



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

EFFECTO DE LA PROLACTINA SOBRE LA EXPRESIÓN Y FUNCIONALIDAD DE
LOS RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS IONOTRÓPICOS EN UN MODELO
IN VITRO DE EXCITOTOXICIDAD EN NEURONAS HIPOCAMPALES

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

PRESENTA:
VALERIA RODRÍGUEZ CHÁVEZ

DIRECTOR DE TESIS
DR. MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES
FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ TUTOR
DRA. ALIESHA ARACELI GONZÁLEZ ARENAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
DR. JULIO EDUARDO ROQUE MORÁN ANDRADE
INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR

MÉXICO, CDMX. OCTUBRE 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) **Rodríguez-Chavez, V.**, Moran, J., Molina-Salinas, G., Zepeda Ruiz, W. A., Rodríguez, M. C., Picazo, O., & Cerbon, M. (2021). Participation of Glutamatergic Ionotropic Receptors in Excitotoxicity: The Neuroprotective Role of Prolactin. *Neuroscience*, *461*, 180–193. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2021.02.027>.
- 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. *Frontiers in neuroendocrinology*, *61*,100913. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2021.100913>.
- 3) **Rodríguez-Chávez, V.**, Flores-Soto, E., Molina-Salinas, G., Martínez-Razo, L. D., Montaña, L. M., & Cerbón, M. (2023). Prolactin reduces the kainic acid-induced increase in intracellular Ca²⁺ concentration, leading to neuroprotection of hippocampal neurons. *Neuroscience letters*, *810*, 137344. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2023.137344>.
- 4) Molina-Salinas, G., **Rodríguez-Chávez, V.**, Langley, E., & Cerbon, M. (2023). Prolactin-induced neuroprotection against excitotoxicity is mediated via PI3K/AKT and GSK3β/NF-κB in primary cultures of hippocampal neurons. *Peptides*, *166*,171037. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2023.171037>.

ABREVIATURAS

(AK)	Ácido kaínico
(RsAK)	Receptores a ácido kaínico
(RsAMPA)	Receptores a α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
(Ca ²⁺)	Calcio
(Gln)	Glutamina
(Glu)	Glutamato
(GPCR)	Receptores acoplados a proteínas G
(RsGluI)	Receptores glutamatérgicos ionotrópicos
(RsIP3)	Receptores de inositol-1,4,5-tris-fosfato
(K ⁺)	Potasio
(MAPK)	Proteína quinasa activada por mitógeno
(Mg ²⁺)	Magnesio
(RsGluM)	Receptores glutamatérgicos metabotrópicos
(MK-801)	Malato de hidrógeno de dizocilpina
(Na ⁺)	Sodio
(NBQX)	2,3-dioxo-6-nitro-7-sulfamoilbenzo(f)quinoxalina
(RsNMDA)	Receptores a N-metil-D-aspartato
(PKA)	Proteínas quinasas A
(PKC)	Proteínas quinasas C
(PMCA)	Transportadores de Ca ²⁺ de membrana plasmática
(PRL)	Prolactina
(RPRL)	Receptor de prolactina
(RE)	Retículo endoplásmico
(ROS)	Especies reactivas de oxígeno
(RyR)	Receptores de rianodina
(SNC)	Sistema nervioso central
(VGCC)	Canales de Ca ²⁺ dependientes de volta

