathways, such as phosphoinositide 3-kinases/Protein Kinase B (PI3K/AKT) and glycogen synthase kinase 3 β / nuclear factor kappa B (GSK3 β /NF- κ B), were evaluated under conditions of glutamate-induced excitotoxicity. Additionally, the effect on downstream regulated genes such as *Bcl-2* and *Nrf2*, was assessed. Here, we show that the PI3K/AKT signaling pathway is activated by PRL treatment during excitotoxicity, promoting neuronal survival through upregulation of active AKT and GSK3 β /NF- κ B, resulting in induction of *Bcl-2* and *Nrf2* gene expression. Inhibition of the PI3K/AKT signaling pathway abrogated the protective effect of PRL against Glu-induced neuronal death. Overall, results indicate that the neuroprotective actions of PRL are mediated in part, by the activation of the AKT pathway and survival genes. Our data support the idea that PRL could be useful as a potential neuroprotective agent in different neurological and neurodegenerative diseases.

Resumen

La prolactina (PRL) es una hormona polipeptídica, secretada por células lactotrópicas de la adenohipófisis y ampliamente ligada a procesos como la lactancia y la conducta materna. Sin embargo, estudios recientes le adjudican un rol destacado en la neuroprotección contra la excitotoxicidad neuronal producida por el glutamato (Glu) o el ácido kaínico (AK), tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* en neuronas del hipocampo, una región vulnerable en enfermedades neurodegenerativas. Aunque se ha caracterizado la participación de la PRL como un agente protector, los mecanismos moleculares implicados en los efectos neuroprotectores de la PRL en el hipocampo no han sido completamente dilucidados. El objetivo del presente estudio fue evaluar las vías de señalización implicadas en la neuroprotección de la PRL contra la excitotoxicidad por Glu. Para ello, se utilizaron cultivos primarios de neuronas hipocámpicas a fin de evaluar la activación de la vía de señalización inducida por PRL en este mecanismo. Se evaluaron los efectos de la PRL sobre la viabilidad neuronal, así como sus efectos sobre la activación de las vías reguladoras clave, tales como: fosfoinosítido 3-quinasas/Proteína quinasa B (PI3K/AKT) y glicógeno sintasa quinasa 3 β /factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (GSK3 β /NF- κ B), en condiciones de excitotoxicidad inducida por glutamato. Además, se evaluó el efecto sobre la expresión de los genes regulados río abajo como *Bcl-2* y *Nrf2*. Los resultados mostraron que la vía de señalización PI3K/AKT es activada por el tratamiento con PRL durante la excitotoxicidad, promoviendo la supervivencia neuronal a través de la regulación al alza de AKT activo y GSK3 β /NF- κ B, resultando en la inducción de la expresión de los genes *Bcl-2* y *Nrf2*. Interesantemente, la inhibición de la vía de señalización PI3K/AKT anuló el efecto protector de la PRL contra la muerte neuronal inducida por Glu. En general, los resultados obtenidos indican que las acciones neuroprotectoras de PRL están mediadas en parte, por la activación de la vía AKT y genes de supervivencia. Nuestros datos apoyan la idea de que la PRL podría ser útil como un agente neuroprotector en diferentes enfermedades neurológicas y neurodegenerativas.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por la educación de calidad, pública y gratuita que me ha brindado, desde la preparatoria, hasta el doctorado. En sus aulas he cultivado el pensamiento, aprendido, reído, llorado y obtenido las mejores experiencias de la vida. Al Programa de Posgrado del Doctorado en Ciencias Biomédicas, por la excelencia del programa que ayuda a formar a los científicos del mañana. A todos los docentes que me llevo en la memoria, que han sido verdaderos maestros de vida y de los que he aprendido tanto y al comité tutor que me proporcionó siempre herramientas para mejorar semestre a semestre. Al PAPIIT por el financiamiento para la realización de este trabajo (IN228420). Al CONAHCYT, por la beca otorgada 892106, para la realización de mis estudios de posgrado.

Al Laboratorio 323 de Endocrinología molecular, a cargo del Dr. Marco Cerbón, por sus enseñanzas, mentoría, consejos, su apoyo siempre y ayudarme a lo largo de mi formación.

A mis compañeros de laboratorio, que se han convertido en amigos a lo largo de este camino. A todos los amigos que me han acompañado, cómplices de aventuras y vivencias.

A mi familia: mi papá, mi mamá y mi hermana Cynthia, mi sobrino Mati: los pilares de mi vida, por su apoyo infinito siempre, sus consejos, su amor y presencia: por ser y estar, por enseñarme los valores que me rigen.

¡Gracias siempre!

*“Caminante no hay camino,
se hace camino al andar”*

Contenido

1. Introducción	1
1.1 Características de la Prolactina	1
1.2 Síntesis y secreción	2
1.3 Funciones de la prolactina	4
1.4 Receptor de prolactina	5
1.5 Vías de señalización asociadas a prolactina	10
1.6 Vías de señalización inducidas por PRL en la neuroprotección contra la excitotoxicidad.	15
1.7 AKT/PI3K y neuroprotección	15
1.8 NF- κ B y PRL relacionados con la neuroprotección	16
1.9 Activación de las vías JAK2/STAT5 y ERK1/2 en la neuroprotección	18
1.10 Neuroprotección mediada por la PRL contra la excitotoxicidad	21
2. Antecedentes	23
3. Relevancia e impacto del proyecto	27
Pregunta	27
4. Hipótesis	27
5. Objetivos	28
General	28
Particulares	28
6. Métodos	28
6.1 Animales	28
6.2 Cultivos de neuronas primarias del hipocampo	29
6.3 Tratamientos en cultivos celulares primarios de neuronas	30
6.4 Viabilidad celular	30
6.5 Inmunofluorescencia	31
6.6 Western blot	32
6.7 Extracción de ARN	33
6.8 RT-qPCR	33
6.9 Análisis estadístico	33
7. Resultados	34
7.1 Expresión de PRLR en cultivos primarios de neuronas del hipocampo	34
7.2 Los tratamientos con PRL e inhibidores de la vía PI3/AKT no modifican la viabilidad de las células del hipocampo.	36

7.3 La neuroprotección inducida por PRL contra el daño excitotóxico provocado por Glu en cultivos de neuronas hipocampales se ve anulada por la inhibición de la vía PI3K/AKT.....	37
7.4 Activación de la vía PI3K/AKT por el tratamiento con PRL durante la neuroprotección contra el daño excitotóxico inducido por Glu en neuronas cultivadas de hipocampo de rata.....	39
7.5 La administración de PRL en cultivos primarios de neuronas del hipocampo promueve la localización nuclear de pAKT.....	41
7.6 La administración de PRL en cultivos primarios de neuronas del hipocampo promueve la fosforilación de GSK3 β	43
7.7 Aumento de la expresión y localización nuclear de NF- κ B mediado por PRL en neuronas del hipocampo.	44
7.8 La expresión de Bcl-2 fue regulada por la administración de PRL en cultivos primarios de neuronas hipocampales.....	46
7.9 La sobreexpresión del gen <i>Nrf2</i> inducida por la administración de PRL en neuronas del hipocampo está asociada a la activación de la vía PI3K/AKT.	48
8. Discusión.....	49
9. Conclusión	65
10. Perspectivas	66
11. Referencias	67
12. Suplementario.....	81
13. Anexo -Artículo Publicado-.....	85

1. Introducción

1.1 Características de la Prolactina

La prolactina (PRL) es una hormona peptídica producida primariamente por los lactotrofos de la adenohipófisis y pertenece al grupo I de la familia de las citocinas hematopoyéticas, que incluyen además a la hormona del crecimiento (GH) y la lactógeno placentario (LP) (Ben-Jonathan et al., 1996; Freeman et al., 2000; Harvey et al., 2012; Marano and Ben-Jonathan, 2014). PRL, GH y LP conforman la familia de los somatolactógenos, también conocidos como citocinas helicoidales de clase I (Huising et al., 2006). Es interesante que la PRL y la GH comparten tanto similitudes estructurales como evolutivas, por ello se ha hipotetizado que la PRL surgió evolutivamente como evento de duplicación del gen que codifica para GH (Bermea et al., 2018; Marano and Ben-Jonathan, 2014), de ahí sus características compartidas.

En cuanto a sus características estructurales, la PRL humana está codificada en el cromosoma 6 por el gen *hprl*, cuyo tamaño es de 10 kb, dicho gen se compone por 5 exones y 4 intrones. Su transcripción está regulada por dos promotores, uno distal y otro proximal, encargados de promover la transcripción de la PRL de la adenohipófisis y de la expresión de la PRL extrahipofisiaria, respectivamente (Bole-Feysot et al., 1998). El ácido ribonucleico mensajero (ARNm) se traduce inicialmente en una proteína precursora de 227 aminoácidos (aa), la cual después de un procesamiento proteolítico da origen a una forma monomérica de PRL compuesta por 199 aminoácidos con un peso molecular de 23 kDa; además, se han descrito otras isoformas funcionales de PRL generadas por modificaciones post-traduccionales (Binart, 2017; Freeman et al., 2000; Teilum et al., 2005). Por su parte, en la rata, el gen que codifica para la PRL se localiza en el cromosoma 17 (Carretero et al., 2019; Sangeeta Devi and Halperin, 2014).

Como previamente se mencionó la PRL está compuesta por 199 aminoácidos y tiene un peso de 23 kDa, a esta forma de la hormona se le conoce como prolactina monomérica. Sin embargo, esta no es la única versión de dicha hormona ya que se han

descrito diversas isoformas como la de 16 kDa, que surge por eventos de proteólisis (Bole-Feysot et al., 1998; Lee et al., 1998). Esta última forma de PRL se asocia con procesos antiangiogénicos, por lo que se conoce como una vasoinhibina (Triebel et al., 2017, 2015). Así mismo se han descrito variantes glicosiladas y fosforiladas (Ben-Jonathan et al., 1996; Binart, 2017; Freeman et al., 2000; Marano and Ben-Jonathan, 2014).

Adicionalmente, se tienen algunos informes de PRL dimérica llamada big prolactin, que tiene un tamaño de 48kDa, como resultado de la unión de dos prolactinas monoméricas. También, se ha descrito a la big big PRL con un peso de más de 100 kDa, que es una prolactina asociada con varias IgG (Binart, 2017). Es interesante que en la glándula pituitaria anterior de ratas lactantes, se han detectado variantes adicionales a la PRL de 23 kDa, cuyos tamaños van desde los 16-100 kDa, si bien presentaban un patrón de secreción variable en el tiempo, la variante de 100 kDa se encontró en proporción similar a la de 23 kDa (Mena et al., 1992). Sin embargo, se requiere mayor información para determinar con exactitud el rol fisiológico de esta variante de PRL, así como su interacción con otras variantes.

1.2 Síntesis y secreción

La secreción de la PRL se regula por un fino mecanismo de factores endógenos, tales como los factores liberadores de PRL (PRF) así como la hormona liberadora de tirotrópina (THR) y el péptido intestinal vasoactivo (VIP); y por factores externos como el fotoperíodo, disponibilidad de alimento y por procesos físicos asociados a la succión de la mama que estimulan su secreción. Al haber altas concentraciones de PRL, se liberan factores inhibidores de PRL (PIF) que pueden ser ácido gamma aminobutírico (GABA), dihidroxifenilalanina (DOPA) y somatostatina (Binart, 2017; Freeman et al., 2000; Marano and Ben-Jonathan, 2014).

La PRL se sintetiza de manera primaria en las células lactotropas presentes en la adenohipófisis, aunque también, se ha reportado su síntesis en varios tejidos extra-hipofisarios, tales como: glándula mamaria, ovarios, decidua (Goffin, 2017), células del sistema inmune (Borba et al., 2018), así como en células endoteliales (Reuwer et al.,

2012). Aunque en todas las especies de mamíferos la mayor proporción de la hormona PRL se origina en la hipófisis, algunos estudios sugieren una posible síntesis en el cerebro de ratas hembras (Brown et al., 2016; Cabrera-Reyes et al., 2017; Emanuele et al., 1992; Hirai et al., 2013).

La evidencia observada sobre la expresión de PRL en el tejido neuronal ha sido reportada utilizando diferentes modelos. En ratas hembras hipofisectomizadas se detectó prolactina inmunorreactiva (ir-PRL) en diferentes áreas cerebrales (DeVito, 1988; DeVito et al., 1992; Paut-Pagano et al., 1993). De hecho, el ARNm de PRL fue detectado por hibridación *in situ*, mientras que la proteína fue detectada por Western blot en el cerebro de ovinos (Roselli et al., 2008). Sin embargo, los datos relacionados con la expresión de PRL en el cerebro siguen siendo limitados y controversiales.

Por ejemplo, autores mencionan que la detección del ARNm de PRL en regiones del cerebro puede ser consecuencia de un evento de contaminación con otras células que sí expresan PRL, como lo son las células del plexo coroideo (PC) y no por una síntesis *per se* de PRL en el cerebro, ni tampoco por PRL de fuentes no hipofisarias (Bridges and Grattan, 2019). Sin embargo, recientemente se detectó expresión de PRL en el PC de ratas preñadas, en cultivos primarios de células epiteliales de PC y en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de rata. Interesantemente, esta PRL tenía un mayor peso molecular respecto a la PRL hipofisaria. Entonces, se ha sugerido que el PC no permite únicamente la entrada de PRL al cerebro, sino que incluso sería una fuente alternativa de PRL para el cerebro (Costa-Brito et al., 2021).

Es ampliamente reconocido que la expresión de PRL en regiones cerebrales es muy baja en comparación a la proveniente de la hipófisis, no obstante, es posible que la PRL de fuentes extrapituitarias como en el cerebro se dé, bajo condiciones fisiológicas particulares y con una fina regulación autocrina y paracrina de PRL (Costa-Brito et al., 2022).

Aunque existen discrepancias acerca de la producción de PRL en el cerebro, hay evidencias que demuestran la presencia de PRL así como de su PRLR en diferentes estructuras y tipos celulares en el cerebro (Cabrera-Reyes et al., 2017). Se sabe también

que la PRL tiene diferentes mecanismos de acción que pueden ser paracrinós, autocrinós además de los endocrinós. Sin embargo, algunos autores proponen que la mayoría de los efectos de PRL en el cerebro son de una fuente hipofisaria (Bridges and Grattan, 2019). No obstante, un estudio transcriptómico reciente elaborado por Cabrera-Reyes et al., 2019, sugiere efectos sobre la expresión génica de PRL en el hipocampo.

1.3 Funciones de la prolactina

Producto de los diversos estudios derivados de la PRL durante años, a esta hormona polipeptídica se le ha asociado con múltiples funciones, incluyendo la reproducción, el embarazo y la lactancia (Emanuele et al., 1992; Freemark et al., 1996; Lerant and Freeman, 1998) de manera canónica. Sin embargo, recientemente se le han adjudicado otras implicaciones fisiológicas, tales como: procesos de crecimiento, desarrollo, metabolismo, regulación de sistema inmune, osmorregulación y conducta materna, entre otras (Ben-Jonathan et al., 1996; Freeman et al., 2000; Marano and Ben-Jonathan, 2014).

Además, la PRL se ha asociado con varias funciones en el sistema nervioso central (SNC) tales como: la plasticidad neuronal (Lévy et al., 2011), la inducción del comportamiento maternal (Larsen and Grattan, 2012), la reducción de la ansiedad (Torner, 2016) y la estimulación de la neurogénesis en la zona subventricular (SVZ), aunque este punto ha sido debatido por las observaciones de Shingo et al., 2003. Sin embargo, estudios adicionales, mostraron que la PRL protege la neurogénesis en el giro dentado del hipocampo (GD) de ratones macho adultos estresados crónicamente (Torner et al., 2009). Es probable que las diferencias relacionadas con el sexo, las condiciones fisiológicas o las especies estudiadas puedan explicar las variaciones entre los estudios. La modulación de la glía así como la actividad mielinizante de los oligodendrocitos son otras funciones relacionadas con la PRL (Gregg, 2009).

Por todos los efectos en los que la PRL se ha visto involucrada, se dice que es una hormona pleiotrópica asociada con más de 300 funciones (Bridges and Grattan, 2019).

1.4 Receptor de prolactina

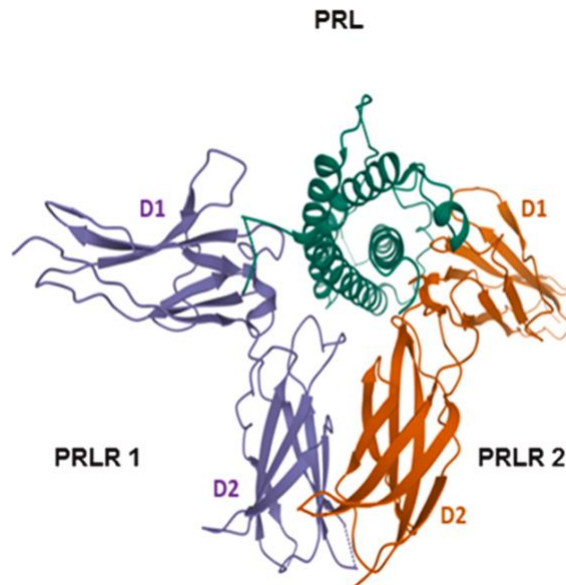
Para que ejerza su acción biológica, la PRL se vale de sus receptores (PRLR) los cuales son expresados en diversos tejidos y órganos. Los PRLR son proteínas transmembranales que pertenecen a la clase I de la superfamilia de receptores a citocinas. Interesantemente, carecen de actividad tirosina-cinasa intrínseca. Esta familia incluye a receptores para GH (GHR), leptina (LEPR), factor de inhibición de leucemia (FIL) y eritropoyetina (EPO), por mencionar algunos (Freeman et al., 2000; Wilkanowska et al., 2014). El gen encargado de codificar para el PRLR en humanos está localizado en el cromosoma 5 en humanos y 15 en ratones, mientras que en rata, se encuentra en el cromosoma 2. (Wilkanowska et al., 2014), contiene 11 exones y por eventos de empalme alternativo (*splicing*), resultan varias isoformas, las más estudiadas para modelos murinos son la isoforma grande (PRLR-L), la intermedia (PRLR-I) y la corta (PRLR-S) (Brooks, 2012).

El PRLR se expresa principalmente en la hipófisis (Bano and Ankarcrona, 2018; Brown et al., 2015; Lévy et al., 2011) y en otros tejidos como el hígado, la glándula mamaria, las glándulas suprarrenales y en el cerebro, particularmente en el hipotálamo, la amígdala (Abramicheva and Smirnova, 2019; Bernard et al., 2019; Bridges and Grattan, 2019; Marano and Ben-Jonathan, 2014; Yip et al., 2019), el plexo coroideo (Hirai et al., 2013) y en el hipocampo de ratas y ratones (Ortiz-Pérez et al., 2019; Tian et al., 2019).

Respecto a su estructura molecular, el PRLR tiene un dominio extracelular de unión a ligando, una porción transmembranal y una región intracelular (Bernard et al., 2019; Freeman et al., 2000; Marano and Ben-Jonathan, 2014; Wilkanowska et al., 2014). PRL se une a dos sitios diferentes en el dominio extracelular de su PRLR, que presentan diferentes afinidades y se nombran como dominio de unión 1 y dominio de unión 2. El dominio de unión 1 tiene una mayor afinidad por PRL y se une primero, promoviendo la unión de PRL al sitio 2 (Ver esquema 1). Esto provoca un cambio conformacional en el dímero del receptor, activando vías de señalización río abajo (Abramicheva and Smirnova, 2019; Bernard et al., 2019; Brooks, 2012). Las diferentes vías de señalización

activadas por PRLR incluyen la Janus cinasa 2/Transductor de señales y activador de la transcripción 5 (JAK2/STAT5), la vía de las MAP-cinasas (MAPK/ERK1/2) y la vía de la proteína cinasa B (PI3K/AKT) (Carretero et al., 2019; Molina-Salinas et al., 2021).

La unión de monómeros de PRLR conduce a la formación de homodímeros o heterodímeros entre isoformas largas y cortas. Los homodímeros PRLR-L se asocian con la activación de la vía JAK2/STAT5, ya que tienen un residuo de tirosina 580 situado en la cola citoplasmática del dominio intracelular necesario para la fosforilación de STAT5 (Carretero et al., 2019; Freeman et al., 2000).



Esquema 1. Interacciones entre la PRL y el PRLR (3NPZ.pdb). Se muestra la interacción entre una molécula de PRL y los dominios extracelulares del dímero de los PRLR. La PRL consta de 4 α -hélices, agrupadas en dos pares antiparalelos (verde), y 3 enlaces disulfuro. La región C-terminal tiene un enlace disulfuro entre los residuos 191 y 199. La PRL se une al PRLR dimerizado, indicado como receptor de prolactina 1 (PRLR1; púrpura) y receptor de prolactina 2 (PRLR2; naranja). El PRLR debe estar dimerizado para activarse. El PRLR tiene 2 subdominios extracelulares con motivos similares a la fibronectina III: D1 con un "motivo WS" (Trp-Ser-X-Trp-Ser) y una región D2, juntos forman el sitio de unión del ligando. Imagen obtenida con el PDB utilizando el software en línea VP'WebGL.

Al igual que la PRL, el PRLR puede presentar diversas isoformas, debido a eventos de empalme alternativo del ARNm. Hasta el momento se han descrito tres isoformas principales para el PRLR en roedores y cinco en humanos (Abramicheva and

Smirnova, 2019; Brooks, 2012; Patil et al., 2014; Sangeeta Devi and Halperin, 2014). Las más estudiadas, por su distribución y expresión, son las isoformas grande (PRLR-L), intermedia (PRLR-I) y corta (PRLR-S) (Brooks, 2012; Freemark et al., 1996; Marano and Ben-Jonathan, 2014), denominadas así, en función de la longitud de su dominio intracelular (DIC). Sin embargo, todas las isoformas presentan un punto en común: la presencia del mismo dominio extracelular (DEC) con motivos similares a la fibronectina tipo III, residuos de cisteína implicados en la unión a hormonas (Hammer and Diakonova, 2015) un motivo WSXWS conservado (Trp-Ser-X-Trp-Ser), y además, comparten el mismo dominio transmembrana (DTM). (Ver Figura 1). De manera particular los DIC (Abramicheva and Smirnova, 2019; Freemark et al., 1996; Marano and Ben-Jonathan, 2014) son diferentes en cada isoforma, y probablemente determinan las vías de señalización activadas por PRL (Molina-Salinas et al., 2021).

El PRLR se compone por un dominio extracelular, uno transmembranal y uno intracelular. El PRLR-L y el PRLR-I tienen un dominio Box-1, en tanto que el PRLR-S un dominio Box-2 (Patil et al., 2014). Estas diferentes variantes de PRLR son el resultado de un evento de empalme alternativo o bien, de algunas otras modificaciones post-traduccionales, ello contribuye a las diversas acciones de la prolactina (Marano and Ben-Jonathan, 2014).

Diversos estudios tanto *in vivo* como *in vitro* han demostrado una amplia distribución del PRLR en tejidos como la glándula mamaria, ovario, páncreas, sistema respiratorio, tracto gastrointestinal (Aoki et al., 2019; Marano and Ben-Jonathan, 2014), y en varias regiones cerebrales como el bulbo olfatorio (Larsen et al., 2008), la corteza cerebral, el hipotálamo, la amígdala, el plexo coroideo (Bakowska and Morrell, 2003; Brown et al., 2011) y el hipocampo (Ortiz-Pérez et al., 2019; Tian et al., 2019). Aunque, la expresión de la proteína del PRLR se ha descrito en algunas regiones cerebrales (Lerant and Freeman, 1998), su detección en el hipocampo no ha sido contundente debido a las complicaciones en la detección de variaciones de los niveles de expresión de su proteína por métodos convencionales, y probablemente también debido a las diferencias entre especies (Carretero et al., 2019).

Sin embargo, algunos estudios han tratado de resolver este problema a través del uso de herramientas como el ratón transgénico Prlr-Cre, en el que el PRLR se expresa altamente tanto en machos como en hembras (Aoki et al., 2019; Kokay et al., 2018). Esto ha permitido un mapeo específico del PRLR así como deducciones sobre su expresión y funcionalidad. En este modelo de ratón transgénico, se ha demostrado que muchas regiones cerebrales expresan PRLR, como los núcleos septales, la amígdala medial, el área preóptica (POA) y el hipotálamo (Kokay et al., 2018).

Aoki et al., 2019 mapearon células que expresan PRLR etiquetadas con τ GFP en ratones hembra, y sugirieron una distribución moderada τ GFP+ en el cerebro. Otro modelo empleado para la localización del PRLR ha sido la hibridación *in situ*, que ha permitido la observación de PRLR en el cerebro de ratas macho y hembra en el núcleo periventricular (PeVN) desde la región preóptica hasta el arcuato (ARC) caudal, así como en el núcleo del lecho de la estría terminal (BNST) y la amígdala medial posterodorsal, entre otros (Bakowska and Morrell, 2003; Brown et al., 2011; Pi and Voogt, 2002; Pi and Grattan, 1998). Interesantemente, el ARNm del PRLR se ha reportado en el hipocampo diseccionado (Nogami et al., 2007; Tian et al., 2019).

Las diferentes isoformas de PRLR-S y PRLR-L han sido detectadas por ensayos de Western blot *in vitro*, a través de cultivos primarios de neuronas hipocámpales de rata (Rivero-Segura et al., 2017; Vergara-Castañeda et al., 2016). Interesantemente, también *in vivo*, el PRLR ha sido detectado por inmunofluorescencia en hipocámpos de ratas hembras, esto en experimentos de neuroprotección inducida por el tratamiento con PRL contra daño excitotóxico promovido por la administración de ácido kaínico (AK) (Ortiz-Pérez et al., 2019). Adicionalmente, hay evidencias de una expresión regulada al alza del ARNm de PRLR en el hipocampo diseccionado de ratas lactantes (De Moura et al., 2015); el mismo efecto de incremento en ARNm en el hipocampo se vio en ratones macho sometidos a ejercicio, mostrando funciones protectoras asociadas a la consolidación de la memoria durante el estrés crónico (Leem et al., 2019).

A pesar de estos resultados, múltiples estudios previos utilizando diferentes estrategias no mostraron una expresión significativa de PRLR en hipocampo (Bakowska

and Morrell, 2003; Brown et al., 2011; Pi and Voogt, 2002; Pi and Grattan, 1998). Es importante mencionar que en algunos estudios no se puede descartar la contaminación del plexo coroideo, como en el estudio de Sárvári et al., 2015, en el que se reportó una alta expresión tanto de PRLR como de transtiretina (TTR) en el hipocampo, ya que es bien sabido que el plexo coroideo es un tejido cerebral con alta expresión tanto de PRLR como de TTR (Phillipps et al., 2020). Por lo tanto, se requieren más estudios para determinar el contenido, la distribución y las isoformas de PRLR expresadas en el hipocampo en condiciones fisiológicas y fisiopatológicas, particularmente con respecto a la neuroprotección contra la excitotoxicidad.

Tanto la isoforma corta como la larga de PRLR se han detectado en cultivos primarios neuronales, y cuando se inhibió la expresión de PRLR en neuronas del hipocampo, se abolió el efecto neuroprotector de PRL frente a la excitotoxicidad inducida por glutamato (Glu) (Vergara-Castañeda et al., 2016), lo cual sugiere que la presencia del PRLR es indispensable para la neuroprotección. Además, tras una administración previa de PRL, el daño por AK promovió un aumento de la expresión de PRLR en todas las regiones del hipocampo, induciendo neuroprotección (Ortiz-Pérez et al., 2019). Sin embargo, queda la duda de por qué se observó la expresión de PRLR mediante tinción específica, sin la activación consecutiva de pSTAT5 en neuronas del hipocampo (Morales et al., 2014). Por lo tanto, la participación de las isoformas del PRLR durante la neuroprotección en el hipocampo queda por elucidar.

Recientemente, se reportó que bajo condiciones de estrés crónico leve, ocurre la activación de la vía JAK2/STAT5, la cual está mediada por el PRLR, induciendo daño en el hipocampo de ratones. La inhibición del PRLR usando shPRLR, produjo la inactivación de la vía JAK2/STAT5, reduciendo el daño neuronal en el hipocampo (Tian et al., 2019). Esta observación implica que la activación de la vía JAK2/STAT5 está mediada por el PRLR y que está involucrada en la respuesta al estrés, induciendo daño en el hipocampo de ratones.

Además, de la vía JAK2/STAT5 activada por PRL, se ha informado que la vía de señalización ERK1/2 se activó en las neuronas hipotalámicas y la amígdala en ratas

hembras después del tratamiento con PRL (Blume et al., 2009). Por último, PI3K/AKT es otra posible vía de señalización que responde a la activación de PRLR tanto en machos como en hembras (Anagnostou and Morales, 2019; Ferraris et al., 2012; Molina-Salinas et al., 2023; Patil et al., 2014). En las siguientes secciones discutiremos en detalle cada vía de señalización, su activación por PRL y los efectos asociados.

Queda claro con la información recolectada hasta el momento que la amplia distribución tanto del PRLR así como la de su ligando: la PRL, le confiere su amplia capacidad funcional y que por lo tanto es probable que sus efectos fisiológicos respondan a diferentes vías de señalización molecular.

1.5 Vías de señalización asociadas a prolactina

Es a través de la activación de distintas vías de señalización que el PRLR lleva a cabo los diversos efectos biológicos de la PRL con los que ha sido relacionada. En este sentido, la vía que más se ha descrito es la correspondiente a JAK2/STAT5 que es estimulada por la isoforma larga del receptor PRLR-L. La PRL se asocia a sus receptores, lo que provoca su dimerización, posteriormente una proteína cinasa que es la JAK2, se activa y fosforila residuos de Tyr del receptor, al tiempo que se autofosforila. Este evento conduce a la activación de las proteínas transductoras de la señal y activadoras de la transcripción: STAT5, las cuales al ser fosforiladas, dimerizan en hetero u homodímeros y se translocan al núcleo, donde ejercen su efecto como factores de transcripción para genes blanco involucrados en procesos como la lactogénesis (Carretero et al., 2019; Freeman et al., 2000; Marano and Ben-Jonathan, 2014; Wilkanowska et al., 2014).

No obstante, la proteína cinasa JAK2 en su versión fosforilada puede desencadenar adicionalmente otras fosforilaciones, entre ellas a las de proteínas como el sustrato-1 del receptor de insulina (IRS-1) así como del fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K), que conduce a la activación del factor AKT que está asociado a procesos de sobrevivencia. Otra vías que responden a la familia de receptores de citocina de tipo I, corresponde a las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) que desencadenan la cascada conformada por la proteína transformadora de SHC1 (Shc), el

factor de intercambio de nucleótidos de guanina (SOS), la proteína ligada al receptor del factor de crecimiento 2 (Grb2), la GTPasa Ras, el receptor tirosina cinasa (Raf), la proteína cinasa activada por mitógeno (MEK) y las cinasas extracelulares reguladas por señales (ERK1/2), mejor conocida como Shc/SOS/Grb2/Ras/Raf/ERK1/2, vinculados a procesos como la proliferación (Carretero et al., 2019; Freeman et al., 2000; Marano and Ben-Jonathan, 2014).

Tanto las isoformas de PRLR-L y PRLR-I poseen los dominios Box-1 y Box-2, en la parte intracelular del receptor, mientras que PRLR-S únicamente posee un dominio Box-1. Box-1 contiene el dominio de unión a JAK2 y la región C-terminal presenta residuos de tirosina (Box-2) necesarios para la activación de proteínas de señalización, como STAT5 (Brooks, 2012).

La principal vía descrita para el PRLR-L es JAK2/STAT5. La unión de PRL a su receptor provoca la dimerización de los PRLR, preferentemente homodímeros del PRLR-L. A continuación, la tirosina cinasa JAK2 se activa por autofosforilación/transfosforilación en los residuos de tirosina Y1007 e Y1008 (Hammer and Diakonova, 2015), promoviendo la posterior fosforilación en los residuos de tirosina del PRLR (Brooks, 2012; Ladyman and Grattan, 2013). Este evento conduce a la activación de las proteínas STAT5, que son fosforiladas por JAK2 y luego dimerizadas en hetero u homodímeros. Posteriormente, se translocan al núcleo, donde desempeñan un papel como factores de transcripción para promover procesos relacionados con las conductas parentales (Bole-Feysot et al., 1998; Buonfiglio et al., 2015; Lerant et al., 2001).

La familia Janus cinasa, considerada el principal efector de PRLR, tiene cuatro miembros: JAK1-JAK3 y TYK2. Todos los miembros contienen un dominio catalítico de tirosina cinasa en el extremo C-terminal y poseen dominios de homología Src 2 (SH2) en el sitio N-terminal que interactúan con proteínas que contienen residuos de tirosina fosforilados (Dymock et al., 2014). STAT5 forma parte de una familia de siete factores de transcripción STAT de mamíferos (STAT1-STAT4, STAT5a, STAT5b y STAT6) con un sitio C-terminal común, un dominio SH2 y un dominio de dimerización N-terminal. El sitio crítico para la fosforilación de tirosina se encuentra en la posición Y694 en STAT5a, y en

la posición Y699 en STAT5b (Chilton and Hewetson, 2005; Kisseleva et al., 2002; Ladyman and Grattan, 2013).

La vía JAK2/STAT5 se activa en respuesta a citocinas, factores de crecimiento y PRL. Esta vía de señalización participa en varias funciones en las células epiteliales mamarias secretoras, como la especificación, la proliferación, la diferenciación y la supervivencia (Rädler et al., 2017; Schmidt et al., 2014). Además, esta vía es activada por la PRL en los lactotropos (Bole-Feysot et al., 1998; De Dios et al., 2019; Marano and Ben-Jonathan, 2014). En el cerebro, se observó la expresión de STAT5 fosforilada (pSTAT5) en células del ARC y la eminencia media, regulada por la elevación de PRL circulante en respuesta al estrés por restricción en ratones macho (Kirk et al., 2017). Además, se ha reportado la expresión de pSTAT5 en otras regiones cerebrales como el núcleo paraventricular (PVN) y áreas hipotalámicas ventromediales en ratones lactantes (Brown et al., 2017, 2015, 2010). El tratamiento con bromocriptina, un compuesto inhibidor de la dopamina, suprime la secreción de PRL (Auriemma et al., 2019), bloqueando la señalización de pSTAT5 en las regiones hipotalámicas implicadas en la secreción de PRL en ratones hembra (Oláh et al., 2018).

Además, se ha informado de un papel esencial de la activación de STAT5 por PRL en la inducción del comportamiento maternal. El tratamiento con PRL indujo una regulación al alza de la vía JAK2/STAT5 en el área preóptica medial (mPOA), PVN, núcleo supraóptico (SON) y el ARC del hipotálamo, áreas necesarias para el comportamiento maternal (Sjoeholm et al., 2011). Curiosamente, en ratones hembra que son STAT5 KO específicos de cerebro, los animales no abolieron el comportamiento maternal postparto (Buonfiglio et al., 2015).

Por el contrario y de manera interesante, se ha reportado que el PRLR-S no es capaz de activar la vía JAK2/STAT5, ya que no contiene el residuo Tyr 580 que debe fosforilarse para activar STAT5 (Abramicheva and Smirnova, 2019; Sangeeta Devi and Halperin, 2014). Por lo tanto, el PRLR-S se ha descrito como un posible regulador negativo que, al formar heterodímeros con la isoforma larga, puede resultar en la incapacidad de activar STAT5, ello se observó en células HEK293 (Kang et al., 2014;

Perrot-Applanat et al., 1997). Por lo tanto, esto indica que la activación de STAT5 depende de la variante de PRLR activada.

Otra vía que responde a la activación del PRLR es la vía MAPK. La unión de PRL a su receptor desencadena la vía Shc/SOS/Grb2/ Ras/Raf/ERK1/2, vinculada a la proliferación en tejidos extrahipofisarios (Marano and Ben-Jonathan, 2014), como las células β pancreáticas (Brelje et al., 2017), células de cáncer de mama T47D (Acosta et al., 2003), así como en la línea celular de ovario GG-CL (Devi et al., 2011), y células mamarias (Sangeeta Devi and Halperin, 2014), entre otras.

Adicionalmente, se ha reportado que la administración de dosis bajas de PRL induce la fosforilación de las cinasas MAPK (MEK) y ERK1/2, con una fosforilación máxima 10 min después del tratamiento con PRL en neuronas hipotalámicas PVN, así como en la línea celular hipotalámica 4B de rata (Blume et al., 2009).

Por otro lado, la tirosina cinasa JAK2 fosforilada puede desencadenar la fosforilación subsiguiente de efectores como IRS-1 y PI3K, lo que conduce a la activación de AKT. El papel de la vía PI3K/AKT está bien establecido en las células no neuronales y está relacionado con la supervivencia, la proliferación y la diferenciación (Rädler et al., 2017; Roof and Gutierrez-Hartmann, 2018). En las células neuronales, la activación de PI3K/AKT está asociada a procesos de supervivencia (Dudek et al., 1997; Vaillant et al., 1999; Xu et al., 2020) y se produce en respuesta a una amplia variedad de estímulos, como factores de crecimiento, lesión cerebral traumática o isquemia (Constantino et al., 2018).

Curiosamente, se ha demostrado que la PRL activa dos vías de señalización en las neuronas. La primera implica la fosforilación del PRLR-L y STAT5, que dirige los efectos a largo plazo en función de la activación transcripcional. Por ejemplo, se observó la expresión de pSTAT5 en el 97% de las neuronas neuroendocrinas tuberoinfundibulares dopaminérgicas (TIDA) 45 min después del tratamiento con PRL en ratones hembra C57BL/6J, (Brown et al., 2012). En este sentido, es bien sabido que estas neuronas dopaminérgicas controlan la secreción de PRL (Grattan, 2015). Evidencias más recientes sugieren la activación temprana de STAT5 por PRL en los

núcleos hipotalámicos, a los dos minutos de la administración de PRL vía intraperitoneal (IP) en ratones machos, se detectó la expresión proteica de pSTAT5, lo que indica su transporte directo y libre al cerebro, así como la activación en cierto tipo de neuronas (Kirk et al., 2019).

Una segunda vía de señalización por PRL en neuronas, implicaría al PRLR-S, que dirige la rápida activación de PI3K con la subsiguiente modulación neuronal, excitabilidad y neurotransmisión, a través de la sensibilización de canales de potencial receptor transitorio (TRPV1) en neuronas trigeminales (TG) de rata hembra, los cuales desempeñan papeles críticos en el dolor. Interesantemente, se observó que la inhibición de PI3K mediante el fármaco sintético LY294002, abolió el efecto de PRL sobre la actividad TRPV1, lo cual sugiere a la vía de señalización PI3K/AKT como un regulador de la actividad de PRL en las neuronas TG.

Es de resaltar que, los efectos transitorios de la PRL en las neuronas sensoriales del TG sólo pudieron ser mediados por la acción del PRLR-S. Además, acciones electrofisiológicas de PRL en las neuronas TIDA se asociaron con la activación de PI3K (Belugin et al., 2013; Lyons et al., 2012; Patil et al., 2014). Curiosamente, los efectos transitorios mediados por PRLR-S son inhibidos por la presencia de PRLR-L en estas células (Belugin et al., 2013). Sin embargo, el estudio de la participación de PRLR-S en la señalización de PRL es insuficiente.

En los ganglios de la raíz dorsal (DRG) y en las neuronas sensoriales TG, se expresan tanto los ARNms del PRLR-L como de PRLR-S, lo cual sugeriría que ambas isoformas participan probablemente en el efecto neuronal de la PRL. Sin embargo, existen diferencias en la expresión neuronal entre sexos, por lo que la expresión del ARNm del PRLR podría depender del mismo (Patil et al., 2019). Se requiere más investigación para dilucidar la activación de las vías de señalización inducidas por PRL en diferentes áreas cerebrales, particularmente en el hipocampo.

1.6 Vías de señalización inducidas por PRL en la neuroprotección contra la excitotoxicidad.

Se han realizado diferentes estudios para dilucidar las vías de señalización implicadas en la neuroprotección inducida por PRL, destacando PI3K/AKT, NF- κ B, JAK2/STAT5, y ERK1/2. El siguiente apartado se enfoca en la participación de la vía PI3K/AKT en diferentes regiones cerebrales, centrándose en el hipocampo.

1.7 AKT/PI3K y neuroprotección

Varios grupos han demostrado el papel crítico de la vía de señalización PI3K/AKT en los mecanismos neuroprotectores en el hipocampo, mediados por diferentes agentes como el ácido eicosapentaenoico (EPA), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), así como el tratamiento de preconditionamiento con N-metil-D-aspartato (NMDA), o fármacos como los inhibidores de la actividad de los receptores NMDA (Almeida et al., 2005; Constantino et al., 2018; Dong et al., 2018; Lai et al., 2014; Soriano et al., 2006). Estas evidencias sugieren que la activación de la señalización PI3K/AKT tiene un papel significativo en la supervivencia, al inhibir la translocación mitocondrial de la proteína agonista de la muerte celular asociada a Bcl-2 (BAD) inducida por la isquemia, la escisión de Bcl-xL, la liberación mitocondrial de citocromo c y la activación de caspasas, promoviendo así la supervivencia neuronal (Bhuiyan et al., 2011; Miyawaki et al., 2008). La proteína AKT también interviene en la fosforilación y la inhibición de la proteína BAD, un miembro de la familia de la proteína de linfoma de células B (Bcl-2) que señala la muerte, en modelos de excitotoxicidad (Lai et al., 2014).

Una de las acciones protectoras de la proteína AKT consiste en su habilidad para fosforilar y en consecuencia inhibir a la proteína glucógeno sintasa cinasa-3 (GSK3 β), que se ha asociado con la patogénesis de diferentes trastornos neurológicos (Hu et al., 2013). En patologías como la Enfermedad de Alzheimer (EA), la señalización PI3K/AKT está atenuada en el cerebro, y su inhibición aumenta la hiperfosforilación de la proteína Tau, la cual es importante para la estabilidad de los microtúbulos (Kitagishi et al., 2014; Matsuda et al., 2018). Estos estudios soportan la idea de que AKT puede considerarse un blanco terapéutico en la supervivencia neuronal.

Es interesante comprender cómo ocurre una asociación de la PRL con la señalización vía AKT. En este sentido, aún son muy pocos los trabajos en los que se han descrito una relación directa entre la activación de la vía PI3K/AKT por efecto de la PRL. En uno de esos estudios, (Domínguez-Cáceres et al., 2004) reportaron en un estudio realizado en células linfoides W53, un aumento en los niveles de expresión de la proteína AKT en respuesta al tratamiento con PRL. Además, se observó que la PRL al aumentar la actividad de AKT promovía la fosforilación de GSK3 β en la posición Ser9, causando su desactivación. De manera similar, se ha sugerido que la PRL tiene un papel neuroprotector mediado por la regulación de Tau y que implicaría la activación de la vía PI3K/AKT/GSK3 β en el daño neurodegenerativo causado por la EA, la cual presenta mayor prevalencia en mujeres (Muñoz-Mayorga et al., 2018).