ABSTRACT

Prolactin (PRL) has been reported to exert a neuroprotective effect against excitotoxicity caused by kainic acid (KA) or glutamate (Glu) *in vivo* and *in vitro* models. However, the mechanism by which PRL induces this neuroprotective effect is not entirely clear. Therefore, the objective of this study was to determine the effect of PRL administration against the excitotoxicity of KA or Glu, in primary cultures of hippocampal neurons, in order to evaluate, its neuroprotective role in an *in vitro* model. For this reason, we evaluated cell viability, changes in intracellular calcium concentration (Ca^{2+}), and identified the mRNAs that encode the subunits of ionotropic glutamatergic receptors (iGluRs). Cell viability and intracellular Ca^{2+} concentration were assessed by MTT and Fura-2 assays, respectively, either after induction by treatment with a specific glutamatergic receptor agonist or antagonist, alone or simultaneously with PRL administration. The expression of iGluRs subunits was evaluated by RT-qPCR. It was found that dose-response treatments with KA and Glu induced a significant reduction in the viability of hippocampal neurons, in addition, these iGluRs agonists induced a significant increase in neuronal intracellular Ca^{2+} . Interestingly, it is also observed that the administration of PRL induced a significant increase in neuronal viability when administered prior to treatment with KA and Glu. Furthermore, PRL administration also reduced the intracellular Ca^{2+} concentration induced by KA or Glu treatment. Likewise, prior administration of NMDARs or AMPARs-KARs antagonists reversed cell death and reduced intracellular Ca^{2+} similarly to PRL. Finally, mRNAs coding for AMPARs-AKRs and NMDARs subunits were detected in hippocampal neurons. However, no significant changes were observed between excitotoxicity treatment or PRL treatment. Overall, the results indicate that KA or Glu induced an increase in intracellular Ca^{2+} concentration that caused neuronal damage and that these effects were blocked by PRL administration. It is concluded that the neuroprotection of PRL may be mediated by a modulation of intracellular Ca^{2+} homeostasis and the interaction of iGluRs with PRL.

RESUMEN

Se ha reportado que la prolactina (PRL) ejerce un efecto neuroprotector contra la excitotoxicidad causada por el ácido kaínico (AK) o el glutamato (Glu) en modelos *in vivo* e *in vitro*. Sin embargo, el mecanismo por el cual la PRL induce este efecto neuroprotector no está completamente claro. Por tanto, el objetivo de este estudio fue determinar el efecto de la administración de PRL frente a la excitotoxicidad de AK o Glu, en cultivos primarios de neuronas del hipocampo para poder evaluar su papel neuroprotector en un modelo *in vitro*. Para esto se evaluó la viabilidad celular, cambios en la concentración de calcio (Ca^{2+}) intracelular y se buscó identificar ARNm que codifican para las subunidades de receptores glutamatérgicos inotrópicos (RsGluI). La viabilidad celular y la concentración intracelular de Ca^{2+} se evaluaron mediante ensayos MTT y Fura-2, respectivamente, ya sea después de la inducción mediante un tratamiento con un agonista o antagonista del receptor glutamatérgico específico, solo o simultáneamente con la administración de PRL. La expresión de las subunidades de los RsGluI se evaluó mediante RT-qPCR. Se observó que los tratamientos dosis-respuesta con AK y Glu indujeron un aumento significativo en la concentración de Ca^{2+} intracelular neuronal seguido de una reducción significativa en la viabilidad de las neuronas del hipocampo. Sorprendentemente, la administración previa de PRL indujo un aumento en la viabilidad neuronal después del tratamiento con AK y Glu. Además, la administración de PRL redujo la concentración de Ca^{2+} intracelular inducida por el tratamiento con AK o Glu. Asimismo, la administración independiente de antagonistas de los RsNMDA o RsAMPA-RsAK revirtió la muerte celular y redujo la concentración de Ca^{2+} intracelular de manera similar a la PRL. Finalmente, se detectó la expresión de ARNm de subtipos de los RsAMPA, RsAK y RsNMDA en neuronas del hipocampo. Sin embargo, no se observaron cambios significativos en las condiciones de excitotoxicidad o en el tratamiento con PRL. En general, los resultados indican que el AK o Glu indujeron un aumento en el Ca^{2+} intracelular que condujo al daño neuronal, y esos efectos fueron bloqueados por la administración de PRL. Se concluye que la neuroprotección por PRL puede estar mediada por una modulación en la homeostasis del Ca^{2+} intracelular y una posible interacción con los RsGluI.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por la educación de calidad, pública y gratuita que me ha brindado desde que inicie la preparatoria, hasta el final del doctorado. En sus aulas he cultivado el pensamiento, aprendido, leído y obtenido las mejores experiencias de la vida, conociendo personas increíbles incluyendo compañeros y docentes. 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 de los que he aprendido tanto y al comité tutor que me daba herramientas para mejorar semestre a semestre. Al CONAHCYT, por la beca otorgada 745619, para la realización de mis estudios de posgrado. A la DGAPA, programa PAPIIT proyecto IN228420 por su apoyo financiero parcial para realizar el trabajo experimental realizado en esta tesis Doctoral.

Al Laboratorio 323 de Endocrinología molecular a cargo del Dr. Marco Cerbón, por sus enseñanzas, su apoyo durante el tiempo que estuve dentro del laboratorio, por ayudarme a crecer en mi formación académica, pero lo más importante por ayudarme a creer en mí.

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 que siempre ha estado conmigo, pero sobre todo a mis papas quienes siempre han estado a mi lado en los buenos y malos momentos, por su cariño, amor, protección y paciencia que siempre me han brindado, por enseñarme que siempre tendré un hogar y el apoyo de ellos.

Al ser que más he amado, que me enseñó que puedo amar infinitamente, en la presencia y en el recuerdo, que aparte me enseñó lo fuerte que puedo ser al mismo tiempo que me mostro lo débil que soy, mi amado Loky, una luz en mi vida al igual que su hermano Tony.

¡Gracias por todo!

ÍNDICE	Paginas
1.- -INTRODUCCIÓN	9
1.1.- La hormona prolactina	10
1.2.- Receptores de prolactina	11
1.3.- Funciones de la prolactina	13
1.4.- Neuroprotección por prolactina ante daño excitotóxico	14
1.5.- Modelos <i>in vivo</i> de neuroprotección por prolactina	15
1.6.- Modelos <i>in vitro</i> de neuroprotección por prolactina	15
1.7.- Glutamato	17
1.8.- Receptores de glutamato	18
1.9.- Receptores de ácido kaínico	19
1.10.- Funciones del glutamato en el sistema nervioso central	21
1.11.- Excitotoxicidad por glutamato	21
1.12.- Excitotoxicidad por ácido kaínico	23
1.13.- Participación del calcio en la excitotoxicidad	24
2.-JUSTIFICACIÓN	26
3.-HIPÓTESIS	27
4.-OBJETIVO GENERAL	27
4.1.- Objetivos particulares	28
5.-MATERIALES Y MÉTODOS	29
5.1.- Uso de animales de experimentación	29
5.2.- Cultivo primario de neuronas de hipocampo de rata	29
5.3.- Tratamientos	30
5.4.- Inmunofluorescencia del receptor de prolactina	30
5.5.- Viabilidad celular por MTT	31
5.6.- Ensayo de concentración de calcio intracelular	31
5.7.- Extracción de ARN	32
5.8.- RT-qPCR	32
5.9.- Análisis estadístico	33
6.-RESULTADOS	34
6.1.- Receptor de prolactina en neuronas hipocampales	34
6.2.- Efecto del ácido kaínico, glutamato y prolactina sobre la viabilidad neuronal	35

6.3.- Efecto neuroprotector de la prolactina contra la excitotoxicidad inducida por ácido kaínico o glutamato	36
6.4.- El antagonista de los RsAMPA-RsKA bloquea la excitotoxicidad de ácido kaínico y glutamato	41
6.5.- El antagonista de los RsNMDA bloquea el daño causado por la administración de ácido kaínico y glutamato	45
6.6.- Efecto de la prolactina sobre el antagonista de los RsAMPA-RsAK ante la excitotoxicidad por ácido kaínico y glutamato	47
6.7.- El efecto de la prolactina sobre el antagonista de los RsNMDA ante la excitotoxicidad por ácido kaínico y glutamato	49
6.8.- Efecto de la Prolactina sobre la concentración de calcio intracelular inducida por ácido kaínico en neuronas del hipocampo	51
6.9.- Efecto de la Prolactina sobre la concentración de calcio intracelular inducida por el glutamato en neuronas del hipocampo	49
6.10.- Efecto de la PRL o excitotoxicidad sobre la modulación de ARNm que codifican para las subunidades de los receptores glutamatérgicos ionotrópicos	55
7.-DISCUSIÓN	57
8.-CONCLUSIÓN	64
9.-PERPECTIVAS	65
10.-REFERENCIAS	66