Otro estudio evaluó el papel neuroprotector que el comportamiento paternal confiere a ratones machos ante un evento excitotóxico inducido por la administración de AK. Machos alojados con las madres y las crías exhibieron menor neurodegeneración y astrogliosis en las áreas CA3 y CA4 del hipocampo en comparación con los controles, como se observó mediante tinción con Fluoro-Jade C e inmunohistoquímica, ello fue asociado a un aumento de la expresión de AKT (Anagnostou and Morales, 2019). De manera similar, el tratamiento con PRL en ratones macho sometidos a daño excitotóxico se asoció con la expresión de AKT induciendo neuroprotección (Anagnostou et al., 2021). A pesar de los extensos estudios que destacan el papel de la vía de señalización PI3K/AKT en los mecanismos de neuroprotección, mediada por diferentes moléculas o fármacos, su relación con la neuroprotección inducida por PRL en el hipocampo es poco conocida.

1.8 NF- κ B y PRL relacionados con la neuroprotección

Se ha descrito que la activación de la vía de señalización NF- κ B está asociada a la neuroprotección contra la excitotoxicidad y el estrés oxidativo mediante la sobreexpresión de p65 (Popiolek-Barczyk and Mika, 2016). La supresión de p65 o la inhibición del NF- κ B neuronal por el superrepressor I κ B provoca la pérdida de

neuroprotección tras el tratamiento con AK en cultivos organotípicos de cortes de hipocampo del ratón transgénico con el NF- κ B silenciado en neuronas del prosencéfalo (Fridmacher et al., 2003). El mismo efecto fue reportado usando modelos *in vivo*, en el cerebro de rata macho preacondicionado con subdosis de AK, mostrando una protección dependiente de NF- κ B contra la muerte neuronal (Blondeau et al., 2001; Kaltschmidt and Kaltschmidt, 2009). Además, se informó que la activación de NF- κ B, después de la fosforilación mediada por AKT de la cinasa I κ B (IKK), resultó en la activación de genes de supervivencia, como *Bcl-2* (Willard and Koochekpour, 2013; Zhu et al., 2018).

En esta misma línea, se informó que el factor de crecimiento transformante β (TGF β) promueve un aumento en la expresión de NF- κ B en las neuronas del hipocampo, mediante la activación de las vías PI3K/AKT y MAPK/ERK1/2, lo que sugiere que estas vías de señalización participan en la actividad antiapoptótica inducida por TGF β (Zhu et al., 2004). Además, se produjo un aumento del daño neuronal inducido por neurotoxina en ratones macho que carecían de la subunidad p50 de NF- κ B, en comparación con los ratones de tipo salvaje (Mattson, 2005; Yu et al., 1999).

NF- κ B se compone por cinco miembros diferentes: p65 (RelA), RelB, c-Rel, p50/p105 (NF- κ B1) y p52/p100 (NF- κ B2). Interesantemente, la combinación de dímeros en que se presente NF- κ B contribuye con el rol que desempeñan en las neuronas, por ejemplo, la subunidad c-Rel de NF- κ B contrarresta la lesión isquémica actuando como un mecanismo innato de neuroprotección. La activación de los heterodímeros NF- κ B/c-Rel tiene efectos neuroprotectores en modelos de ictus al promover la transcripción de genes antiapoptóticos específicos, como *Bcl-xL* y *BIRC3*. Sin embargo, cuando se presenta NF- κ B/RelA desencadena la expresión de genes proapoptóticos como *Bim* y *Noxa*. Por si fuera poco, también mecanismos epigenéticos se ven involucrados en la acción aberrante de NF- κ B/RelA, puesto que esta forma activada reduce la acetilación total de histonas, pero incrementa significativamente la acetilación en una lisina específica: la 310, que facilita también la transcripción de los genes proapoptóticos (Lanzillotta et al., 2015). Estas evidencias ponen de manifiesto que tanto la composición de los dímeros de NF- κ B, así como los mecanismos epigenéticos que modulan la

acetilación de histonas condicionan en gran medida el papel que NF- κ B tiene en los mecanismos neuroprotectores.

En cuanto a la respuesta al estrés oxidativo, se ha descrito que la PRL induce la activación de NF- κ B durante la neuroprotección frente a la excitotoxicidad en el hipocampo, lo que se ha asociado a la inducción de proteínas antiapoptóticas, como Bcl-2, y a un aumento de la actividad y del contenido proteínico de las enzimas Mn²⁺-SOD y Cu²⁺/Zn²⁺-SOD (Rivero-Segura et al., 2019). Del mismo modo, se ha descrito que el tratamiento con PRL induce un aumento de la expresión y actividad de SOD1 (Cu²⁺/Zn²⁺-SOD) y SOD2 en ovario y glándula mamaria (Bolzán et al., 1997). Además, en células de sarcoma tratadas con TNF α , la supresión de NF- κ B provoca un aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que la convierte en una molécula implicada en la promoción de enzimas antioxidantes (Djavaheri-Mergny et al., 2004). La activación de NF- κ B inducida por PRL puede ser un mecanismo a través del cual se promueva la actividad antioxidante, pero los efectos antioxidantes de PRL siguen siendo objeto de debate (Thébault, 2017).

En este respecto, hay estudios sobre el papel de PI3K/AKT en la regulación de la síntesis de glutatión (GSH) (Kim et al., 2004). De hecho, PRL podría estar relacionada con la expresión de antioxidantes enzimáticos en poblaciones celulares de la retina, reduciendo el estrés oxidativo (Thébault, 2017). En este sentido, los ratones PRLR KO mostraron mayores niveles de especies oxidativas y apoptosis en el epitelio pigmentario de la retina (EPR) (Meléndez García et al., 2016).

1.9 Activación de las vías JAK2/STAT5 y ERK1/2 en la neuroprotección

Es bien conocido que la acción de PRL en neuronas de núcleos hipotalámicos está mediada por la fosforilación de la vía JAK2/STAT5 (Brown et al., 2015, 2011, 2010; Grattan and Kokay, 2008; Kirk et al., 2019). Así, esta vía de señalización es una de las más estudiadas en diferentes regiones cerebrales. Curiosamente, la expresión de pSTAT5 en el hipocampo, inducida por los efectos neuroprotectores de PRL, no se ha encontrado en diferentes estudios (Anagnostou and Morales, 2019; Morales et al., 2014).

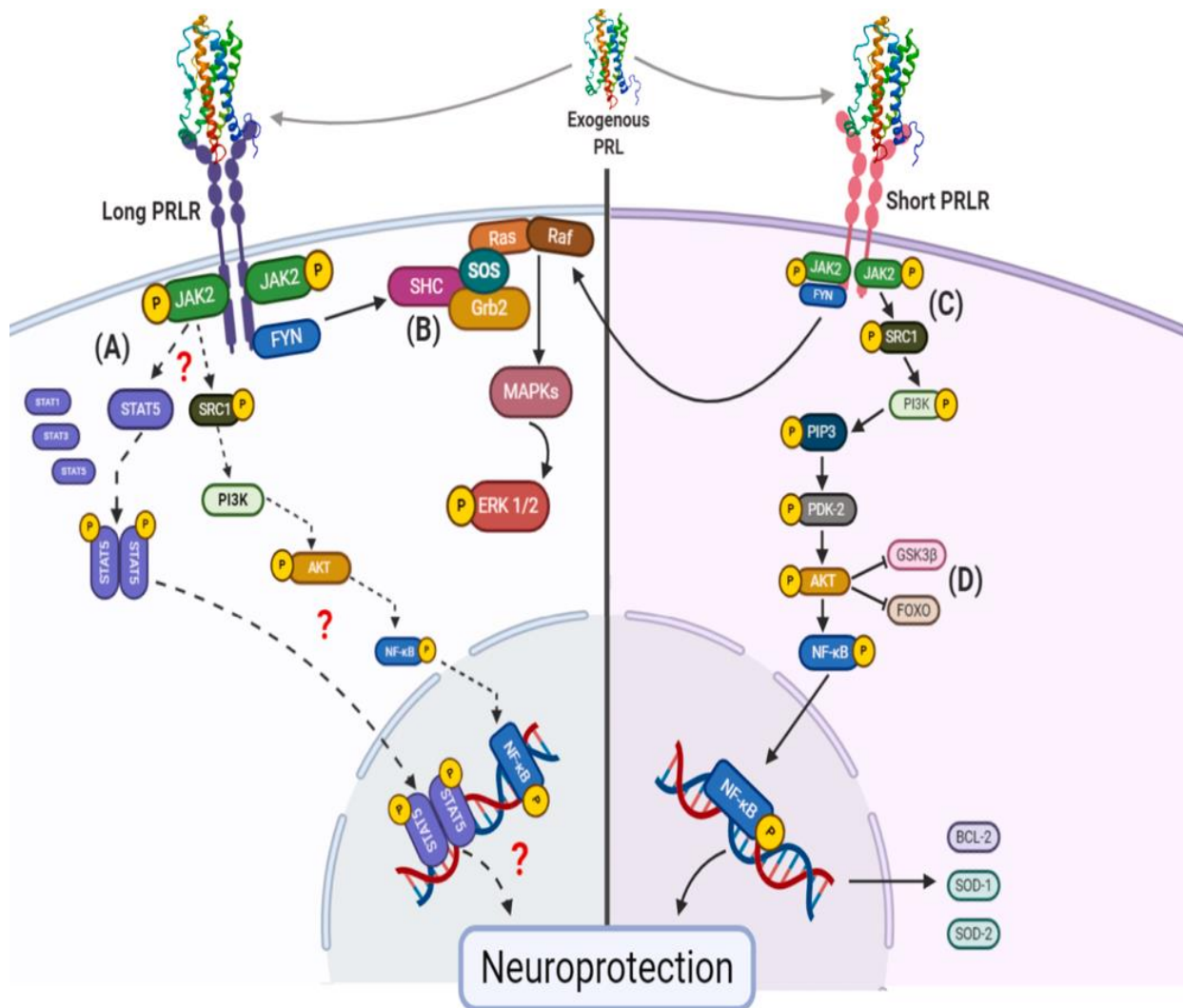
De manera interesante, el silenciamiento de PRLR mediante shRNA específico en neuronas del hipocampo, en un modelo de depresión en ratón macho, indujo una disminución de la señalización JAK2/STAT5. Esto condujo a un aumento de la expresión tanto de BDNF como de Bcl-2, promoviendo la inhibición de la apoptosis neuronal (Tian et al., 2019).

Estudios adicionales muestran que en un modelo murino de EA, tanto los genes PRL como PRLR están regulados a la baja durante las primeras etapas de la amiloidogénesis en el hipocampo. Esto sugiere que la regulación a la baja de la PRL, así como sus moléculas de señalización intracelular descendentes, en particular STAT5b y el supresor de la señalización de citocinas 1-3 (SOCS 1-3), pueden participar en la fisiopatología de la EA (Pedrós et al., 2015). La ausencia de expresión de pSTAT5 en el hipocampo durante la inducción por PRL de efectos neuroprotectores contra la excitotoxicidad sugiere un mecanismo diferente de acción de PRL en el hipocampo que podría no estar relacionado con la activación de STAT5. Sin embargo, se requiere más investigación para proporcionar pruebas adicionales que permitan descartar o atribuir el papel de esta vía de señalización en la neuroprotección mediada por PRL en el hipocampo.

Además, se ha informado de la fosforilación de las cinasas ERK1/2 después del tratamiento con PRL en las neuronas hipotalámicas PVN (Blume et al., 2009). Sin embargo, hay poca información sobre la señalización de PRL y la activación de la vía ERK1/2 con respecto a la neuroprotección. No obstante, estudios en ratas ovariectomizadas (OVX) a las que se administró PRL durante 7 días antes de la administración de AK, encontraron activación de ERK1/2 en la amígdala, pero no en el hipocampo (Morales et al., 2014). De igual manera, el tratamiento con PRL de neuronas del hipocampo en cultivos celulares primarios induce la fosforilación de la cinasa ERK1/2 (Vergara-Castañeda et al., 2016).

En resumen, todavía es limitado el conocimiento sobre la señalización de PRL durante la neuroprotección en el cerebro, así como la forma en que puede modular las vías de señalización AKT, NF- κ B y JAK2/STAT5 para la neuroprotección en respuesta al

daño. Sin embargo, es importante destacarla como blanco para futuras investigaciones. La comprensión de la activación de la vía de señalización es fundamental para entender mejor las acciones moleculares de la PRL tanto en condiciones patológicas como fisiológicas. En el esquema 2 se resumen las vías de señalización relacionadas con la neuroprotección por PRL, en particular PI3K/AKT, NF- κ B, JAK2/ STAT5 y ERK1/2.



Esquema 2. Vías de señalización de PRL relacionadas con la neuroprotección. Esquema de las posibles vías de señalización reguladas por las isoformas larga y corta del PRLR, implicadas en los efectos neuroprotectores. (A) La isoforma larga de PRLR activa la vía de señalización JAK2/STAT5, los signos de interrogación (?) muestran su posible papel en el efecto neuroprotector, ya que los informes sobre la participación de pSTAT5 no son concluyentes. La línea punteada sugiere la posible activación de la vía de señalización PI3K/AKT debido a la fosforilación de JAK2 y la consiguiente activación de AKT, que puede promover la activación de NF- κ B. (B) La vía de señalización MAPK/ERK1/2 es activada probablemente por las isoformas largas y cortas. (C) La isoforma corta del PRLR promueve la activación de la vía de señalización PI3K/AKT y, posteriormente, de otras moléculas río abajo, como NF- κ B, promoviendo la

expresión de las proteínas de la familia Bcl-2 y SOD1/SOD2. (D) AKT inhibe GSK3 β y FOXO, que participan en el proceso de apoptosis. La función neuroprotectora de la PRL es compleja y requiere la interacción de muchas vías de señalización. (AKT), proteína cinasa B; (Bcl-2), proteína de linfoma de células B 2; (ERK1/2), cinasas reguladas por señales extracelulares; (FOXO), proteína O de la caja de horquillas; (FYN), proteína cinasa tirosina protooncogénica; (GRB2), proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento; (GSK3 β), glucógeno sintasa cinasa 3; (JAK2), Janus cinasa 2; (MAPK), proteína cinasa activada por mitógenos; (NF- κ B), factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa; (PDK-1), cinasa dependiente de fosfoinositidos-1; (PI3K), fosfatidilinositol 3-cinasa; (PIP3), fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato; (PRL), prolactina; (PRLRL) receptor de prolactina largo; (PRLRS), receptor de prolactina en su isoforma corta; (Raf), protooncogen raf serina/treonina-proteína cinasa; (Ras), familia de pequeñas GTPasas; (SHC), proteína SHC-transformadora; SOS, *son of sevenless*; (SOD1), superóxido dismutasa 1 Cu²⁺/Zn²⁺ -SOD; (SOD2), superóxido dismutasa 2 Mn²⁺ -SOD; (SRC1), protooncogen tirosina-proteína cinasa; (STAT5), transductor de señales y activador de la transcripción 5.

Aunque son conocidos varios efectos fisiológicos en los que se involucra de manera directa a la PRL en el sistema nervioso central (SNC) y en el periférico (SNP), el mecanismo de acción molecular y más aún, de regulación de expresión génica, no se tiene del todo claro.

1.10 Neuroprotección mediada por la PRL contra la excitotoxicidad

Las enfermedades neurodegenerativas que incluyen a patologías como la esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington y el Parkinson (Lewerenz and Maher, 2015), aunque tienen particularidades, comparten una característica en común: la excitotoxicidad, que es una condición, caracterizada por una pérdida progresiva de neuronas, como consecuencia de una desregulación en la homeostasis del calcio, y con ello, la pérdida de viabilidad mitocondrial, que finalmente desencadenan en la muerte celular por necrosis o apoptosis (Mehta et al., 2012). De manera interesante, se ha visto que una de las regiones del cerebro más afectadas por estas patologías es el hipocampo (Ycaza Herrera and Mather, 2015).

La excitotoxicidad se define como la muerte neuronal dada por el aumento del flujo de neurotransmisores excitadores como el Glu, , el aspartato (Asp) o el análogo agonista AK, entre otros (Bano and Ankarcróna, 2018). La sobreactivación de los receptores de NMDA, α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) o AK

conducen a una desregulación del calcio intracelular que desencadena la disfunción mitocondrial y la señalización de la muerte neuronal (Sattler and Tymianski, 2001).

Aunque la PRL está involucrada en varias funciones del SNC como: plasticidad neuronal (Lévy et al., 2011), inducción del comportamiento materno, reducción de la ansiedad (Torner, 2016), estimulación de la neurogénesis en el bulbo olfativo (Torner and Neumann, 2002), activación de la glía y remielinización de los oligodendrocitos en condición de daño (Gregg, 2009). Es de resaltar que la PRL se ha asociado recientemente con la neuroprotección contra la excitotoxicidad producida por el Glu (Rivero-Segura et al., 2017; Vergara-Castañeda et al., 2016) o el AK (Vanoye-Carlo et al., 2008).

Las investigaciones desarrolladas en torno a la PRL en términos de neuroprotección, en modelos *in vivo*, se remontan a Vanoye y colaboradores (2008), quienes demostraron que la lactancia es un modelo interesante para estudiar la neuroprotección en el hipocampo.

Por otro lado, en modelos *in vitro*, en cultivos primarios de neuronas del hipocampo se reportó la presencia de PRLR bajo el efecto del tratamiento con PRL, así como la participación del PRLR en la neuroprotección contra el daño excitotóxico producido por el Glu (Vergara-Castañeda et al., 2016). En nuestro grupo se demostró recientemente que la PRL mantenía la viabilidad mitocondrial de las neuronas del hipocampo tratadas con Glu. Se propone que la PRL previene la excitotoxicidad en parte a través de su posible papel antiapoptótico, quizás mediado por la actividad de NF- κ B que ejerce su actividad transcripcional sobre genes antiapoptóticos (Rivero-Segura et al., 2017).

Algunos investigadores han identificado que la administración de PRL aumenta las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-xL, las cuales reducen el índice proapoptótico Bax/Bcl2, que se notificaron en las células Nb2 (Kochendoerfer et al., 2003).

Por último, se ha informado que en modelos de isquemia cerebral, el tratamiento con PRL promueve la expresión de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), lo que sugiere

que la PRL podría tener un efecto en los astrocitos (Anagnostou et al., 2018). Además, en el modelo de lesión isquémica hipóxica por ligadura de la arteria carótida en ratas macho, se observó tanto la expresión a nivel de ARNm y de proteína del PRLR en la microglía 5 días después de la lesión. Se propone que la isquemia hipóxica induce una activación del PRLR y de la PRL en células gliales. Con base en estas evidencias, se propone que la PRL ejercería un rol durante la recuperación de una lesión cerebral. (Mödersheim et al., 2007). Una vez más, se desconocen los mecanismos de acción molecular implicados.

Finalmente, se ha reportado que los genes *Prl* y *Prlr* están regulados a la baja en las etapas tempranas de la amiloidogénesis, en el hipocampo del modelo murino doble transgénico para la depresión por EA: APP^{swe}/PS1^{dE9}, en comparación con ratones silvestres (Pedrós et al., 2015), lo que significa que la ausencia del PRLR debería ser un blanco interesante para entender este tipo de enfermedades.

2. Antecedentes

Los trabajos que se han desarrollado para poder entender el papel que puede desempeñar la prolactina en cuanto a la neuroprotección, se han descrito tanto a nivel *in vitro* como *in vivo*. Vanoye y colaboradores (2008) demostraron que las ratas hembras en lactancia bajo una administración vía IP con AK, presentaban una mayor densidad de neuronas piramidales por tinción de NISSL y un menor número de células positivas al marcador de daño neuronal Fluoro-Jade en las regiones del hipocampo CA1, CA3 y CA4. Este efecto se compartió con ratas hembras en etapa de diestro. Esto significó que la lactancia podía ser un buen modelo de neuroprotección contra eventos de excitotoxicidad.

En estudios posteriores se evaluó, en fase de lactancia en ratas, el daño inducido por AK administrado vía intracerebroventricular (ICV) durante más de 24 horas, lo cual contribuyó a que la administración sistémica de AK modificara su disponibilidad y así se

redujo el daño neuronal. La comparación se hizo con un control de ratas núbiles (Cabrera et al., 2009).

Utilizando a ratas OVX para descartar el efecto neuroprotector de hormonas esteroideas, se evaluó el efecto *per se* de la PRL. Se administró PRL, AK y solución salina. Se informó que las regiones CA1, CA3 y CA4 presentaban un menor daño neuronal con respecto a los controles (Tejadilla et al., 2010). Estos estudios corroboraron que la PRL era responsable de la protección contra un insulto excitotóxico. En la Tabla 1 se muestra un resumen de las investigaciones relacionadas con PRL y neuroprotección ante daño por excitotoxicidad.

En cuanto a modelos *in vitro*, mediante cultivos primarios de neuronas hipocampales se demostró el efecto neuroprotector de la PRL ante un daño excitotóxico producido por Glu. Interesantemente, dicho efecto era dependiente de la expresión del PRLR. (Vergara-Castañeda et al., 2016). Rivero y colaboradores (2017) demostraron que la administración de PRL en neuronas hipocampales promovía la sobrevivencia neuronal, aún en presencia de un daño excitotóxico por el tratamiento con Glu. Se observó que la PRL mantenía la actividad mitocondrial, ello se demostró por un ensayo colorimétrico, en el cual, ocurre una reducción de la sal de tetrazolio (Bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol o MTT) a cristales de formazán, proceso que realizan las células metabólicamente activas, a través, de la enzima succinato-deshidrogenasa.

Además del mantenimiento de la actividad mitocondrial, el tratamiento con PRL en las neuronas hipocampales reguló a la baja el índice proapoptótico Bax/Bcl-2, de manera similar, la actividad de la proteína caspasa-3 asociada con el fenómeno de apoptosis se redujo por efecto de PRL, lo cual sugiere su participación en la regulación de la apoptosis (Rivero-Segura et al., 2017).

El estudio anterior propuso que la PRL previene la excitotoxicidad, fenómeno que causa muerte neuronal y que se da por una estimulación sostenida de los canales NMDA, AMPA y AK, que se traduce en una sobrecarga de calcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$, mismo que desencadena disfunción mitocondrial y apoptosis. La PRL a través del mantenimiento de

la homeostasis del calcio y de su posible papel antiapoptótico, quizá mediado por la actividad de NF- κ B que ejerce su actividad transcripcional sobre genes antiapoptóticos en neuronas, mediaría la neuroprotección contra excitotoxicidad en neuronas del hipocampo (Rivero-Segura et al., 2017). En el esquema 2 se propone un modelo de cómo la PRL media la neuroprotección.

Finalmente, un estudio llevado a cabo por nuestro grupo de trabajo reveló que la PRL aumenta la actividad y el contenido proteínico de las enzimas SOD1 y SOD 2 en las neuronas del hipocampo en presencia de Glu y también disminuye significativamente los productos de peroxidación de lípidos (LPO), lo que se asociaría a un efecto antioxidante de esta hormona contra el daño excitotóxico (Rivero-Segura et al., 2019).

	Tratamiento	Efecto en el hipocampo	Referencia
<i>In vivo</i>	Ratas lactantes tratadas con AK (7.5 mg/kg por 24 h) vía IP vs ratas núbiles en diestro tratadas con AK (7.5 mg/kg por 24 h) vía IP	Las zonas CA1, CA2 y CA4 del hipocampo, se protegen del daño neuronal causado por la administración de AK, a través de la disminución de células dañadas vistas con Fluoro-Jade.	Vanoye-Carlo et al., 2008
	Ratas lactantes tratadas con AK vía ICV, (100 ng por 24 ó 72 h) vs ratas núbiles tratadas con solución salina.	Regiones CA1, CA2 y CA4 presentaron disminución del daño neuronal causado por AK.	Cabrera et al., 2009
	Ratas OVX tratadas con PRL vía IP (100 μ g)+ AK (7.5 mg/kg por 24 h) vs Ratas OVX+ AK (7.5mg/kg por 24h).	Protección en neuronas piramidales de las regiones CA1, CA3 y CA4 del hipocampo.	Tejadilla et al., 2010
	Dosis diaria por 14 días de PRL (100 μ g/kg) a ratas OVX y una dosis única de AK (7.5mg/kg) vs ratas OVX tratadas con solución salina.	PRL administrada antes del daño por AK, protege a las neuronas del hipocampo, incrementando la expresión del receptor de PRL y VGLUT1	Ortiz-Pérez et al., 2019

	Ratones CD-1 machos adultos tratados con AK, posteriormente, se dividió en grupos: control, sin manipulación y el grupo con PRL (8 µg de PRL/100 µl).	El tratamiento crónico con PRL en ratones machos, antes de la exposición al daño excitotóxico inducido por la administración de AK, promovió un efecto protector en el subcampo hipocampal CA3, disminuyendo los marcadores de daño neuronal	Anagnostou et al., 2021
	Ratas hembras OVX tratadas con PRL vía IP (100 µg) por 3 h, 6 h y 24 h vs solución salina.	El análisis transcriptómico mostró 162 genes expresados diferencialmente en respuesta al tratamiento con PRL. Los genes encontrados se relacionaron con procesos cerebrales regulados por el hipocampo: aprendizaje, la memoria, conducta, diferenciación glial, axogénesis, sinápsis y la migración neuronal y glial.	Cabrera-Reyes et al., 2019
	Cultivos primarios de neuronas hipocampales tratadas con PRL (10 ng/ml por 72 h) + Glu (100 µg por 24h) vs Controles.	La PRL reduce la muerte de las neuronas por excitotoxicidad, el PRLR es necesario para la neuroprotección	Vergara-Castañeda et al., 2016
<i>In vitro</i>	Cultivos primarios de neuronas hipocampales tratadas con PRL (10 ng/ml por 72 h) + Glu (100 µg por 24h) vs Controles.	Disminución de la muerte celular, por atenuación del índice proapoptótico y también reducción del flujo de la $[Ca^{2+}]_i$, junto con la expresión de NF-κB.	Rivero-Segura et al., 2017
	Cultivos primarios de neuronas hipocampales tratadas con PRL (10 ng/ml por 72 h), Glu (100 µg por 24 h) y la combinación de PRL+Glu, con sus respectivos controles.	La actividad y el contenido proteínico de Mn ²⁺ -SOD y Cu ²⁺ /Zn ²⁺ -SOD en neuronas expuestas a excitotoxicidad inducida por glutamato se aumenta. La PRL previene la disfunción mitocondrial inducida por el glutamato.	Rivero-Segura et al., 2019

Tabla1. Resumen del papel de la PRL como agente neuroprotector ante excitotoxicidad.

3. Relevancia e impacto del proyecto

Si bien se ha encontrado que la PRL influye en el control de daño neuronal por excitotoxicidad, inducido por el aumento en la concentración de Glu y AK, aún no se conoce de manera precisa cuál es el mecanismo molecular de las vías de señalización asociadas que expliquen el funcionamiento neuroprotector de esta hormona en el hipocampo. Aún son pocos los estudios actuales enfocados en responder estas preguntas, por lo cual, es un campo de conocimiento y de trabajo con mucho por explorar y elucidar.

Además, la investigación sobre las vías de señalización que son activadas por PRL en neuronas del hipocampo en respuesta a un daño excitotóxico, es necesaria para tener un mejor entendimiento sobre el efecto neuroprotector de la PRL y en última instancia, dilucidar su potencial uso como blanco en terapias que ayuden a la mejora de trastornos fisiopatológicos relacionados con el sistema nervioso.

Pregunta

¿La vía de señalización PI3K/AKT será inducida por efecto de prolactina y participará en la neuroprotección contra daño excitotóxico en neuronas del hipocampo de rata?

4. Hipótesis

La PRL ejercerá un efecto neuroprotector en respuesta al daño generado por excitotoxicidad en neuronas hipocampales de rata, mediante la activación de la vía PI3K/AKT relacionada con sobrevivencia celular, a través de sus proteínas blanco: PI3K, AKT, NF- κ B y GSK3 β promoviendo la expresión de genes de sobrevivencia como *Bcl-2* y *Nrf2*.

5. Objetivos

General

Estudiar si la señalización celular inducida por PRL sobre la vía PI3K/AKT, que participa en la neuroprotección sobre neuronas hipocampales de rata sometidas a daño excitotóxico por glutamato, y si su participación involucra la activación de genes asociados a sobrevivencia como lo son *Bcl-2* y *Nrf2*.

Particulares

- ✓ Caracterizar el efecto de PRL sobre la activación de la vía de señalización PI3K/AKT en neuronas hipocampales de rata.
- ✓ Establecer la participación de la vía PI3K/AKT en la neuroprotección inducida por PRL.
- ✓ Evaluar la expresión de proteínas blanco que participan en la señalización de la vía PI3K/AKT: PI3K, AKT, NF- κ B y GSK3 β .
- ✓ Evaluar la expresión de genes río abajo de PI3K/AKT que estén relacionados con sobrevivencia (*Bcl-2* y *Nrf2*) en el modelo de protección mediado por PRL.

6. Métodos

Para cumplir con los objetivos antes planteados, se llevó a cabo el siguiente protocolo experimental.

6.1 Animales

En este estudio se utilizaron 40 ratas Wistar preñadas con 17-18 días de gestación. Las ratas fueron alojadas individualmente, bajo condiciones de temperatura (20-25 °C) y fotoperiodo (ciclo luz: oscuridad de 12:12 h, luces encendidas a las 06:00 h) controlados, con comida y agua disponibles ad libitum con Rat Chow TM. De estas ratas preñadas se obtuvieron fetos (10-12), cuyos hipocampos fueron disecados para la preparación de cultivos neuronales primarios como se describe en detalle más adelante. Todos los experimentos se realizaron en estricto cumplimiento de las normas internacionales establecidas por la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio

de los Institutos Nacionales de Salud (NIH publicación N0. 80-23, revisada en 1996). Este protocolo fue aprobado por el Comité de Cuidado Animal (CICUAL) de la Facultad de Química, de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se hicieron todos los esfuerzos para minimizar el sufrimiento de los animales.

6.2 Cultivos de neuronas primarias del hipocampo

Los cultivos neuronales primarios de hipocampo se prepararon a partir de fetos de rata Wistar de 17-18 días de gestación, como se describió previamente por de la Cadena et al., 2014. En resumen, tras el sacrificio de la rata gestante, se diseccionaron los cerebros de los fetos bajo microscopía estereoscópica. Se obtuvieron 10-12 hipocampos y se homogeneizaron mecánicamente. El tejido del hipocampo se incubó en una solución de tripsina al 0.10% (25200056, Gibco Life Technologies, Grand Island, EE.UU.), y DNAsa (Sigma-Aldrich, D5025) (0.08%) para la disgregación del tejido. La reacción se detuvo añadiendo un inhibidor de tripsina (A4736401, Gibco Life Technologies, Grand Island, EE.UU.). Por último, las células se suspendieron en medio Neurobasal (21103049, Gibco), suplementado con 0.2% de B-27 (17504044, Gibco) con antioxidantes, 20 µg/mL de gentamicina (15710064, Gibco) y 0.5 mM de L-Glutamina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.). Las células se cultivaron y se sembraron a una densidad de 2.1×10^6 células/pocillo en placas de 6 pocillos para el aislamiento de proteínas, 8×10^5 células/pocillo en placas de 12 pocillos para inmunofluorescencia, y 2×10^5 células/pocillo en placas de 24 pocillos para ensayos de MTT. Las placas se trataron e incubaron con poli-L-Lys a 5 µg/mL (P1339 Sigma-Aldrich). Los cultivos se incubaron a 37 °C en una atmósfera humidificada, 5% CO₂ / 95% aire. A los 4 días *in vitro* (DIV), se añadieron 500 µL de medio Neurobasal fresco, y las células se cultivaron durante 4 días más (8 DIV), tras lo cual se utilizaron para los experimentos. Las células se trataron con arabinósido de citosina (AraC) (0.75 µM) (P1768 Sigma-Aldrich) para inhibir la proliferación de células gliales. En todos los experimentos realizados se utilizaron cultivos primarios de células neuronales obtenidas por este método.

6.3 Tratamientos en cultivos celulares primarios de neuronas

A los 8 DIV, las células se trataron con PRL (20 ng/mL) de hipófisis ovina (L6520-1000IU, Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.) solubilizada en solución salina estéril o bien con el vehículo (medio neurobasal). Los tratamientos con PRL en experimentos curso temporal se realizaron durante 5, 15, 30 min, 1h, 3h, 6h y 24 h. Los cultivos se trataron o no con PRL durante 1 ó 3 h y, a continuación, se expusieron a Glu (50 μ M) durante 1 h. Además, a otros cultivos se les administró el inhibidor de PI3K: LY294002 (50 μ M durante 1h). El inhibidor se añadió solo o en combinación con Glu y/o PRL. Tras los tratamientos, se retiró el medio que contenía PRL y/o Glu y/o el inhibidor LY294002, y se añadió un nuevo medio neurobasal. Después de un periodo de 24h, con medio neurobasal fresco, se evaluó el daño celular con el ensayo de reducción de MTT (Hernández-Fonseca et al., 2008). Los grupos experimentales con cultivos neuronales primarios de hipocampo para este estudio fueron: Vehículo (Ctrl), prolactina (PRL), glutamato (Glu), la combinación de pretratamiento con PRL y posterior administración de Glu (PRL+Glu) o el inhibidor de la vía PI3K/AKT (LY294002), y la combinación de los tres (LY294002+PRL+Glu). Estos tratamientos se realizaron en los tiempos y concentraciones anteriormente mencionados. Posteriormente, las neuronas del hipocampo cultivadas se utilizaron para el análisis de la viabilidad celular por el método de MTT, así como para evaluar la expresión de proteínas de interés a través de western blot e inmunofluorescencia y finalmente para la obtención del ARNm, el cual se utilizó para determinar la expresión de los genes por RT-qPCR.

6.4 Viabilidad celular

La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) (M2128-1G, Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.). Las mitocondrias funcionales metabolizan activamente el MTT a su forma reducida produciendo formazán, que puede detectarse mediante un ensayo colorimétrico (Hernández-Fonseca et al., 2008). En resumen, las neuronas se sembraron a una densidad de 2×10^5 células/pocillo en placas de 24 pocillos. La viabilidad de las células neuronales se evaluó según el ensayo MTT descrito anteriormente por Hernández-

Fonseca et al., 2008. Una vez retirado el medio contenido en cada uno de los tratamientos, los cultivos se colocaron en un medio neurobasal fresco durante un periodo de 24h. Se le administró reactivo MTT (2.5 mg/ml) directamente a cada pocillo y se incubó durante 1 h a 37 °C en una atmósfera humidificada de 5% CO₂ / 95% aire. A continuación, se aspiró el medio y la sal de formazán precipitada se solubilizó en 500 µL de isopropanol ácido. La absorbancia de la sal de formazán se leyó a 570 nm en un lector de placas (EPOC, BioTek, Wisconsin, EE.UU.).

6.5 Inmunofluorescencia

Las neuronas se cultivaron en cubreobjetos de vidrio redondos en placas de 12 pocillos. Inmediatamente después de los tratamientos, se lavaron con PBS 1X y se fijaron con PFA (4%) durante 30 min. Luego, las neuronas se permeabilizaron con Triton X-100 al 0.05 % en PBS durante 20 min a temperatura ambiente y se incubaron con solución de bloqueo (albúmina sérica bovina al 10%, Triton X-100 al 1% y Tween 20 al 0.05% en PBS) durante 1h. A continuación, las células se incubaron con los anticuerpos primarios dirigidos contra los siguientes marcadores anti-NeuN (1:250, Ab104225, Abcam, EE. UU.); pAKT (ser476) (1:250; Cell Signaling Technology, S473); PRLR (1:250; Santa Cruz Biotechnology SC-74529); GFAP (1:200; Santa Cruz Biotechnology SC) y p65 (NF-kB) (1:200; Santa Cruz Biotechnology SC-5563), durante toda la noche a 4 °C. Las células se lavaron y se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes: anti-IgG de conejo conjugado con Alexa fluor 568 (1:500, Invitrogen, A10040) o bien anti-IgG de ratón conjugado con Alexa fluor 488 (1:500 Invitrogen, C10425) durante 1h. Después del lavado, los núcleos se tiñeron durante 5 min en una solución de 1 µL/mL de 6-diamidino-2-fenilindol-diclorhidrato (DAPI) (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Alemania). Se montaron los cubreobjetos de vidrio con neuronas hipocampales en portaobjetos de vidrio con medio de montaje (DAKO, Santa Clara, CA, EE. UU.). Se analizaron las laminillas con un microscopio confocal LSM 710- Zeiss, utilizando un objetivo de inmersión de 60X y las imágenes fluorescentes se procesaron con el software Fiji ImageJ.

6.6 Western blot

Después de los diferentes tratamientos aplicados, en el día 9 de incubación, las células cultivadas en placas de 6 pocillos se lavaron con PBS 1X y se lisaron en amortiguador de lisis RIPA (PBS 1X pH 7.2, NP40 al 1 %, SDS al 0.1 % y desoxicolato de sodio al 0.05 %, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) suplementado con 5 mM de un cóctel con inhibidores de proteasas y fosfatasas (mini-Complete, Roche, Mannheim, Alemania). La concentración de proteína en los extractos se determinó por el método de Lowry (ensayo de proteína DC, BioRad, CA, EE. UU.). Posteriormente, se resuspendieron 40 µg de proteína, en amortiguador de carga (5 % de β-mercaptoetanol, 0.1% de glicerol y 0.01% de azul de bromofenol) (BioRad, EE. UU.) y se cargaron en geles de SDS-poliacrilamida al 10 % o al 15 % (BioRad, EE. UU.). La separación de proteínas se realizó en condiciones desnaturalizantes, a un voltaje de 60mV por 1h, una vez alineadas las proteínas en el gel, se utilizó un voltaje constante de 80 mV durante 3h. Luego, las proteínas separadas en los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (88018 Thermo Scientific, Alemania) aplicando una corriente constante de 90 mV durante una hora y media. Las membranas se bloquearon con una solución de leche descremada en polvo al 5% y Tween-20 al 1% en amortiguador TBS 1X, durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se incubaron durante la noche a 4 °C en solución de bloqueo que contenía los correspondientes anticuerpos policlonales primarios: anti-pAKT (1:500; Cell Signaling Technology); anti-AKT (1:500; Santa Cruz Biotechnology SC-81434); anti-GAPDH (1:1000; Santa Cruz Biotechnology SC-25778) y anti-β-actina (1:1000; Santa Cruz Biotechnology SC -47778). Las membranas se lavaron y se incubaron con los respectivos anticuerpos secundarios conjugados con fluorescencia, durante 1h: anti-IgG de conejo (1:15000 LI-COR 925-68073) y anti-IgG de ratón (1:15000 LI-COR925-32210). Las bandas inmunorreactivas se detectaron con un sistema de imágenes Odyssey (LI-COR, Biosciences). El análisis densitométrico se realizó con el programa Image Studio™ Lite (Ver. 5.2, LI-COR Biosciences). El contenido de proteínas se normalizó utilizando a β-actina o GAPDH como marcadores de referencia. Los valores de control se normalizaron al 100% y la densidad de las bandas se expresó como porcentaje de los valores de control.

6.7 Extracción de ARN

El ARN se extrajo de cultivos primarios de neuronas del hipocampo utilizando el reactivo TRIZOL (ABP Biosciences; #FP313, Virginia, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El sedimento de ARN resultante se eluyó en 30 μ L de agua libre de ARNasa. La calidad y el rendimiento del ARN aislado se determinaron mediante Qubit RNA (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). El ARN se cuantificó en un NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, EE. UU.). Para la síntesis de ADNc, 1 μ g de ARN se transcribió inversamente utilizando el estuche de síntesis de ADNc First Strand de Revert Aid (Thermo Scientific, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, utilizando cebadores oligo(dT).

6.8 RT-qPCR

Los genes sometidos a análisis fueron *Bcl-2* y *Nrf2*. La RT-qPCR se realizó con TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) en las siguientes condiciones: 95 °C durante 20 s seguido de 40 ciclos de 95 °C durante 1 s y 60 °C durante 20 s. La RT-qPCR se realizó con un sistema de PCR en tiempo real StepOne Plus (Applied Biosystems, EE. UU.). Todos los resultados se normalizaron al control *Hprt* para el análisis. Se utilizó el software de detección de secuencias CFX maestro (Bio-Rad) para el análisis de datos. Se utilizó el método CT comparativo ($2^{-\Delta\Delta CT}$) para calcular los cambios relativos en la expresión del gen blanco. El promedio y la desviación estándar de $2^{-\Delta\Delta CT}$ se calcularon por triplicado para los tres experimentos independientes. Applied Biosystems suministró las sondas para todos los genes. Todas las sondas se adquirieron en Applied Biosystems (Ver la Tabla 1 suplementaria para conocer las secuencias de las sondas TaqMan usadas como primers).

6.9 Análisis estadístico

Todos los datos se analizaron con el software Graphpad Prism® (RRID: SCR_002798). Las barras representan la media \pm de la desviación estándar (DE) de 4

experimentos independientes. Los datos se analizaron mediante ANOVA seguido de la prueba *post hoc* de Dunnett. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ para comparar el efecto entre control y grupos y # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ para determinar las diferencias entre grupos frente a PRL. Para comparar el daño de PRL+Glu vs Glu, los datos significativos fueron † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$, ††† $p < 0.001$; y para determinar las diferencias intergrupales vs PRL+Glu se utilizó + $p < 0.05$; ++ $p < 0.01$; +++ $p < 0.001$.

7. Resultados

7.1 Expresión de PRLR en cultivos primarios de neuronas del hipocampo.

En primer lugar, para determinar la expresión de PRLR y verificar la calidad de nuestros cultivos primarios de células neuronales del hipocampo, realizamos ensayos de inmunofluorescencia para detectar la colocalización entre PRLR y el marcador neuronal, NeuN, bajo diferentes tratamientos. Los tratamientos utilizados a lo largo de este estudio fueron vehículo (Ctrl), PRL, Glu para inducir daño neuronal, y la combinación PRL+Glu para mostrar el efecto del pretratamiento con PRL en el rescate de los cultivos neuronales de la excitotoxicidad por Glu. Como se muestra en la figura 1, tanto el vehículo (Fig 1 a-d) como los tratamientos con PRL a una concentración de 20 ng/ml durante 3 h (Fig 1 e-h), muestran una mayor intensidad de marca para el PRLR en comparación con las células tratadas con Glu (50 μ M durante 1h) (Fig 1 i-l). Además, las puntas de flecha indican tanto la localización citoplasmática como nuclear. El tratamiento con Glu por sí solo causó una reducción de la marca de PRLR y promovió un patrón de localización de PRLR diferente, siendo más citoplasmático que nuclear. Sin embargo, la localización de PRLR permaneció homogénea cuando las células fueron tratadas con PRL previamente a la adición de Glu (PRL+Glu) (Fig 1, m-p). Para determinar el papel de la vía de señalización PI3K/AKT, se realizaron tratamientos con el inhibidor de PI3K, LY294002, en presencia y ausencia de PRL+Glu. El inhibidor por sí solo redujo la intensidad del marcaje del PRLR. Los tratamientos con LY294002+PRL+Glu (Figura 1, q-t) también mostraron una localización homogénea de PRLR.