1.-INTRODUCCIÓN

En la actualidad es de importancia científica descubrir compuestos o moléculas capaces de inducir neuroprotección a las neuronas, esto con el objetivo de evitar su daño y muerte, debido a que ambas dan lugar a fisiopatologías o enfermedades neurodegenerativas (Vanoye-Carlo et al., 2008; Rivero-Segura et al., 2017; Rodriguez-Chavez et al., 2021; Molina-Salinas et al., 2023). Respecto al daño neuronal, uno de los mecanismos involucrados en la muerte por apoptosis y por necrosis es la excitotoxicidad, que consiste en la sobreactivación de los receptores glutamatérgicos ionotrópicos (RsGluI) por un exceso de glutamato (Glu) extracelular, este mecanismo está involucrado en múltiples condiciones neurológicas, incluyendo epilepsia, isquemia y trastornos neurodegenerativos (Dong et al., 2009; Mehta et al., 2013; Lewerenz and Maher, 2015; Avila et al., 2017; Armada-Moreira et al., 2020; Choi, 2020). Asimismo, estas condiciones comparten un mecanismo patogénico común, que incluye la desregulación de la homeostasis del calcio (Ca^{2+}) intracelular, la activación de la síntesis de óxido nítrico y la activación de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo cual a su vez genera daño en diferentes biomoléculas de la célula (Wang et al., 2005; Brini et al., 2014; Bertero and Maack, 2018). No obstante, hasta el momento se han sugerido algunos compuestos que son capaces de tener un efecto neuroprotector contra la excitotoxicidad por Glu, entre ellos se ha reportado a la hormona prolactina (PRL) como un compuesto natural que induce neuroprotección en modelos *in vivo* e *in vitro*. Sin embargo, su mecanismo de acción no está completamente descrito (Vanoye-Carlo et al., 2008; Vergara-Castañeda et al., 2016; Rivero-Segura et al., 2017, 2019; Molina-Salinas et al., 2023). Por esta razón el objetivo de esta tesis fue determinar el efecto de la PRL sobre la expresión y funcionalidad de los RsGluI en un modelo *in vitro* de excitotoxicidad en neuronas hipocampales.

1.1.-La hormona prolactina

La prolactina (PRL) es de interés para la comunidad científica, debido a que se le reconoce como una hormona endocrina multifuncional en el organismo (Freeman et al., 2000; Grattan and Kokay, 2008; Cabrera-Reyes et al., 2017; Bernard et al., 2019). Esta hormona fue descubierta desde la década de 1930 por el biólogo Oscar Riddle (Freeman et al., 2000; Cabrera-Reyes et al., 2017), aunque al inicio se reconocía como un factor que controla la producción y secreción de leche, en la actualidad se le conoce como hormona pleiotrópica, con múltiples funciones en el organismo (Grattan and Kokay, 2008; Bernard et al., 2019).

La PRL pertenece a la familia de hormonas peptídicas que incluyen a la hormona del crecimiento y lactogeno placentario, caracterizadas por tener una estructura terciaria compuesta por cuatro hélices α antiparalelas (Cabrera-Reyes et al., 2017; Bernard et al., 2019; Molina-Salinas et al., 2021). La PRL, es sintetizada en el lóbulo anterior de la hipófisis, por células especializadas denominadas lactótrofos (Marano and Ben-Jonathan, 2014; Bernard et al., 2015; Torner, 2016), aunque también se ha reportado que se sintetiza de manera extrahipofisaria en otros tejidos como linfocitos, fibroblastos de la piel, células de la próstata, células del tejido adiposo y en el cerebro (Costanza and Pedotti, 2016; Cabrera-Reyes et al., 2019; Molina-Salinas et al., 2021; Costa-Brito et al., 2022).

Se ha reportado que la PRL está codificada por un único gen (*PRL*) compuesto por 5 exones y 4 intrones en la mayoría de las especies, las cuales incluyen: mamíferos, peces y aves (Guh et al., 2015; Cabrera-Reyes et al., 2017, 2019; Bernard et al., 2019; Carretero et al., 2019; Costa-Brito et al., 2022; Farrar et al., 2022; Wilson et al., 2023). Asimismo, la regulación transcripcional de la expresión de PRL tanto hipofisaria, como extrahipofisaria está bajo el control de dos regiones promotoras independientes: la primera es la región promotora proximal que modula la expresión de la PRL hipofisaria y la segunda es una región promotora distal que promueve la expresión de PRL extrahipofisaria (Ben-Jonathan et al., 1996; Bernard et al., 2019; Molina-Salinas et al., 2021; Costa-Brito et al., 2022).

Sin embargo, a nivel molecular, su expresión y regulación es tejido-específica, debido a que se han descrito varias isoformas de la PRL que resultan del splicing

alternativo, la escisión proteolítica o de modificaciones postraduccionales (como pueden ser fosforilación, glicosilación, desamidación) y la asociación con otras proteínas circulantes. Cabe señalar que estas modificaciones pueden modificar la actividad biológica de la PRL (Grattan and Kokay, 2008; Bernard et al., 2019; Molina-Salinas et al., 2021; Costa-Brito et al., 2022).