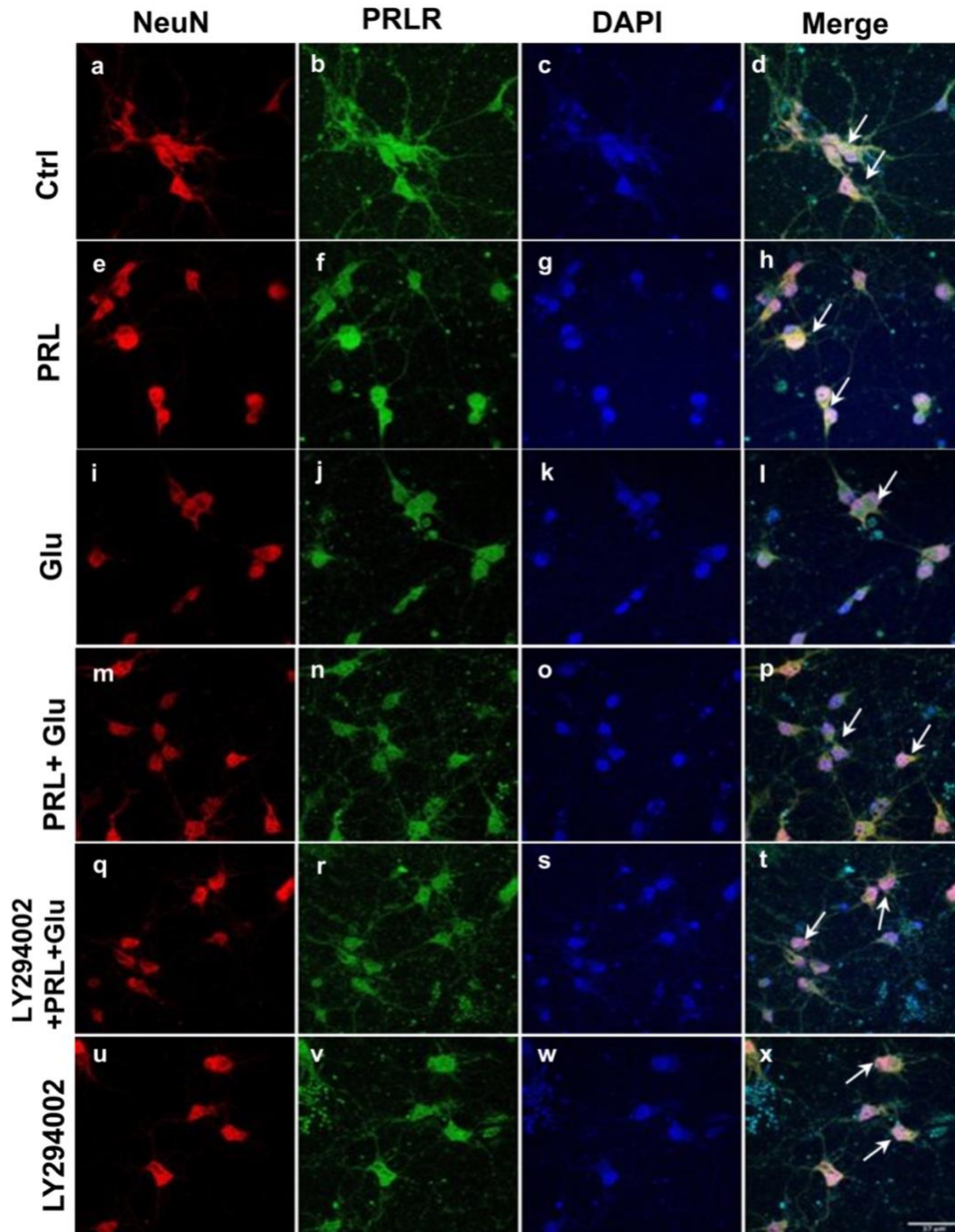


Fig 1. Expresión de PRLR en cultivos de neuronas del hipocampo. Fotomicrografías representativas de neuronas del hipocampo inmunoteñidas con anticuerpos para observar la expresión del PRLR y de NeuN. Ctrl (a-d), PRL (e-h), Glu (i-l), PRL+Glu (m-p), LY294002+PRL+Glu (u-x). En rojo, se muestra la proteína NeuN para la visualización de las neuronas; en verde se muestra el marcaje de la proteína PRLR, véanse las flechas blancas; los núcleos, en azul, se tiñeron con DAPI. Barra de escala 37 μ m. Los cultivos neuronales se expusieron a PRL (20 ng/ml durante 3 h), Glu (50 μ M durante 1 h) y LY294002 (50 μ M durante 1 h) o se trataron con combinaciones: PRL+Glu y LY294002+PRL+Glu, como se ha descrito previamente.

7.2 Los tratamientos con PRL e inhibidores de la vía PI3/AKT no modifican la viabilidad de las células del hipocampo.

Una vez observado que las neuronas del cultivo primario de hipocampo mostraban expresión de la proteína PRLR, procedimos a estudiar la vía PI3K/AKT como posible vía de señalización reguladora de PRL. Se realizaron ensayos MTT para determinar si la inhibición de la vía PI3K/AKT podía alterar la viabilidad de los cultivos neuronales primarios de hipocampo. Este ensayo determina la actividad mitocondrial como una medida indirecta de la supervivencia neuronal a los tratamientos en experimentos curso temporal (Fig 2). Observamos que la exposición a PRL a una concentración de 20 ng/ml desde los 5 min hasta las 24 h de tratamiento no afecta a la supervivencia de las neuronas del hipocampo (Fig 2A). Además, la administración de concentraciones crecientes del inhibidor de PI3K, LY294002 (5-50 μ M), no afectó a la viabilidad celular, como se observa en la Figura 2B. Por lo tanto, determinamos que se podría utilizar una concentración de 50 μ M de LY294002 para los siguientes ensayos.

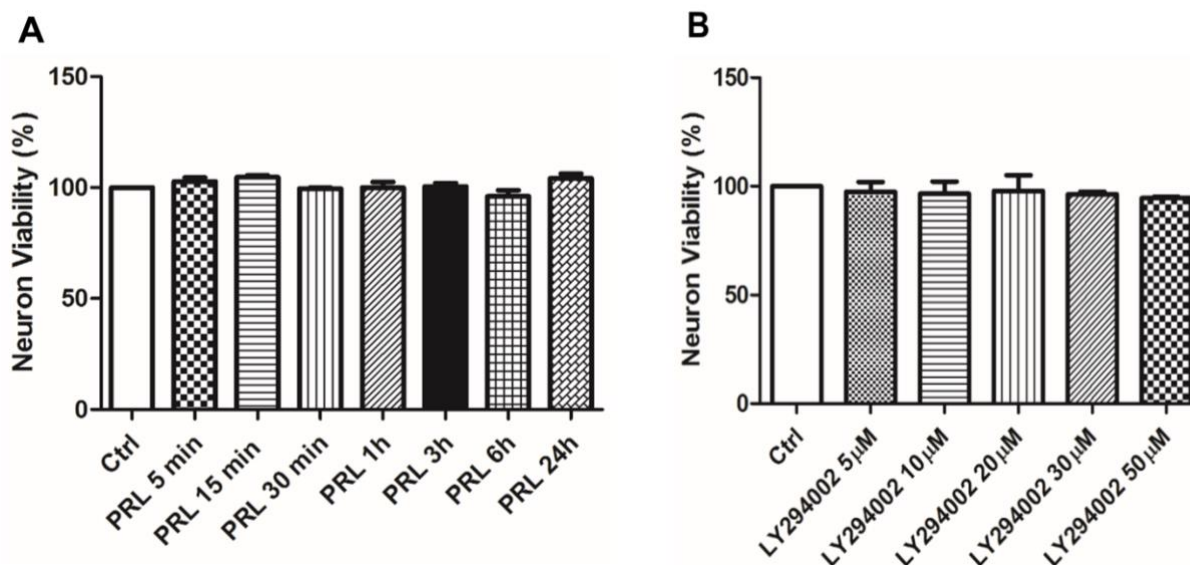


Fig 2. Efecto de los tratamientos con PRL y LY294002 sobre la viabilidad de las neuronas del hipocampo en experimentos de curso temporal y concentraciones. Se realizaron ensayos de viabilidad en cultivos neuronales primarios de hipocampo expuestos a diferentes tratamientos: A) El curso temporal del tratamiento con PRL (20 ng/ml) no afecta a la viabilidad neuronal en diferentes tiempos hasta 24 h (5 min a 24 h). B) La administración de concentraciones crecientes (5-50 μ M durante 1 h) del inhibidor de PI3K: LY294002, no afecta a la viabilidad celular, determinada mediante el ensayo de reducción de MTT (véase la sección de materiales y métodos). El control indica células no tratadas. Los datos se expresan como media \pm DE, n=6 experimentos independientes por triplicado. Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba *post hoc* de Dunnett.

7.3 La neuroprotección inducida por PRL contra el daño excitotóxico provocado por Glu en cultivos de neuronas hipocampales se ve anulada por la inhibición de la vía PI3K/AKT.

Inicialmente, se realizaron una serie de experimentos para determinar la capacidad de diferentes concentraciones de Glu para inducir daño neuronal (Figura 3A), mediante la evaluación de la viabilidad neuronal. Observamos que el tratamiento por 1 h con 30 μM ó 50 μM de Glu reduce la viabilidad celular en un 20% y un 30%, respectivamente, en comparación con el control. A continuación, realizamos ensayos de viabilidad celular para evaluar la neuroprotección inducida al añadir PRL (20 ng/ml durante 1 h y 3 h) previo al daño excitotóxico causado por Glu (50 μM durante 1 h), en cultivos primarios de neuronas del hipocampo. Nuestro objetivo era producir un daño neuronal moderado en las neuronas del hipocampo y determinar el efecto de protección de la prolactina a través de la prevención del daño citotóxico, así como los mecanismos de señalización implicados, por lo que elegimos la concentración de 50 μM de Glu porque reducía la viabilidad neuronal en más de un 30%. El pretratamiento con PRL durante 1 h y 3 h protegió casi completamente a las células del daño inducido por Glu (PRL+Glu, Fig 3B, C). Como se demostró anteriormente, la administración de LY294002 (50 μM) solo, no afectó a la supervivencia celular; sin embargo, la protección de PRL contra la excitotoxicidad de Glu fue abrogada en presencia de LY294002 (LY294002+PRL+Glu) (Fig 3B). Se observó una inhibición similar de la neuroprotección inducida por PRL incluso con 3 horas de tratamiento con PRL antes de añadir LY294002 y Glu, mostrando una reducción de la supervivencia celular del 30% (Fig 3C).

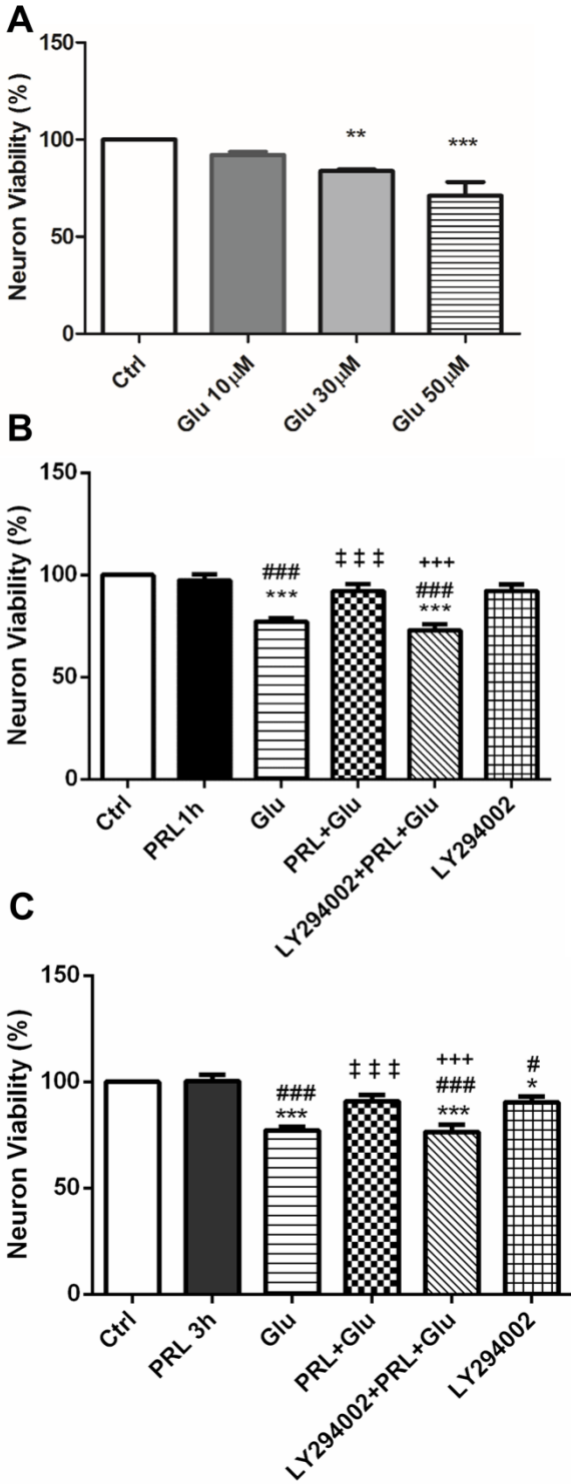


Fig. 3. El efecto protector de la PRL contra la excitotoxicidad inducida por Glu está mediado por la vía de señalización PI3K/AKT. La viabilidad de las células neuronales del hipocampo se midió por ensayos MTT (ver materiales y métodos). A) El tratamiento con Glu (1 h) disminuye la viabilidad celular de forma dependiente de la dosis (10-50 μ M). Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba *post hoc* de Dunnett ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$ frente al control (Ctrl). B) Los cultivos neuronales se trataron con PRL (20 ng/ml durante 1 h), Glu (50 μ M durante 1 h) y LY294002 (50 μ M durante 1 h) solos o en combinación con PRL y Glu. El tratamiento con PRL durante 1 h rescató el daño inducido por Glu (PRL+Glu). La combinación de PRL+Glu con LY294002 (50 μ M) anula el efecto protector de PRL. C) El tratamiento con PRL durante 3 horas también protege frente a la lesión por Glu (PRL+Glu), y este efecto se suprime en presencia del inhibidor de la vía PI3K/AKT. Los datos se expresan como la media \pm DE, $n=6$ experimentos independientes por triplicado. Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba *post hoc* de Dunnett. * $p < 0.05$ y *** $p < 0.001$ vs Ctrl; # $p < 0.05$ y ### $p < 0.001$ vs PRL; ††† $p < 0.001$ vs Glu; +++ $p < 0.001$ vs PRL+Glu.

7.4 Activación de la vía PI3K/AKT por el tratamiento con PRL durante la neuroprotección contra el daño excitotóxico inducido por Glu en neuronas cultivadas de hipocampo de rata.

Una vez observado que la inhibición de la vía PI3K/AKT reducía la neuroprotección ejercida por PRL, procedimos a analizar la activación de los efectores de esta vía de señalización. Encontramos que en presencia de PRL, sola o en combinación con Glu y/o LY294002, se producía la fosforilación de AKT (Fig 4A). Además, el tratamiento con Glu o con el inhibidor LY294002 individualmente, redujo la fosforilación de AKT. En cambio, el tratamiento triple (LY294002+PRL+Glu) restauró la fosforilación de AKT a niveles similares a los de control, lo que sugiere que la PRL es capaz de activar la fosforilación de AKT, a pesar de la presencia del inhibidor (Fig 4A). Un patrón similar de activación se observó para la fosforilación de su efector, PI3K en presencia de PRL, mostrando la fosforilación de PI3K en los residuos Tyr 458 y Tyr 199. De manera similar a lo observado en la combinación de PRL+Glu y también en el triple tratamiento (LY294002+PRL+Glu), ya que fueron capaces de activar la fosforilación de AKT, a pesar de la presencia del inhibidor (Fig. 4A). Por el contrario, los tratamientos con Glu y LY294002 solos, desencadenan una reducción de la fosforilación de PI3K en comparación con la administración de PRL y el control. Entonces, el tratamiento con PRL puede restaurar la fosforilación de PI3K incluso en presencia del inhibidor de la vía (Fig 4B). Las neuronas cerebelosas K5+ y K5- se utilizaron como controles positivos y negativos, respectivamente, para la fosforilación de las proteínas AKT y PI3K.

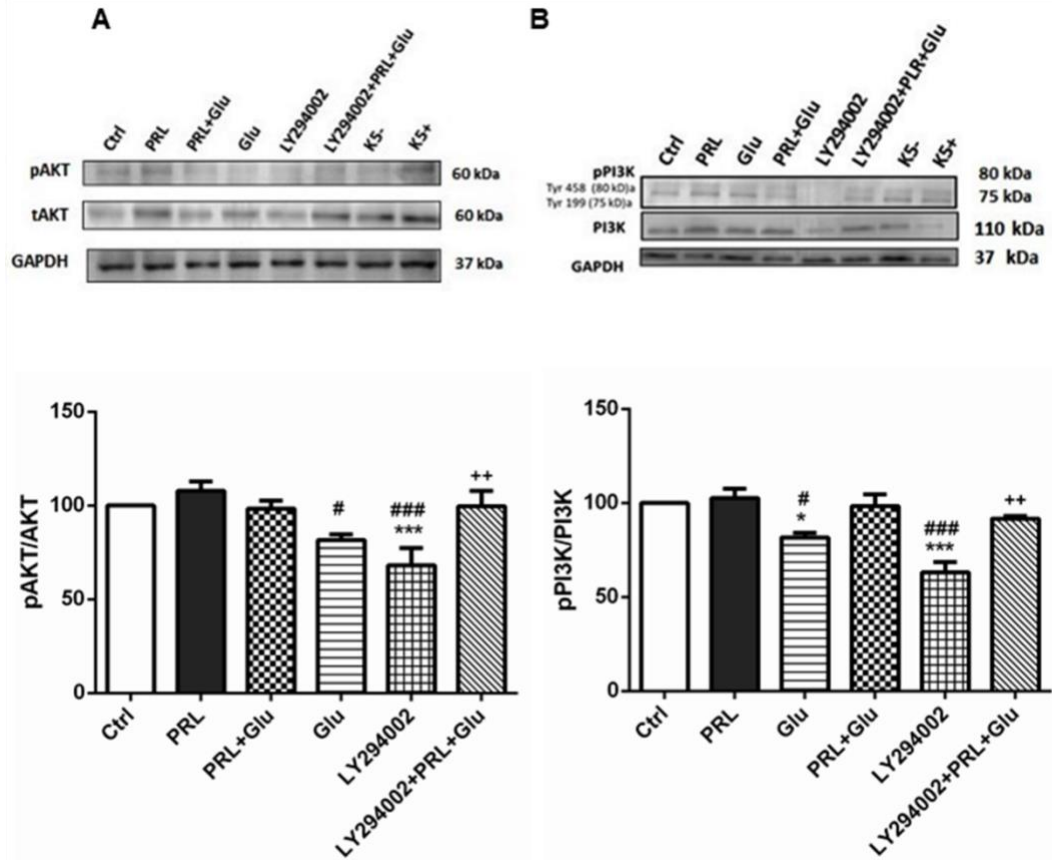


Fig 4. El tratamiento con PRL induce la fosforilación de PI3K/AKT, promoviendo la neuroprotección contra el daño excitotóxico en cultivos primarios de neuronas del hipocampo. La activación de las proteínas PI3K y AKT se evaluó mediante western blot. Los cultivos fueron tratados con PRL (20 ng/ml durante 3 h), Glu (50 μ M durante 1 h) y LY294002 (50 μ M durante 1 h) o pretratados con PRL antes de añadir Glu, o Glu+LY294002. Los resultados de los análisis de western blot y densitometría se expresan como la proporción relativa de proteína fosforilada/proteína total. El control indica las células no tratadas, mientras que las células neuronales cerebelosas K5- y K5+ se utilizan como controles de fosforilación positivo y negativo, respectivamente. A) Western blot muestra que AKT es fosforilada por el tratamiento con PRL sola y en combinación (PRL+Glu y LY294002+PRL+Glu). Sin embargo, en ausencia de PRL, los tratamientos con LY294002 o Glu individuales inhiben la fosforilación de AKT. Además, en el tratamiento PRL+Glu con inhibidor (LY294002+PRL+Glu), la fosforilación de AKT se restablece en comparación con el tratamiento con el inhibidor solo. B) La administración de LY294002 (50 μ M) deroga la activación de la proteína PI3K en sus formas fosforiladas (Tyr 458, Tyr 199), sin embargo, en combinación con PRL (LY294002+PRL+Glu) la fosforilación de PI3K se observa a niveles similares a los del control y PRL sola. Los datos se expresan como la media \pm DE, n=4 experimentos independientes por triplicado. Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba *post hoc* de Dunnett. * $p \leq 0.05$ y *** $p \leq 0.001$ vs Ctrl; # $p \leq 0.05$ y ### $p \leq 0.001$ vs PRL; ++ $p \leq 0.01$ vs LY294002.

7.5 La administración de PRL en cultivos primarios de neuronas del hipocampo promueve la localización nuclear de pAKT.

Para explorar el efecto del tratamiento con PRL sobre la expresión de pAKT en neuronas del hipocampo y su co-expresión con PRLR, estudiamos su expresión y localización celular bajo diferentes tratamientos. En primer lugar, observamos una localización nuclear específica de pAKT tras la administración de PRL en todas las combinaciones: PRL (Fig 5 e-h), PRL+Glu (Fig 5 m-p) y en LY294002+PRL+Glu (Fig 5 u-x) (flecha blanca fina). Mientras que en las células no tratadas (vehículo) (Fig 5 a-d), también se observó pAKT en el citoplasma y pocas neuronas presentaron pAKT en el núcleo; similar a lo observado con Glu solo (Fig 5 m-p). El tratamiento con el inhibidor LY294002 solo, redujo la expresión de pAKT en las neuronas, como era de esperar. PRLR mostró un patrón de expresión y localización homogéneo bajo todas las combinaciones que contenían PRL [PRL (Fig 5 e-h), PRL+Glu (Fig 5 m-p) y LY294002+PRL+Glu (Fig 5 u-x), así como en el control. Por el contrario, observamos que tras el tratamiento con Glu, el marcaje de PRLR se localizaba claramente en el citoplasma y se acumulaba allí, de forma similar a lo que se vió con la administración de LY294002 solo (Fig 5 j y v).

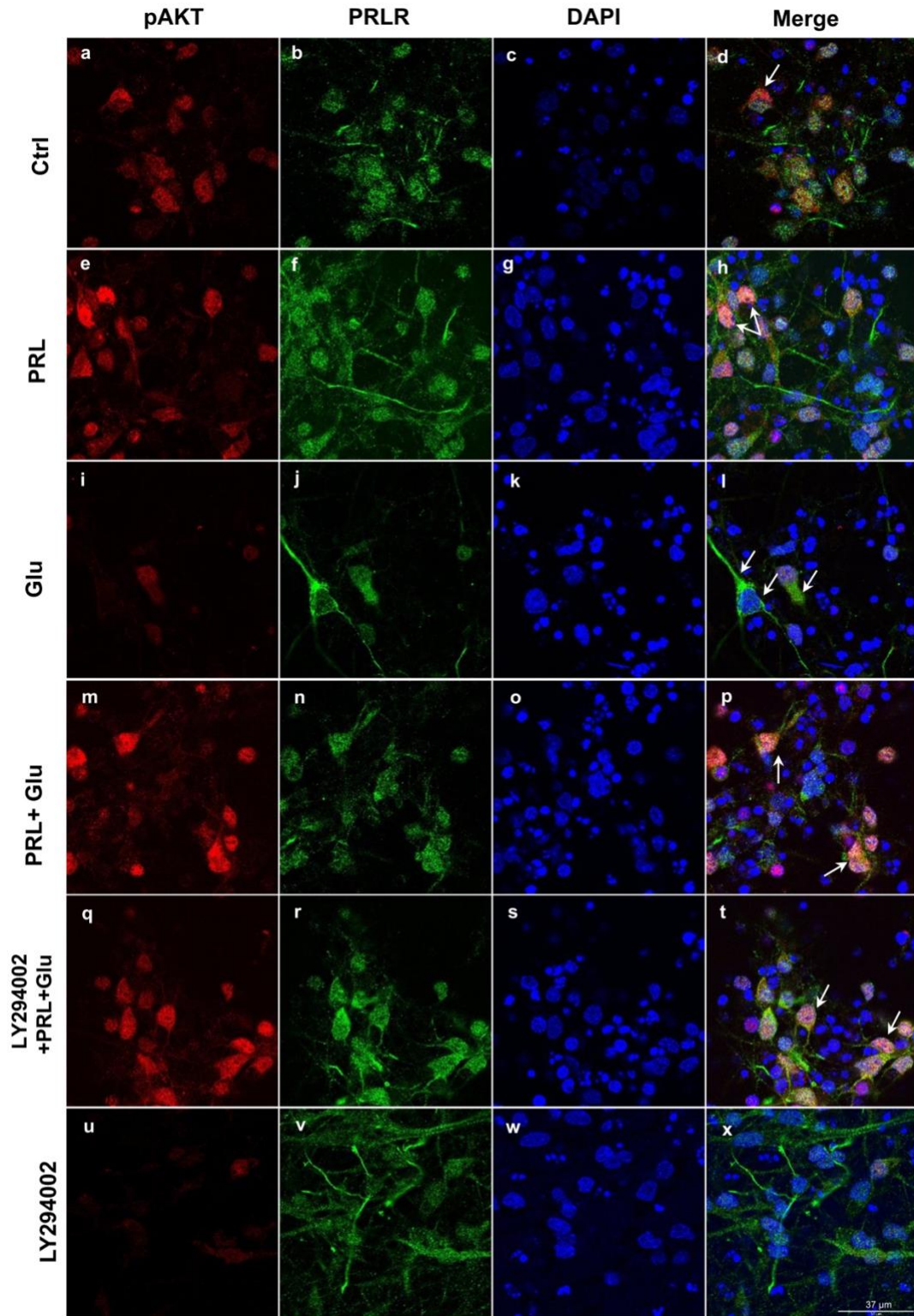


Fig. 5. AKT fosforilada (pAKT) se expresa por la administración de PRL y colocaliza con el PRLR. A los cultivos primarios de neuronas del hipocampo expuestos a tratamientos con PRL (20 ng/ml durante 3 h), Glu (50 μ M durante 1 h) y LY294002 (50 μ M durante 1 h) o sus combinaciones: PRL+Glu y LY294002+PRL+Glu, se inmunotiñeron para detectar el marcaje de las proteínas pAKT y PRLR.

pAKT muestra localización nuclear tras la administración de PRL, véase las pequeñas flechas blancas. Además, se observó marcaje de PRLR (flechas blancas) en todos los tratamientos, como se mostró anteriormente. Ctrl (a-d), PRL (e-h), Glu (i-l), PRL+Glu (m-p), LY294002+PRL+Glu (q-t) y LY294002 (u-x). pAKT se muestra en rojo y PRLR en verde; se muestra marcaje DAPI en azul para identificar núcleos. Barra de escala 37 μm .

7.6 La administración de PRL en cultivos primarios de neuronas del hipocampo promueve la fosforilación de GSK3 β .

A continuación, nos fijamos en GSK3 β , ya que se ha informado ampliamente de que esta proteína se regula río abajo de la vía de señalización AKT durante eventos de daño neuronal o patologías (Matsuda et al., 2019). Aquí mostramos que el tratamiento con Glu o LY294002 solos, disminuyó la proporción de fosforilación de GSK3 β en un 50% y 30%, respectivamente (Fig 6A y 6B). Sin embargo, el tratamiento con PRL durante 3 h y 6 h, protege a GSK3 β contra la desfosforilación, manteniendo así GSK3 β en su forma inactiva. Por lo tanto, el tratamiento con PRL puede reducir la activación de GSK3 β observada durante el daño neuronal. En algunos tratamientos se observó un decremento en la proteína total de GSK3 β además de la forma fosforilada (Fig 6A). Un efecto similar se ha reportado *in vitro* en células Neuro2A (Zhang et al., 2003) y en cultivos primarios de corteza de ratón (Krishnankutty et al., 2017).

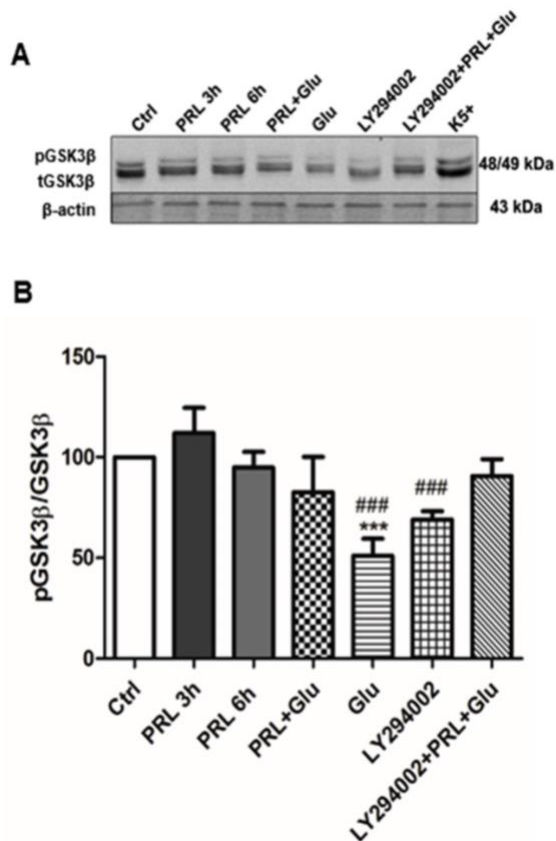


Fig 6. La administración de PRL induce la fosforilación de GSK3 β , implicada en la neuroprotección frente al daño por Glu en neuronas del hipocampo. La fosforilación de GSK3 β se evaluó mediante western blot. Los cultivos se trataron con PRL (20 ng/ml durante 3 h y 6 h), Glu (50 μ M durante 1 h) o LY294002 (50 μ M durante 1 h). A) Blot representativo de GSK3 β fosforilada y GSK3 β total. B) Análisis densitométrico de la fosforilación de GSK3 β (pGSK3 β /GSK3 β). Los tratamientos con Glu y LY294002 tienden a disminuir la fosforilación de GSK3 β , mientras que la presencia de PRL sola o en combinación anula la disminución de la fosforilación inducida por Glu o LY294002, manteniendo niveles de fosforilación similares a los del control. Los datos se expresan como la media \pm DE, n=4 experimentos independientes por triplicado. Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía seguida de la prueba *post hoc* de Dunnett ***p \leq 0.001 vs Ctrl; ###p \leq 0.001 vs PRL.

7.7 Aumento de la expresión y localización nuclear de NF- κ B mediado por PRL en neuronas del hipocampo.

Se ha informado anteriormente que el factor de transcripción NF- κ B está implicado en la neuroprotección contra la excitotoxicidad y además, en el estrés oxidativo mediante la inducción de la sobreexpresión de p65, así como la promoción de genes de supervivencia *Bcl-xL* después del daño en el hipocampo (Popiolek-Barczyk and Mika, 2016; Willard and Koochekpour, 2013). Además, se ha sugerido que la señalización de AKT está relacionada con la activación de NF- κ B en las neuronas (Zhu et al., 2004). Con estos antecedentes, se decidió evaluar la implicación de NF- κ B como proteína blanco de la vía de señalización PI3K/AKT. Aquí, observamos que la forma fosforilada de NF- κ B mostró translocación al núcleo después de la administración de PRL (Fig 7 d-f). Una localización similar se observó con los tratamientos PRL+Glu (Fig 7 j-l) y LY294002+PRL+Glu (m-o). Por el contrario, los tratamientos con Glu (Fig 7 g-i) o

LY294002 (Fig 7 p-r) solos mostraron una localización completamente citoplasmática de p-NF- κ B.

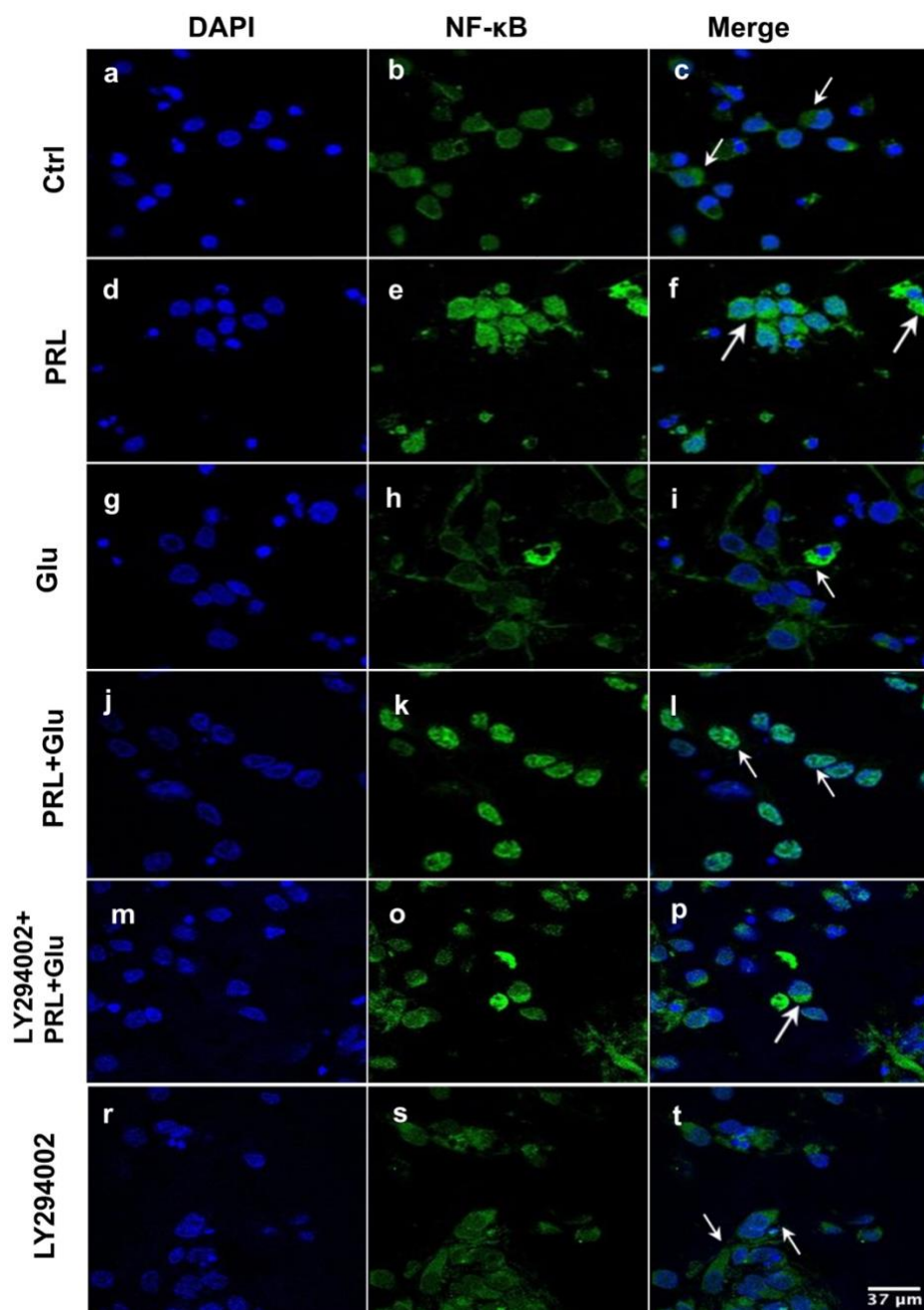


Fig 7. El tratamiento con PRL induce la expresión y localización nuclear de Phospho NF- κ B (pNF- κ B) en neuronas del hipocampo. Se observó el marcaje por inmunofluorescencia de pNF- κ B en cultivos neuronales de hipocampo expuestos a diferentes tratamientos: PRL (20 ng/ml

durante 3 h), Glu (50 μ M durante 1 h) y LY294002 (50 μ M durante 1 h) o combinaciones: PRL+Glu y LY294002+PRL+Glu. Tras la administración de PRL, la tinción de la proteína pNF- κ B aumentó en el núcleo (d-f, véanse las flechas blancas) en comparación con Glu (g-i), donde pNF- κ B se localizó en el citoplasma. Fotomicrografías representativas de neuronas del hipocampo inmunoteñidas: Ctrl (a-c), PRL (d-f), Glu (g-i), PRL+Glu (j-l), LY294002+PRL+Glu (m-o), LY294002 (p-r). pNF- κ B se muestra en verde y los núcleos en azul (DAPI). Barra de escala 37 μ m.

7.8 La expresión de Bcl-2 fue regulada por la administración de PRL en cultivos primarios de neuronas hipocampales.

Dado que se identificó que el tratamiento con PRL implicaba la activación de la vía de señalización PI3K/AKT así como de NF- κ B y además, se han vinculado con la regulación de genes de sobrevivencia como *Bcl-xL* (Popiolek-Barczyk y Mika, 2016; Willard y Koochekpour, 2013), como siguiente paso determinamos el efecto de PRL en la expresión de genes de sobrevivencia.

La administración de PRL durante 3 h promovió un aumento de la expresión de *Bcl-2* en comparación con el control, incluso en presencia de excitotoxicidad por Glu (PRL+Glu) (Fig 8A), lo que sugiere que la PRL puede inducir neuroprotección, en parte, mediante el aumento de la expresión de genes de supervivencia. Además, la combinación con Glu y LY294002 (LY294002+PRL+Glu) no fue suficiente para abrogar significativamente el efecto de la PRL sobre la expresión del ARNm de *Bcl-2*. Curiosamente, ni los tratamientos con Glu ni con LY294002 por sí solos modificaron la expresión de este gen de supervivencia, aunque el tratamiento con LY294002 mostró una tendencia a regular a la baja la expresión de *Bcl-2* (Fig 8A). Además, la combinación de PRL+Glu, aumentó el nivel de ARNm de *Bcl-2* en comparación con el tratamiento de Glu solo. Sin embargo, cuando se combinó con el inhibidor, se observó una disminución de los niveles de ARNm de *Bcl-2*. Analizando el índice proapoptótico (Bax/Bcl-2), a nivel proteínico, observamos que los tratamientos con PRL durante 1, 3 y 6 horas muestran un índice proapoptótico similar al control. Además, solo el tratamiento con LY294002+PRL+Glu indujo un aumento significativo de la relación Bax/Bcl-2, en comparación con los tratamientos control, PRL y PRL+Glu (Fig 8B). Curiosamente, aunque los tratamientos Glu y LY294002 por sí solos muestran una tendencia a aumentar

la proporción proapoptótica, esto no fue significativo, posiblemente debido al corto tiempo de exposición (1 h).

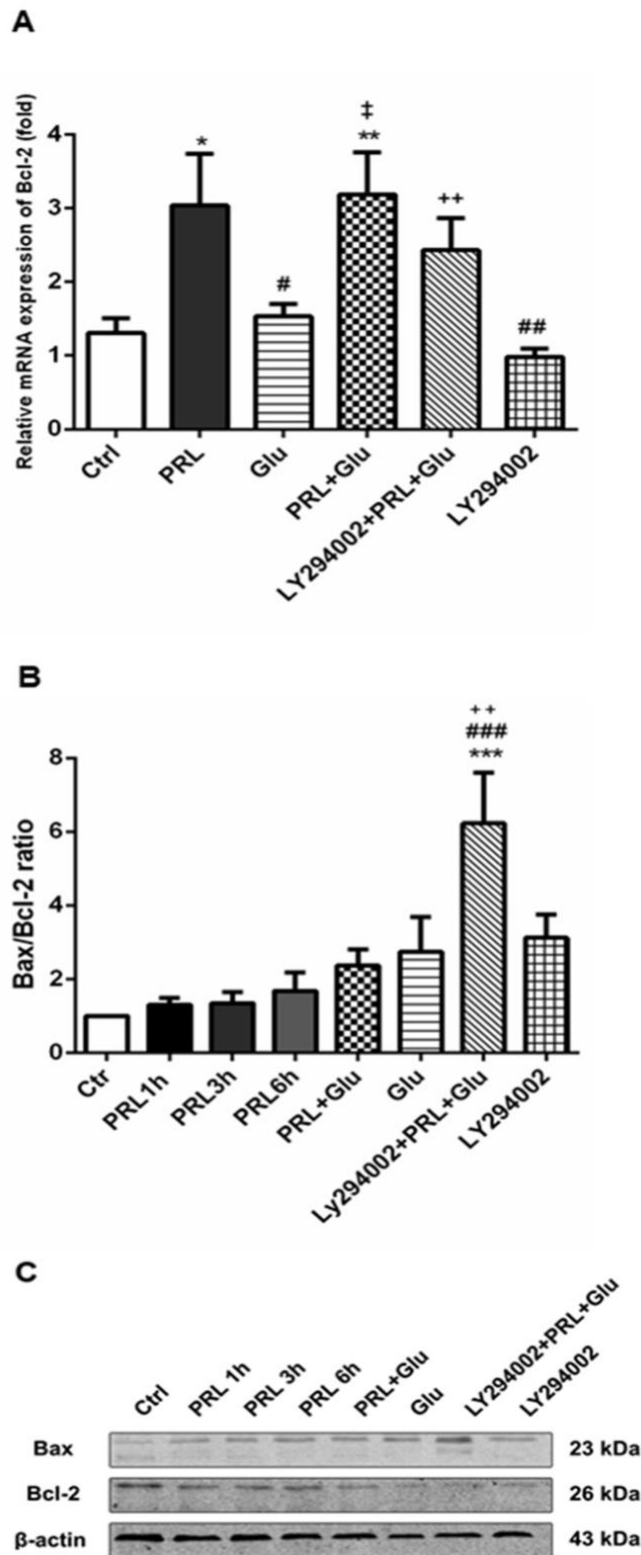


Fig 8. El tratamiento con PRL reduce la relación proapoptótica en el daño neuronal, manteniendo la expresión de Bcl-2. A) La expresión del gen *Bcl-2* fue evaluada por RT-qPCR. Los cultivos neuronales fueron tratados con PRL (20 ng/ml durante 3 h), Glu (50 μ M durante 1 h) y LY294002 (50 μ M durante 1 h) o sus combinaciones. El ARN total de los cultivos neuronales se utilizó para la RT-qPCR. La expresión del gen de control endógeno *Hprt* se utilizó para calcular la expresión génica relativa por el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. En presencia de PRL sola y en combinación con Glu (PRL+Glu), el gen *Bcl-2* se incrementó en comparación con el control. Por el contrario, en los tratamientos con Glu y LY294002, se observó una regulación a la baja del ARNm de *Bcl-2* en comparación con PRL. Además, el tratamiento PRL+Glu aumentó el nivel de ARNm de *Bcl-2* en comparación con el tratamiento Glu. Sin embargo, cuando se combinó con el inhibidor, se observó una disminución de los niveles de ARNm de *Bcl-2*. B) Análisis densitométrico de la relación proapoptótica Bcl-2/Bax. La administración de PRL sola no afecta a la relación proapoptótica. Sin embargo, la presencia del inhibidor LY294002 con PRL+Glu (LY294002+PRL+Glu), muestra un aumento del cociente proapoptótico con respecto al control, PRL y PRL+Glu, mientras que Glu y LY294002 solos sólo muestran un ligero aumento de dicho cociente que no es significativo. C) Blot representativo de la relación Bax/Bcl-2. Los datos se expresan como la media \pm DE n=4 experimentos independientes por triplicado. Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba *post hoc* de Dunnett. *p \leq 0.05, **p \leq 0.01 y ***p \leq 0.001 vs Ctrl; #p \leq 0.05, ##p \leq 0.01 y ###p \leq 0.001 vs PRL; †p < 0.05 vs Glu; ++p \leq 0.01 vs PRL+Glu.

7.9 La sobreexpresión del gen *Nrf2* inducida por la administración de PRL en neuronas del hipocampo está asociada a la activación de la vía PI3K/AKT.

Tras observar que la PRL aumentaba la expresión del gen *Bcl-2*, exploramos el efecto de la PRL sobre otros genes regulados por la señalización PI3K/AKT que podrían estar asociados a la regulación del estrés oxidativo y, por tanto, asociados en última instancia a la supervivencia celular. Observamos que la expresión del gen *Nrf2* aumentó aproximadamente 2 veces tras el tratamiento con PRL, en comparación con el control. El tratamiento con Glu redujo la expresión del gen *Nrf2*, y PRL (PRL+Glu) fue parcialmente capaz de rescatar este efecto. Inesperadamente, el tratamiento con LY294002 por sí solo también indujo un aumento significativo de la expresión de *Nrf2* (Fig 9).

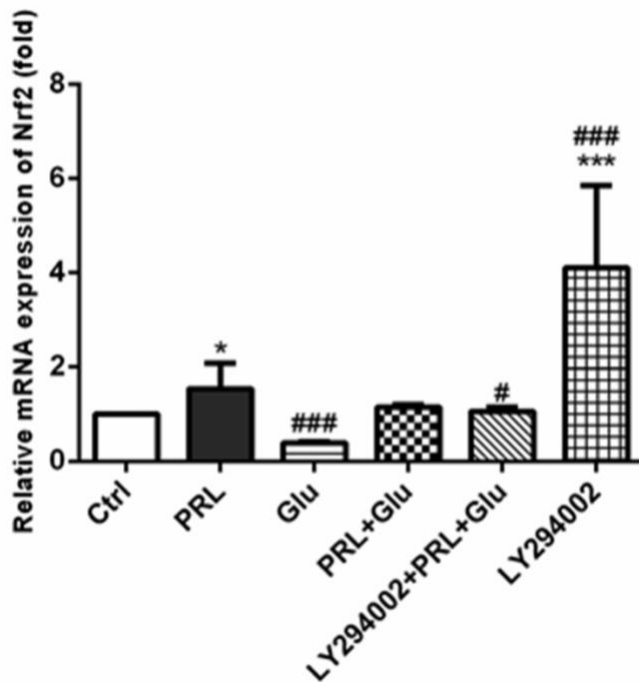


Fig 9. Expresión del gen *Nrf2* inducida por la administración de PRL en cultivos de neuronas del hipocampo.

La expresión del gen *Nrf2* se evaluó mediante RT-qPCR. Para la RT-qPCR se utilizó ARN total obtenido de cultivos neuronales de hipocampo tratados con PRL (20 ng/ml durante 3 h), Glu (50 μ M durante 1 h) y LY294002 (50 μ M durante 1 h) y combinaciones. El ARN del gen de control endógeno *Hprt* se utilizó para calcular la expresión relativa del gen *Nrf2* según el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. La administración de PRL aumentó la expresión del gen *Nrf2* en comparación con el control. Por el contrario, los tratamientos con Glu y la combinación de LY294002+PRL+Glu mostraron una menor expresión del ARNm de *Nrf2* con respecto al tratamiento con PRL. LY294002 solo promuevió una mayor regulación al alza en comparación con el control y el tratamiento con PRL. Los valores se presentan como la media \pm DE, n=3 ensayos independientes por triplicado. Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba *post hoc* de Dunnett. *p < 0.05 y ***p < 0.001 vs Ctrl; #p < 0.05 vs PRL; ###p < 0.001 vs PRL.

8. Discusión

Es bien sabido que la excitotoxicidad desempeña un papel importante en el daño neuronal asociado a las enfermedades neurológicas (Mehta et al., 2012). Recientemente, un grupo de hormonas, en particular la PRL, ha sido objeto de atención por su participación como agente neuroprotector contra el daño excitotóxico tanto *in vitro* como *in vivo* (Cabrera et al., 2009; Rivero-Segura et al., 2017; Vergara-Castañeda et al., 2016). Nuestro grupo ha reportado que el efecto de la PRL en la neuroprotección contra la excitotoxicidad inducida por Glu requiere la participación de su receptor: PRLR (Vergara-Castañeda et al., 2016). Además, previamente informamos la posible participación de NF- κ B en la regulación del índice apoptótico (Rivero-Segura et al., 2017).

En el presente estudio demostramos que la PRL ejerce un efecto neuroprotector en respuesta al daño excitotóxico inducido por Glu y que dicho efecto está mediado, en parte, por la activación de la vía de señalización PI3K/AKT (mostrada en las Figuras 3 y 4), la regulación de GSK3 β /NF- κ B (Figuras 6 y 7), además de la sobreexpresión de los genes *Bcl-2* y *Nfr2* (Figuras 8 y 9). Adicionalmente, nuestros resultados demuestran que la inhibición de la vía de señalización PI3K/AKT abrogó el efecto protector de la PRL contra la muerte neuronal inducida por glutamato, apoyando la participación de esta vía en el papel neuroprotector de la PRL. Estos hallazgos apoyan y extienden la idea de que el tratamiento con PRL puede regular las vías de señalización PI3K/AKT y GSK3 β /NF- κ B en cultivos neuronales de hipocampo y que estas participan en el proceso de neuroprotección.

Inicialmente, exploramos la localización y expresión de PRLR en cultivos primarios de neuronas del hipocampo con diferentes tratamientos. A través del uso de técnicas de análisis morfológico por inmunofluorescencia, se observó un interesante patrón de localización del marcaje correspondiente a la proteína del PRLR. Además de confirmar la expresión de PRLR en cultivos neuronales primarios de hipocampo, también observamos la calidad de nuestros cultivos, los cuales mostraron una mínima

contaminación por glía, identificada por la presencia de la proteína GFAP (Fig. Suplementaria 2). Se observó que después del tratamiento con PRL, el marcaje de su receptor aumentó y se localizó tanto en el citoplasma como en el núcleo; en contraste, con la administración del tratamiento con Glu, se localizó principalmente en el citoplasma (Fig 1). En este sentido, se ha asociado neuroprotección con la sobreexpresión de PRLR y VGLUT1 en hipocampo de ratas ovariectomizadas durante excitotoxicidad (Ortiz-Pérez et al., 2019). Previamente, nuestro grupo reportó que la presencia de ambas isoformas, corta y larga de PRLR eran necesarias para que la PRL ejerciera neuroprotección contra el daño excitotóxico provocado por Glu (Vergara-Castañeda et al., 2016).

Observamos que la mayoría de las neuronas de nuestros cultivos primarios de neuronas hipocampales expresaban PRLR (Fig 1). En el hipocampo, hay tres tipos principales de neuronas: las células granulares y piramidales, que son neuronas excitatorias, y las interneuronas inhibitorias. Las neuronas piramidales son el principal tipo celular del hipocampo (Kaech and Banker, 2006). Curiosamente, se ha informado que en los primeros días de los cultivos primarios del hipocampo, la población más representativa son las neuronas piramidales y, con el tiempo, el cultivo se enriquece con neuronas granulares; en conjunto, estas células representan el 90% de la población neuronal, el 10% restante son interneuronas (Pelkey et al., 2017; Wu et al., 2015).

Se utilizaron embriones de 17-18 días para realizar nuestros cultivos neuronales; en esta etapa de desarrollo, se ha reportado que la mayoría de las células son neuronas piramidales con sinapsis funcionales (Wu et al., 2015). Con base en estas observaciones sugerimos que en nuestros cultivos primarios de neuronas hipocampales, predominan las neuronas de tipo piramidal. Sin embargo, es probable que también se encuentren presentes neuronas granulares, puesto que estas últimas a medida que pasa el tiempo en el cultivo neuronal, son más abundantes. (Pelkey et al., 2017; Wu et al., 2015). Es destacable que ambas poblaciones de neuronas: piramidales y granulares expresaban PRLR (Fig 1).

En este sentido, y de forma similar, estudios previos *in vitro* en neuronas hipocámpales cultivadas mostraron una expresión generalizada de PRLR en las neuronas (Vergara-Castañeda et al., 2016). Además, estudios *in vivo* demostraron una distribución extendida del marcaje para PRLR en neuronas del hipocampo de ratas ovariectomizadas (Ortiz-Pérez et al., 2019).

Estos estudios coinciden con nuestras observaciones en cultivos primarios de neuronas del hipocampo. Sin embargo, queda por dilucidar la presencia de una isoforma particular del receptor en diferentes tipos de neuronas del hipocampo, es decir, definir si existe expresión diferencial de isoformas de PRLR en subpoblaciones (células piramidales y granulares) de cultivos neuronales primarios de hipocampo.

Además, es importante identificar si todas o sólo un tipo de neuronas específicas estarían protegidas por la PRL. Por lo observado en nuestro grupo la PRL ejerce neuroprotección en cultivos de hipocampo (Rivero-Segura et al., 2017; Vergara-Castañeda et al., 2016) y también *in vivo* en ratas ovariectomizadas tratadas con PRL (Cabrera et al., 2009). Por ejemplo, el tratamiento con PRL antes de la administración de AK en ratas hembras ovariectomizadas promovió la supervivencia neuronal. Esta observación se correlacionó con la sobreexpresión de PRLR que se observó en todos los subcampos del hipocampo: CA1, CA2 y CA3 (Ortiz-Pérez et al., 2019). Además, en cultivos neuronales primarios de hipocampo se ha sugerido que la PRL media la neuroprotección contra la excitotoxicidad a través de su receptor, y el bloqueo de PRLR disminuyó la supervivencia neuronal (Vergara-Castañeda et al., 2016).

En nuestros cultivos primarios de neuronas hipocámpales, el tratamiento con PRL mostró alrededor de un 95% de supervivencia celular con respecto a los tratamientos sin PRL. Entonces, la administración de PRL promovió una sobrevivencia similar a la condición control (Fig 2A). Interesantemente, la mayoría de las neuronas mostraron un marcaje de PRLR generalizado (Fig 1), por lo tanto, consideramos que tanto las poblaciones neuronales piramidales como granulares son capaces de expresar PRLR, una idea apoyada por la evidencia mencionada anteriormente de la expresión de PRLR

tanto en modelos *in vivo* como *in vitro* después de la administración de PRL (Ortiz-Pérez et al., 2019; Vergara-Castañeda et al., 2016). Sin embargo, más estudios son necesarios para determinar la supervivencia de cada población neuronal utilizando marcadores específicos de células piramidales o granulares como CaMKII α y Prox1, respectivamente (Wang et al., 2013; Wu et al., 2015).

En cuanto al papel del PRLR en las neuronas, se ha demostrado que ambas isoformas, PRLR larga (PRLR-L) y corta (PRLR-S), participan de forma diferencial en la activación neuronal. Por ejemplo, PRL-L se ha asociado con la vía STAT5 en ciertas regiones del cerebro durante el embarazo. Sin embargo, la ablación neuronal de STAT5 en ratones, demostró que la fosforilación de STAT5 no es necesaria para la expresión de conductas maternas y de lactancia (Buonfiglio et al., 2015). En relación a las vías de señalización involucradas con la isoforma PRLR-S, se ha reportado que existe una acción transitoria de PRL mediada por la forma PRLR-S en neuronas sensoriales de los ganglios trigeminales. Interesantemente, los efectos transitorios mediados por PRLR-S son inhibidos por la presencia de PRLR-L en estas células (Belugin et al., 2013). Además, en ganglios de raíz dorsal (DRG) y neuronas sensoriales TG, ambos PRLR-L y PRLR-S ARNm son expresados, lo que sugiere que ambas isoformas probablemente participan en efectos neuronales de PRL (Patil et al., 2019). Notablemente, la mayoría de los estudios que implican la activación de PRLR en el cerebro no discriminan entre las isoformas de PRLR.

Dado que la presencia de JAK2 es suficiente para desencadenar la señalización de ambas isoformas el homodímero corto y el largo del PRLR y aunado a que existen evidencias de la presencia de ambos receptores en las neuronas (Vergara-Castañeda et al., 2016), es probable que el PRLR en los cultivos utilizados en este trabajo (Fig 1) puedan ser una combinación de ambos homodímeros activando la señalización a través de AKT. Existen evidencias de la activación de PI3K/AKT en varios tipos de neuronas mientras que la señalización STAT5 en el hipocampo no ha sido probada (Morales et al., 2014). Sin embargo, la identificación de la implicación de distintas isoformas de PRLR es

una cuestión importante que requiere investigación adicional en la neuroprotección inducida por PRL.

Es bien sabido que la PRL se sintetiza principalmente en las células lactotropas de la hipófisis, sin embargo, también se expresa en tejidos extrapituitarios. Además, algunos estudios sugieren una posible síntesis en el cerebro de las ratas (Cabrera-Reyes et al., 2017). Por lo tanto, existe un amplio debate sobre si la PRL puede ser sintetizada por células neuronales. En este sentido, se ha reportado evidencia de expresión de PRL en tejido neuronal en ratas hembras hipofisectomizadas en las que se detectó prolactina inmunoreactiva (ir-PRL) en diferentes áreas cerebrales (DeVito, 1988). Sin embargo, cabe mencionar que la inmunorreactividad positiva no implica necesariamente que la PRL se exprese en el sitio dónde se localizó, ya que puede llegar a esa región desde de la circulación.

Los datos relacionados con la expresión de PRL en el cerebro siguen siendo limitados y controvertidos. Por un lado, se ha sugerido que la mayoría de los efectos de PRL en el cerebro provengan de una fuente pituitaria (Bridges and Grattan, 2019). Sin embargo, también han sido descritos efectos tanto paracrinicos como autocrinos de PRL en sistema nervioso, además de la expresión del ARNm del PRLR en diversas regiones del cerebro (Cabrera-Reyes et al., 2017), siendo el hipocampo motivo de controversia (Carretero et al., 2019; Molina-Salinas et al., 2021). En esta misma línea, en condiciones de daño por hipoxia-isquemia en pollo, se ha reportado un incremento significativo en la expresión del ARNm de GH tanto en corteza como en cerebelo, sin embargo, en hipocampo no se observó el mismo patrón de expresión (Alba-Betancourt et al., 2013; Baltazar-Lara et al., 2022, 2020).

En nuestros cultivos primarios de neuronas hipocampales no se midió el ARNm de PRL, queda por elucidar en futuras investigaciones si hay un incremento en la expresión del ARNm de PRL en las neuronas hipocampales tanto en condiciones de protección y de daño. En un estudio transcriptómico, el gen *PRLR* se expresó

diferencialmente por efecto de la administración de PRL (Cabrera-Reyes et al., 2019), lo cual podría sugerir que en modelos *in vitro*, se presentaría una condición similar.

Es importante mencionar que la mayoría de los estudios que describen el efecto neuroprotector de PRL en neuronas hipocampales utilizaron la administración exógena de esta hormona, sin tener en cuenta el sitio de síntesis de PRL (Cabrera et al., 2009; Vanoye-Carlo et al., 2008). Por lo tanto, los datos relacionados con la síntesis de PRL en las neuronas que podrían contribuir a ejercer efectos neuroprotectores en el hipocampo quedan aún por dilucidar. Basado en la evidencia de los estudios antes mencionados, es posible que la PRL de origen hipofisiario se puede transportar y alcanzar las células blanco que estén enriquecidas del PRLR, tales como las neuronas, para ejercer diversos efectos incluyendo la neuroprotección. Sin embargo, se necesita más investigación para resolver la cuestión sobre si las neuronas pueden sintetizar PRL.

Una vez observada la expresión de PRLR en cultivos neuronales, procedimos a dilucidar la activación de la vía de señalización PI3K/AKT en la neuroprotección inducida por PRL. PI3K/AKT ha sido descrita como una importante vía de señalización promotora de la supervivencia en diferentes tejidos y líneas celulares (Li et al., 2020), incluyendo las neuronas (Dudek et al., 1997). Particularmente, en la región del hipocampo se ha demostrado que esta vía de señalización desempeña un papel crítico en los mecanismos neuroprotectores frente a diferentes agentes como el ácido eicosapentaenoico (EPA), el BDNF y los tratamientos de preconditionamiento con NMDA, fármacos como los inhibidores de la actividad NMDAR o incluso la protección frente al daño por isquemia cerebral (Almeida et al., 2005; Constantino et al., 2018; Dong et al., 2018). En línea con dichos estudios, nuestros hallazgos concuerdan con estos datos previos sobre la participación de la vía de señalización PI3K/AKT en la neuroprotección de las neuronas del hipocampo.

Nosotros encontramos que el inhibidor de la vía PI3K/AKT, LY294002, fue capaz de abrogar el efecto protector de la PRL frente a la excitotoxicidad en cultivos neuronales, apoyando la participación de esta vía de supervivencia como efector descendente de la

acción de la PRL. Esto queda demostrado por el mantenimiento de la fosforilación de AKT en presencia de PRL durante la excitotoxicidad por Glu (Fig 3, Fig 4A y Fig 5).

Además de la fosforilación de AKT, se analizó la activación de la molécula que está río arriba de AKT, es decir, PI3K, la cual, por el tratamiento con PRL se fosforiló. El tratamiento con Glu y LY294002, abrogó la fosforilación de PI3K, mientras que la adición de PRL a estos compuestos (tratamiento LY294002+PRL+Glu) restauró su fosforilación (Fig 4B). Es sabido que PI3K se presenta en forma de un heterodímero entre una subunidad catalítica (p110) y una subunidad reguladora (p85), la cual se fosforila en sus residuos Tyr 458 (Bhuiyan et al., 2011).

En el presente estudio, se observó que en los cultivos de neuronas hipocampales tratados con PRL, ésta promovió la fosforilación de la proteína PI3K en los residuos Tyr 458 y Tyr 199 (Fig 4B). Una activación similar de PI3K por efecto de la PRL, ha sido previamente reportada en la glándula mamaria (Roof and Gutierrez-Hartmann, 2018). Interesantemente, la activación de PI3K se ha observado en las neuronas del TG de ratas hembra, donde la inhibición de PI3K por el tratamiento con LY294002 abolió el efecto de PRL en la actividad del canal del receptor transitorio potencial vanilloide 1 (TRPV1) (Belugin et al., 2013; Patil et al., 2014).

Además, las acciones electrofisiológicas de PRL en neuronas TIDA se asociaron con la activación de PI3K (Belugin et al., 2013; Lyons et al., 2012; Patil et al., 2014). Estos informes están de acuerdo con nuestros resultados y extienden la idea de que la PRL media la neuroprotección vía la activación de PI3K y AKT. Notablemente, la activación de PI3K/AKT se ha asociado con PRLR en diversos modelos gliales y neuronales (Anagnostou and Morales, 2019; Belugin et al., 2013; Lyons et al., 2012; Patil et al., 2019).

Realizamos una curva dosis-respuesta, utilizando una concentración de PRL de 20 ng/ml y variando la concentración del inhibidor de 10 a 50 μ g. Observamos que la viabilidad no se veía afectada por los cambios en la concentración del inhibidor (Fig.

suplementaria 1). En consecuencia, elegimos una concentración alta del inhibidor LY294002 para realizar los siguientes experimentos, tal y como se indica en un informe anterior de (Almeida et al., 2005).

Además, observamos colocalización de PRLR con fosfo-AKT (pAKT) en el núcleo de las neuronas (Fig 5). pAKT se redujo significativamente tras los tratamientos con LY294000 y Glu (Fig 5 i-l; u-x). Así, nuestros resultados muestran la participación de la vía PI3K/AKT en la neuroprotección inducida por PRL frente a Glu en neuronas del hipocampo. En este sentido, existe muy poca información para explicar cómo el tratamiento a las neuronas hipocámpales con PRL produce la activación de AKT. Nuestro estudio intenta aclarar y explicar esta relación. Algunos trabajos muestran que PRL promovió la expresión de pAKT en células linfoides (Domínguez-Cáceres et al., 2004). En las neuronas, se ha demostrado que el comportamiento paternal está asociado con la expresión de AKT regulada al alza, pero no con la fosforilación (Anagnostou and Morales, 2019).

En este trabajo sugerimos que PRL induce la fosforilación de AKT (Fig 4A y 5), entonces, pAKT modula la expresión de GSK3 β e inhibe la relación proapoptótica Bax/Bcl-2, además de desencadenar factores antioxidantes como *Nrf2*. Curiosamente, PI3K y AKT se localizan predominantemente en el citoplasma, pero también se han detectado en el núcleo de las neuronas en condiciones de protección. Por ejemplo, en células PC12, la administración del factor de crecimiento Nervioso (NGF), promovió la translocación de pAKT al núcleo resultando en efectos antiapoptóticos (Xuan Nguyen et al., 2006). Efectos neuroprotectores similares se producen con la translocación nuclear de pAKT en modelos de isquemia cerebral en ratas. pAKT inactiva factores apoptogénicos como Bad y caspasa-9, inhibiendo la muerte celular (Noshita et al., 2001). Estos informes coinciden con nuestra observación: el tratamiento con PRL promueve la localización nuclear de pAKT (Fig 5).

Los efectos que pAKT puede ejercer directamente en el núcleo se han asociado con la desactivación de acino, un factor nuclear necesario para la condensación de la

cromatina en la apoptosis a través de la activación de la caspasa 3. Así, la pAKT previene la condensación de la cromatina dependiente de acino, promoviendo la supervivencia celular. Además, pAKT podría regular la activación de factores apoptóticos como GSK3 β , FOXO, y puede modular el estrés oxidativo (Uranga et al., 2013). Los estudios centrados en determinar cómo pAKT se transloca al núcleo después del tratamiento con PRL en neuronas necesitan más estudios para entender si PRL promueve la modulación de la cromatina por AKT, como se ha visto en otros modelos.

Es bien sabido que AKT fosforila a la cinasa GSK3 β , inhibiendo su actividad, lo que se ha asociado ampliamente con la patogénesis en diferentes trastornos neurodegenerativos. Un ejemplo es la EA, en la que la señalización PI3K/AKT está atenuada en el cerebro, y su inhibición aumenta la hiperfosforilación de Tau, importante para la estabilidad de los microtúbulos (Kitagishi et al., 2014; Matsuda et al., 2018). La actividad de GSK3 está regulada negativamente por la fosforilación de GSK3 α en Ser 21 y de GSK3 β en Ser 9 (Matsuda et al., 2019).

En nuestros experimentos observamos que GSK3 β se fosforila en Ser 9 por efecto de la administración de PRL. Adicionalmente, la PRL fue capaz de rescatar la fosforilación de GSK3 β , promoviendo la neuroprotección, en presencia de daño por Glu en neuronas del hipocampo (Fig 6). Ambos tratamientos, Glu y LY294002 por sí solos redujeron la fosforilación de GSK3 β en comparación con PRL y el control, además, la adición de PRL a estos tratamientos revirtió dicho efecto. Este resultado está en consonancia con una observación previa (Domínguez-Cáceres et al., 2004) donde el tratamiento con PRL aumentó la actividad de AKT en las células linfoides W53 y fosforiló GSK3 β en Ser 9, lo que resultó en su desactivación. Además, se ha sugerido que la PRL muestra un efecto neuroprotector mediado por la regulación de Tau durante la neurodegeneración y está implicada en la activación de la vía PI3K/AKT/GSK3 β (Muñoz-Mayorga et al., 2018).

En nuestros tratamientos observamos que no sólo la fosforilación de GSK3 β decreció, sino también la proteína total, lo cual se ha visto también en células Neuro2A

(Zhang et al., 2003) y en cultivos primarios de corteza de ratón (Krishnankutty et al., 2017). Se propone que decrementos de la forma no fosforilada, de GSK3 β se relacionan con disminución de su fosforilación, lo cual podría estar ocurriendo en nuestro modelo. Además, se ha reportado una expresión diferencial de la proteína no fosforilada GSK3 β en diversas zonas del cerebro de ratón, interesantemente, el hipocampo fue de las regiones con menos niveles de GSK3 β total, sin embargo, en su forma fosforilada estaba incrementada respecto a áreas como la corteza (Krishnankutty et al., 2017). Por consiguiente, la regulación de GSK3 β necesita ser más estudiado en cultivos de neuronas hipocampales, así como durante la neuroprotección por efecto de PRL.

Así, la PRL podría activar AKT, desencadenando la inactivación de GSK3 β y, en consecuencia, la inhibición de p-Tau. Esta regulación de la vía de señalización podría explicar por qué la ausencia de PRL contribuye al riesgo de desarrollo de patologías como el Alzheimer (Duc Nguyen et al., 2022). En el presente trabajo, sugerimos que PRL promueve la activación de PI3K/AKT, que conduce a la inactivación de GSK3 β , promoviendo vías de supervivencia. Interesantemente, GSK3 está relacionada con comportamientos depresivos y condiciones psiquiátricas como la esquizofrenia (Matsuda et al., 2018). Por lo tanto, los efectos de la PRL en la regulación de los trastornos psiquiátricos necesitan una mayor aclaración.

Se ha reportado previamente que el factor de transcripción NF- κ B está asociado con la neuroprotección a través de la inducción de genes de supervivencia (Popiolek-Barczyk and Mika, 2016; Willard and Koochekpour, 2013). Además, se ha sugerido que NF- κ B es una molécula blanco de la señalización por AKT (Zhu et al., 2018).

En línea con estos reportes, nosotros observamos que la administración de PRL en cultivos primarios de hipocampo, promovía la translocación de fosfo-NF- κ B p65 al núcleo, ello se analizó empleando el marcaje de la proteína mediante inmunofluorescencia y se detectó una tinción más intensa en el núcleo (Fig 7 d-f). Interesantemente, después del tratamiento con PRL en combinación con Glu (Fig 7 g-i), esta translocación nuclear de fosfo-NF- κ B p65 hacia el núcleo fue mayor (Fig 7 d-f).

Curiosamente, tras el tratamiento con Glu (Fig 7 g-i), no se observó esta localización nuclear; de hecho, el NF- κ B se observó en el citoplasma, lo que significa que fue secretado e inactivado, de forma similar a lo observado con el tratamiento con LY294002 (Fig 7 p-r). Sin embargo, bajo condiciones neuroprotectoras (PRL+Glu; Fig 7 j-l), NF- κ B se localizó tanto en el núcleo como en el citoplasma. Esto sugiere que la activación de NF- κ B resulta del tratamiento con PRL, y participa en los efectos neuroprotectores de esta hormona, ya que se ha demostrado que NF- κ B, en respuesta a AKT, puede activar genes anti-apoptóticos como *Bcl-2*, *Bcl-xL* y *BIRC3* en modelos de isquemia cerebral, promoviendo la neuroprotección (Willard and Koochekpour, 2013; Zhu et al., 2018). Nuestros resultados están en línea con estudios en neuronas del hipocampo donde NF- κ B se ha asociado con la inducción de proteínas anti-apoptóticas, como *Bcl-2*, y un incremento en la actividad y contenido proteínico de las enzimas Mn²⁺ SOD y Cu²⁺/Zn²⁺ SOD (Rivero-Segura et al., 2019).

Además, existen pruebas sólidas que apoyan la idea de que el NF- κ B está implicado en la neuroprotección contra la excitotoxicidad y el estrés oxidativo mediante la sobreexpresión de p65 (Popiolek-Barczyk and Mika, 2016). El modelo *knockout* de p65 o la inhibición del NF- κ B neuronal causa la pérdida de neuroprotección tras el tratamiento con KA en cultivos organotípicos de hipocampo (Fridmacher et al., 2003). Sin embargo, también hay informes en los que la translocación de NF- κ B p65 al núcleo es inhibida y se relaciona con la atenuación de la activación de la microglía y la neuroinflamación en la lesión cerebral traumática (Tao et al., 2018). En contraste, varios informes identifican a NF- κ B como una molécula responsable de la neuroinflamación y el daño neuronal (Ding et al., 2020; Tao et al., 2018), puesto que NF- κ B puede promover la transcripción de interleucinas proinflamatorias y la activación de la microglía (Lezoualc'h and Behl, 1998).

En este trabajo se observó que los cultivos neuronales tratados con PRL promueven la translocación de NF- κ B y este efecto se relacionó con la neuroprotección. Sin embargo, un estudio reciente realizado con la línea celular inmortalizada de la microglía, SIM-A9, demostró que PRL inhibió NF- κ B y por lo tanto, sus efectos

inflamatorios, tales como una sobrerregulación de las interleucinas IL-6 e IL-1 β (Jayakumar et al., 2022). Estos resultados contradictorios pueden explicarse por la naturaleza del tipo celular: neuronas frente a glía. Sin embargo, se requiere más investigación para elucidar claramente su función y explicar las controversias que rodean el papel de NF- κ B en la neuroprotección inducida por PRL.

Además, observamos que el tratamiento con PRL, solo y en combinación, promueve la regulación al alza del gen *Bcl-2* en comparación con el control (Fig 8 A), mientras que los tratamientos con Glu y LY294002 solos, no tuvieron ningún efecto. Se ha reportado que el tratamiento con PRL durante 1 h fue suficiente para promover un incremento en la expresión del gen *Bcl-2* en la línea celular de leucemia mieloide humana HL60 (Hsu et al., 2006). Sin embargo, el tratamiento con LY294002+PRL+Glu fue capaz de reducir parcialmente la expresión de *Bcl-2* en comparación con PRL, lo que se correlaciona con el mantenimiento de la proporción proapoptótica observada bajo el tratamiento con PRL en comparación con el control (Fig 8 B-C) y el aumento del índice proapoptótico en el tratamiento con LY294002+PRL+Glu.

Esta observación concuerda con el estudio publicado por (Lai et al., 2014), en el que AKT mediaba la fosforilación y la inhibición de la proteína BAD, miembro de la familia Bcl-2 y señalizadora de muerte, en modelos de excitotoxicidad e isquemia cerebral. Además, se sugirió que PRL en las neuronas del hipocampo, redujó el índice proapoptótico (Rivero-Segura et al., 2017). En este sentido, se evaluó otro gen regulado por AKT: *Nrf2*, gen que participa en la defensa antioxidante, promoviendo la transcripción de varios genes antioxidantes río abajo, como la hemoxigenasa-1 (HO-1) y la quinona oxidorreductasa-1 (Nqo1), entre otros (Alfieri et al., 2011).

En este trabajo, mostramos que el tratamiento con PRL de cultivos de neuronas del hipocampo aumentó la expresión de *Nrf2*, y se observó un patrón similar en el tratamiento con PRL+Glu en comparación con el control. Por el contrario, en los tratamientos con Glu y LY294002+PRL+Glu, el ARNm de *Nrf2* se reguló a la baja en comparación con PRL. Sorprendentemente, el inhibidor LY294002, estimuló una mayor

regulación al alza del gen, lo que indica una regulación compleja (Fig 9). El hecho de que la PRL estimule la regulación al alza del gen *Nrf2* promoviendo la supervivencia, posiblemente en respuesta a la activación de PI3K/AKT, está en línea con estudios recientes en los cuales se ha visto que *AKT/Nrf2* es clave en la supervivencia neuronal en la lesión isquémica cerebral (Liu et al., 2019; Shah et al., 2007), así como en la inhibición de la neuroinflamación en la lesión cerebral isquémica (Ding et al., 2022). Además, se informó de que el *knockout* del gen *Nrf2* aumentaba significativamente el infarto cerebral y el déficit neurológico en modelos de ratas con isquemia por reperusión (Shih et al., 2005), y la inhibición de *Nrf2* abrogaba la neuroprotección en neuronas dopaminérgicas (Wang et al., 2022). Por lo tanto, *Nrf2* parece tener posibilidades terapéuticas prometedoras para la neuroprotección.

En cuanto a la relación entre la vía de señalización PI3K/AKT y la activación de *Nrf2*, ésta se ha descrito en modelos de isquemia *in vivo* e *in vitro* (Liu et al., 2019), así como en modelos de citotoxicidad por amiloide- β en células PC12 (Hui et al., 2018), entre otros. Notablemente, cuando se utilizó el inhibidor LY294002 en estos estudios, se observó una disminución de la actividad de *Nrf2*, pero sólo en su forma fosforilada. Además, en células del epitelio retinal pigmentario se informó que la proteína *Nrf2* se translocaba al núcleo 2 horas después de la exposición al sulforafano (un inductor de *Nrf2*). Sorprendentemente, no se observaron diferencias significativas en la expresión de ARNm en las células tratadas con LY294002, lo que sugiere que existen vías dependientes e independientes de AKT que contribuyen a la función de *Nrf2* río abajo (Wang et al., 2008). Este estudio coincide con nuestras observaciones sobre *Nrf2* (Fig 9). Contrariamente a lo que esperábamos, observamos un aumento del ARNm de *Nrf2* tras el tratamiento con LY294002 (Fig 9). Sin embargo, es posible que no observáramos una disminución debido a la regulación postranscripcional que se produce en nuestras condiciones experimentales.

Dada la gran variedad de estímulos que pueden activar *Nrf2* y los diversos procesos celulares que controla, la regulación de la actividad de *Nrf2* es muy compleja. De hecho, la activación de *Nrf2* puede ser controlada a nivel transcripcional y post-

transcripcional, mediante la regulación de la estabilidad de la proteína y modificaciones post-transcripcionales (Tonelli et al., 2018).

Además, no se sabe qué proteína, río abajo de PI3K/AKT, está implicada en el control de la actividad de Nrf2, pero se ha sugerido que otras vías pueden estar implicadas en la activación de Nrf2 como MAPKs, GSK3 β e incluso que NF- κ B. Interesantemente, Nrf2 tiene una relación sinérgica en enfermedades neurodegenerativas (Sivandzade et al., 2019). Por tanto, es posible que *Nrf2* no sólo responda a la vía de señalización PI3K/AKT sino también a otras que podrían estar implicadas en su activación. En este sentido, se requieren más estudios para entender la relación y regulación fina entre PRL, AKT y *Nrf2* en un contexto de neuroprotección en el hipocampo, ya que hay muy pocas publicaciones al respecto.

Es importante comprender todo el alcance de la PRL como agente protector en el hipocampo. En este estudio, evaluamos la neuroprotección inducida por PRL contra la excitotoxicidad por glutamato en las neuronas del hipocampo, que fue mediada por la activación de PI3K/AKT. Es de interés, el hecho de que la hormona PRL también pueda regular los efectos perjudiciales de los glucocorticoides como la antiproliferación y la muerte celular en el hipocampo (Torner et al., 2009). Se ha reportado extensamente que la administración de PRL, así como la lactancia, mejoran la respuesta al estrés, la proliferación y la posible neurogénesis contra el daño por estrés relacionado con los glucocorticoides a través de la atenuación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA) (Torner, 2016). Con todos estos efectos, es posible que la PRL como agente neuroprotector también juegue un papel como hormona protectora contra el daño causado por el exceso de glucocorticoides, aunque se necesitan más estudios para dilucidar si la vía de señalización PI3K/AKT está implicada en la prevención del daño por glucocorticoides o incluso en otros tipos de daño neuronal.

En resumen, nuestros resultados indican que la administración de PRL en cultivos primarios de neuronas del hipocampo protege contra la excitotoxicidad por Glu, y este efecto neuroprotector está mediado, en parte, por la activación de la vía de señalización

PI3K/AKT, la consiguiente regulación de GSK3 β /NF- κ B, y la regulación al alza de genes de supervivencia, como *Bcl-2* y el gen regulador del estrés oxidativo *Nrf2*. Se muestran los posibles mecanismos moleculares implicados en la neuroprotección inducida por PRL derivados de este estudio en la Fig 10.

Es bien sabido que otras vías de señalización se han asociado con PRL. Sin embargo, no hay informes de actividad canónica de STAT5 en este modelo de excitotoxicidad (Molina-Salinas et al., 2021). En línea con esta observación, en el presente estudio no observamos expresión de pSTAT5 en las neuronas del hipocampo (datos no mostrados). Consideramos que todavía hay un conocimiento limitado sobre la señalización de PRL durante la neuroprotección en el cerebro, así como la forma en que puede modular las vías AKT y NF- κ B para la neuroprotección. Por lo tanto, se necesitan más estudios para dilucidar estas complejas interacciones en red. La comprensión de la activación de la vía de señalización inducida por PRL es necesaria para determinar sus acciones moleculares tanto en condiciones patológicas como fisiológicas.

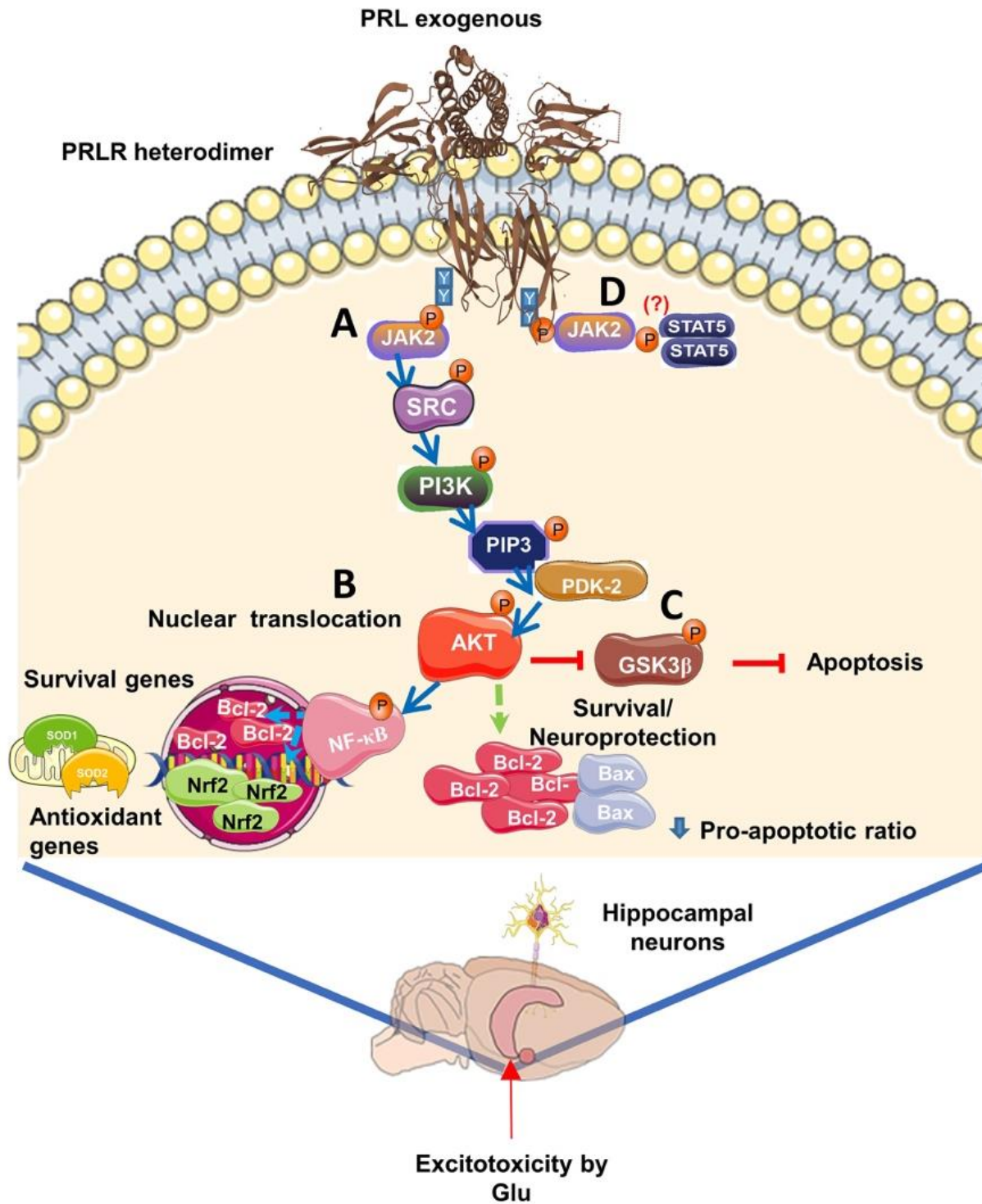


Fig 10. La activación de las vías de señalización PI3K/AKT; GSK3β/NF-κB indujo neuroprotección mediante el tratamiento con PRL en cultivos primarios de neuronas del hipocampo. Representación esquemática de la participación de las vías de señalización PI3K/AKT; GSK3β/NF-κB reguladas por PRL, implicadas en los efectos neuroprotectores. (A)

PRLR activa la cinasa JAK2, que fosforila SRC1 y en consecuencia esta cinasa activa PI3K. La línea azul muestra la activación de la vía de señalización PI3K/AKT, (B) que puede promover la translocación de NF- κ B al núcleo, aumentando la expresión de genes de supervivencia, como Bcl-2, promoviendo una reducción de la relación proapoptótica. Además, genes antioxidantes como Nrf2, también se expresan tras la administración de PRL a través de la vía PI3K/AKT, y probablemente las proteínas SOD1/SOD2. (C) AKT inhibe GSK3 β , que está implicado en eventos apoptóticos. La neuroprotección inducida por PRL es un proceso complejo y tal vez implique la interacción entre muchas vías de señalización, (D). Sin embargo, otras vías relacionadas con PRL, como la activación de STAT5, no se ha observado en las neuronas del hipocampo después del tratamiento con PRL (?). (AKT), proteína cinasa B; (Bcl-2), proteína de linfoma de células B 2; (GSK3 β), glucógeno sintasa cinasa-3 (JAK2), Janus cinasa-2; (NF- κ B), factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de células B activadas; (PDK-1), cinasa dependiente de fosfoinosítidos-1; (PI3K), fosfatidilinositol 3-cinasa; (PIP3), fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato; (PRL), prolactina; (PRLR) receptor de prolactina; (SOD1), superóxido dismutasa 1 Cu²⁺ /Zn²⁺ - SOD; (SOD2), superóxido dismutasa 2 Mn²⁺ -SOD; (Src), proto-oncogén tirosina-proteína cinasa SRC; (STAT5), transductor de señales y activador de la transcripción.

9. Conclusión

En este estudio, demostramos que el efecto neuroprotector de la PRL está mediado en parte, por la activación de la vía de señalización de supervivencia PI3K/AKT y la regulación de sus proteínas blanco, particularmente GSK3 β y NF- κ B, lo que puede resultar en un aumento de los genes *Bcl-2* y *Nrf2*, promoviendo la supervivencia neuronal frente a la excitotoxicidad por Glu en neuronas del hipocampo. Sin embargo, la participación de otras vías de señalización, así como sus interacciones que podrían estar implicadas en el efecto neuroprotector de PRL, queda aún por dilucidar. Así, los efectos de la PRL sobre la activación de las vías de señalización abren nuevas oportunidades en la investigación sobre los mecanismos protectores de la PRL y sus posibles efectos terapéuticos en el cerebro.