Conjuntamente, se ha reportado que la PRL madura de origen hipofisario está compuesta por 197 y 198 aminoácidos en ratas y humanos, respectivamente, con tres enlaces disulfuro presentes en lugares similares en ambas especies (Ben-Jonathan et al., 1996; Grattan and Kokay, 2008). Asimismo, se ha informado que la PRL puede formar dímeros, polímeros y agregados (Cabrera-Reyes et al., 2017; Molina-Salinas et al., 2021). Otros ejemplos de las modificaciones que la PRL puede tener, son las PRL de alta masa molecular como la “big PRL” y la “big big PRL” (también conocidas como macroPRL), las cuales se han reportado en el tejido sanguíneo de aproximadamente 100 kDa (Hattori et al., 2012; Bernard et al., 2019; Costa-Brito et al., 2022). Sin embargo, las macroPRLs muestran una menor actividad biológica y se sugiere que participan en el almacenamiento, modificación y liberación de PRL (Bernard et al., 2015, 2019; Molina-Salinas et al., 2021). Por otra parte, existen las PRL con bajo peso molecular, las cuales pueden ser de: 14 kDa, 16 kDa y 22 kDa, estas hormonas se generan a partir de la escisión proteolítica de la PRL hipofisaria de 23 kDa (Freeman et al., 2000; Cabrera-Reyes et al., 2017; Bernard et al., 2019). Un ejemplo de un fragmento molecular derivado del procesamiento proteolítico de la PRL, es la vaso inhibina, generada por la acción de proteasas como la catepsina D (Clapp et al., 2006; Triebel et al., 2022). Finalmente se reconoce que las funciones de la PRL están mediadas por la interacción con sus propios receptores (Gorvin, 2015; Vergara-Castañeda et al., 2016; Cabrera-Reyes et al., 2017).

1.2.-Receptores de prolactina

Como se ha reportado previamente (Gorvin, 2015; Vergara-Castañeda et al., 2016; Cabrera-Reyes et al., 2017), las acciones de la PRL se inician en cuanto esta hormona se une a un homodímero del receptor de prolactina (RPRL), formando un complejo heterotrimérico (Horseman and Gregerson, 2014; Gorvin, 2015; Molina-

Salinas et al., 2021; Costa-Brito et al., 2022). Por lo que es importante describir las características de los RsPRL, los cuales se expresan ubicuamente en los organismos (Bu et al., 2015; Gorvin, 2015; Carretero et al., 2019; Molina-Salinas et al., 2021), en tejidos entre los que se incluyen a la glándula mamaria, las gónadas, el hígado, el riñón, la glándula suprarrenal, el cerebro, el corazón, los pulmones, la glándula pituitaria, el útero, el músculo esquelético, la piel y las células del sistema inmune (Freeman et al., 2000; Grattan and Kokay, 2008; Bu et al., 2015; Gorvin, 2015; Torner, 2016; Vergara-Castañeda et al., 2016; Gustafson et al., 2017; Bernard et al., 2019).

Los RsPRL son proteínas de membrana pertenecientes a la superfamilia de receptores de citocinas de clase I (Horseman and Gregerson, 2014; Bernard et al., 2019; Molina-Salinas et al., 2021). Este tipo de receptores son proteínas transmembrana que carecen de actividad tirosina quinasa intrínseca y pueden ser fosforilados por proteínas citoplasmáticas (Patil et al., 2014; Gorvin, 2015; Carretero et al., 2019; Costa-Brito et al., 2022). Están compuestos por tres dominios: el extracelular, el transmembranal y el intracelular (Freeman et al., 2000; Patil et al., 2014; Carretero et al., 2019); en el dominio extracelular se incluye dos regiones, denominadas S1 y S2 (o D1 y D2), que juntos forman el sitio de unión del ligando y es idéntica entre especies al igual que el dominio transmembranal, el único que difiere es el dominio intracelular o citoplasmático, que puede variar de longitud (Freeman et al., 2000; Patil et al., 2014; Carretero et al., 2019; Molina-Salinas et al., 2021; Costa-Brito et al., 2022). Las modificaciones en el dominio intracelular son clave para el reconocimiento de las diversas isoformas descritas del RPRL, entre las más estudiadas, por su distribución y expresión son la isoforma larga, la isoforma intermedia y la isoforma corta (Freeman et al., 2000; Patil et al., 2014; Sangeeta Devi and Halperin, 2014; Gorvin, 2015; Carretero et al., 2019; Molina-Salinas et al., 2021). Es importante señalar que en humanos se ha descrito una isoforma soluble (Sangeeta Devi and Halperin, 2014; Bernard et al., 2019; Costa-Brito et al., 2022). Esta isoforma soluble del RPRL se ha caracterizado en líneas celulares de cáncer de mama humano, siendo un mecanismo regulador de la biodisponibilidad y señalización de la PRL extrahipofisaria, por lo que también se le conocen como