10. Perspectivas

- ◇ Realizar la caracterización de neuronas piramidales y granulares dentro de los cultivos primarios de neuronas hipocampales y determinar si poseen una respuesta diferenciada a la neuroprotección por PRL y en excitotoxicidad por Glu.
- ◇ Elaborar un estudio transcriptómico de neuronas hipocampales sometidas a condición de excitotoxicidad por Glu y también en condición de neuroprotección con PRL, para elucidar genes y más vías involucrados en este complejo mecanismo y sus interacciones.
- ◇ Estudiar la interacción que podría presentar la vía de supervivencia neuronal PI3K/AKT y GSK3 β /NF- κ B con otras vías de señalización como ERK1/2 y STAT5.
- ◇ Ahondar en el papel que la mitocondria presenta en condición de neuroprotección inducida por PRL, puesto que en este trabajo observamos el involucramiento de *Nrf2*, gen de respuesta antioxidante.
- ◇ Identificar las funciones a nivel de regulación transcripcional que AKT en su forma fosforilada desencadena en respuesta al tratamiento con PRL.
- ◇ Contribuir con el estudio de alternativas terapéuticas en las cuales PRL sea un candidato viable para mitigar daños excitotóxicos, provocados en patologías como enfermedades neurodegenerativas.

11. Referencias

- Abramicheva, P.A., Smirnova, O. V., 2019. Prolactin Receptor Isoforms as the Basis of Tissue-Specific Action of Prolactin in the Norm and Pathology. *Biochem.* 84, 329–345. <https://doi.org/10.1134/S0006297919040011>
- Acosta, J.J., Muñoz, R.M., González, L., Subtil-Rodríguez, A., Domínguez-Cáceres, M.A., García-Martínez, J.M., Calcabrini, A., Lazaro-Trueba, I., Martín-Pérez, J., 2003. Src Mediates Prolactin-Dependent Proliferation of T47D and MCF7 Cells via the Activation of Focal Adhesion Kinase/Erk1/2 and Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathways. *Mol. Endocrinol.* 17, 2268–2282. <https://doi.org/10.1210/me.2002-0422>
- Alba-Betancourt, C., Luna-Acosta, J.L., Ramírez-Martínez, C.E., Avila-González, D., Granados-Ávalos, E., Carranza, M., Martínez-Coria, H., Arámburo, C., Luna, M., 2013. Neuro-protective effects of growth hormone (GH) after hypoxia-ischemia injury in embryonic chicken cerebellum. *Gen. Comp. Endocrinol.* 183, 17–31. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2012.12.004>
- Alfieri, A., Srivastava, S., Siow, R.C.M., Mado, M., Fraser, P.A., Mann, G.E., 2011. Targeting the Nrf2-Keap1 antioxidant defence pathway for neurovascular protection in stroke. *J. Physiol.* 589, 4125–4136. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.210294>
- Almeida, R.D., Manadas, B.J., Melo, C. V., Gomes, J.R., Mendes, C.S., Grãos, M.M., Carvalho, R.F., Carvalho, A.P., Duarte, C.B., 2005. Neuroprotection by BDNF against glutamate-induced apoptotic cell death is mediated by ERK and PI3-kinase pathways. *Cell Death Differ.* 12, 1329–1343. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401662>
- Anagnostou, I., Morales, T., 2019. Fatherhood diminishes hippocampal damaging action of excitotoxic lesioning in mice. *J. Neuroendocrinol.* 31, 0–3. <https://doi.org/10.1111/jne.12783>
- Anagnostou, I., Muñoz-Mayorga, D., Morales, T., 2021. Prolactin neuroprotective action against excitotoxic insult in the hippocampus of male mice. *Peptides* 135. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2020.170425>
- Anagnostou, I., Reyes-Mendoza, J., Morales, T., 2018. Glial cells as mediators of protective actions of prolactin (PRL) in the CNS. *Gen. Comp. Endocrinol.* 265, 106–110. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.01.024>
- Aoki, M., Wartenberg, P., Grünewald, R., Phillipps, H.R., Wyatt, A., Grattan, D.R., Boehm, U., 2019. Widespread Cell-Specific Prolactin Receptor Expression in Multiple Murine Organs. *Endocrinology* 160, 2587–2599. <https://doi.org/10.1210/en.2019-00234>
- Auriemma, R.S., Pirchio, R., De Alcubierre, D., Pivonello, R., Colao, A., 2019. Dopamine Agonists: From the 1970s to Today. *Neuroendocrinology* 109, 34–41. <https://doi.org/10.1159/000499470>
- Bakowska, J.C., Morrell, J.I., 2003. The distribution of mRNA for the short form of the prolactin receptor in the forebrain of the female rat. *Mol. Brain Res.* 116, 50–58. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(03\)00213-4](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(03)00213-4)
- Baltazar-Lara, R., Ávila-Mendoza, J., Martínez-Moreno, C.G., Carranza, M., Pech-Pool, S., Vázquez-Martínez, O., Díaz-Muñoz, M., Luna, M., Arámburo, C., 2020. Neuroprotective Effects of Growth Hormone (GH) and Insulin-Like Growth Factor Type 1 (IGF-1) after Hypoxic-Ischemic Injury in Chicken Cerebellar Cell Cultures. *Int. J. Mol. Sci.* 22. <https://doi.org/10.3390/ijms22010256>
- Baltazar-Lara, R., Zenil, J.M., Carranza, M., Ávila-Mendoza, J., Martínez-Moreno, C.G.,

- Arámburo, C., Luna, M., 2022. Growth Hormone (GH) Crosses the Blood-Brain Barrier (BBB) and Induces Neuroprotective Effects in the Embryonic Chicken Cerebellum after a Hypoxic Injury. *Int. J. Mol. Sci.* 23. <https://doi.org/10.3390/ijms231911546>
- Bano, D., Ankarcrona, M., 2018. Beyond the critical point: An overview of excitotoxicity, calcium overload and the downstream consequences. *Neurosci. Lett.* 663, 79–85. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.08.048>
- Belugin, S., Diogenes, A.R., Patil, M.J., Ginsburg, E., Henry, M.A., Akopian, A.N., 2013. Mechanisms of transient signaling via short and long prolactin receptor isoforms in female and male sensory neurons. *J. Biol. Chem.* 288, 34943–34955. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.486571>
- Ben-Jonathan, N., Mershon, J.L., Allen, D.L., Steinmetz, R.W., 1996. Extrapituitary prolactin: Distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocr. Rev.* 17, 639–669. <https://doi.org/10.1210/er.17.6.639>
- Bermea, K.C., Rodríguez-García, A., Tsin, A., Barrera-Saldaña, H.A., 2018. Somatolactogens and diabetic retinopathy. *Growth Horm. IGF Res.* 41, 42–47. <https://doi.org/10.1016/j.ghir.2018.02.002>
- Bernard, V., Young, J., Binart, N., 2019. Prolactin a pleiotropic factor in health and disease. *Nat. Rev. Endocrinol.* <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0194-6>
- Bhuiyan, M.I.H., Jung, S.Y., Kim, H.J., Lee, Y.S., Jin, C., 2011. Major role of the PI3K/Akt pathway in ischemic tolerance induced by sublethal oxygen-glucose deprivation in cortical neurons in vitro. *Arch. Pharm. Res.* 34, 1023–1034. <https://doi.org/10.1007/s12272-011-0620-3>
- Binart, N., 2017. Prolactin, Seventh Ed. ed, *The Pituitary: Fourth Edition.* Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804169-7.00005-2>
- Blondeau, N., Widmann, C., Lazdunski, M., Heurteaux, C., 2001. Activation of the nuclear factor- κ B is a key event in brain tolerance. *J. Neurosci.* 21, 4668–4677. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-13-04668.2001>
- Blume, A., Torner, L., Liu, Y., Subburaju, S., Aguilera, G., Neumann, I.D., 2009. Prolactin Activates Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling and Corticotropin Releasing Hormone Transcription in Rat Hypothalamic Neurons. *Endocrinology* 150, 1841–1849. <https://doi.org/10.1210/en.2008-1023>
- Bole-Feysot, C., Goffin, V., Edery, M., Binart, N., Kelly, P.A., 1998. Prolactin (PRL) and its receptor: Actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr. Rev.* 19, 225–268. <https://doi.org/10.1210/edrv.19.3.0334>
- Bolzán, A.D., Bianchi, M.S., Cónsole, G.M., Goya, R.G., 1997. Relationship between pituitary hormones, antioxidant enzymes, and histopathological changes in the mammary gland of senescent rats. *Exp. Gerontol.* 32, 297–304. [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(96\)00101-5](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(96)00101-5)
- Borba, V.V., Zandman-Goddard, G., Shoenfeld, Y., 2018. Prolactin and autoimmunity. *Front. Immunol.* 9, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00073>
- Brelje, T.C., Bhagroo, N. V., Stout, L.E., Sorenson, R.L., 2017. Prolactin and oleic acid synergistically stimulate β -cell proliferation and growth in rat islets. *Islets* 9, 49–62. <https://doi.org/10.1080/19382014.2017.1330234>
- Bridges, R.S., Grattan, D.R., 2019. 30 years after: CNS actions of prolactin: Sources,

- mechanisms and physiological significance. *J. Neuroendocrinol.* 31, 1–12. <https://doi.org/10.1111/jne.12669>
- Brooks, C.L., 2012. Molecular mechanisms of prolactin and its receptor. *Endocr. Rev.* 33, 504–525. <https://doi.org/10.1210/er.2011-1040>
- Brown, R.S.E., Aoki, M., Ladyman, S.R., Phillipps, H.R., Wyatt, A., Boehm, U., 2017. Prolactin action in the medial preoptic area is necessary for postpartum maternal nursing behavior 114, 10779–10784. <https://doi.org/10.1073/pnas.1708025114>
- Brown, R.S.E., Herbison, A.E., Grattan, D.R., 2015. Effects of Prolactin and Lactation on A15 Dopamine Neurones in the Rostral Preoptic Area of Female Mice. *J. Neuroendocrinol.* 27, 708–717. <https://doi.org/10.1111/jne.12297>
- Brown, R.S.E., Herbison, A.E., Grattan, D.R., 2011. Differential Changes in Responses of Hypothalamic and Brainstem Neuronal Populations to Prolactin During Lactation in the Mouse 836, 826–836. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.089185>
- Brown, R.S.E., Kokay, I.C., Herbison, A.E., Grattan, D.R., 2010. Distribution of prolactin-responsive neurons in the mouse forebrain. *J. Comp. Neurol.* 518, 92–102. <https://doi.org/10.1002/cne.22208>
- Brown, R.S.E., Piet, R., Herbison, A.E., Grattan, D.R., 2012. Differential actions of prolactin on electrical activity and intracellular signal transduction in hypothalamic neurons. *Endocrinology* 153, 2375–2384. <https://doi.org/10.1210/en.2011-2005>
- Brown, R.S.E., Wyatt, A.K., Herbison, R.E., Knowles, P.J., Ladyman, S.R., Binart, N., Banks, W.A., Grattan, D.R., 2016. Prolactin transport into mouse brain is independent of prolactin receptor. *FASEB J.* 30, 1002–1010. <https://doi.org/10.1096/fj.15-276519>
- Buonfiglio, D.C., Ramos-Lobo, A.M., Silveira, M.A., Furigo, I.C., Hennighausen, L., Frazão, R., Donato, J.J., 2015. Neuronal STAT5 signaling is required for maintaining lactation but not for postpartum maternal behaviors in mice. *Horm. Behav.* 71, 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2015.04.004>
- Cabrera-Reyes, E.A., Limón-Morales, O., Rivero-Segura, N.A., Camacho-Arroyo, I., Cerbón, M., 2017. Prolactin function and putative expression in the brain. *Endocrine* 57, 199–213. <https://doi.org/10.1007/s12020-017-1346-x>
- Cabrera-Reyes, E.A., Vanoye-Carlo, A., Rodríguez-Dorantes, M., Vázquez-Martínez, E.R., Rivero-Segura, N.A., Collazo-Navarrete, O., Cerbón, M., 2019. Transcriptomic analysis reveals new hippocampal gene networks induced by prolactin. *Sci. Rep.* 9, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50228-7>
- Cabrera, V., Cantú, D., Ramos, E., Vanoye-Carlo, A., Cerbón, M., Morales, T., 2009. Lactation is a natural model of hippocampus neuroprotection against excitotoxicity. *Neurosci. Lett.* 461, 136–139. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.06.017>
- Carretero, J., Sánchez-Robledo, V., Carretero-Hernández, M., Catalano-Iniesta, L., García-Barrado, M.J., Iglesias-Osma, M.C., Blanco, E.J., 2019. Prolactin system in the hippocampus. *Cell Tissue Res.* 375, 193–199. <https://doi.org/10.1007/s00441-018-2858-2>
- Chilton, B.S., Hewetson, A., 2005. Prolactin and Growth Hormone Signaling. *Curr. Top. Dev. Biol.* 68, 1–23. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(05\)68001-5](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(05)68001-5)
- Constantino, L.C., Binder, L.B., Vandresen-Filho, S., Viola, G.G., Ludka, F.K., Lopes, M.W., Leal, R.B., Tasca, C.I., 2018. Role of Phosphatidylinositol-3 Kinase Pathway in NMDA Preconditioning: Different Mechanisms for Seizures and Hippocampal

- Neuronal Degeneration Induced by Quinolinic Acid. *Neurotox. Res.* 34, 452–462. <https://doi.org/10.1007/s12640-018-9903-5>
- Costa-Brito, A.R., Gonçalves, I., Santos, C.R.A., 2022. The brain as a source and a target of prolactin in mammals. *Neural Regen. Res.* 17, 1695–1702. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.332124>
- Costa-Brito, A.R., Quintela, T., Gonçalves, I., Duarte, A.C., Costa, A.R., Arosa, F.A., Cavaco, J.E., Lemos, M.C., Santos, C.R.A., 2021. The Choroid Plexus Is an Alternative Source of Prolactin to the Rat Brain. *Mol. Neurobiol.* 58, 1846–1858. <https://doi.org/10.1007/s12035-020-02267-9>
- De Dios, N., Orrillo, S., Irizarri, M., Theas, M.S., Boutillon, F., Candolfi, M., Seilicovich, A., Goffin, V., Pisera, D., Ferraris, J., 2019. JAK2/STAT5 pathway mediates prolactin-induced apoptosis of lactotropes. *Neuroendocrinology* 108, 84–97. <https://doi.org/10.1159/000494975>
- de la Cadena, S.G., Hernández-Fonseca, K., Camacho-Arroyo, I., Massieu, L., 2014. Glucose deprivation induces reticulum stress by the PERK pathway and caspase-7- and calpain-mediated caspase-12 activation. *Apoptosis* 19, 414–427. <https://doi.org/10.1007/s10495-013-0930-7>
- De Moura, A.C., Lazzari, V.M., Becker, R.O., Gil, M.S., Ruthschilling, C.A., Agnes, G., Almeida, S., da Veiga, A.B.G., Lucion, A.B., Giovenardi, M., 2015. Gene expression in the CNS of lactating rats with different patterns of maternal behavior. *Neurosci. Res.* 99, 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2015.05.003>
- Devi, Y.S., Seibold, A.M., Shehu, A., Maizels, E., Halperin, J., Le, J., Binart, N., Bao, L., Gibori, G., 2011. Inhibition of MAPK by prolactin signaling through the short form of its receptor in the ovary and decidua: Involvement of a novel phosphatase. *J. Biol. Chem.* 286, 7609–7618. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.166603>
- DeVito, W.J., 1988. Distribution of immunoreactive prolactin in the male and female rat brain: Effects of hypophysectomy and intraventricular administration of colchicine. *Neuroendocrinology* 47, 284–289. <https://doi.org/10.1159/000124926>
- DeVito, W.J., Avakian, C., Stone, S., Ace, C.I., 1992. Estradiol increases prolactin synthesis and prolactin messenger ribonucleic acid in selected brain regions in the hypophysectomized female rat. *Endocrinology* 131, 2154–2160. <https://doi.org/10.1210/endo.131.5.1425416>
- Ding, B., Lin, C., Liu, Q., He, Y., Ruganzu, J.B., Jin, H., Peng, X., Ji, S., Ma, Y., Yang, W., 2020. Tanshinone IIA attenuates neuroinflammation via inhibiting RAGE/NF- κ B signaling pathway in vivo and in vitro. *J. Neuroinflammation* 17, 302. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01981-4>
- Ding, P., Chen, W., Yan, X., Zhang, J., Li, C., Zhang, G., Wang, Y., Li, Y., 2022. BMPER alleviates ischemic brain injury by protecting neurons and inhibiting neuroinflammation via Smad3-Akt-Nrf2 pathway. *CNS Neurosci. Ther.* 28, 593–607. <https://doi.org/10.1111/cns.13782>
- Djavaheri-Mergny, M., Javelaud, D., Wietzerbin, J., Besançon, F., 2004. NF- κ B activation prevents apoptotic oxidative stress via an increase of both thioredoxin and MnSOD levels in TNF α -treated Ewing sarcoma cells. *FEBS Lett.* 578, 111–115. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.10.082>
- Domínguez-Cáceres, M.A., García-Martínez, J.M., Calcabrini, A., González, L., González Porque, P., León, J., Martín-Pérez, J., 2004. Prolactin induces c-Myc expression and

- cell survival through activation of Src/Akt pathway in lymphoid cells. *Oncogene* 23, 7378–7390. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208002>
- Dong, Y.L., Pu, K.J., Duan, W.J., Chen, H.C., Chen, L.X., Wang, Y.M., 2018. Involvement of Akt/CREB signaling pathways in the protective effect of EPA against interleukin-1 β -induced cytotoxicity and BDNF down-regulation in cultured rat hippocampal neurons. *BMC Neurosci.* 19, 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12868-018-0455-7>
- Duc Nguyen, H., Pal Yu, B., Hoang, N.H.M., Jo, W.H., Young Chung, H., Kim, M.-S., 2022. Prolactin and Its Altered Action in Alzheimer’s Disease and Parkinson’s Disease. *Neuroendocrinology* 112, 427–445. <https://doi.org/10.1159/000517798>
- Dudek, H., Datta, S.R., Franke, T.F., Birnbaum, M.J., Yao, R., Cooper, G.M., Segal, R.A., Kaplan, D.R., Greenberg, M.E., 1997. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science* (80-.). 275, 661–665. <https://doi.org/10.1126/science.275.5300.661>
- Dymock, B.W., Yang, E.G., Chu-Farseeva, Y., Yao, L., 2014. Medicinal Chemistry Selective JAK inhibitors. *Futur. Med. Chem* 6, 1439–1471. <https://doi.org/10.4155/FMC.14.92>
- Emanuele, N. V., Jurgens, J.K., Halloran, M.M., Tentler, J.J., Lawrence, A.M., Kelley, M.R., 1992. The rat prolactin gene is expressed in brain tissue: detection of normal and alternatively spliced prolactin messenger RNA. *Mol. Endocrinol.* 6, 35–42. <https://doi.org/10.1210/mend.6.1.1738369>
- Ferraris, J., Boutillon, F., Bernadet, M., Seilicovich, A., Goffin, V., Pisera, D., 2012. Prolactin receptor antagonism in mouse anterior pituitary: Effects on cell turnover and prolactin receptor expression. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 302, 356–364. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00333.2011>
- Freeman, M.E., Kanyicska, L.A., Lerant, A., Nagy, G., 2000. Prolactin : Structure , Function , and Regulation of Secretion. *Am. Physiological Soc.* 80, 1523–1631. <https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.4.1523>
- Freemark, M., Driscoll, P., Andrews, J., Kelly, P.A., Royster, M., 1996. Ontogenesis of prolactin receptor gene expression in the rat olfactory system: Potential roles for lactogenic hormones in olfactory development. *Endocrinology* 137, 934–942. <https://doi.org/10.1210/endo.137.3.8603606>
- Fridmacher, V., Kaltschmidt, B., Goudeau, B., Ndiaye, D., Rossi, F.M., Pfeiffer, J., Kaltschmidt, C., Israël, A., Mémet, S., 2003. Forebrain-Specific Neuronal Inhibition of Nuclear Factor- κ B Activity Leads to Loss of Neuroprotection. *J. Neurosci.* 23, 9403–9408. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-28-09403.2003>
- Goffin, V., 2017. Prolactin receptor targeting in breast and prostate cancers: New insights into an old challenge. *Pharmacol. Ther.* 179, 111–126. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.05.009>
- Grattan, D.R., 2015. The hypothalamo-prolactin axis. *J. Endocrinol.* 226, T101–T122. <https://doi.org/10.1530/JOE-15-0213>
- Grattan, D.R., Kokay, I.C., 2008. Prolactin: A pleiotropic neuroendocrine hormone. *J. Neuroendocrinol.* 20, 752–763. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2008.01736.x>
- Gregg, C., 2009. Pregnancy, prolactin and white matter regeneration. *J. Neurol. Sci.* 285, 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2009.06.040>
- Hammer, A., Diakonova, M., 2015. Tyrosyl Phosphorylated Serine-Threonine Kinase PAK1 is a Novel Regulator of Prolactin-Dependent Breast Cancer Cell Motility and

- Invasion. *Adv. Exp. Med. Biol.* 846, 97–137. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-319-12114-7_5
- Harvey, S., Arámburo, C., Sanders, E.J., 2012. Extrapituitary production of anterior pituitary hormones: An overview. *Endocrine* 41, 19–30. <https://doi.org/10.1007/s12020-011-9557-z>
- Hernández-Fonseca, K., Cárdenas-Rodríguez, N., Pedraza-Chaverri, J., Massieu, L., 2008. Calcium-dependent production of reactive oxygen species is involved in neuronal damage induced during glycolysis inhibition in cultured hippocampal neurons. *J. Neurosci. Res.* 86, 1768–1780. <https://doi.org/10.1002/jnr.21634>
- Hirai, J., Nishita, M., Nakao, N., Saito, T.R., Tanaka, M., 2013. Regulation of Prolactin Receptor Gene Expression in the Rat Choroid Plexus via Transcriptional Activation of Multiple First Exons during Postnatal Development and Lactation. *Exp. Anim.* 62, 49–56. <https://doi.org/10.1538/expanim.62.49>
- Hsu, P.-C., Hour, T.-C., Liao, Y.-F., Hung, Y.-C., Liu, C.-C., Chang, W.-H., Kao, M.-C., Tsay, G.J., Hung, H.-C., Liu, G.-Y., 2006. Increasing ornithine decarboxylase activity is another way of prolactin preventing methotrexate-induced apoptosis: crosstalk between ODC and BCL-2. *Apoptosis* 11, 389–399. <https://doi.org/10.1007/s10495-006-4002-0>
- Hu, Y.S., Long, N., Pigino, G., Brady, S.T., Lazarov, O., 2013. Molecular Mechanisms of Environmental Enrichment: Impairments in Akt/GSK3 β , Neurotrophin-3 and CREB Signaling. *PLoS One* 8, e64460. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064460>
- Hui, Y., Chengyong, T., Cheng, L., Haixia, H., Yuanda, Z., Weihua, Y., 2018. Resveratrol Attenuates the Cytotoxicity Induced by Amyloid- β 1–42 in PC12 Cells by Upregulating Heme Oxygenase-1 via the PI3K/Akt/Nrf2 Pathway. *Neurochem. Res.* 43, 297–305. <https://doi.org/10.1007/s11064-017-2421-7>
- Huising, M.O., Kruiswijk, C.P., Flik, G., 2006. Phylogeny and evolution of class-I helical cytokines. *J. Endocrinol.* 189, 1–25. <https://doi.org/10.1677/joe.1.06591>
- Jayakumar, P., Martínez-Moreno, C.G., Lorensen, M.Y., Walker, A.M., Morales, T., 2022. Prolactin Attenuates Neuroinflammation in LPS-Activated SIM-A9 Microglial Cells by Inhibiting NF- κ B Pathways Via ERK1/2. *Cell. Mol. Neurobiol.* 42, 2171–2186. <https://doi.org/10.1007/s10571-021-01087-2>
- Kaech, S., Banker, G., 2006. Culturing hippocampal neurons. *Nat. Protoc.* 1, 2406–2415. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.356>
- Kaltschmidt, B., Kaltschmidt, C., 2009. NF- κ B in the Nervous System. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1, 1–13. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001271>
- Kang, J.H., Hassan, S.A., Zhao, P., Tsai-Morris, C.H., Dufau, M.L., 2014. Impact of subdomain D1 of the short form S1b of the human prolactin receptor on its inhibitory action on the function of the long form of the receptor induced by prolactin. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1840, 2272–2280. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.04.006>
- Kim, S.K., Woodcraft, K.J., Khodadadeh, S.S., Novak, R.F., 2004. Insulin signaling regulates γ -glutamylcysteine ligase catalytic subunit expression in primary cultured rat hepatocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 311, 99–108. <https://doi.org/10.1124/jpet.104.070375>
- Kirk, S.E., Grattan, D.R., Bunn, S.J., 2019. The Median Eminence Detects and Responds to Circulating Prolactin in the Male Mouse. *J. Neuroendocrinol.* e12733.

<https://doi.org/10.1111/jne.12733>

- Kirk, S.E., Xie, T.Y., Steyn, F.J., Grattan, D.R., Bunn, S.J., 2017. Restraint stress increases prolactin-mediated phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 5 in the hypothalamus and adrenal cortex in the male mouse. *J. Neuroendocrinol.* 29, 1–9. <https://doi.org/10.1111/jne.12477>
- Kisseleva, T., Bhattacharya, S., Braunstein, J., Schindler, C.W., 2002. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* 285, 1–24. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(02\)00398-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(02)00398-0)
- Kitagishi, Y., Nakanishi, A., Ogura, Y., Matsuda, S., 2014. Dietary regulation of PI3K/AKT/GSK-3 β pathway in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Res. Ther.* 6, 1–7. <https://doi.org/10.1186/alzrt265>
- Kochendoerfer, S.K., Krishnan, N., Buckley, D.J., Buckley, A.R., 2003. Prolactin regulation of Bcl-2 family members: Increased expression of bcl-xL but not mcl-1 or bad in Nb2-T cells. *J. Endocrinol.* 178, 265–273. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1780265>
- Kokay, I.C., Wyatt, A., Phillipps, H.R., Aoki, M., Ectors, F., Boehm, U., Grattan, D.R., 2018. Analysis of prolactin receptor expression in the murine brain using a novel prolactin receptor reporter mouse. *J. Neuroendocrinol.* 30, 0–1. <https://doi.org/10.1111/jne.12634>
- Krishnankutty, A., Kimura, T., Saito, T., Aoyagi, K., Asada, A., Takahashi, S.-I., Ando, K., Ohara-Imaizumi, M., Ishiguro, K., Hisanaga, S.-I., 2017. In vivo regulation of glycogen synthase kinase 3 β activity in neurons and brains. *Sci. Rep.* 7, 8602. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09239-5>
- Ladyman, S.R., Grattan, D.R., 2013. JAK-STAT and feeding. *JAK-STAT* 2, e23675. <https://doi.org/10.4161/jkst.23675>
- Lai, T.W., Zhang, S., Wang, Y.T., 2014. Excitotoxicity and stroke: Identifying novel targets for neuroprotection. *Prog. Neurobiol.* 115, 157–188. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.11.006>
- Lanzillotta, A., Porrini, V., Bellucci, A., Benarese, M., Branca, C., Parrella, E., Spano, P.F., Pizzi, M., 2015. NF- κ B in Innate Neuroprotection and Age-Related Neurodegenerative Diseases. *Front. Neurol.* 6, 98. <https://doi.org/10.3389/fneur.2015.00098>
- Larsen, C.M., Grattan, D.R., 2012. Prolactin, neurogenesis, and maternal behaviors. *Brain. Behav. Immun.* 26, 201–209. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.07.233>
- Larsen, C.M., Kokay, I.C., Grattan, D.R., 2008. Male pheromones initiate prolactin-induced neurogenesis and advance maternal behavior in female mice. *Horm. Behav.* 53, 509–517. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2007.11.020>
- Lee, H., Struman, I., Clapp, C., Martial, J., Weiner, R.I., 1998. Inhibition of urokinase activity by the antiangiogenic factor 16K prolactin: activation of plasminogen activator inhibitor 1 expression. *Endocrinology* 139, 3696–3703. <https://doi.org/10.1210/endo.139.9.6194>
- Leem, Y.H., Park, J.S., Chang, H., Park, J., Kim, H.S., 2019. Exercise Prevents Memory Consolidation Defects Via Enhancing Prolactin Responsiveness of CA1 Neurons in Mice Under Chronic Stress. *Mol. Neurobiol.* 56, 6609–6625. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-1560-z>
- Lerant, A., Freeman, M.E., 1998. Ovarian steroids differentially regulate the expression

- of PRL-R in neuroendocrine dopaminergic neuron populations: A double label confocal microscopic study. *Brain Res.* 802, 141–154. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(98\)00583-6](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(98)00583-6)
- Lerant, A., Kanyicska, B., Freeman, M.E., 2001. Nuclear translocation of STAT5 and increased expression of Fos related antigens (FRAs) in hypothalamic dopaminergic neurons after prolactin administration. *Brain Res.* 904, 259–269. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)02470-2](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)02470-2)
- Lévy, F., Gheusi, G., Keller, M., 2011. Plasticity of the parental brain: A case for neurogenesis. *J. Neuroendocrinol.* 23, 984–993. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2011.02203.x>
- Lewerenz, J., Maher, P., 2015. Chronic glutamate toxicity in neurodegenerative diseases—What is the evidence? *Front. Neurosci.* 9, 1–20. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00469>
- Lezoualc'h, F., Behl, C., 1998. Transcription factor NF-kappaB: friend or foe of neurons? *Mol. Psychiatry* 3, 15–20. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4000295>
- Li, M., Gao, W.W., Liu, L., Gao, Y., Wang, Y.F., Zhao, B., Xiong, X.X., 2020. The Akt/glycogen synthase kinase-3 β pathway participates in the neuroprotective effect of interleukin-4 against cerebral ischemia/reperfusion injury. *Neural Regen. Res.* 15, 1716–1723. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.276343>
- Liu, Q., Jin, Z., Xu, Z., Yang, H., Li, L., Li, G., Li, F., Gu, S., Zong, S., Zhou, J., Cao, L., Wang, Z., Xiao, W., 2019. Antioxidant effects of ginkgolides and bilobalide against cerebral ischemia injury by activating the Akt/Nrf2 pathway in vitro and in vivo. *Cell Stress Chaperones* 24, 441–452. <https://doi.org/10.1007/s12192-019-00977-1>
- Lyons, D.J., Hellysaz, A., Broberger, C., 2012. Prolactin regulates tuberoinfundibular dopamine neuron discharge pattern: Novel feedback control mechanisms in the lactotrophic axis. *J. Neurosci.* 32, 8074–8083. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0129-12.2012>
- Marano, R.J., Ben-Jonathan, N., 2014. Minireview: Extrapituitary prolactin: An update on the distribution, regulation, and functions. *Mol. Endocrinol.* 28, 622–633. <https://doi.org/10.1210/me.2013-1349>
- Matsuda, S., Ikeda, Y., Murakami, M., Nakagawa, Y., Tsuji, A., Kitagishi, Y., 2019. Roles of PI3K/AKT/GSK3 Pathway Involved in Psychiatric Illnesses. *Diseases* 7, 22. <https://doi.org/10.3390/diseases7010022>
- Matsuda, S., Nakagawa, Y., Tsuji, A., Kitagishi, Y., Nakanishi, A., Murai, T., 2018. Implications of PI3K/AKT/PTEN Signaling on Superoxide Dismutases Expression and in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Diseases* 6, 1–13. <https://doi.org/10.3390/diseases6020028>
- Mattson, M.P., 2005. NF-kB in the Survival and Plasticity of Neurons. *Neurochem. Res.* 30, 883–893. <https://doi.org/10.1007/s11064-005-6961-x>
- Mehta, A., Prabhakar, M., Kumar, P., Deshmukh, R., Sharma, P.L., 2012. Excitotoxicity : Bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. *Eur. J. Pharmacol.* 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.10.032>
- Meléndez García, R., Arredondo Zamarripa, D., Arnold, E., Ruiz-Herrera, X., Noguez Imm, R., Baeza Cruz, G., Adán, N., Binart, N., Riesgo-Escovar, J., Goffin, V., Ordaz, B., Peña-Ortega, F., Martínez-Torres, A., Clapp, C., Thebault, S., 2016. Prolactin protects retinal pigment epithelium by inhibiting sirtuin 2-dependent cell death.

- EBioMedicine 7, 35–49. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.03.048>
- Mena, F., Hummelt, G., Aguayo, D., Clapp, C., Martínez de la Escalera, G., Morales, M.T., 1992. Changes in molecular variants during in vitro transformation and release of prolactin by the pituitary gland of the lactating rat. *Endocrinology* 130, 3365–3377. <https://doi.org/10.1210/endo.130.6.1597148>
- Miyawaki, T., Mashiko, T., Ofengeim, D., Flannery, R.J., Noh, K.M., Fujisawa, S., Bonanni, L., Bennett, M.V.L., Zukin, R.S., Jonas, E.A., 2008. Ischemic preconditioning blocks BAD translocation, Bcl-xL cleavage, and large channel activity in mitochondria of postischemic hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 4892–4897. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800628105>
- Mödersheim, T.A.E., Gorba, T., Pathipati, P., Kokay, I.C., Grattan, D.R., Williams, C.E., Scheepens, A., 2007. Prolactin is involved in glial responses following a focal injury to the juvenile rat brain. *Neuroscience* 145, 963–973. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2006.12.053>
- Molina-Salinas, G., Rivero-Segura, N.A., Cabrera-Reyes, E.A., Rodríguez-Chávez, V., Langley, E., Cerbon, M., 2021. Decoding signaling pathways involved in prolactin-induced neuroprotection: A review. *Front. Neuroendocrinol.* 61, 100913. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2021.100913>
- Molina-Salinas, G., Rodríguez-Chávez, V., Langley, E., Cerbon, M., 2023. Prolactin-induced neuroprotection against excitotoxicity is mediated via PI3K/AKT and GSK3 β /NF- κ B in primary cultures of hippocampal neurons. *Peptides* 166, 171037. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2023.171037>
- Morales, T., Lorensen, M., Walker, A.M., Ramos, E., 2014. Both prolactin (PRL) and a molecular mimic of phosphorylated PRL, S179D-PRL, protect the hippocampus of female rats against excitotoxicity. *Neuroscience* 258, 211–217. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.11.015>
- Muñoz-Mayorga, D., Guerra-Araiza, C., Torner, L., Morales, T., 2018. Tau phosphorylation in female neurodegeneration: Role of estrogens, progesterone, and prolactin. *Front. Endocrinol.* 9, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00133>
- Nogami, H., Hoshino, R., Ogasawara, K., Miyamoto, S., Hisano, S., 2007. Region-specific expression and hormonal regulation of the first exon variants of rat prolactin receptor mRNA in rat brain and anterior pituitary gland. *J. Neuroendocrinol.* 19, 583–593. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2007.01565.x>
- Noshita, N., Lewén, A., Sugawara, T., Chan, P.H., 2001. Evidence of phosphorylation of Akt and neuronal survival after transient focal cerebral ischemia in mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 21, 1442–1450. <https://doi.org/10.1097/00004647-200112000-00009>
- Oláh, S., Cservenák, M., Keller, D., Fazekas, E.A., Renner, É., Lőw, P., Dobolyi, A., 2018. Prolactin-induced and neuronal activation in the brain of mother mice. *Brain Struct. Funct.* 223, 3229–3250. <https://doi.org/10.1007/s00429-018-1686-1>
- Ortiz-Pérez, A., Limón-Morales, O., Rojas-Castañeda, J.C., Cerbón, M., Picazo, O., 2019. Prolactin prevents the kainic acid-induced neuronal loss in the rat hippocampus by inducing prolactin receptor and putatively increasing the VGLUT1 overexpression. *Neurosci. Lett.* 694, 116–123. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.11.052>
- Patil, M., Hovhannisyan, A.H., Wangzhou, A., Mecklenburg, J., Koek, W., Goffin, V., Grattan, D., Boehm, U., Dussor, G., Price, T.J., Akopian, A.N., 2019. Prolactin

- receptor expression in mouse dorsal root ganglia neuronal subtypes is sex-dependent. *J. Neuroendocrinol.* 31, 0–2. <https://doi.org/10.1111/jne.12759>
- Patil, M.J., Henry, M.A., Akopian, A.N., 2014. Prolactin receptor in regulation of neuronal excitability and channels. *Channels* 8, 193–202. <https://doi.org/10.4161/chan.28946>
- Paut-Pagano, L., Roky, R., Valatx, J.L., Kitahama, K., Jouvet, M., 1993. Anatomical distribution of prolactin-like immunoreactivity in the rat brain. *Neuroendocrinology* 58, 682–695. <https://doi.org/10.1159/000126609>
- Pedrós, I., Petrov, D., Artiach, G., Abad, S., Ramon-Duaso, C., Sureda, F., Pallàs, M., Beas-Zarate, C., Folch, J., Camins, A., 2015. Adipokine pathways are altered in hippocampus of an experimental mouse model of Alzheimer’s disease. *J. Nutr. Heal. Aging* 19, 403–412. <https://doi.org/10.1007/s12603-014-0574-5>
- Pelkey, K.A., Chittajallu, R., Craig, M.T., Tricoire, L., Wester, J.C., McBain, C.J., 2017. Hippocampal GABAergic Inhibitory Interneurons. *Physiol. Rev.* 97, 1619–1747. <https://doi.org/10.1152/physrev.00007.2017>
- Perrot-Appianat, M., Gualillo, O., Pezet, A., Vincent, V., Edery, M., Kelly, P.A., 1997. Dominant negative and cooperative effects of mutant forms of prolactin receptor. *Mol. Endocrinol.* 11, 1020–1032. <https://doi.org/10.1210/mend.11.8.9954>
- Phillipps, H.R., Yip, S.H., Grattan, D.R., 2020. Patterns of prolactin secretion. *Mol. Cell. Endocrinol.* 502, 110679. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.110679>
- Pi, X., Voogt, J.L., 2002. Sex difference and estrous cycle: Expression of prolactin receptor mRNA in rat brain. *Mol. Brain Res.* 103, 130–139. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(02\)00194-8](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(02)00194-8)
- Pi, X.J., Grattan, D.R., 1998. Differential expression of the two forms of prolactin receptor mRNA within microdissected hypothalamic nuclei of the rat. *Mol. Brain Res.* 59, 1–12. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(98\)00109-0](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(98)00109-0)
- Popiolek-Barczyk, K., Mika, J., 2016. Targeting the Microglial Signaling Pathways: New Insights in the Modulation of. *Curr. Med. Chem.* 23, 2908–2928. <https://doi.org/10.2174/0929867323666160607120124>
- Rädler, P.D., Wehde, B.L., Wagner, K.U., Patrick D. Rädler, Barbara L. Wehde, and K.-U.W., 2017. Crosstalk between STAT5 activation and PI3K/AKT functions in normal and transformed mammary epithelial cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 451, 31–39. <https://doi.org/doi:10.1016/j.mce.2017.04.025>
- Reuwer, A.Q., Nowak-Sliwinska, P., Mans, L.A., van der Loos, C.M., von der Thüsen, J.H., Twickler, M.T.B., Spek, C.A., Goffin, V., Griffioen, A.W., Borensztajn, K.S., 2012. Functional consequences of prolactin signalling in endothelial cells: A potential link with angiogenesis in pathophysiology? *J. Cell. Mol. Med.* 16, 2035–2048. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01499.x>
- Rivero-Segura, N.A., Coronado-Mares, M.I., Rincón-Heredia, R., Pérez-Torres, I., Montiel, T., Pavón, N., Cabrera-Reyes, E.A., Massieu, L., Cerbón, M., 2019. Prolactin prevents mitochondrial dysfunction induced by glutamate excitotoxicity in hippocampal neurons. *Neurosci. Lett.* 701, 58–64. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.02.027>
- Rivero-Segura, N.A., Flores-Soto, E., De La Cadena, S.G., Coronado-Mares, I., Gomez-Verjan, J.C., Ferreira, D.G., Cabrera-Reyes, E.A., Lopes, L. V., Massieu, L., Cerbón, M., 2017. Prolactin-induced neuroprotection against glutamate excitotoxicity is mediated by the reduction of [Ca²⁺]_i overload and NF-κB activation. *PLoS One* 12,

- 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176910>
- Roof, A.K., Gutierrez-Hartmann, A., 2018. Consider the context: Ras/ERK and PI3K/AKT/mTOR signaling outcomes are pituitary cell type-specific. *Mol. Cell. Endocrinol.* 463, 87–96. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.04.019>
- Roselli, C.E., Bocklandt, S., Stadelman, H.L., Wadsworth, T., Vilain, E., Stormshak, F., 2008. Prolactin expression in the sheep brain. *Neuroendocrinology* 87, 206–215. <https://doi.org/10.1159/000114643>
- Sangeeta Devi, Y., Halperin, J., 2014. Reproductive actions of prolactin mediated through short and long receptor isoforms. *Mol. Cell. Endocrinol.* 382, 400–410. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.09.016>
- Sárvári, M., Kalló, I., Hrabovszky, E., Solymosi, N., Rodolosse, A., Vastagh, C., Auer, H., Liposits, Z., 2015. Hippocampal gene expression is highly responsive to estradiol replacement in middle-aged female rats. *Endocrinology* 156, 2632–2645. <https://doi.org/10.1210/en.2015-1109>
- Sattler, R., Tymianski, M., 2001. Molecular mechanisms of glutamate receptor-mediated excitotoxic neuronal cell death. *Mol. Neurobiol.* 24, 107–129. <https://doi.org/10.1385/MN:24:1-3:107>
- Schmidt, J.W., Wehde, B.L., Sakamoto, K., Triplett, A.A., Anderson, S.M., Tschlis, P.N., Leone, G., Wagner, K.-U., 2014. Stat5 Regulates the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt1 Pathway during Mammary Gland Development and Tumorigenesis. *Mol. Cell. Biol.* 34, 1363–1377. <https://doi.org/10.1128/mcb.01220-13>
- Shah, Z.A., Li, R.-C., Thimmulappa, R.K., Kensler, T.W., Yamamoto, M., Biswal, S., Doré, S., 2007. Role of reactive oxygen species in modulation of Nrf2 following ischemic reperfusion injury. *Neuroscience* 147, 53–59. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.02.066>
- Shih, A.Y., Li, P., Murphy, T.H., 2005. A small-molecule-inducible Nrf2-mediated antioxidant response provides effective prophylaxis against cerebral ischemia in vivo. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 10321–10335. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4014-05.2005>
- Shingo, T., Gregg, C., Enwere, E., Fujikawa, H., Hassam, R., Geary, C., Cross, J.C., Weiss, S., 2003. Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin. *Science* 299, 117–120. <https://doi.org/10.1126/science.1076647>
- Sivandzade, F., Prasad, S., Bhalerao, A., Cucullo, L., 2019. NRF2 and NF-κB interplay in cerebrovascular and neurodegenerative disorders: Molecular mechanisms and possible therapeutic approaches. *Redox Biol.* 21, 101059. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.11.017>
- Sjoeholm, A., Bridges, R.S., Grattan, D.R., Anderson, G.M., 2011. Region-, neuron-, and signaling pathway-specific increases in prolactin responsiveness in reproductively experienced female rats. *Endocrinology* 152, 1979–88. <https://doi.org/10.1210/en.2010-1220>
- Soriano, F.X., Papadia, S., Hofmann, F., Hardingham, N.R., Bading, H., Hardingham, G.E., 2006. Preconditioning doses of NMDA promote neuroprotection by enhancing neuronal excitability. *J. Neurosci.* 26, 4509–4518. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0455-06.2006>
- Tao, L., Li, D., Liu, H., Jiang, F., Xu, Y., Cao, Y., Gao, R., Chen, G., 2018. Neuroprotective

- effects of metformin on traumatic brain injury in rats associated with NF- κ B and MAPK signaling pathway. *Brain Res. Bull.* 140, 154–161. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.04.008>
- Teilum, K., Hoch, J.C., Goffin, V., Kinet, S., Martial, J.A., Kragelund, B.B., 2005. Solution Structure of Human Prolactin 810–823. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.06.042>
- Tejadilla, D., Cerbón, M., Morales, T., 2010. Prolactin reduces the damaging effects of excitotoxicity in the dorsal hippocampus of the female rat independently of ovarian hormones. *Neuroscience* 169, 1178–1185. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.05.074>
- Thébault, S., 2017. Potential mechanisms behind the antioxidant actions of prolactin in the retina. *Exp. Eye Res.* 160, 56–61. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2017.03.014>
- 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 Res.* 1725, 146472. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.146472>
- Tonelli, C., Chio, I.I.C., Tuveson, D.A., 2018. Transcriptional Regulation by Nrf2. *Antioxid. Redox Signal.* 29, 1727–1745. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7342>
- Torner, L., 2016. Actions of prolactin in the brain: From physiological adaptations to stress and neurogenesis to psychopathology. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 7:25, 1–6. <https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00025>
- Torner, L., Karg, S., Blume, A., Kandasamy, M., Kuhn, H.G., Winkler, J., Aigner, L., Neumann, I.D., 2009. Prolactin prevents chronic stress-induced decrease of adult hippocampal neurogenesis and promotes neuronal fate. *J. Neurosci.* 29, 1826–1833. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3178-08.2009>
- Torner, L., Neumann, I.D., 2002. The brain prolactin system: Involvement in stress response adaptations in lactation. *Stress* 5, 249–257. <https://doi.org/10.1080/1025389021000048638>
- Triebel, J., Bertsch, T., Bollheimer, C., Rios-Barrera, D., Pearce, C.F., Hüfner, M., Martínez de la Escalera, G., Clapp, C., 2015. Principles of the prolactin/vasoinhibin axis. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 309, R1193-203. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00256.2015>
- Triebel, J., Robles-Osorio, M.L., Garcia-Franco, R., de la Escalera, G.M., Clapp, C., Bertsch, T., 2017. From bench to bedside: Translating the prolactin/vasoinhibin axis. *Front. Endocrinol.* 8, 1–7. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00342>
- Uranga, R.M., Katz, S., Salvador, G.A., 2013. Enhanced phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt signaling has pleiotropic targets in hippocampal neurons exposed to iron-induced oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 288, 19773–19784. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.457622>
- Vaillant, A.R., Mazzoni, I., Tudan, C., Boudreau, M., Kaplan, D.R., Miller, F.D., 1999. Depolarization and neurotrophins converge on the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway to synergistically regulate neuronal survival. *J. Cell Biol.* 146, 955–966. <https://doi.org/10.1083/jcb.146.5.955>
- Vanoye-Carlo, A., Morales, T., Ramos, E., Mendoza-Rodríguez, A., Cerbón, M., 2008. Neuroprotective effects of lactation against kainic acid treatment in the dorsal hippocampus of the rat. *Horm. Behav.* 53, 112–123. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2007.09.004>

- Vergara-Castañeda, E., Grattan, D.R., Pasantes-Morales, H., Pérez-Domínguez, M., Cabrera-Reyes, E.A., Morales, T., Cerbón, M., 2016. Prolactin mediates neuroprotection against excitotoxicity in primary cell cultures of hippocampal neurons via its receptor. *Brain Res.* 1636, 193–199. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.02.011>
- Wang, L., An, H., Yu, F., Yang, J., Ding, H., Bao, Y., Xie, H., Huang, D., 2022. The neuroprotective effects of paeoniflorin against MPP(+)-induced damage to dopaminergic neurons via the Akt/Nrf2/GPX4 pathway. *J. Chem. Neuroanat.* 122, 102103. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2022.102103>
- Wang, L., Chen, Y., Sternberg, P., Cai, J., 2008. Essential roles of the PI3 kinase/Akt pathway in regulating Nrf2-dependent antioxidant functions in the RPE. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49, 1671–1678. <https://doi.org/10.1167/iovs.07-1099>
- Wang, X., Zhang, C., Szábo, G., Sun, Q.-Q., 2013. Distribution of CaMKII α expression in the brain in vivo, studied by CaMKII α -GFP mice. *Brain Res.* 1518, 9–25. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.04.042>
- Wilkanowska, A., Mazurowski, A., Mroczkowski, S., Kokoszyński, D., 2014. Prolactin (PRL) and prolactin receptor (PLR) genes and their role in poultry production traits. *Folia Biol. (Praha).* 62, 1–8. https://doi.org/10.3409/fb62_1.1
- Willard, S.S., Koochekpour, S., 2013. Glutamate, glutamate receptors, and downstream signaling pathways. *Int. J. Biol. Sci.* 9, 948–959. <https://doi.org/10.7150/ijbs.6426>
- Wu, Y.K., Fujishima, K., Kengaku, M., 2015. Differentiation of apical and basal dendrites in pyramidal cells and granule cells in dissociated hippocampal cultures. *PLoS One* 10, 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118482>
- Xu, F., Na, L., Li, Y., Chen, L., 2020. Roles of the PI3K/AKT/mTOR signalling pathways in neurodegenerative diseases and tumours. *Cell Biosci.* 10, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13578-020-00416-0>
- Xuan Nguyen, T. Le, Choi, J.W., Lee, S.B., Ye, K., Woo, S.-D., Lee, K.-H., Ahn, J.-Y., 2006. Akt phosphorylation is essential for nuclear translocation and retention in NGF-stimulated PC12 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 349, 789–798. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.08.120>
- Ycaza Herrera, A. and M.M., Mather, M., 2015. Actions and interactions of estradiol and glucocorticoids in cognition and the brain: Implications for aging women. *Alexandra. Neurosci. Biobehav. Rev.* 55, 36–52. <https://doi.org/doi:10.1016/j.neubiorev.2015.04.005>. Actions
- Yip, S.H., Romanò, N., Gustafson, P., Hodson, D.J., Williams, E.J., Kokay, I.C., Martin, A.O., Mollard, P., Grattan, D.R., Bunn, S.J., 2019. Elevated Prolactin during Pregnancy Drives a Phenotypic Switch in Mouse Hypothalamic Dopaminergic Neurons. *Cell Rep.* 26, 1787-1799.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.067>
- Yu, Z.F., Zhou, D., Bruce-Keller, A.J., Kindy, M.S., Mattson, M.P., 1999. Lack of the p50 subunit of nuclear factor-kb increases the vulnerability of hippocampal neurons to excitotoxic injury. *J. Neurosci.* 19, 8856–8865. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.19-20-08856.1999>
- Zhang, F., Phiel, C.J., Spece, L., Gurvich, N., Klein, P.S., 2003. Inhibitory phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) in response to lithium. Evidence for autoregulation of GSK-3. *J. Biol. Chem.* 278, 33067–33077. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212635200>

- Zhu, M., Liu, M., Guo, Q. lin, Zhu, C. qing, Guo, J. chun, 2018. Prolonged DADLE exposure epigenetically promotes Bcl-2 expression and elicits neuroprotection in primary rat cortical neurons via the PI3K/Akt/NF- κ B pathway. *Acta Pharmacol. Sin.* 39, 1582–1589. <https://doi.org/10.1038/aps.2018.7>
- Zhu, Y., Culmsee, C., Klumpp, S., Krieglstein, J., 2004. Neuroprotection by transforming growth factor- β 1 involves activation of nuclear factor- κ B through phosphatidylinositol-3-OH kinase/Akt and mitogen-activated protein kinase-extracellular-signal regulated kinase1,2 signaling pathways. *Neuroscience* 123, 897–906. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2003.10.037>

12. Suplementario

Curva dosis-respuesta ante el tratamiento con PRL. La administración del inhibidor de PI3K/AKT (LY294002) en combinación con PRL no afectó a la viabilidad de las neuronas del hipocampo.

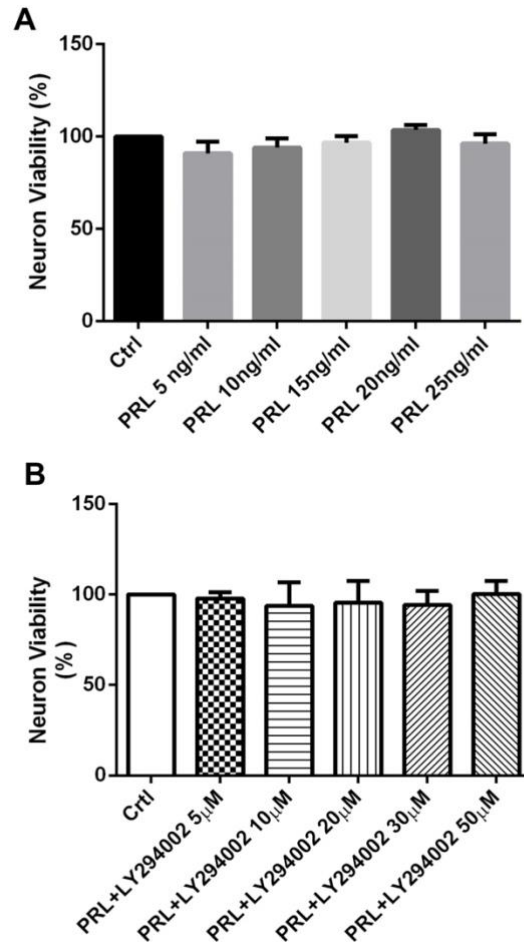


Fig 1S. La administración de PRL sola, y en combinación con el inhibidor de PI3K/AKT (LY294002) no afectó a la viabilidad de las neuronas del hipocampo. (A) Las neuronas del hipocampo se incubaron con diferentes dosis de PRL (1- 25 ng/ml), y la viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo de MTT, utilizamos una concentración de PRL de 20ng/ml para nuestros experimentos. (B) Experimento dosis-respuesta de tratamiento simultáneo con el inhibidor LY294002, y PRL no modificó la supervivencia de las neuronas en cultivos primarios de neuronas de hipocampo de rata. La viabilidad se evaluó mediante MTT (véase material y métodos). Los datos se expresan como la media

±DE, n=5 experimentos independientes. Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba *post hoc* de Dunnett.

Fig. 2S. Los cultivos primarios de neuronas del hipocampo están enriquecidos en neuronas y tienen cantidades mínimas de células gliales.

Los cultivos neuronales primarios de hipocampo se inmunotñeron para la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) para detectar la contaminación de células gliales del cultivo. Las células se trataron con PRL (20 ng/ml durante 3h), Glu (50 μ M durante 1h) y LY294002 (50 μ M durante 1h) o se trataron con combinaciones: PRL+Glu y LY294002+PRL+Glu, como se ha descrito previamente. Fotomicrografías representativas de neuronas del hipocampo inmunoteñidas con: Ctrl (a-d), PRL (e-h), Glu (i-l), PRL+Glu (m-p), LY294002+PRL+Glu (u-x). La proteína GFAP se muestra en rojo, indicando las células de la glía; PRLR se tiñe en verde, véanse las flechas blancas; los núcleos se tiñen en azul, utilizando el etiquetado DAPI. Barra de escala 37 μ m.

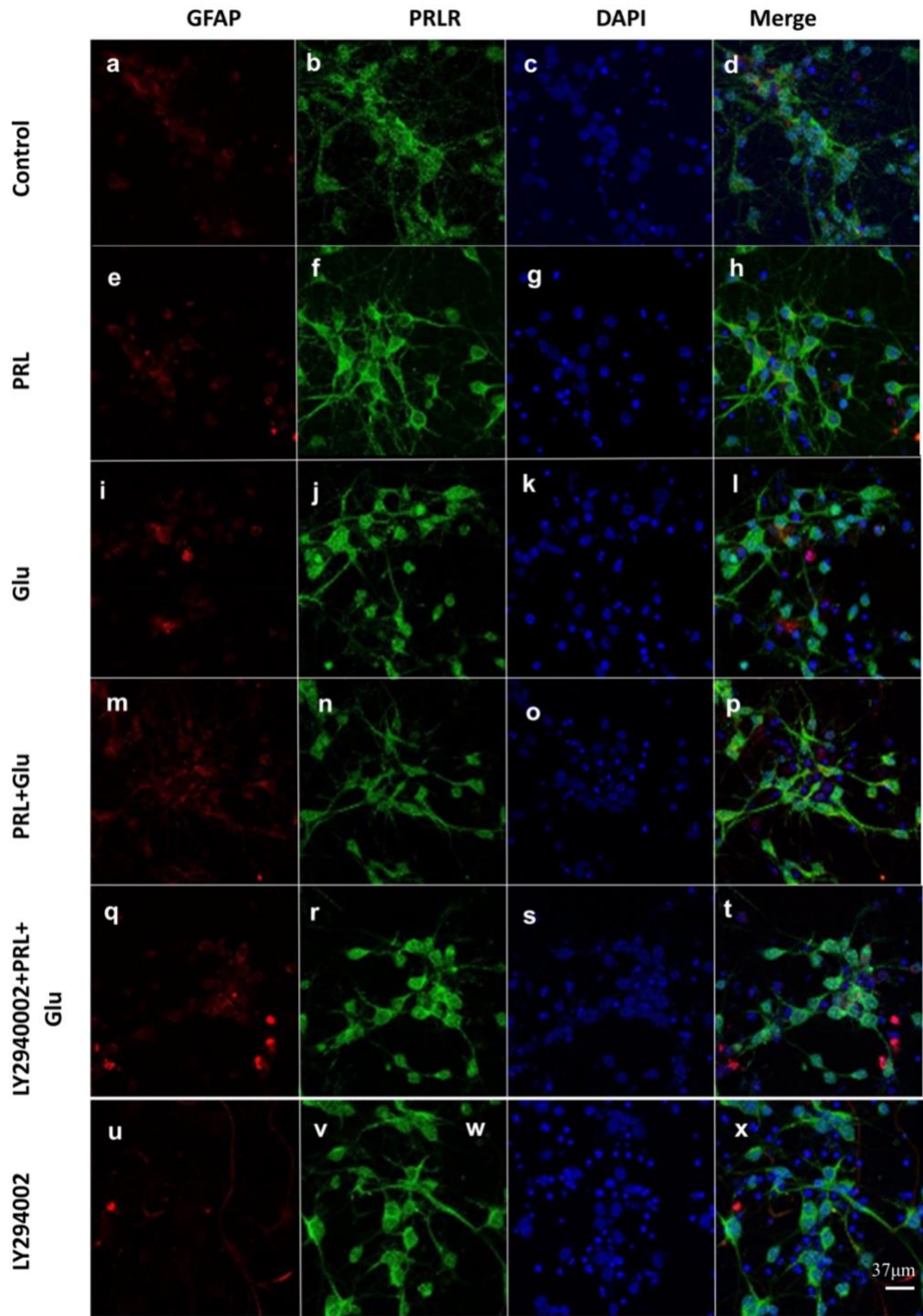


Tabla 1S. Se muestra las sondas utilizadas para los ensayos de RT-qPCR para los genes *Bcl-2* y *Nrf2* y el control endógeno *Hprt*.

Símbolo del Gen	Nombre del gen	Assay ID
<i>Bcl-2</i>	Regulador de la apoptosis Bcl2	Rn06267811_g1
<i>Nrf2</i>	Factor nuclear eritroide tipo 2	Rn00582415_m1
<i>Hprt</i>	Hipoxantina guanina fosforribosil transferasa	Rn-01527840_m1

Fig. 3S Extracción de ARN en cultivos primarios de neuronas hipocampales

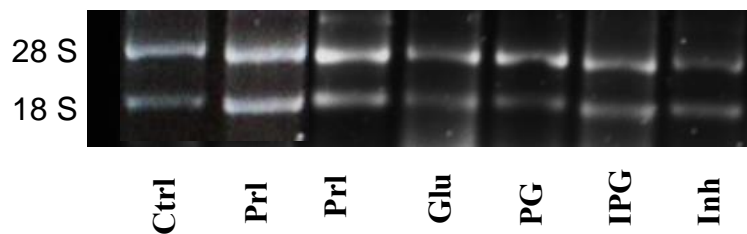
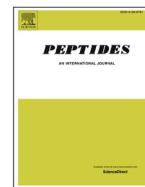


Fig 3S Extracción del ARN de neuronas hipocampales con diferentes tratamientos: PRL, Glu, PG, IPG e inhibidor LY294002. Se observa buena integridad de ARN en las subunidades 18s y 28S.

13. Anexo -Artículo Publicado-

Referencia: Molina-Salinas G, Rodríguez-Chávez V, Langley E and Cerbon M. 2023. Prolactin-induced neuroprotection against excitotoxicity is mediated via PI3K/AKT and GSK3 β /NF- κ B in primary cultures of hippocampal neurons. Peptides. 166. doi.org/10.1016/j.peptides.2023.171037



Prolactin-induced neuroprotection against excitotoxicity is mediated via PI3K/AKT and GSK3 β /NF- κ B in primary cultures of hippocampal neurons

G. Molina-Salinas^a, V. Rodríguez-Chávez^a, E. Langley^b, M. Cerbon^{a,*}

^a Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX, México 04510, Mexico

^b Subdirección de Investigación Básica, Instituto Nacional de Cancerología, CDMX, México 14080, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Prolactin
Neuroprotection
Excitotoxicity
PI3K/AKT
Hippocampal neurons

ABSTRACT

Prolactin (PRL) is a polypeptide hormone that has been reported to play a significant role in neuroprotection against neuronal excitotoxicity produced by glutamate (Glu) or kainic acid (KA) in both, *in vitro* and *in vivo* models. However, the molecular mechanisms involved in PRL's neuroprotective effects in the hippocampus have not been completely elucidated. The aim of the present study was to assess the signaling pathways involved in PRL neuroprotection against excitotoxicity. Primary rat hippocampal neuronal cell cultures were used to assess PRL-induced signaling pathway activation. The effects of PRL on neuronal viability, as well as its effects on activation of key regulatory pathways, phosphoinositide 3-kinases/Protein Kinase B (PI3K/AKT) and glycogen synthase kinase 3 β / nuclear factor kappa B (GSK3 β /NF- κ B), were evaluated under conditions of Glutamate-induced excitotoxicity. Additionally, the effect on downstream regulated genes such as *Bcl-2* and *Nrf2*, was assessed. Here, we show that the PI3K/AKT signaling pathway is activated by PRL treatment during excitotoxicity, promoting neuronal survival through upregulation of active AKT and GSK3 β /NF- κ B, resulting in induction of *Bcl-2* and *Nrf2* gene expression. Inhibition of the PI3K/AKT signaling pathway abrogated the protective effect of PRL against Glu-induced neuronal death. Overall, results indicate that the neuroprotective actions of PRL are mediated in part, by the activation of the AKT pathway and survival genes. Our data support the idea that PRL could be useful as a potential neuroprotective agent in different neurological and neurodegenerative diseases.

1. Introduction

The hippocampus is an area of the brain containing a high density of glutamate receptors [1]. Thus, it has been widely used for the study of glutamatergic neuronal damage due to its selective sensitivity to excitotoxic stimuli [2]. Several approaches to mitigate Glu excitotoxicity, which is present in many neurological and neurodegenerative diseases, have been considered. For example, different natural and synthetic compounds have been studied such as curcumin and synthetic 12-amino acid peptide, among many others [3,4]. Furthermore, several hormones have become relevant in this process, particularly prolactin (PRL); a pleiotropic hormone with more of 300 associated functions [5]. Our group and others have reported that PRL plays a significant role in neuroprotection against excitotoxic damage produced by glutamate

(Glu) or kainic acid (KA) in both, *in vitro* and *in vivo* models [6–9]. Particularly, *in vitro* studies using primary neuronal cultures from the hippocampus have shown a significant survival rate against glutamate-induced excitotoxic insult after treatment with PRL. This neuroprotective effect is mediated *via* its receptor (PRLR) [10], indicating that PRL induced intracellular pathway activation is necessary [11]. Additional studies suggest that this involves intracellular pathways related to anti-apoptotic-molecules such B-Cell CLL/Lymphoma 2 (Bcl-2) and the activation of nuclear factor- κ B (NF- κ B), as well as mechanisms of intracellular Ca²⁺ restoration [6].

It is well known that the classic mechanism of PRL action involves activation of Janus kinase 2/ signal transducer and activator of transcription 5 (JAK2/STAT), mitogen-activated protein kinases (MAPKs), and Phosphatidylinositol 3-kinase/ Protein kinase B (PI3K/AKT)

Abbreviations: AD, Alzheimer's disease; AKT, Protein kinase B; Bcl-2, B-cell lymphoma 2; E2, 17 β -estradiol; GFAP, Glial fibrillary acidic protein; Glu, Glutamate; JAK2, Janus kinase 2; KA, Kainic acid; MAPK, Mitogen-activated protein kinase; NF- κ B, Factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells; Nrf2, Nuclear factor erythroid 2-related factor 2; PI3K, Phosphatidylinositol 3-kinase; PRL, Prolactin; PRLR, prolactin receptor; STAT5, Signal transducer and activator of transcription 5; TIDA, Tuberoinfundibular dopamine neurons; TG, Trigeminal neurons.

* Corresponding author.

E-mail addresses: mcerbon85@yahoo.com.mx, marcocerbon@quimica.unam.mx (M. Cerbon).

<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2023.171037>

Received 28 February 2023; Received in revised form 15 May 2023; Accepted 3 June 2023

Available online 8 June 2023

0196-9781/© 2023 Published by Elsevier Inc.

pathways. These pathways are involved in survival, metabolism, and cell proliferation [5,11]. However, the molecular mechanisms involved in PRL's neuroprotective effects against Glu excitotoxicity in the hippocampus via different signaling pathways require clarification. The aim of this study was to assess PRL activated signaling pathways involved in promoting neuronal survival of hippocampal neurons against Glu excitotoxicity.

2. Methods

2.1. Animals

Forty pregnant Wistar rats with 17–18 days of gestation were used throughout this study. Rats were individually housed under a controlled temperature and photoperiod (12:12 h light: dark cycle, lights on at 06:00), with food and water available *ad libitum* with Rat Chow TM. Pregnant rats were used to obtain fetuses (10–12), whose hippocampi were dissected for preparation of primary neuronal cultures as described in detail below. All experiments were performed in strict adherence with the international rules set by the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH publication N0. 80–23 revised in 1996). This protocol was approved by the Animal Care committee (CICUAL) of the School of Chemistry at the National Autonomous University of Mexico. All efforts were made to minimize animal suffering.

2.2. Hippocampal primary neuronal cultures

Hippocampal primary neuronal cultures were prepared from Wistar rat fetuses of 17–18 days of gestation, as previously described [12]. In brief, after the pregnant rat was sacrificed, the brains of the fetuses were dissected under stereoscopic microscopy. 10–12 hippocampi were obtained and mechanically homogenized. Hippocampal tissue was incubated in 0.10% trypsin solution (25200056, Gibco Life Technologies, Grand Island, USA), and DNase (Sigma-Aldrich, D5025) (0.08%) for tissue disaggregation. The reaction was stopped by addition of trypsin inhibitor (A4736401, Gibco Life Technologies, Grand Island, USA). Finally, cells were suspended in Neurobasal medium (21103049, Gibco), supplemented with 0.2% B-27 (17504044, Gibco) with Antioxidants, 20 µg/ml gentamicin (15710064, Gibco), and 0.5 mM L-Glutamine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Cells were cultured and plated at a density of 2.1×10^6 cells/well in 6-well plates for protein isolation, 8×10^5 cells/well in 12-well plates for immunofluorescence, and 2×10^5 cells/well in 24-well plates for MTT viability assays. The plates were pretreated with poly-L-Lys at 5 µg/ml (P1339 Sigma-Aldrich). Cultures were incubated at 37 °C in a humidified, 5% CO₂ / 95% air atmosphere. At 4 days *in vitro* (DIV), 500 µL of fresh Neurobasal medium was added, and cells were cultured for 4 more days (8 DIV), after which they were used for experiments. Cells were treated with cytosine arabinoside (AraC) (0.75 µM) (P1768 Sigma-Aldrich) to inhibit glial cell proliferation. Cultured primary neuronal cells obtained by this method were used in all experiments performed.

2.3. Treatments in primary cell culture neurons

At 8 DIV, cells were treated with PRL (20 ng/ml) from sheep pituitary (L6520–1000IU, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) solubilized in sterile saline solution or vehicle. Treatments with PRL in time course experiments were performed for 5, 15, 30 min, 1 h, 3 h, 6 h and 24 h. Cultures were either pretreated or not with PRL for 1 or 3 h and then, exposed to Glu (50 µM) for 1 h. Additionally, other cultures were pretreated with PI3K inhibitor LY294002 (50 µM for 1 h). The inhibitor was added either alone or in combination with Glu and/or PRL. After treatments, the medium containing PRL and/or Glu and/or LY294002 inhibitor, was withdrawn and fresh neurobasal medium was added. After a period of 24 h, cell damage was evaluated with a MTT reduction

assay according to the literature [13]. The experimental groups with hippocampal primary neuronal cultures for this study were: Vehicle (Ctrl), prolactin (PRL), glutamate (Glu), the combination of pretreatment with PRL and subsequent administration of Glu (PRL+Glu) or PI3K/AKT pathway inhibitor (LY294002), and the combination of all three (LY294002 +PRL+Glu). These treatments were performed at the times and concentrations previously mentioned. Subsequently, cultured hippocampal neurons were used for cell viability and immunofluorescence assays, or to obtain total protein and RNA for western blot or RT-qPCR assays, respectively.

2.4. Cell viability

Cell viability was evaluated using the MTT assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium) (M2128–1 G, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), as previously described [13]. MTT is actively metabolized to formazan by functional mitochondria, which can then be detected using a colorimetric assay. In brief, neurons were plated at a density of 2×10^5 cells/well in 24 well plates. Once the medium containing each of the treatments was removed, fresh neurobasal medium was added for a period of 24 h. Then, 24 µL of MTT (2.5 mg/ml) reagent was administered directly to each well and incubated for 1 h at 37 °C in a humidified 5% CO₂ / 95% air atmosphere. The medium was then aspirated, and the precipitated formazan salt was solubilized in 500 µL of acid isopropanol. The absorbance of the formazan salt was read at 570 nm on a plate reader (EPOC, BioTek, Wisconsin, USA).

2.5. Immunofluorescence

Neurons were cultured on round glass coverslips in 12 well plates. Immediately, after treatments, they were washed with 1X PBS and fixed with PFA (4%) for 30 min. Then, neurons were permeabilized with 0.05% Triton X-100 in PBS for 20 min at room temperature and incubated with blocking solution (10% bovine serum albumin, 1% Triton X-100 and 0.05% Tween 20 in PBS) for 1 h. Cells were then incubated with the corresponding primary antibodies: polyclonal anti-NeuN (1:250, Ab104225, Abcam, USA), pAKT (ser476) (1:250; Cell Signaling Technology, S473), PRLR (1:250; Santa Cruz Biotechnology SC-74529), GFAP (1:200; Santa Cruz Biotechnology SC-) and p65 (NF-κB) (1:200; Santa Cruz Biotechnology SC-5563), overnight at 4 °C. The cells were washed and incubated with anti-rabbit antibody conjugated with Alexa fluor 568 (1:500, Invitrogen, A10040) or anti-mouse antibody Alexa fluor 488 (1:500 Invitrogen, C10425) for 1 h. After washing, the nuclei were stained for 5 min in a 1 µL/ml 6-diamidino-2-phenylindole-dihydrochloride (DAPI) solution (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany). Glass coverslips with the hippocampal neurons were mounted on glass slides with mounting medium (DAKO, Santa Clara, CA, USA). Immunofluorescent staining was analyzed and images were collected with a LSM 710-Zeiss confocal microscope, with a 60x immersion objective. Fluorescence was processed with the Fiji ImageJ software.

2.6. Western blotting

After the different treatments applied on day 9, the cells cultured in 6-well plates were washed with 1X PBS and lysed in RIPA lysis buffer (1X PBS pH 7.2, 1% NP40, 0.1% SDS, and 0.05% sodium deoxycholate) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented with 5 mM protease and phosphatase inhibitor cocktail (mini-Complete, Roche, Mannheim, Germany). Protein concentration was determined by the Lowry method (DC protein assay, BioRad, CA, USA) and 40 µg of protein sample were resuspended in loading buffer (5% β-mercaptoethanol, 0.1% glycerol, and 0.01% Bromophenol blue) (BioRad, USA) and loaded into 10% or 15% SDS-polyacrylamide gels (BioRad, USA). Protein separation was performed under denaturing conditions. Proteins were transferred to nitrocellulose membranes (88018 Thermo Scientific, Germany) by

electrophoresis. Membranes were blocked with 1X TBS buffer containing 5% nonfat dry milk and 1% Tween-20 for 1 h at room temperature and then incubated overnight at 4 °C in blocking buffer containing polyclonal primary antibodies: anti-pAKT (1:500; Cell Signaling Technology), anti-AKT (1:500; Santa Cruz Biotechnology SC-81434), anti-GAPDH (1:1000; Santa Cruz Biotechnology SC-25778), and anti- β -actin (1:1000; Santa Cruz Biotechnology SC-47778). The membranes were washed and incubated with the appropriate fluorescence-conjugated secondary antibody for 1 h: anti-rabbit (1:15000 LI-COR 925–68073) and anti-mouse (1:15000 LI-COR 925–32210). Antibodies were detected with an Odyssey imaging system (LI-COR, Biosciences). Densitometry analysis was performed with Image Studio™ Lite (Ver. 5.2, LI-COR Biosciences). Protein content was normalized against β -Actin or GAPDH. Control values were normalized to 100% and the density of the bands is expressed as percent of control values.

2.7. RNA extraction

RNA was extracted from primary cultures of hippocampal neurons using TRIZOL reagent (ABP Biosciences; #FP313, Virginia, USA) according to manufacturer's instructions. The resulting RNA pellet was eluted in 30 μ L of RNase-free water and the quality and yield of isolated RNA were determined by Qubit RNA (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). The RNA was quantified on a NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, USA). For cDNA synthesis, 1 μ g of RNA was reverse-transcribed using Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, USA) according to the manufacturer's instructions, using oligo(dT) primers.

2.8. RT-qPCR

The genes subjected to analyses were *Bcl-2* and *Nrf2*. RT-qPCR was performed using TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) under the following conditions: 95 °C for 20 s followed by 40 cycles of 95 °C for 1 s and 60 °C for 20 s. RT-qPCR was performed using a StepOne Plus Real Time PCR system (Applied Biosystems, USA). All results were normalized to the *Hprt* control for analysis. Sequence Detection Software CFX maestro (Bio-Rad) was used for data analysis. The comparative CT method ($2^{-\Delta\Delta CT}$) was used to calculate the relative changes in target gene expression. The average and standard deviation of $2^{-\Delta\Delta CT}$ were calculated for three independent experiments in triplicate. Applied Biosystems supplied the probes for all genes. All assays were purchased from Applied Biosystems (see Supplementary Table for the primer sequences).

2.9. Statistical analysis

All data were analyzed using the Graphpad Prism® software (RRID: SCR_002798). Bars represent the mean \pm SD from 4 independent experiments. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Dunnett's *post hoc* test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ to compare the effect between control and groups and # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ to determine intergroup differences vs PRL. To compare PRL+Glu vs Glu damage, significance data was † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$, ††† $p < 0.001$; and to determine intergroup differences vs PRL+Glu we used † $p < 0.05$; †† $p < 0.01$; ††† $p < 0.001$.

3. Results

3.1. PRLR expression in primary cultures of hippocampal neurons

First, to determine PRLR expression and verify the quality of our primary hippocampal neuronal cell cultures, we performed immunofluorescence assays to detect neuronal expression of PRLR and its colocalization with the neuronal marker, NeuN, under different treatments. The treatments used throughout this study were vehicle, PRL, Glu

to induce neuronal damage, and the combination PRL+Glu to determine the effect of PRL pretreatment in rescuing the neuronal cultures from Glu excitotoxicity. As depicted in Fig. 1, both vehicle (Fig. 1a-d) and PRL treatments at a concentration of 20 ng/ml for 3 h (Fig. 1e-h), show higher PRLR labeling intensity compared to Glu treated cells (50 μ M for 1 h) (Fig. 1i-l). Additionally, the arrowheads indicate both cytoplasmic and nuclear localization. Glu treatment alone caused a reduction in PRLR and promoted a different PRLR localization pattern, being more cytoplasmic than nuclear. However, PRLR localization remained homogeneous when cells were treated with PRL previous to addition of Glu (PRL+Glu) (Fig. 1, m-p).

To determine the role of the PI3K/AKT signaling pathway, treatments with the PI3K inhibitor, LY294002, in the presence and absence of PRL+Glu were carried out. The inhibitor alone reduced PRLR intensity. Treatments with LY294002 +PRL+Glu (Fig. 1, q-t) also showed homogeneous PRLR localization.

The concentration of 20 ng/ml PRL used for our assays was determined from a dose-response assay (Supplementary Fig 1A) showing that this dose alone did not affect neuronal viability. Also, we observed that administration of LY294002 inhibitor in combination with PRL did not affect the viability of the neurons (Supplementary Fig 1B).

3.2. PRL and PI3/AKT pathway inhibitor treatments do not modify hippocampal cell viability

Once we observed that neurons from our primary hippocampal cultures showed PRLR protein expression, we proceeded to study the PI3K/AKT pathway as a possible PRL downstream regulatory signaling pathway. MTT assays were performed to determine whether inhibiting the PI3K/AKT pathway could alter the viability of primary hippocampal neuronal cultures. This assay determines mitochondrial activity as an indirect measure of neuronal survival to treatments in time course experiments (Fig. 2). We observed that exposure to PRL at a concentration of 20 ng/ml from 5 min to 24 h of treatment does not affect the survival of hippocampal neurons (Fig. 2A). Furthermore, administration of increasing concentrations of the PI3K inhibitor, LY294002 (5–50 μ M), did not affect cell viability, as observed in Fig. 2B. Therefore, we determined a concentration of 50 μ M of LY294002 could be used for the following assays.

3.3. PRL induced neuroprotection against Glu-induced excitotoxicity on cultured hippocampal neurons is abrogated by inhibiting the PI3K/AKT pathway

To test the neuroprotective effects induced by PRL on hippocampal neurons, excitotoxic damage was induced by Glu administration after PRL treatment. Additionally, the involvement of the PI3K/AKT pathway was assessed. Initially, a series of experiments were performed to determine the ability of different concentrations of Glu to induce neuronal damage (Fig. 3A), by assessing neuronal viability. We observed that treatment with 30 μ M or 50 μ M Glu reduces cell viability by 20% and 30%, respectively, as compared to the control. We then carried out cell viability assays to evaluate the neuroprotection induced when adding PRL (20 ng/ml for 1 h and 3 h) previous to excitotoxic damage caused by Glu (50 μ M for 1 h), in primary cultures of hippocampal neurons. Our aim was to produce moderate neuronal damage to the hippocampal neurons and determine the rescue effect of prolactin, as well as the signaling mechanisms involved. Therefore, we chose a concentration of 50 μ M Glu, since it reduced neuronal viability by more than 30%. PRL pre-treatment for 1 h and 3 h almost completely rescued the cells from Glu-induced damage (PRL+Glu, Fig. 3B, C). As shown previously, the PI3K inhibitor, LY294002 (50 μ M) alone, does not affect cell survival; however, PRL protection against Glu excitotoxicity was abrogated in the presence of LY294002 (LY294002 +PRL+Glu) (Fig. 3B). Similar inhibition of PRL-induced neuroprotection was observed with 3 h of PRL treatment before adding LY294002 and Glu,

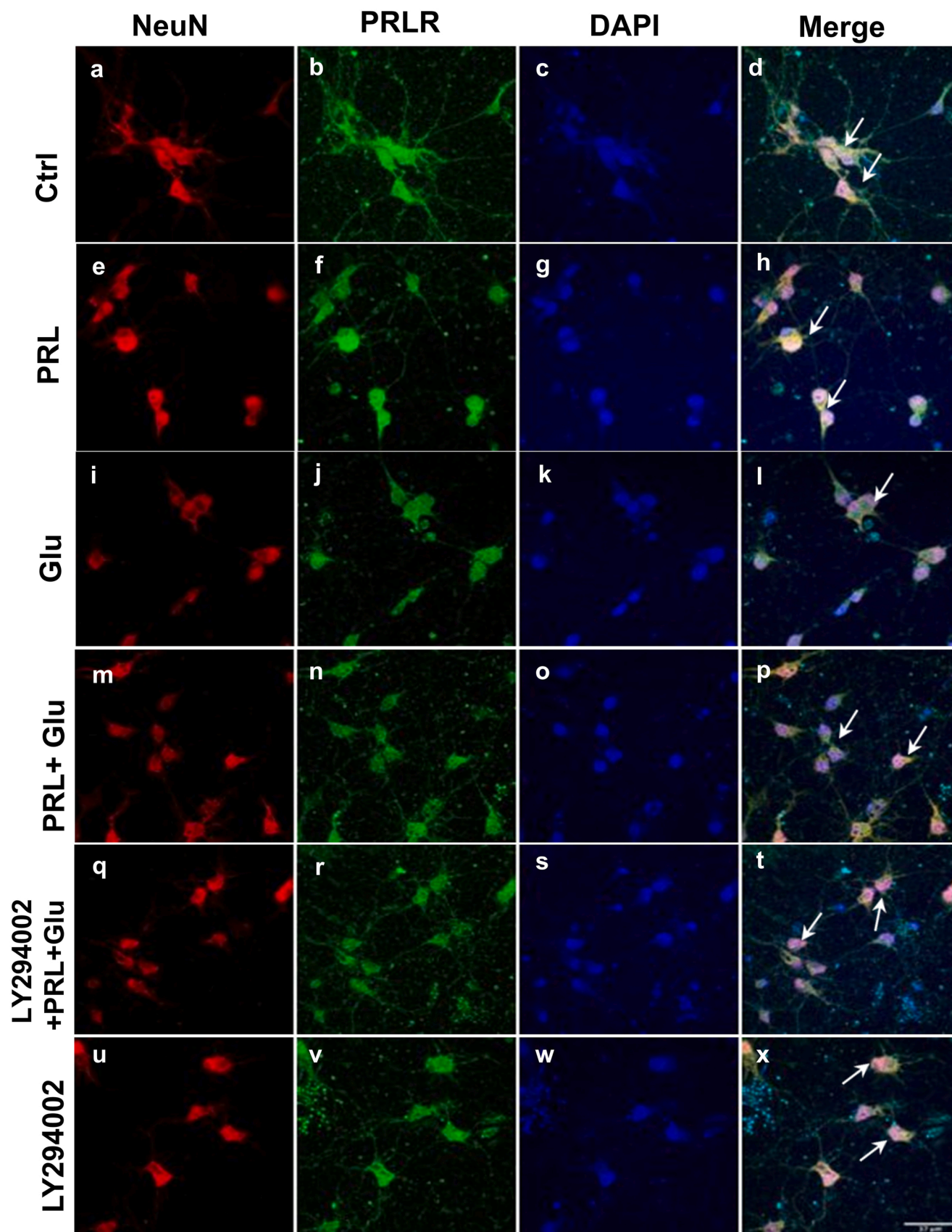


Fig. 1. PRLR expression in cultures of hippocampal neurons. Representative photomicrographs of PRLR and NeuN immuno-stained hippocampal neurons. Ctrl (a-d), PRL (e-h), Glu (i-l), PRL+Glu (m-p), LY294002 +PRL+Glu (u-x). In red, NeuN protein is shown for neuron visualization; green shows PRLR protein labelling, (white arrows); nuclei were stained with DAPI labelling shown in blue. Scale bar 37 μ m. Neuronal cultures were exposed to PRL (20 ng/ml for 3 h), Glu (50 μ M for 1 h) and LY294002 (50 μ M for 1 h) or were treated with combinations: PRL+Glu and LY294002 +PRL+Glu, as previously described.

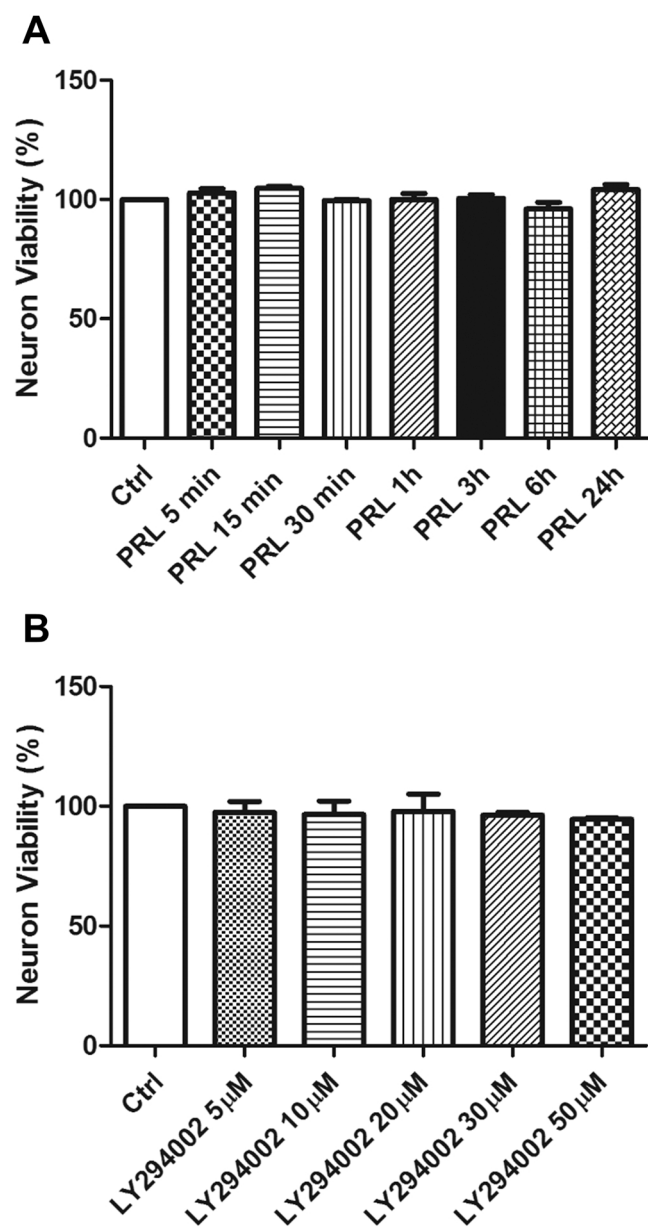


Fig. 2. Effect of PRL and LY294002 treatments on hippocampal neuron viability on time course and concentrations experiments. Viability assays were carried out on primary hippocampal neuronal cultures exposed to different treatments: A) Time course of PRL treatment (20 ng/ml) does not affect neuronal viability at different times up to 24 h (5 min to 24 h). B) Administration of increasing concentrations (5–50 μ M for 1 h) of PI3K inhibitor, LY294002, does not affect cell viability, as determined by MTT reduction assay (see materials and methods section). Control indicates untreated cells. Data are expressed as the mean \pm SD, n = 6 independent experiments in triplicate. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Dunnett's *post hoc* test.

showing a reduction in cell survival of 30% (Fig. 3C).

3.4. PI3K/AKT pathway activation by PRL treatment during neuroprotection against Glu-induced excitotoxic damage in rat cultured hippocampal neurons

After observing that inhibition of the PI3K/AKT pathway reduced neuroprotection exerted by PRL, we proceeded to analyze the activation of the effectors of this signaling pathway. We found that in the presence of PRL, alone or in combination, there was AKT phosphorylation (Fig. 4 A). Indeed, treatment with Glu or LY294002 alone reduced AKT

phosphorylation. In contrast, the triple treatment (LY294002 +PRL+Glu) restored AKT phosphorylation at similar levels to those of the control, suggesting that PRL is able to activate AKT phosphorylation, despite the presence of the inhibitor (Fig. 4A). A similar pattern of activation was observed for phosphorylation of its effector, PI3K, in the presence of PRL, showing PI3K phosphorylation at Tyr 458 and Tyr 199 residues. Conversely, Glu and LY294002 treatments alone, trigger a significant reduction in PI3K phosphorylation compared to PRL administration and control. However, PRL treatment can restore PI3K phosphorylation even in the presence of the pathway inhibitor (Fig. 4B). K5 + and K5- cerebellar neurons, are used as positive and negative controls, respectively, for both, AKT and PI3K protein phosphorylation.

3.5. PRL administration in primary cultures of hippocampal neurons promotes nuclear pAKT localization

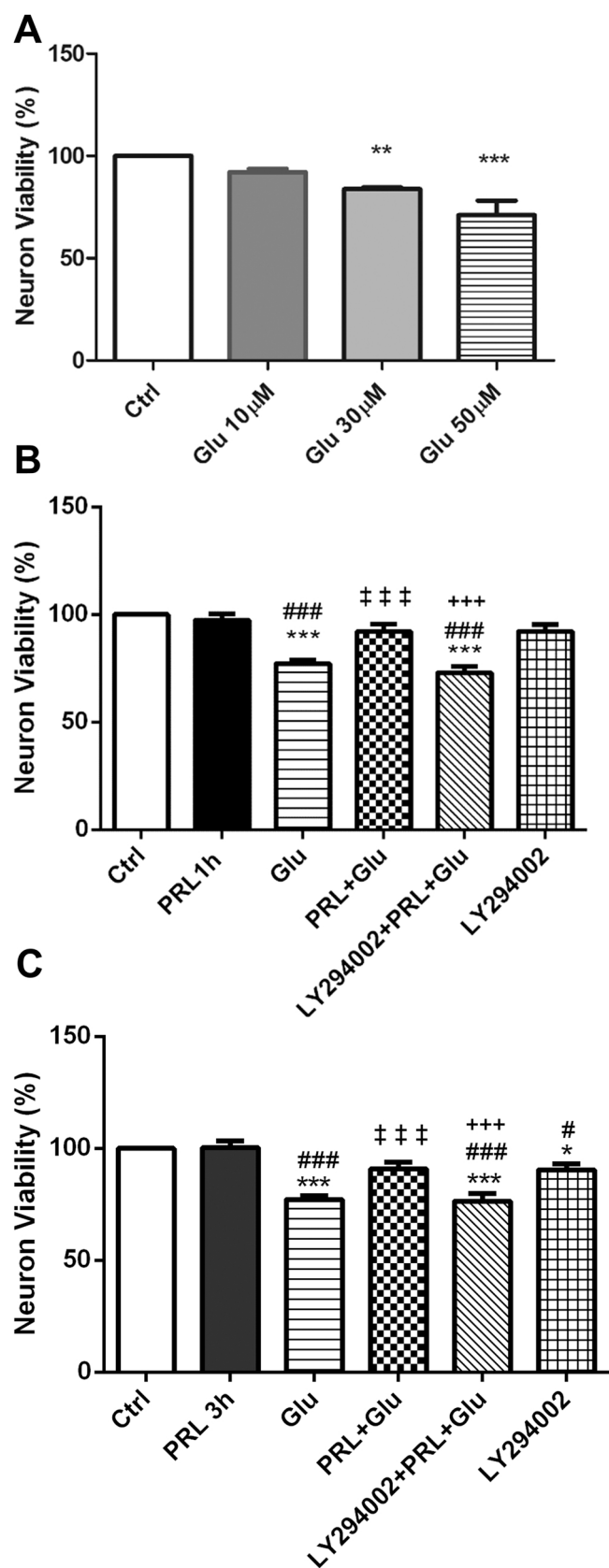
Since we corroborated the involvement of the PI3K/AKT pathway in cell protection conferred by PRL administration against Glu injury, we decided to explore the effect of PRL treatment on hippocampal neuron expression of pAKT and its co-expression with PRLR, studying their expression and cellular localization under different treatments. First, we observed specific nuclear localization of pAKT after PRL administration in all combinations: PRL (Fig. 5e-h), PRL+Glu (Fig. 5m-p) and in LY294002 +PRL+Glu (Fig. 5u-x) (thin white arrow). However, in untreated cells (vehicle) (Fig. 5a-d), pAKT was also observed in the cytoplasm and few neurons presented pAKT in the nucleus; similar to what is observed with Glu alone (Fig. 5m-p). Treatment with the LY294002 inhibitor alone, reduced the expression of pAKT in neurons, as expected. PRLR showed homogeneous expression and localization pattern under all combinations containing PRL [PRL (Fig. 5e-h), PRL+Glu (Fig. 5m-p) and LY294002 +PRL+Glu (Fig. 5u-x)], as well as in the control. In contrast, we observed that after Glu treatment, PRLR labeling was clearly localized in the cytoplasm and accumulated there, similar to what we observed with LY294002 administration alone (Fig. 5j and v).

3.6. PRL administration in primary cultures of hippocampal neurons promotes phosphorylation of GSK3 β

Since PRL-induced neuroprotection against Glu-excitotoxicity is mediated by PI3K/AKT activation, we decided to examine activation of GSK3 β , a downstream effector molecule in this signaling pathway widely reported to be deregulated during neuronal damage events or pathologies [14]. Herein we show that treatment with Glu or LY294002 alone, decreased the GSK3 β phosphorylation ratio by 50% and 30%, respectively (Fig. 6A and 6B). However, PRL treatment for 3 h and 6 h, protects GSK3 β against dephosphorylation, thereby maintaining GSK3 β in its inactive form. Therefore, PRL treatment may reduce activation of GSK3 β observed during neuronal damage.

3.7. Increased expression and nuclear localization of NF- κ B mediated by PRL in hippocampal neurons

Since we had already explored target molecules downstream of PI3K/AKT, such as GSK3 β , we decide to further assess other molecules that respond to PI3K/AKT signaling, in particular, NF- κ B. It has been previously reported that NF- κ B is involved in neuroprotection against excitotoxicity and oxidative stress by inducing overexpression of p65, as well as promoting *Bcl-xL* survival genes after damage in the hippocampus [15,16]. Moreover, it has been suggested that AKT signaling is related to NF- κ B activation in neurons [17]. Thus, we explored the involvement of NF- κ B as a target protein of the PI3K/AKT signaling pathway. Here, we observed that the phosphorylated form of NF- κ B showed translocation to the nucleus after PRL administration (Fig. 7d-f) (see white arrowheads). A similar localization was observed with both the PRL+Glu (Fig. 7j-l) and LY294002 +PRL+Glu (m-o) treatments. In contrast, treatment with Glu (Fig. 7g-i) or LY294002 (Fig. 7p-r) alone



(caption on next column)

Fig. 3. Protective effect of PRL against Glu-induced excitotoxicity is mediated by the PI3K/AKT signaling pathway. Hippocampal neuronal cell viability was measured using MTT assays (see materials and methods). A) Glu treatment (1 h) decreases cell viability in a dose-dependent manner (10–50 μM). Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Dunnett's *post hoc* test * $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ vs control (Ctrl). B) Neuronal cultures were treated with PRL (20 ng/ml for 1 h), Glu (50 μM for 1 h) and LY294002 (50 μM for 1 h) alone or in combination with PRL and Glu. PRL treatment for 1 h rescued the damage induced by Glu (PRL+Glu). Combination of PRL+Glu with LY294002 (50 μM) abrogates the protective effect of PRL. C) 3 h PRL treatment also protects against Glu insult (PRL+Glu), and this effect is abolished in the presence of the PI3K/AKT pathway inhibitor. Data are expressed as the mean \pm SD, $n = 6$ independent experiments in triplicate. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Dunnett's *post hoc* test. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ vs Ctrl; # $p < 0.05$ and ### $p < 0.001$ vs PRL; ††† $p < 0.001$ vs Glu; +++ $p < 0.001$ vs PRL+Glu.

showed a completely cytoplasmic p-NF- κ B.

3.8. *Bcl-2* gene expression was upregulated by PRL administration in cultured hippocampal neurons

After evaluating the participation of GSK3 β and NF- κ B in neuroprotection induced by PRL via PI3K/AKT, we decided to continue testing survival genes downstream of this signaling pathway. Lai et al., 2014 [18] reported AKT mediated phosphorylation and inhibition of the death-signaling BAD protein, a Bcl-2 family member, in an excitotoxicity and stroke ischemia model. In our model, administration of PRL for 3 h promoted an increase in *Bcl-2* expression compared to the control, even in the presence of Glu excitotoxicity (PRL+Glu) (Fig. 8A), suggesting that PRL may induce neuroprotection, in part, by increasing expression of survival genes. Furthermore, combination with Glu and LY294002 (LY294002 +PRL+Glu) was not enough to significantly abrogate the effect of PRL on *Bcl-2* mRNA expression. Interestingly, neither Glu nor LY294002 treatments alone modified the expression of this survival gene, although treatment with LY294002 showed a tendency to down-regulate *Bcl-2* expression (Fig. 8A). In addition, combination of PRL+Glu, increased the level of *Bcl-2* mRNA compared to Glu treatment alone. However, when it was combined with the inhibitor, a decrease in *Bcl-2* mRNA levels was observed. Analyzing the proapoptotic ratio (Bax/Bcl-2), at the protein level, we observed that PRL treatments for 1, 3 and 6 h show a similar pro-apoptotic ratio as the control. Furthermore, only the LY294002 +PRL+Glu treatment induced a significant increase in the Bax/Bcl-2 ratio, compared to the control, PRL and PRL+Glu treatments (Fig. 8B). Interestingly, although Glu and LY294002 treatments alone show a tendency to increase the proapoptotic ratio, this was not significant, possibly due to the short exposure time (1 h).

3.9. *Nrf2* gene over-expression induced by PRL administration in hippocampal neurons is associated with the activation of the PI3K/AKT pathway

After observing that PRL upregulated *Bcl-2* gene expression, we explored the effect of PRL on other genes regulated by PI3K/AKT signaling that could be associated with the regulation of oxidative stress, and thus, ultimately associated with cell survival. We observed that *Nrf2* gene expression was increased approximately 2-fold after PRL treatment, as compared to the control. Treatment with Glu reduced *Nrf2* gene expression, and PRL (PRL+Glu) was partially able to rescue this effect. Unexpectedly, LY294002 treatment alone also induced increased expression of *Nrf2* (Fig. 9).

4. Discussion

It is well known that excitotoxicity plays a significant role in neuronal damage associated with neurological diseases [19]. Recently, a

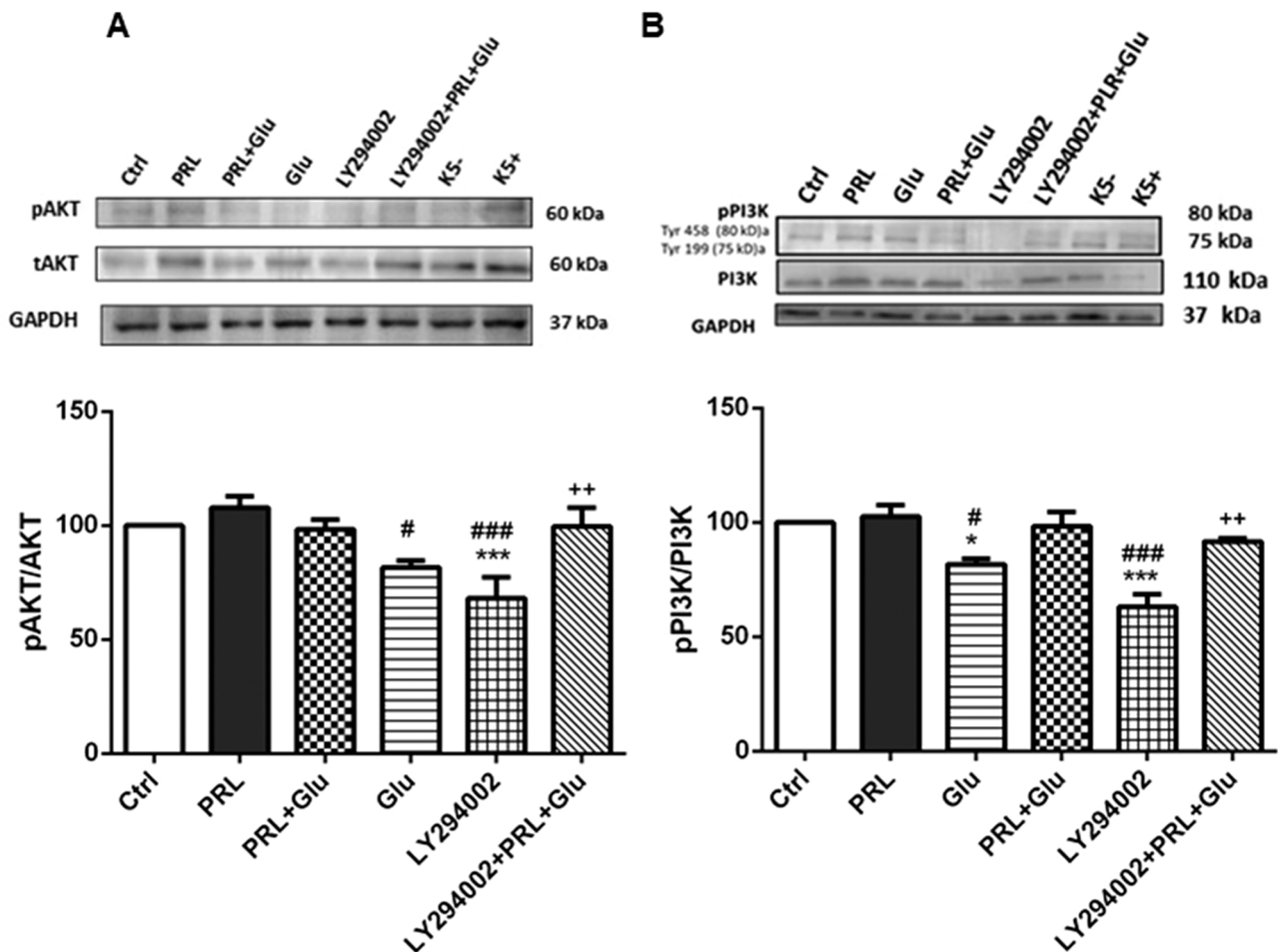


Fig. 4. PRL treatment induces PI3K/AKT phosphorylation, promoting neuroprotection against excitotoxic damage in primary cultures of hippocampal neurons. Activation of PI3K and AKT proteins was measured by western blot. Cultures were treated with PRL (20 ng/ml for 3 h), Glu (50 μ M for 1 h) and LY294002 (50 μ M for 1 h) or pretreated with PRL before adding Glu, or Glu + LY294002. Results from western blot and densitometry analyses are expressed as the relative ratio of phosphorylated protein/total protein. Control indicates untreated cells, while K5- and K5+ cerebellar neuronal cells are used as positive and negative phosphorylation controls, respectively. A) Western blot shows AKT phosphorylation by PRL treatment alone and in combination (PRL+Glu and LY294002 +PRL+Glu). However, in the absence of PRL, treatments with LY294002 or Glu alone inhibit AKT phosphorylation. Additionally, in PRL+Glu with inhibitor (LY294002 +PRL+Glu) treatment, AKT phosphorylation is restored compared to the inhibitor treatment alone. B) Administration of LY294002 (50 μ M) abrogates the activation of PI3K protein in its phosphorylated forms (Tyr 458, Tyr 199), however, combination with PRL (LY294002 +PRL+Glu) PI3K phosphorylation is observed at similar levels as control and PRL alone. Data are expressed as the mean \pm SD, n = 4 independent experiments in triplicate. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Dunnett's *post hoc* test. * $p \leq 0.05$ and *** $p \leq 0.001$ vs Ctrl; # $p \leq 0.05$ and ### $p \leq 0.001$ vs PRL; ++ $p \leq 0.01$ vs LY294002.

group of hormones, particularly, PRL have been the focus of attention for their significant neuroprotective action against excitotoxic damage both, *in vitro* and *in vivo* [6,8,10]. Our group has reported that PRL induction of neuroprotection against Glu-induced excitotoxicity requires the presence of the PRL receptor [10]. Furthermore, we previously reported the possible participation of NF- κ B in regulating the apoptotic ratio [6].

In the present study, we demonstrated that PRL exerts a neuroprotective effect against Glu excitotoxicity that is mediated, in part, by PI3K/AKT signaling pathway activation (shown in Figs. 3 and 4), GSK3 β /NF- κ B regulation (Figs. 6 and 7), and overexpression of *Bcl-2* and *Nfr2* genes (Figs. 8 and 9). Furthermore, our results demonstrate that inhibition of the PI3K/AKT signaling pathway abrogated the protective effect of PRL against glutamate-induced neuronal death, supporting the participation of this pathway in PRL's neuroprotective role. These findings support and extend the idea that PRL treatment may regulate PI3K/AKT and GSK3 β /NF- κ B signaling pathways in hippocampal neuronal cultures, and indeed, may participate during neuroprotection.

Initially, we explored the localization and expression of PRLR in primary cultures of hippocampal neurons under different treatments

using immunofluorescence, demonstrating an interesting labeling pattern. In addition to confirming PRLR expression in primary hippocampal neuronal cultures, we also observed the quality of our cultures, showing minimal glia contamination (Supplementary Fig 2). After PRL treatment, its receptor label is increased and located in both, cytoplasm and nucleus, whereas under Glu treatment, it is primarily localized in the cytoplasm (Fig. 1). In this regard, neuroprotection has been associated with PRLR and VGLUT1 overexpression in hippocampus of ovariectomized rats during excitotoxicity [20]. Previously, our group reported that the presence of both, short and long isoforms of PRLR were necessary to confer PRL neuroprotection against Glu excitotoxicity [10].

We observed that most of the neurons in our primary hippocampus cell cultures expressed the PRLR (Fig. 1). In the hippocampus, there are three main types of neurons: granular and pyramidal cells which are excitatory neurons, and inhibitory interneurons. Pyramidal neurons are the main cell type in the hippocampus [21]. Interestingly, it has been reported that in early primary hippocampus cell cultures, the most representative population are pyramidal neurons and over time, the culture is enriched with granular neurons; together these cells represent 90% of the neuronal population, the remaining 10% are interneurons

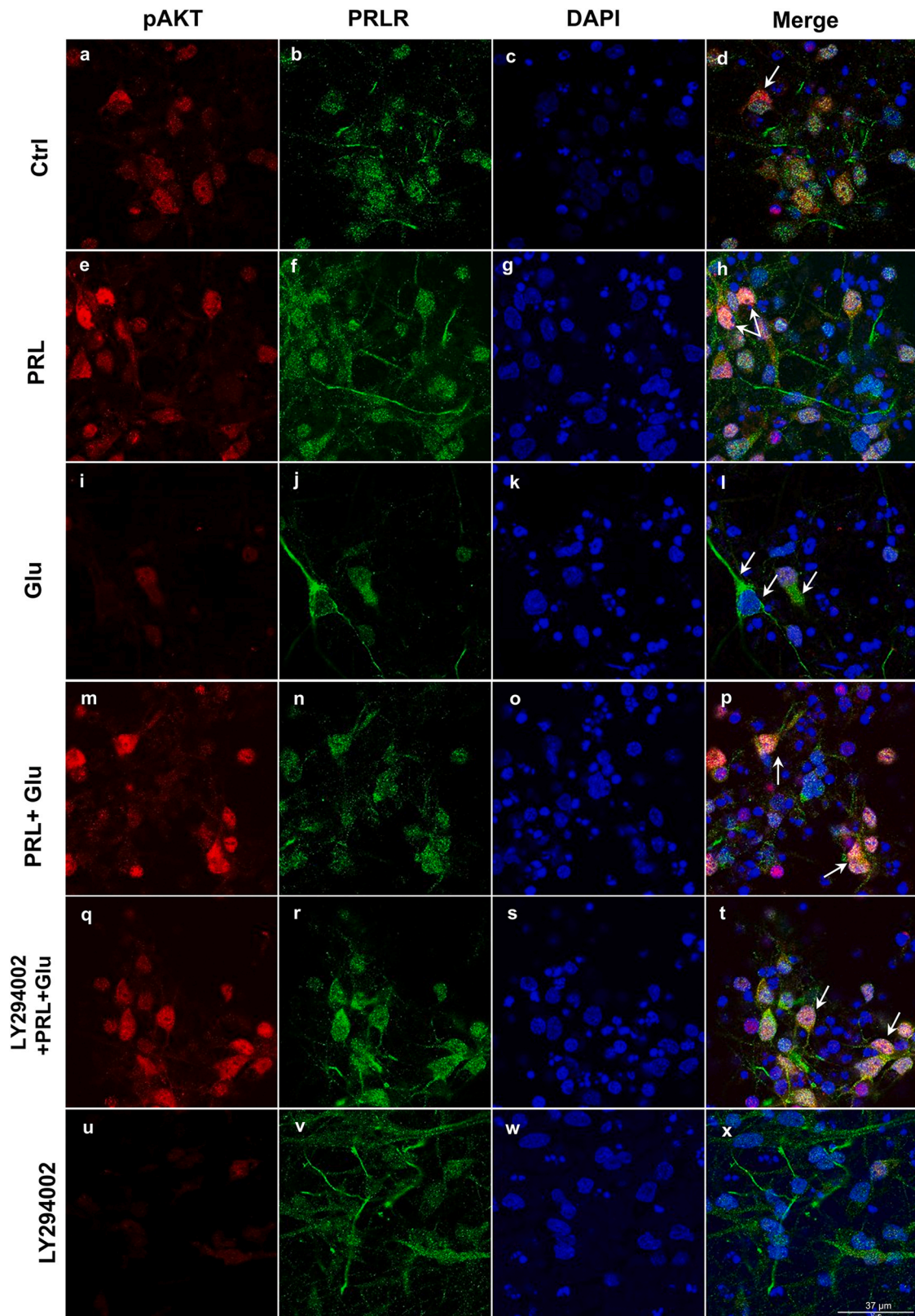


Fig. 5. Phospho AKT (pAKT) is induced after administration of PRL and colocalizes with PRLR. Primary cultures of hippocampal neurons were treated with PRL (20 ng/ml for 3 h), Glu (50 μM for 1 h) or LY294002 (50 μM for 1 h) or their combinations: PRL+Glu and LY294002 +PRL+Glu, were immuno-stained for pAKT and PRLR. pAKT shows nuclear localization after PRL administration, (small white arrows). Additionally, PRLR labelling (white arrows) was observed in all treatments, as shown above. Ctrl (a-d), PRL (e-h), Glu (i-l), PRL+Glu (m-p), LY294002 +PRL+Glu (q-t) and LY294002 (u-x). pAKT is shown in red and PLRL in green; DAPI labeling (blue) is shown to identify nuclei. Scale bar 37 μm.

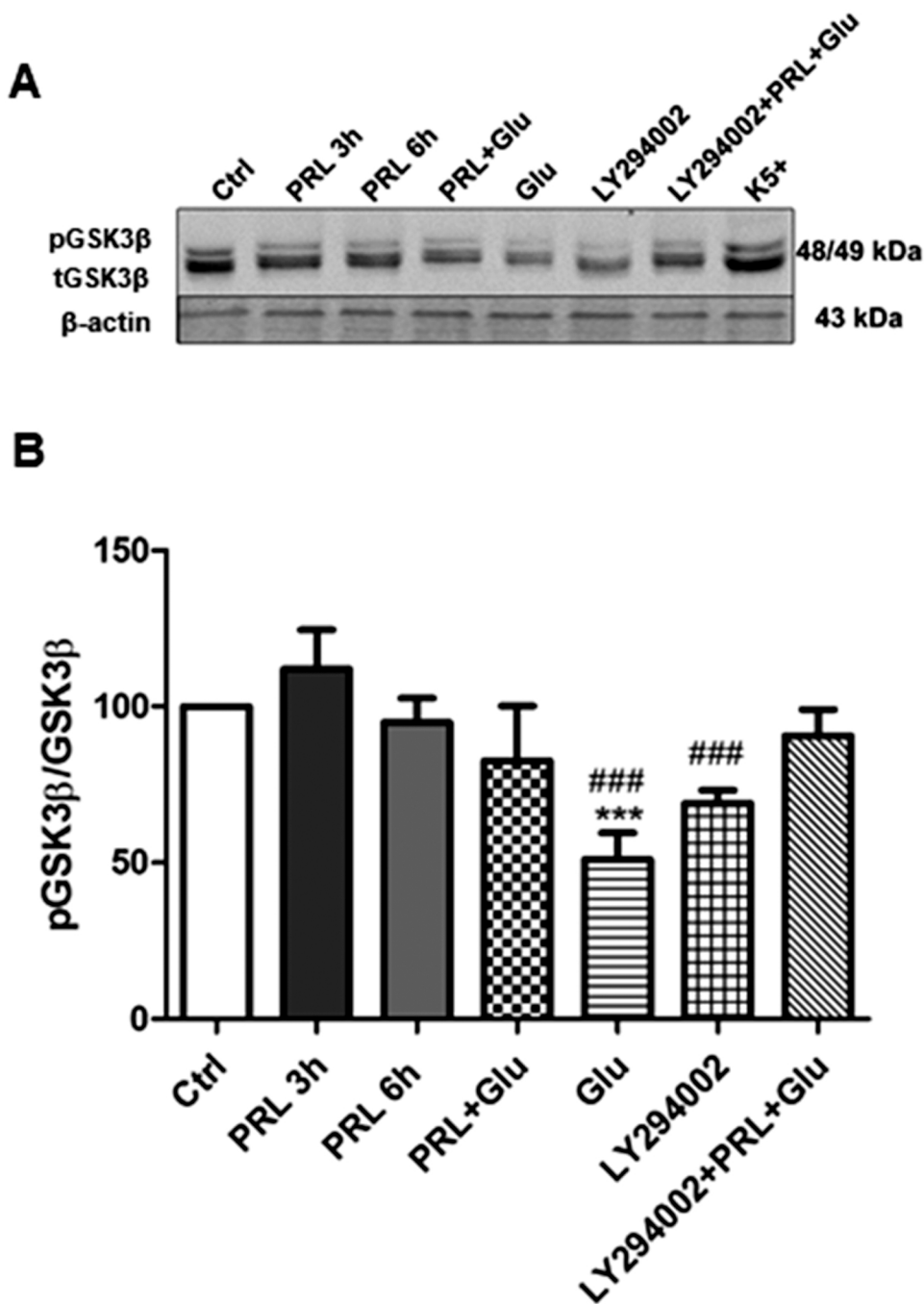


Fig. 6. PRL administration induces GSK3 β phosphorylation, which is involved in neuroprotection against Glu damage in hippocampal neurons. GSK3 β phosphorylation was measured by western blot. Cultures were treated with PRL (20 ng/ml for 3 h and 6 h), Glu (50 μ M for 1 h) or LY294002 (50 μ M for 1 h). A) Representative blot of phosphorylated GSK3 β and total GSK3 β . B) Densitometric analysis of GSK3 β phosphorylation (pGSK3 β /GSK3 β). Glu and LY294002 treatments tend to decrease GSK3 β phosphorylation, while the presence of PRL alone or in combination abrogates the decrease in phosphorylation induced by Glu or LY294002, maintaining similar phosphorylation levels as the control. Data are expressed as the mean \pm SD, n = 4 independent experiments in triplicate. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Dunnett's *post hoc* test *** p \leq 0.001 vs Ctrl; ### p \leq 0.001 vs PRL.

[22,23].

We used 17–18 day embryos to perform our neuronal cultures, at this developmental stage, most of the cells are pyramidal neurons with functional synapse connections. Accordingly, in our cultures the main population were pyramidal neurons, and probably a small quantity of granular neurons, and all cells expressed PRLR (Fig. 1). In this regard, previous similar *in vitro* studies in cultured hippocampal neurons showed generalized PRLR expression in the neurons [10]. Additionally, *in vivo* studies demonstrated a widespread distribution of PRLR staining in neurons of the hippocampus of ovariectomized rats [20]. These studies are in line with our observations in primary cultures of hippocampal neurons. However, the presence of a particular receptor isoform in different types of hippocampal neurons remains to be elucidated. In this sense, in future research we will try to define whether there is differential expression of PRLR isoforms in subpopulations (pyramidal and

granular cells) of hippocampus primary neuronal cultures.

Additionally, it is important to define if all or only specific neurons are protected by PRL. As previously mentioned, several studies from our group and others have demonstrated that PRL hormone exerts neuroprotection in hippocampal cultures [6,10] and *in vivo* in ovariectomized rats treated with PRL [8]. For example, treatment with PRL before kainic acid administration in female ovariectomized rats promoted neuronal survival. This observation was correlated to PRLR overexpression that was observed in all hippocampal subfields: CA1, CA2, and CA3 [20]. Moreover, in primary hippocampal neuronal cultures it has been suggested that PRL mediates neuroprotection against excitotoxicity *via* its receptor, and blocking PRLR decreased neuronal survival [10]. In our primary cultured neurons, PRL treatment showed around 95% cell survival. Interestingly, most of the neurons showed widespread PRLR labeling (Fig. 1), therefore, we hypothesize that both, pyramidal and

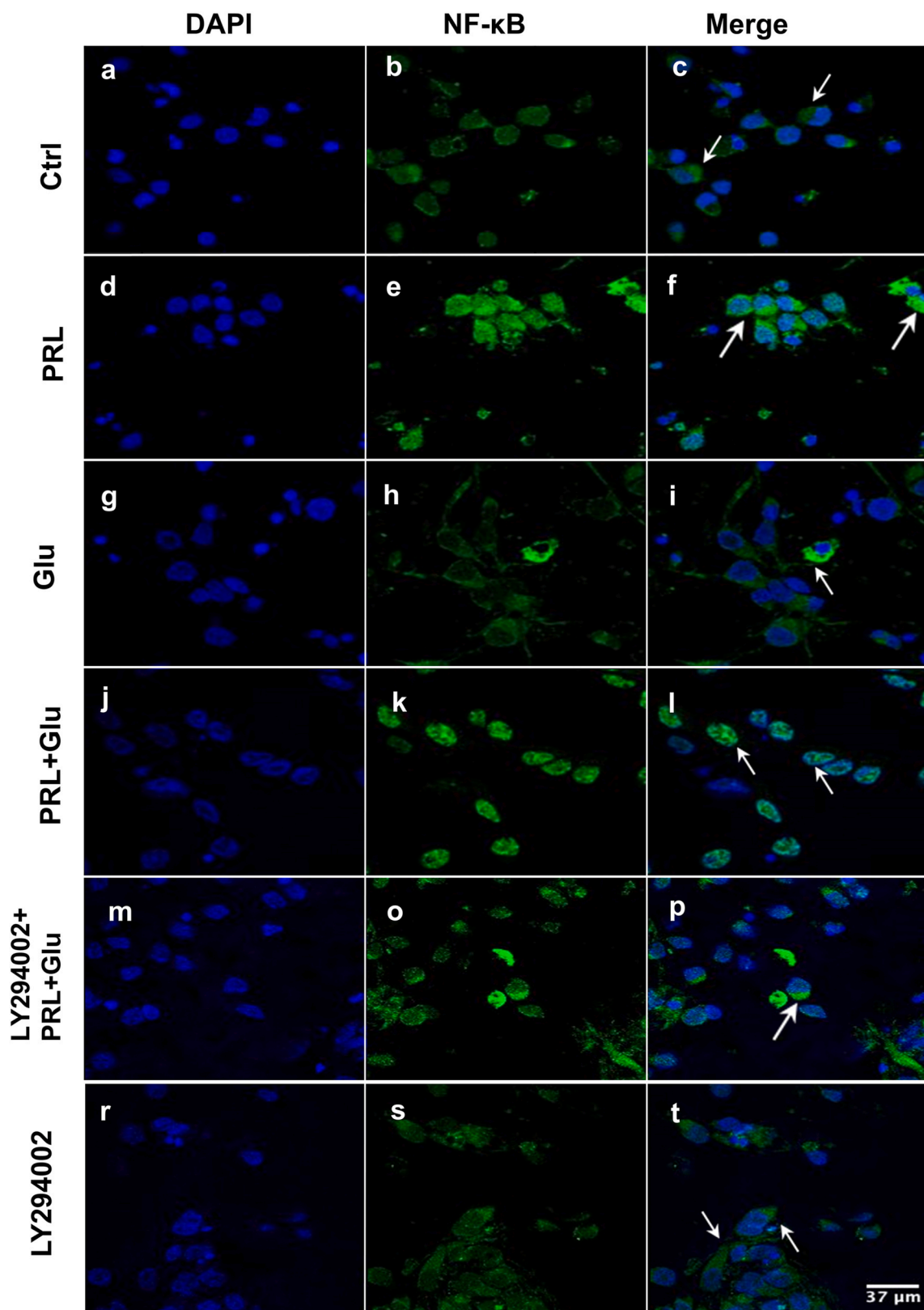


Fig. 7. PRL treatment induces Phospho-NF- κ B (pNF- κ B) and its nuclear localization in hippocampal neurons. Immunofluorescence labelling of pNF- κ B was observed in neuronal hippocampal cultures after different treatments: PRL (20 ng/ml for 3 h), Glu (50 μ M for 1 h) or LY294002 (50 μ M for 1 h) or combinations: PRL+Glu and LY294002 +PRL+Glu. After PRL administration, pNF- κ B protein staining was increased in the nucleus (*d-f*; see white arrows) compared with Glu (*g-i*) where pNF- κ B was localized in the cytoplasm. Representative photomicrographs of immuno-stained hippocampal neurons: Ctrl (*a-c*), PRL (*d-f*), Glu (*g-i*), PRL+Glu (*j-l*), LY294002 +PRL+Glu (*m-o*), LY294002 (*p-r*). pNF- κ B is shown in green and nuclei in blue (DAPI). Scale bar 37 μ m.

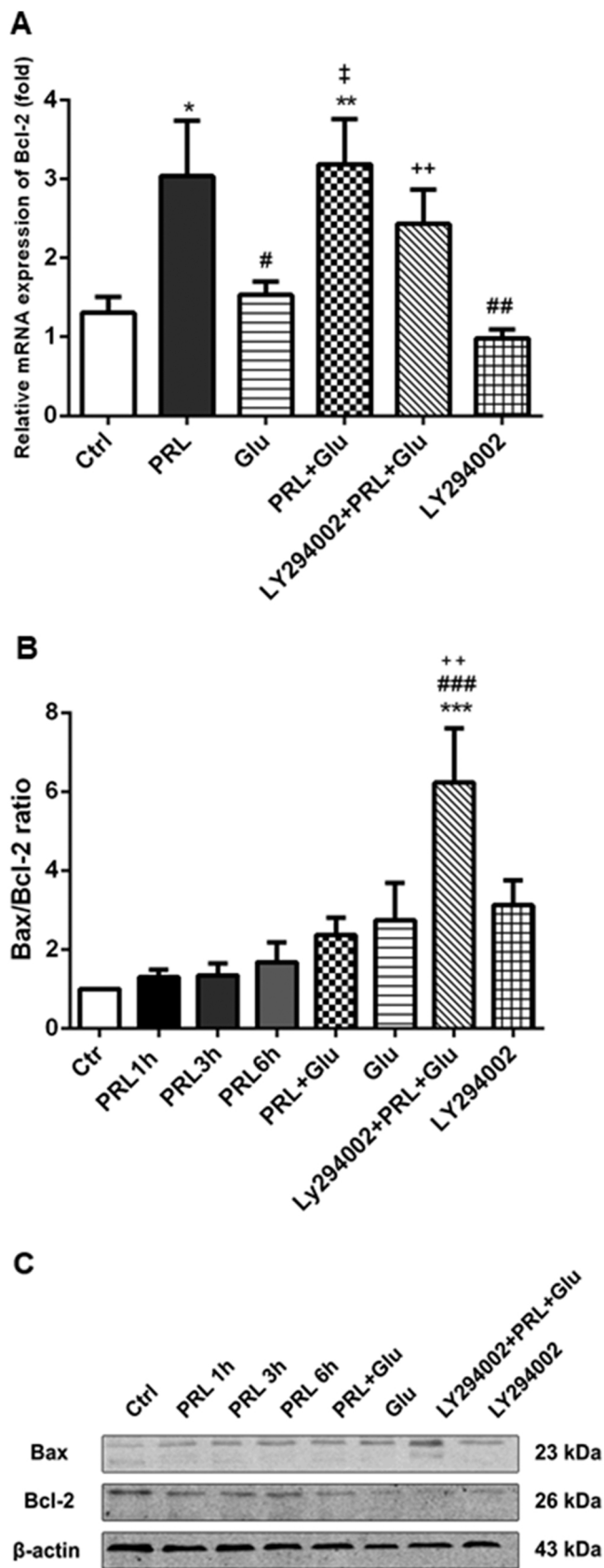


Fig. 8. PRL treatment reduces the pro-apoptotic ratio in damaged neurons by maintaining *Bcl-2* expression. A) *Bcl-2* gene expression was evaluated by RT-qPCR. Neuronal cultures were treated with PRL (20 ng/ml for 3 h), Glu (50 μ M for 1 h) or LY294002 (50 μ M for 1 h), or their combinations. Expression of the *Hprt* gene was used as an internal control to calculate relative gene expression using $2^{-\Delta\Delta Ct}$ calculations. B) Densitometric analyzes of the *Bcl-2*/*Bax* proapoptotic ratio. C) Representative blot of *Bax*/*Bcl-2*. Data are expressed as the mean \pm SD n = 4 independent experiments in triplicate. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Dunnett's *post hoc* test. * $p < 0.05$, ** $p \leq 0.01$ and *** $p \leq 0.001$ vs Ctrl; # $p \leq 0.05$, ## $p \leq 0.01$ and ### $p \leq 0.001$ vs PRL; † $p < 0.05$ vs Glu; †† $p \leq 0.01$ vs PRL+Glu.

granular neuronal populations are capable of expressing PRLR, an idea supported by the above-mentioned evidence of PRLR expression in both *in vivo* and *in vitro* models after PRL administration [10,20]. However, further studies will be undertaken to determine the survival of each neuronal population using specific pyramidal or granular cell markers such as CaMKII α and Prox1, respectively [23,24].

Regarding the role of PRLR in neurons, it has been demonstrated that both isoforms, PRLR long (PRLR-L) and short (PRLR-S), participate differentially in neuronal activation. For instance, PRL-L has been associated with the STAT5 activation pathway in certain regions of the brain during pregnancy. However, neuronal ablation of STAT5 in mice showed that STAT5 phosphorylation is not required for the expression of nursing behaviors [25]. In relation to signaling pathways involved with the PRLR-S isoform, it has been reported that there is transient action of PRL mediated by the PRLR-short form in sensory neurons of the trigeminal ganglia. Interestingly, transient effects mediated by PRLR-S are inhibited by the presence of PRLR-L in these cells [26]. In addition, in dorsal root ganglia (DRG) and TG sensory neurons, both PRLR-L and PRLR-S mRNAs are expressed, which suggests that both isoforms are probably participating in neuronal PRL effects [27]. Notably, most studies involving PRLR activation in the brain do not discriminate between PRLR isoforms.

Given that the presence of JAK2 is sufficient to trigger signaling from both, the short and long PRLR homodimer isoforms and there is evidence for the presence of both receptors in neurons [10], it is likely that the PRLR in our cultures (Fig. 1) could be a combination of both homodimers activating signaling through AKT. There is evidence for PI3K/AKT activation in several types of neurons while STAT5 signaling in the hippocampus has not been tested [28]. However, identifying the involvement of PRLR isoforms is an important question that requires further investigation in PRL-induced neuroprotection.

It is well known, that PRL is mostly synthesized in lactotroph cells, but is also expressed in extrapituitary tissues. Furthermore, some studies suggest possible synthesis in the brain of rats [29]. Therefore, there is an extensive debate about whether PRL can be synthesized by neuronal cells. In this regard, evidence for PRL expression in neuronal tissue has been reported in hypophysectomized female rats in which immunoreactive prolactin (ir-PRL) was detected in different brain areas [30]. However, data related to PRL expression in the brain remains limited and controversial. Given that there are no conclusive studies demonstrating PRL expression in the brain, it is probable that all PRL effects in the brain arise from a pituitary source.

It is important to mention that most studies describing the neuroprotective effect of PRL in hippocampal neurons used exogenous administration of this hormone, without regard for the site of PRL synthesis [8,9]. Thus, data related to PRL synthesis in neurons that could contribute to exerting neuroprotective effects in the hippocampus remain to be elucidated. Based on the evidence from the above studies, we hypothesize that PRL from the pituitary can be transported and reaches receptor-rich target cells, such as neurons, to trigger effects including neuroprotection. More research is needed to resolve the question of whether neurons can synthesize PRL.

Once we observed PRLR expression in neuronal cultures, we proceeded to elucidate the activation of the PI3K/AKT signaling pathway in

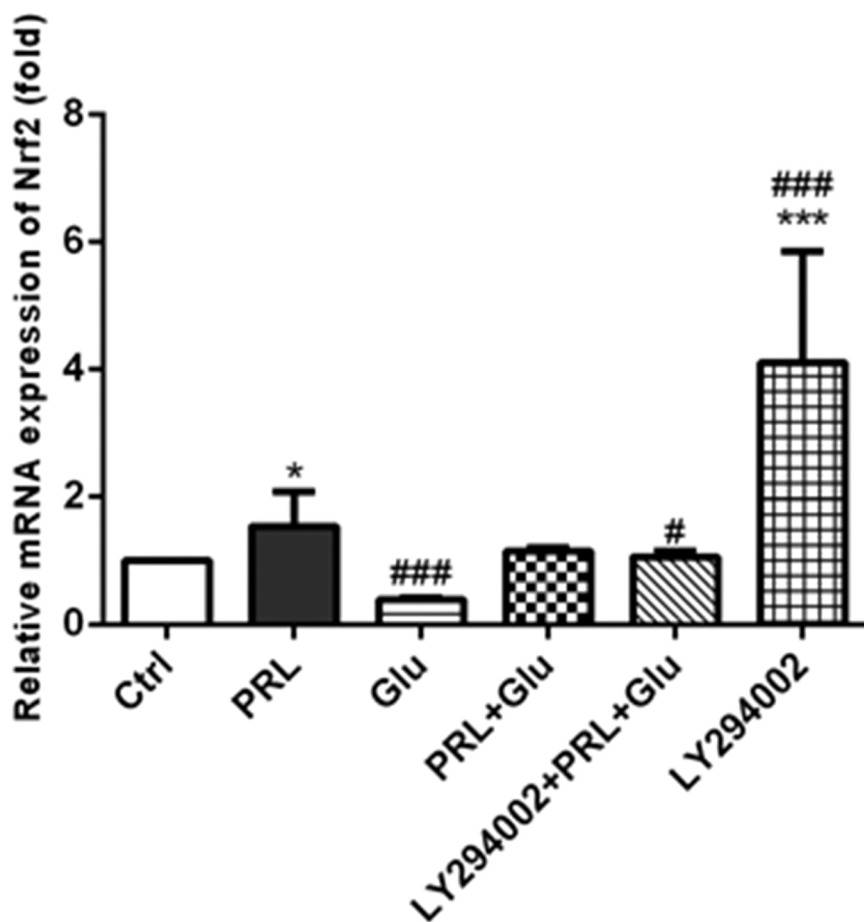


Fig. 9. *Nrf2* gene expression induced by PRL administration in cultures of hippocampal neurons. Total RNA obtained from hippocampal neuronal cultures treated with PRL (20 ng/ml for 3 h), Glu (50 μ M for 1 h) or LY294002 (50 μ M for 1 h) and combinations, was used for RT-qPCR assessment of gene expression. *Hprt* gene expression was used as an internal control to calculate the relative expression of *Nrf2* gene according to the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. The values are presented as the mean \pm SD, $n = 3$ independent assays in triplicate. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Dunnett's *post hoc* test. * $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$ vs Ctrl; # $p < 0.05$ vs PRL; ### $p < 0.001$ vs PRL.

PRL-induced neuroprotection. PI3K/AKT has been reported to be an important survival-promoting signaling pathway in different tissues and cell lines [31], including neurons [32]. Specifically, in the hippocampal region this signaling pathway has been shown to play a critical role in neuroprotective mechanisms against different agents such as eicosapentaenoic acid (EPA), BDNF, and NMDA preconditioning treatments, or drugs like NMDAR activity inhibitors or even protecting against stroke damage [18,33–35]. In this regard, our findings are in agreement with these previous data about the participation of the PI3K/AKT signaling pathway in neuroprotection in hippocampal neurons.

We found that the PI3K/AKT pathway inhibitor, LY294002, was able to abrogate the protective effect of PRL against excitotoxicity in neuronal cultures, supporting the participation of this survival pathway as a downstream effector of PRL action. This is further established by showing maintenance of AKT phosphorylation in the presence of PRL during Glu excitotoxicity (Fig. 3, Fig. 4 A and Fig. 5). In addition, we analyzed phosphorylation of PI3K, the upstream activator of AKT. Treatment with Glu and LY294002, abrogated phosphorylation of PI3K, while addition of PRL to these compounds (LY294002 +PRL+Glu treatment) rescued phosphorylation (Fig. 4B). PRL treatment promoted PI3K phosphorylation at Tyr 458 and Tyr 199. Similar activation has been previously reported in mammary gland [36]. Additionally, PI3K activation has been observed in female rat trigeminal neurons (TG), where the inhibition of PI3K by LY294002 treatment abolished the effect of PRL on transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) channel activity. In addition, electrophysiological actions of PRL in Tubero-infundibular dopamine (TIDA) neurons were associated with PI3K activation [26,37,38]. These reports are in agreement with our results and extend the idea that PRL mediates neuroprotection *via* PI3K and AKT activation. Remarkably, PI3K/AKT activation has been reported to

be induced by PRLR in different glial and neuronal models [26,27,37, 39].

We performed a dose-response curve, using a PRL concentration of 20 ng/ml and varying the inhibitor concentration from 10 to 50 μ g. We observed that viability was not affected by changes in inhibitor concentration (Supplementary Fig 1). Accordingly, we chose a high concentration of the LY294002 inhibitor to perform the next experiments as a previous report by [33]. It would be interesting in future studies to increase the concentration of the inhibitor LY294002 in order to evaluate the potency of PRL to restore PI3K phosphorylation.

In addition, we observed colocalization of PRLR with phospho AKT in the nucleus of neurons (Fig. 5). pAKT was significantly reduced after LY294000 and Glu treatments (Fig. 5i-l; u-x). Thus, our results show the participation of the PI3K/AKT pathway on PRL-induced neuroprotection against Glu in hippocampal neurons. In this regard, there is very limited information to explain how PRL treatment of neurons produces AKT activation. Our manuscript attempts to clarify and explain this relationship. A few studies show that PRL promotes pAKT expression in lymphoid cells [40]. In neurons, paternal behavior has been shown to be associated with upregulated AKT expression but not phosphorylation [39]. We suggest that PRL induces AKT phosphorylation (Fig. 4 A and 5), then, pAKT modulates GSK3 β expression and inhibits the pro-apoptotic Bax/Bcl-2 ratio, in addition to triggering antioxidant factors such as Nrf2.

Interestingly, PI3K and AKT are predominantly located in the cytoplasm, but have also been detected in the nucleus of neurons under protective conditions. For instance, in PC12 cells, administration of Nerve Growth Factor, promoted translocation of pAKT to the nucleus resulting in antiapoptotic effects [41]. Similar neuroprotective effects occur with pAKT nuclear translocation in models of cerebral ischemia in

rats. pAKT inactivates apoptogenic factors such as Bad and caspase-9, inhibiting cell death [42]. These reports are in line with our observation: PRL treatment promotes nuclear localization of pAKT (Fig. 5).

The effects that nuclear pAKT may exert directly in the nucleus have been associated with deactivation of acinus, a nuclear factor required for chromatin condensation in apoptosis *via* caspase 3 activation. Thus, pAKT prevents acin-dependent chromatin condensation, promoting cell survival. Additionally, pAKT might regulate activation of apoptotic targets such as GSK3 β , FOXO, and can modulate oxidative stress [43]. Studies focused on determining how pAKT is translocated to the nucleus after PRL treatment in neurons needs further study to understand if PRL promotes the modulation of chromatin by AKT, as has been seen in other models.

It is well known that AKT phosphorylates glycogen synthase kinase-3 (GSK3 β), inhibiting its activity, which has been extensively associated with pathogenesis in different neurodegenerative disorders. One example is AD, where PI3K/AKT signaling is attenuated in the brain, and its inhibition increases hyperphosphorylation of Tau, important for microtubule stability [44,45]. The activity of GSK3 is negatively regulated by serine phosphorylation of GSK3 α at Ser 21 and of GSK3 β at Ser 9 [14]. Here, we observed that GSK3 β is phosphorylated at Ser 9 by effect of PRL administration.

Additionally, PRL was able to rescue GSK3 β phosphorylation, promoting neuroprotection, in the presence of damage by Glu in hippocampal neurons (Fig. 6). Both, Glu and LY294002 treatments alone reduced GSK3 β phosphorylation compared with PRL and control, and addition of PRL to these treatments reverted this effect. This result is in line with a previous observation [40] who proposed that PRL treatment increases AKT activity in W53 lymphoid cells and phosphorylates GSK3 β on Ser 9, resulting in its deactivation. Additionally, it has been suggested that PRL displays a neuroprotective effect mediated by regulation of Tau during female neurodegeneration, and is implicated in PI3K/AKT/GSK3 β pathway activation [46].

Thus, PRL might activate AKT, triggering inactivation of GSK3, and consequently, the inhibition of p-Tau. This signaling pathway regulation may explain why the absence of PRL contributes to the risk of AD development [47]. Here, we suggest that PRL promotes PI3K/AKT activation, which leads to the inactivation of GSK3 β , promoting survival pathways. Interestingly, GSK3 is related to depressive behaviors and psychiatric conditions such as schizophrenia [45]. Therefore, PRL effects in the regulation of psychiatric disorders needs further clarification.

It has been reported that NF- κ B is associated with neuroprotection through induction of survival genes [15,16]. Furthermore, NF- κ B has been suggested as a target molecule of AKT signaling [48]. In this regard, we observed, that PRL administration to hippocampal cell cultures promoted translocation of phospho-NF- κ B p65 into the nucleus with stronger staining (Fig. 7d-f). Interestingly, after Glu treatment (Fig. 7g-i), this nuclear localization was not observed; indeed, NF- κ B was observed in cytoplasm, which means that it was secreted and inactivated, similar to what was observed with the LY294002 treatment (Fig. 7p-r). However, under neuroprotective conditions (PRL+Glu; Fig. 7j-l), NF- κ B was located in both, nucleus and cytoplasm. This suggests that activation of NF- κ B results from PRL treatment, and participates in the neuroprotective effects of this hormone, since it has been shown that NF- κ B, in response to AKT, can activate anti-apoptotic genes such as *Bcl-2*, *Bcl-xL* and *BIRC3* in stroke models, promoting neuroprotection [16,48]. Our result is in line with studies in hippocampal neurons where NF- κ B has been associated with the induction of anti-apoptotic proteins, such as *Bcl-2*, and an increase in the activity and protein content of Mn2 + SOD and Cu2 + /Zn2 + SOD enzymes [7].

In addition, there is strong evidence that supports the idea that NF- κ B is involved in neuroprotection against excitotoxicity and oxidative stress by overexpression of p65 [15]. Knockout of p65 or inhibition of neuronal NF- κ B causes loss of neuroprotection after KA treatment in

organotypic hippocampal slice cultures [49]. However, there are also reports where the inhibited translocation of NF- κ B p65 into the nucleus is related with attenuation of microglia activation and neuroinflammation in traumatic brain injury [50]. Several reports identify NF- κ B as a molecule responsible for neuroinflammation and neuronal damage [50,51], since NF- κ B can promote transcription of pro-inflammatory interleukins and microglia activation [52].

We found that PRL-treated neuronal cultures promote translocation of NF- κ B and this effect was related with neuroprotection. However, a recent study performed with the immortalized microglia cell line, SIM-A9, showed that PRL inhibited NF- κ B and thereby, its inflammatory effects, such as interleukin up-regulation [53]. These contradictory results may be explained by the nature of the cell type: neurons vs glia. However, more research is required to clearly elucidate its function and explain the controversies surrounding the role of NF- κ B in PRL induced neuroprotection.

Moreover, we observed that PRL treatment, alone and in combination, promotes up-regulation of the *Bcl-2* gene as compared to the control (Fig. 8 A), while treatments with Glu and LY294002 alone, had no effect. It has been reported that PRL treatment for 1 h was enough to promote an increase in *Bcl-2* gene expression in HL60 human myeloid leukemia cell line [54]. However, treatment with LY294002 +PRL+Glu was able to partially reduce *Bcl-2* expression compared to PRL, which correlates with maintenance of the proapoptotic ratio observed under PRL treatment as compared to control (Fig. 8 B-C) and the increase of the proapoptotic ratio in LY294002 +PRL+Glu treatment. This observation is in accordance with the study reported by Lai et al., 2014 in which AKT mediated phosphorylation and inhibition of the death-signaling BAD protein, a *Bcl-2* family member, in excitotoxicity and stroke models. In addition, it was suggested that PRL in hippocampal neurons reduced the pro-apoptotic ratio [6].

In this regard, another AKT regulated gene was evaluated: *Nrf2*. This gene participates in antioxidant cell defense, promoting the transcription of various downstream antioxidant genes, such as hemeoxygenase-1 (HO-1) and quinone oxidoreductase-1 (Nqo1), among others [55]. Herein, we show that PRL treatment of hippocampal neuron cultures upregulated *Nrf2* expression, and a similar pattern was observed in PRL+Glu as compared to control. Conversely, in Glu and LY294002 +PRL+Glu treatments, *Nrf2* was downregulated compared to PRL. Surprisingly, the inhibitor, LY294002, stimulates greater up-regulation of the gene, indicating a complex regulation (Fig. 9). The fact that PRL promotes up-regulation of the *Nrf2* gene promoting survival, possibly in response to PI3K/AKT activation, is in agreement with recent studies where AKT/*Nrf2* was seen to be key in neuronal survival in ischemic stroke injury [56,57] as well as inhibiting neuroinflammation in ischemic brain injury [58]. In addition, it was reported that Knockout of the *Nrf2* gene significantly increased cerebral infarction and neurological deficit in ischemia reperfusion rats models [59], and *Nrf2* inhibition abrogated neuroprotection in dopaminergic neurons [60]. Therefore, *Nrf2* seems to have promising therapeutic possibilities for neuroprotection.

Regarding the relationship between the PI3K/AKT signaling pathway and the activation of *Nrf2*, this has been described in ischemia models *in vivo* and *in vitro* [57], as well as in models of Amyloid- β cytotoxicity in PC12 cells [61], among others. Interestingly, when the LY294002 inhibitor was used in these studies, a decrease in *Nrf2* activity was observed, but only in its phosphorylated form. Furthermore, in RPE cells it was reported that *Nrf2* protein was translocated to the nucleus 2 h after exposure to sulforaphane (an inducer of *Nrf2*). Surprisingly, no significant differences in mRNA expression were observed in LY294002-treated cells, suggesting that downstream of PI3K there are both, AKT-dependent and AKT-independent pathways that contribute to *Nrf2* function [62]. This study is in line with our observations regarding *Nrf2* (Fig. 9). Contrary to what we expected, we observed an increase in *Nrf2* mRNA after treatment with LY294002 (Fig. 9). However, it is possible that we did not observe a decrease due to post-transcriptional

regulation occurring under our experimental conditions. Given the vast array of stimuli that can activate Nrf2 and the diverse cellular processes that it controls, the regulation of Nrf2 activity is very complex. Indeed, Nrf2 activation can be controlled at the transcriptional and post-transcriptional level, by regulation of protein stability,

post-transcriptional modifications [63].

In addition, it is not known which protein downstream of PI3K/AKT is involved in the control of Nrf2 activity, but it has been suggested that other pathways may be involved in Nrf2 activation such as MAPKs, GSK3 β and even that NF- κ B, and Nrf2 have a synergistic relationship in

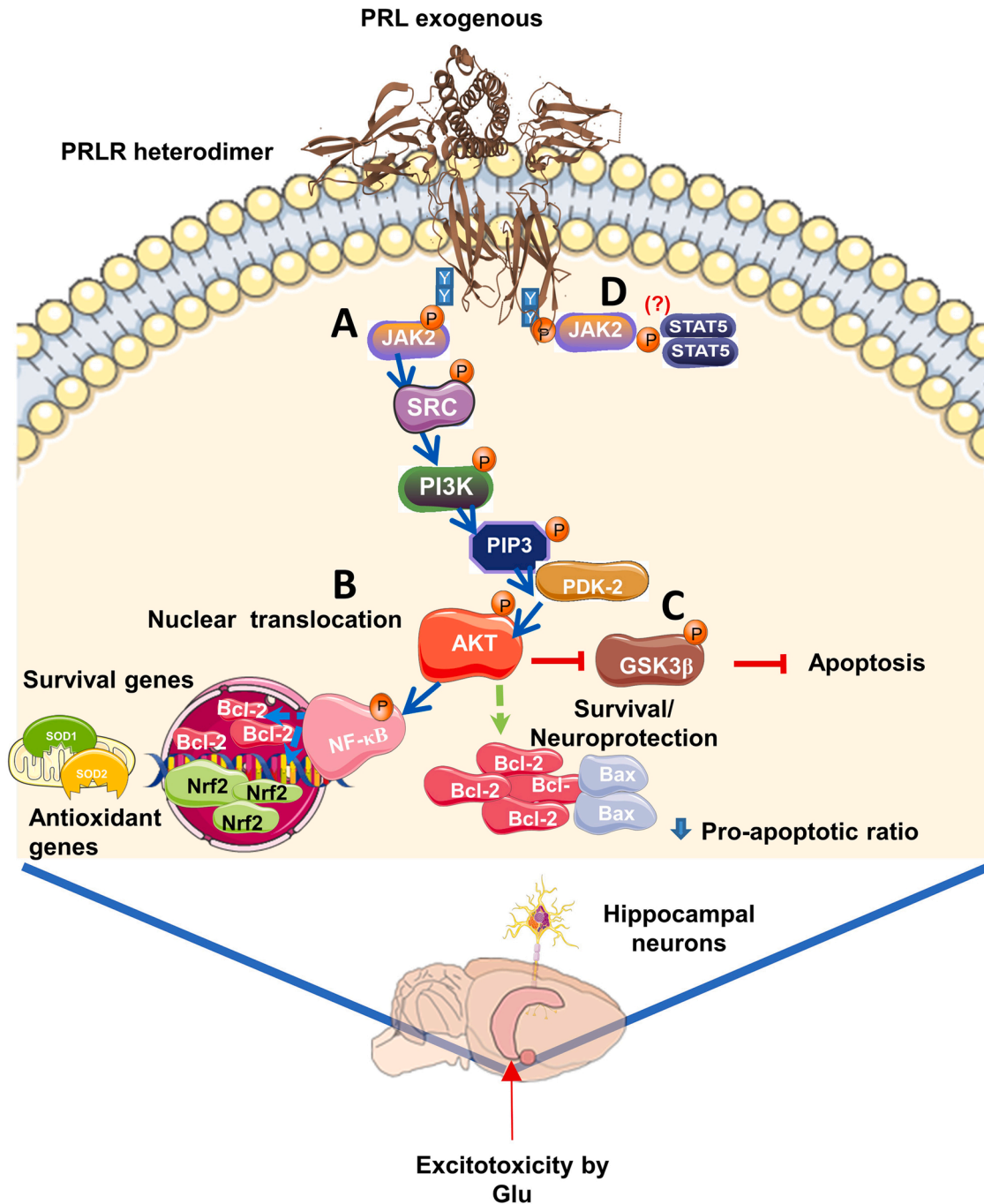


Fig. 10. PI3K/AKT; GSK3 β /NF- κ B signaling pathway activation induced neuroprotection by treatment of PRL in primary cultures of hippocampal neurons. Schematic representation of the participation of PI3K/AKT; GSK3 β /NF- κ B signaling pathways regulated by PRL, involved in neuroprotective effects. (A) PRLR activates the JAK2 kinase, which phosphorylates SRC1 and consequently this kinase activates PI3K. The blue line shows the activation of the PI3K/AKT signaling pathway, (B) which may promote NF- κ B translocation to the nucleus, increasing expression of survival genes, such as *Bcl-2*, promoting a reduction in the proapoptotic ratio. Additionally, antioxidant genes like *Nrf2*, are also expressed after PRL administration via the PI3K/AKT pathway, and probably SOD1/SOD2 proteins. (C) AKT inhibits GSK3 β , which is involved in apoptotic events. PRL-induced neuroprotection is complex process and maybe involves cross-talk between many signaling pathways, (D) STAT5 activation, has not been observed in hippocampal neurons after PRL treatment (?). (AKT), protein kinase B; (*Bcl-2*), B-cell lymphoma 2; (GSK3 β), glycogen synthase kinase-3 (JAK2), Janus kinase-2; (NF- κ B), factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells; (PDK-1), phosphoinositide-dependent kinase-1; (PI3K), phosphatidylinositol 3-kinase; (PIP3), phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate; (PRL), prolactin; (PRLR) prolactin receptor; (SOD1), superoxide dismutase 1 Cu2 + /Zn2 + -SOD; (SOD2), superoxide dismutase 2 Mn2 + -SOD; (Src), SRC proto-oncogene tyrosine-protein kinase; (STAT5), signal transducer and activator of transcription.

neurodegenerative diseases [64]. Therefore, it is possible that Nrf2 is not only responding to the PI3K/AKT signaling pathway but also to others that could be involved in its activation. In this sense, more studies are required to understand the relationship and fine regulation between PRL, AKT and *Nrf2* in a context of neuroprotection in the hippocampus, since there are very few publications on this matter.

It will be important to understand the full extent of PRL as a protective agent in the hippocampus. In this study, we evaluated PRL-induced neuroprotection against glutamate excitotoxicity in hippocampal neurons that was mediated by PI3K/AKT activation. Interestingly, PRL can also regulate detrimental effects of glucocorticoids such as antiproliferation and cell death in the hippocampus [65]. PRL administration, as well as lactation, improves stress response, proliferation, and possible neurogenesis against glucocorticoid-related stress damage through attenuation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis [66]. Based on this, it is possible that PRL as a neuroprotective agent also plays a role as a protective hormone against damage caused by glucocorticoid excess, although further studies are needed to elucidate whether the PI3K/AKT signaling pathway is involved in the prevention of glucocorticoid damage or even in other types of neuronal damage.

In summary, our results indicate that PRL administration in primary cultures of hippocampal neurons is protective against Glu excitotoxicity, and this neuroprotective effect is mediated, in part, by the activation of the PI3K/AKT signaling pathway, the consequent regulation of GSK3 β /NF- κ B, and the upregulation of survival genes, such as *Bcl-2* and oxidative stress regulation gene *Nrf2*. We have summarized the possible molecular mechanisms involved in PRL-induced neuroprotection derived from this study in Fig. 10. It is well known that other signaling pathways have been associated with PRL. However, there are no reports of canonical STAT5 activity in this model of excitotoxicity [11]. In line with this observation, in the present study we did not observe pSTAT5 expression in hippocampal neurons (data not shown). We consider that there is still limited knowledge about PRL signaling during neuroprotection in the brain, as well how it may modulate the AKT and NF- κ B pathways for neuroprotection. Thus, further studies are required to elucidate these complex network interactions. The understanding of the activation of the signaling pathway induced by PRL is necessary to determine its molecular actions under both, pathological and physiological conditions.

5. Conclusion

In this study, we demonstrate that the neuroprotective effect of PRL is mediated in part, by the activation of the PI3K/AKT survival signaling pathway and the regulation of its target proteins, particularly GSK3 β and NF- κ B, which may result in an increase in *Bcl-2* and *Nrf2* genes, promoting neuronal survival against Glu excitotoxicity in hippocampal neurons. Nevertheless, data related to other signaling pathways and crosstalk between them, which could be involved in the neuroprotective effect of PRL, remains to be elucidated. Therefore, PRL effects on signaling pathway activation open new avenues of research about PRL protective mechanisms and possible therapeutic effects in the brain.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the data reported in this paper.

Data Availability

No data was used for the research described in the article.

Acknowledgements

Gladys Molina Salinas is a doctoral student from the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received CONAHCYT fellowship 892106. This study was supported by grants from PAPIIT IN228420.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at [doi:10.1016/j.peptides.2023.171037](https://doi.org/10.1016/j.peptides.2023.171037).

References

- [1] G.L. Wenk, C.A. Barnes, Regional changes in the hippocampal density of AMPA and NMDA receptors across the lifespan of the rat, *Brain Res* 885 (2000) 1–5, [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)02792-X](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)02792-X).
- [2] M. P. P. M, R.T. Butler, R.L. Self, J.K. Smith, L.J. Sharrett-Field, N.J. Berry, J. M. Littleton, J.R. Pauly, Selective vulnerability of hippocampal cornu ammonis 1 pyramidal cells to excitotoxic insult is associated with the expression of polyamine-sensitive N-methyl-D-aspartate-type glutamate receptors, *Neuroscience* 20 (2010) 525–534, <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.10.018>.
- [3] P.V. Tran, In vitro evidence for post-insult neuroprotective activity of an evolutionarily conserved motif against excitotoxic neuronal cell death, *Neuroreport* 30 (2019) 213–216, <https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000001186>.
- [4] R. Pluta, M. Ułamek-Kozioł, S.J. Czuczwar, Neuroprotective and neurological enhancement effects of curcumin after brain ischemia injury with alzheimer's disease phenotype, *Int. J. Mol. Sci.* 19 (2018) 1–16, <https://doi.org/10.3390/ijms19124002>.
- [5] M.E. Freeman, L.A. Kanyicska, A. Lerant, G. Nagy, Prolactin: structure, function, and regulation of secretion, *Am. Physiological Soc.* 80 (2000) 1523–1631, <https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.4.1523>.
- [6] N.A. Rivero-Segura, E. Flores-Soto, S.G. De La Cadena, I. Coronado-Mares, J. C. Gomez-Verjan, D.G. Ferreira, E.A. Cabrera-Reyes, L.V. Lopes, L. Massieu, M. Cerbón, Prolactin-induced neuroprotection against glutamate excitotoxicity is mediated by the reduction of [Ca²⁺]_i overload and NF- κ B activation, *PLoS One* 12 (2017) 1–16, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176910>.
- [7] N.A. Rivero-Segura, M.I. Coronado-Mares, R. Rincón-Heredia, I. Pérez-Torres, T. Montiel, N. Pavón, E.A. Cabrera-Reyes, L. Massieu, M. Cerbón, Prolactin prevents mitochondrial dysfunction induced by glutamate excitotoxicity in hippocampal neurons, *Neurosci. Lett.* 701 (2019) 58–64, <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.02.027>.
- [8] V. Cabrera, D. Cantú, E. Ramos, A. Vanoye-Carlo, M. Cerbón, T. Morales, Lactation is a natural model of hippocampus neuroprotection against excitotoxicity, *Neurosci. Lett.* 461 (2009) 136–139, <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.06.017>.
- [9] A. Vanoye-Carlo, T. Morales, E. Ramos, A. Mendoza-Rodríguez, M. Cerbón, Neuroprotective effects of lactation against kainic acid treatment in the dorsal hippocampus of the rat, *Horm. Behav.* 53 (2008) 112–123, <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2007.09.004>.
- [10] E. Vergara-Castañeda, D.R. Grattan, H. Pasantes-Morales, M. Pérez-Domínguez, E. A. Cabrera-Reyes, T. Morales, M. Cerbón, Prolactin mediates neuroprotection against excitotoxicity in primary cell cultures of hippocampal neurons via its receptor, *Brain Res* 2016 (1636) 193–199, <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.02.011>.
- [11] G. Molina-Salinas, N.A. Rivero-Segura, E.A. Cabrera-Reyes, V. Rodríguez-Chávez, E. Langley, M. Cerbon, Decoding signaling pathways involved in prolactin-induced neuroprotection: A review, *Front. Neuroendocrinol.* 61 (2021), 100913, <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2021.100913>.
- [12] S.G. de la Cadena, K. Hernández-Fonseca, I. Camacho-Arroyo, L. Massieu, Glucose deprivation induces reticulum stress by the PERK pathway and caspase-7- and calpain-mediated caspase-12 activation, *Apoptosis* 19 (2014) 414–427, <https://doi.org/10.1007/s10495-013-0930-7>.
- [13] K. Hernández-Fonseca, N. Cárdenas-Rodríguez, J. Pedraza-Chaverri, L. Massieu, Calcium-dependent production of reactive oxygen species is involved in neuronal damage induced during glycolysis inhibition in cultured hippocampal neurons, *J. Neurosci. Res.* 86 (2008) 1768–1780, <https://doi.org/10.1002/jnr.21634>.
- [14] S. Matsuda, Y. Ikeda, M. Murakami, Y. Nakagawa, A. Tsuji, Y. Kitagishi, Roles of PI3K/AKT/GSK3 pathway involved in psychiatric illnesses, *Diseases* 7 (2019) 22, <https://doi.org/10.3390/diseases7010022>.
- [15] K. Popiolek-Barczyk, J. Mika, Targeting the microglial signaling pathways: new insights in the modulation of, *Curr. Med. Chem.* 23 (2016) 2908–2928, <https://doi.org/10.2174/0929867323666160607120124>.
- [16] S.S. Willard, S. Koochekpour, Glutamate, glutamate receptors, and downstream signaling pathways, *Int. J. Biol. Sci.* 9 (2013) 948–959, <https://doi.org/10.7150/ijbs.6426>.
- [17] Y. Zhu, C. Culmsee, S. Klumpp, J. Krieglstein, Neuroprotection by transforming growth factor-beta1 involves activation of nuclear factor-kappaB through phosphatidylinositol-3-OH kinase/Akt and mitogen-activated protein kinase-extracellular-signal regulated kinase1,2 signaling pathways, *Neuroscience* 123 (2004) 897–906, <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2003.10.037>.

- [18] T.W. Lai, S. Zhang, Y.T. Wang, Excitotoxicity and stroke: Identifying novel targets for neuroprotection, *Prog. Neurobiol.* 115 (2014) 157–188, <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.11.006>.
- [19] A. Mehta, M. Prabhakar, P. Kumar, R. Deshmukh, P.L. Sharma, Excitotoxicity: Bridge to various triggers in neurodegenerative disorders, *Eur. J. Pharm.* (2012) 1–13, <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.10.032>.
- [20] A. Ortiz-Pérez, O. Limón-Morales, J.C. Rojas-Castañeda, M. Cerbón, O. Picazo, Prolactin prevents the kainic acid-induced neuronal loss in the rat hippocampus by inducing prolactin receptor and putatively increasing the VGLUT1 overexpression, *Neurosci. Lett.* 694 (2019) 116–123, <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.11.052>.
- [21] S. Kaech, G. Banker, Culturing hippocampal neurons, *Nat. Protoc.* 1 (2006) 2406–2415, <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.356>.
- [22] K.A. Pelkey, R. Chittajallu, M.T. Craig, L. Tricoire, J.C. Wester, C.J. McBain, Hippocampal GABAergic Inhibitory Interneurons, *Physiol. Rev.* 97 (2017) 1619–1747, <https://doi.org/10.1152/physrev.00007.2017>.
- [23] Y.K. Wu, K. Fujishima, M. Kengaku, Differentiation of apical and basal dendrites in pyramidal cells and granule cells in dissociated hippocampal cultures, *PLoS One* 10 (2015) 1–16, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118482>.
- [24] X. Wang, C. Zhang, G. Szábo, Q.-Q. Sun, Distribution of CaMKII α expression in the brain in vivo, studied by CaMKII α -GFP mice, *Brain Res* 1518 (2013) 9–25, <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.04.042>.
- [25] D.C. Buonfiglio, R.-L. AM, M.A. Silveira, I.C. Furigo, L. Hennighausen, R. an Frazão, J. Donato, Hormones and behavior neuronal STAT5 signaling is required for maintaining lactation but not for postpartum maternal behaviors in mice, *Horm. Behav.* 71 (2015) 60–68, <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2015.04.004>.
- [26] H.M. ans A.A. Belugin S, A.R. Diogenes, M.J. Patil, E. Ginsburg, Mechanisms of transient signaling via short and long prolactin receptor isoforms in female and male sensory, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 34943–34955, <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.486571>.
- [27] M. Patil, A.H. Hovhannisyian, A. Wangzhou, J. Mecklenburg, W. Koek, V. Goffin, D. Grattan, U. Boehm, G. Dussor, T.J. Price, A.N. Akopian, Prolactin receptor expression in mouse dorsal root ganglia neuronal subtypes is sex-dependent, *J. Neuroendocrinol.* 31 (2019) 0–2, <https://doi.org/10.1111/jne.12759>.
- [28] T. Morales, M. Lorenson, A.M. Walker, E. Ramos, Both prolactin (PRL) and a molecular mimic of phosphorylated PRL, S179D-PRL, protect the hippocampus of female rats against excitotoxicity, *Neuroscience* 258 (2014) 211–217, <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.11.015>.
- [29] E.A. Cabrera-Reyes, O. Limón-Morales, N.A. Rivero-Segura, I. Camacho-Arroyo, M. Cerbón, Prolactin function and putative expression in the brain, *Endocrine* 57 (2017) 199–213, <https://doi.org/10.1007/s12020-017-1346-x>.
- [30] W.J. DeVito, Distribution of immunoreactive prolactin in the male and female rat brain: effects of hypophysectomy and intraventricular administration of colchicine, *Neuroendocrinology* 47 (1988) 284–289, <https://doi.org/10.1159/000124926>.
- [31] M. Li, W.W. Gao, L. Liu, Y. Gao, Y.F. Wang, B. Zhao, X.X. Xiong, The Akt/glycogen synthase kinase-3 β pathway participates in the neuroprotective effect of interleukin-4 against cerebral ischemia/reperfusion injury, *Neural Regen. Res.* 15 (2020) 1716–1723, <https://doi.org/10.4103/1673-5374.276343>.
- [32] H. Dudek, S.R. Datta, T.F. Franke, M.J. Birnbaum, R. Yao, G.M. Cooper, R.A. Segal, D.R. Kaplan, M.E. Greenberg, Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt, *Science* 275 (1997) 661–665, <https://doi.org/10.1126/science.275.5300.661>.
- [33] R.D. Almeida, B.J. Manadas, C.V. Melo, J.R. Gomes, C.S. Mendes, M.M. Grãos, R. F. Carvalho, A.P. Carvalho, C.B. Duarte, Neuroprotection by BDNF against glutamate-induced apoptotic cell death is mediated by ERK and PI3-kinase pathways, *Cell Death Differ.* 12 (2005) 1329–1343, <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401662>.
- [34] L.C. Constantino, L.B. Binder, S. Vandresen-Filho, G.G. Viola, F.K. Ludka, M. W. Lopes, R.B. Leal, C.I. Tasca, Role of Phosphatidylinositol-3 Kinase Pathway in NMDA preconditioning: different mechanisms for seizures and hippocampal neuronal degeneration induced by quinolinic acid, *Neurotox. Res.* 34 (2018) 452–462, <https://doi.org/10.1007/s12640-018-9903-5>.
- [35] Y.L. Dong, K.J. Pu, W.J. Duan, H.C. Chen, L.X. Chen, Y.M. Wang, Involvement of Akt/CREB signaling pathways in the protective effect of EPA against interleukin-1 β -induced cytotoxicity and BDNF down-regulation in cultured rat hippocampal neurons, *BMC Neurosci.* 19 (2018) 1–8, <https://doi.org/10.1186/s12868-018-0455-7>.
- [36] A.K. Roof, A. Gutierrez-Hartmann, Consider the context: Ras/ERK and PI3K/AKT/mTOR signaling outcomes are pituitary cell type-specific, *Mol. Cell. Endocrinol.* 463 (2018) 87–96, <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.04.019>.
- [37] D.J. Lyons, A. Hellysaz, C. Broberger, Prolactin regulates tuberoinfundibular dopaminergic neuron discharge pattern: novel feedback control mechanisms in the lactotrophic axis, *J. Neurosci.* 32 (2012) 8074–8083, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0129-12.2012>.
- [38] M.J. Patil, M.A. Henry, A.N. Akopian, Prolactin receptor in regulation of neuronal excitability and channels, *Channels* 8 (2014) 193–202, <https://doi.org/10.4161/chan.28946>.
- [39] I. Anagnostou, T. Morales, Fatherhood diminishes hippocampal damaging action of excitotoxic lesioning in mice, *J. Neuroendocrinol.* 31 (2019) 0–3, <https://doi.org/10.1111/jne.12783>.
- [40] M.A. Domínguez-Cáceres, J.M. García-Martínez, A. Calcabrini, L. González, P. González Porque, J. León, J. Martín-Pérez, Prolactin induces c-Myc expression and cell survival through activation of Src/Akt pathway in lymphoid cells, *Oncogene* 23 (2004) 7378–7390, <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208002>.
- [41] T. Le Xuan Nguyen, J.W. Choi, S.B. Lee, K. Ye, S.-D. Woo, K.-H. Lee, J.-Y. Ahn, Akt phosphorylation is essential for nuclear translocation and retention in NGF-stimulated PC12 cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 349 (2006) 789–798, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.08.120>.
- [42] N. Noshita, A. Lewén, T. Sugawara, P.H. Chan, Evidence of phosphorylation of Akt and neuronal survival after transient focal cerebral ischemia in mice, *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* 21 (2001) 1442–1450, <https://doi.org/10.1097/00004647-200112000-00009>.
- [43] R.M. Uranga, S. Katz, G.A. Salvador, Enhanced phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt signaling has pleiotropic targets in hippocampal neurons exposed to iron-induced oxidative stress, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 19773–19784, <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.457622>.
- [44] Y. Kitagishi, A. Nakanishi, Y. Ogura, S. Matsuda, Dietary regulation of PI3K/AKT/GSK-3 β pathway in Alzheimer's disease, *Alzheimer's Res. Ther.* 6 (2014) 1–7, <https://doi.org/10.1186/alzrt265>.
- [45] S. Matsuda, Y. Nakagawa, A. Tsuji, Y. Kitagishi, A. Nakanishi, T. Murai, Implications of PI3K/AKT/PTEN signaling on superoxide dismutases expression and in the pathogenesis of Alzheimer's Disease, *Diseases* 6 (2018) 1–13, <https://doi.org/10.3390/diseases6020028>.
- [46] D. Muñoz-Mayorga, C. Guerra-Araiza, L. Torner, T. Morales, Tau phosphorylation in female neurodegeneration: role of estrogens, progesterone, and prolactin, *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 9 (2018) 1–8, <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00133>.
- [47] H. Duc Nguyen, N.M.H. Hoang, M. Ko, D. Seo, S. Kim, W.H. Jo, J.-W. Bae, M.-S. Kim, Association between serum prolactin levels and neurodegenerative diseases: systematic review and meta-analysis, *Neuroimmunomodulation* 29 (2022) 85–96, <https://doi.org/10.1159/000519552>.
- [48] M. Zhu, M. Liu, Q. lin Guo, C. Qing Zhu, J. chun Guo, Prolonged DADLE exposure epigenetically promotes Bcl-2 expression and elicits neuroprotection in primary rat cortical neurons via the PI3K/Akt/NF- κ B pathway, *Acta Pharmacol. Sin.* 39 (2018) 1582–1589, <https://doi.org/10.1038/aps.2018.17>.
- [49] V. Fridmacher, B. Kaltschmidt, B. Goudeau, D. Ndiaye, F.M. Rossi, J. Pfeiffer, C. Kaltschmidt, A. Israël, S. Mémot, Forebrain-specific neuronal inhibition of nuclear factor- κ B activity leads to loss of neuroprotection, *J. Neurosci.* 23 (2003) 9403–9408, <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-28-09403.2003>.
- [50] L. Tao, D. Li, H. Liu, F. Jiang, Y. Xu, Y. Cao, R. Gao, G. Chen, Neuroprotective effects of metformin on traumatic brain injury in rats associated with NF- κ B and MAPK signaling pathway, *Brain Res. Bull.* 140 (2018) 154–161, <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.04.008>.
- [51] B. Ding, C. Lin, Q. Liu, Y. He, J.B. Ruganzu, H. Jin, X. Peng, S. Ji, Y. Ma, W. Yang, Tanshinone IIA attenuates neuroinflammation via inhibiting RAGE/NF- κ B signaling pathway in vivo and in vitro, *J. Neuroinflamm.* 17 (2020) 302, <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01981-4>.
- [52] F. Lezoualc'h, C. Behl, Transcription factor NF-kappaB: friend or foe of neurons? *Mol. Psychiatry* 3 (1998) 15–20, <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4000295>.
- [53] P. Jayakumar, C.G. Martínez-Moreno, M.Y. Lorenson, A.M. Walker, T. Morales, Prolactin attenuates neuroinflammation in LPS-Activated SIM-A9 microglial cells by inhibiting NF- κ B pathways via ERK1/2, *Cell. Mol. Neurobiol.* 42 (2022) 2171–2186, <https://doi.org/10.1007/s10571-021-01087-2>.
- [54] P.-C. Hsu, T.-C. Hour, Y.-F. Liao, Y.-C. Hung, C.-C. Liu, W.-H. Chang, M.-C. Kao, G. J. Tsay, H.-C. Hung, G.-Y. Liu, Increasing ornithine decarboxylase activity is another way of prolactin preventing methotrexate-induced apoptosis: crosstalk between ODC and BCL-2, *Apoptosis* 11 (2006) 389–399, <https://doi.org/10.1007/s10495-006-4002-0>.
- [55] A. Alfieri, S. Srivastava, R.C.M. Siow, M. Modo, P.A. Fraser, G.E. Mann, Targeting the Nrf2-Keap1 antioxidant defence pathway for neurovascular protection in stroke, *J. Physiol.* 589 (2011) 4125–4136, <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2011.210294>.
- [56] Z.A. Shah, R.-C. Li, R.K. Thimmulappa, T.W. Kensler, M. Yamamoto, S. Biswal, S. Doré, Role of reactive oxygen species in modulation of Nrf2 following ischemic reperfusion injury, *Neuroscience* 147 (2007) 53–59, <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.02.066>.
- [57] Q. Liu, Z. Jin, Z. Xu, H. Yang, L. Li, G. Li, F. Li, S. Gu, S. Zong, J. Zhou, L. Cao, Z. Wang, W. Xiao, Antioxidant effects of ginkgolides and bilobalide against cerebral ischemia injury by activating the Akt/Nrf2 pathway in vitro and in vivo, *Cell Stress Chaperon-*. 24 (2019) 441–452, <https://doi.org/10.1007/s12192-019-00977-1>.
- [58] P. Ding, W. Chen, X. Yan, J. Zhang, C. Li, G. Zhang, Y. Wang, Y. Li, BMPER alleviates ischemic brain injury by protecting neurons and inhibiting neuroinflammation via Smad3-Akt-Nrf2 pathway, *CNS Neurosci. Ther.* 28 (2022) 593–607, <https://doi.org/10.1111/cns.13782>.
- [59] A.Y. Shih, P. Li, T.H. Murphy, A small-molecule-inducible Nrf2-mediated antioxidant response provides effective prophylaxis against cerebral ischemia in vivo, *J. Neurosci.* . J. Soc. Neurosci. 25 (2005) 10321–10335, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4014-05.2005>.
- [60] L. Wang, H. An, F. Yu, J. Yang, H. Ding, Y. Bao, H. Xie, D. Huang, The neuroprotective effects of paeoniflorin against MPP(+)-induced damage to dopaminergic neurons via the Akt/Nrf2/GPX4 pathway, *J. Chem. Neuroanat.* 122 (2022), 102103, <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2022.102103>.
- [61] Y. Hui, T. Chengyong, L. Cheng, H. Haixia, Z. Yuanda, Y. Weihua, Resveratrol attenuates the cytotoxicity induced by amyloid- β 1–42 in PC12 cells by upregulating heme oxygenase-1 via the PI3K/Akt/Nrf2 pathway, *Neurochem. Res.* 43 (2018) 297–305, <https://doi.org/10.1007/s11064-017-2421-7>.
- [62] L. Wang, Y. Chen, P. Sternberg, J. Cai, Essential roles of the PI3 kinase/Akt pathway in regulating Nrf2-dependent antioxidant functions in the RPE, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 49 (2008) 1671–1678, <https://doi.org/10.1167/iovs.07-1099>.

- [63] C. Tonelli, I.I.C. Chio, D.A. Tuveson, Transcriptional regulation by Nrf2, *Antioxid. Redox Signal.* 29 (2018) 1727–1745, <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7342>.
- [64] F. Sivandzade, S. Prasad, A. Bhalerao, L. Cucullo, NRF2 and NF- κ B interplay in cerebrovascular and neurodegenerative disorders: molecular mechanisms and possible therapeutic approaches, *Redox Biol.* 21 (2019), 101059, <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.11.017>.
- [65] L. Torner, S. Karg, A. Blume, M. Kandasamy, H.G. Kuhn, J. Winkler, L. Aigner, I. D. Neumann, Prolactin prevents chronic stress-induced decrease of adult hippocampal neurogenesis and promotes neuronal fate, *J. Neurosci.* 29 (2009) 1826–1833, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3178-08.2009>.
- [66] L. Torner, Actions of prolactin in the brain: from physiological adaptations to stress and neurogenesis to psychopathology, *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 7 (25) (2016) 1–6, <https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00025>.