"proteínas de unión a PRL" en el dominio extracelular (Laud et al., 2000; Fleming et al., 2013).

Por otra parte, los RsPRL se han relacionado principalmente con la activación de la vía de señalización JAK2-STAT5 (Sangeeta Devi and Halperin, 2014; Molina-Salinas et al., 2021; Costa-Brito et al., 2022), además, es que interesante que el descubrimiento de esta cascada de señalización fue un gran avance en la comprensión de las acciones de la PRL en el organismo (Bole-Feysot et al., 1998; Horseman and Gregerson, 2014; Molina-Salinas et al., 2021). No obstante, en la actualidad también se ha descrito que la PRL puede inducir la activación de otras dos vías, las cuales son la vía MAPK/ERK1/2 y la vía P13K/Akt (Marano and Ben-Jonathan, 2014; Carretero et al., 2019; Molina-Salinas et al., 2021; Costa-Brito et al., 2022). Concluyendo que la activación de todas estas vías tiene la capacidad de influir en las diversas funciones descritas de la PRL.

1.3.-Funciones de la prolactina

A pesar de que la función canónica de la PRL es estimular la secreción de leche a través de la glándula mamaria durante la lactancia (Freeman et al., 2000; Gustafson et al., 2017; Cabrera-Reyes et al., 2019). Actualmente, se sabe que la PRL regula un gran número de procesos fisiológicos, por eso se conoce como una hormona pleiotrópica con más de 300 funciones descritas en el organismo, que se dividen en categorías como: reproducción, lactogénesis, procesos cerebrales, respuesta inmune, angiogénesis comportamiento materno, crecimiento, metabolismo y osmorregulación (Ben-Jonathan et al., 1996; Costanza and Pedotti, 2016; Pardo et al., 2016; Bernard et al., 2019; Borba et al., 2019; Cabrera-Reyes et al., 2019; Jayakumar et al., 2022; Macotela et al., 2022). Además, se ha informado que la PRL puede atravesar la barrera hematoencefálica (Fitzgerald and Dinan, 2008; Costanza and Pedotti, 2016; Torner, 2016; Tejeda et al., 2019). Por lo que en la actualidad, es de interés para la investigación científica el papel que desempeña la PRL en el cerebro, donde se han reportado su expresión en varias áreas cerebrales, como el bulbo olfatorio, el cuerpo calloso, los plexos coroideos, la amígdala, el hipotálamo, el tálamo, la corteza cerebral y el hipocampo (Bole-Feysot et al., 1998; Horseman and Gregerson, 2014; Gorvin, 2015; Cabrera-Reyes et al., 2017; Carretero et al.,

2019; Costa-Brito et al., 2022). Asimismo, los efectos de la PRL en el cerebro dependen de factores como la edad, el sexo y el estado reproductivo de la especie (Horseman and Gregerson, 2014; Sangeeta Devi and Halperin, 2014; Costa-Brito et al., 2022).

Finalmente, es relevante mencionar que se ha reportado que la PRL participa en muchas funciones cerebrales, entre las que se incluyen el comportamiento materno, la memoria, el balance energético, la ingesta de alimentos, el sueño, la ansiedad, la neurogénesis, y la neuroprotección (Torner et al., 2009; Larsen and Grattan, 2012; Walker et al., 2012; Torner, 2016; Vergara-Castañeda et al., 2016; Rivero-Segura et al., 2017; Zamora-Moratalla and Martín, 2020; Molina-Salinas et al., 2023), siendo esta última un campo de interés para la comunidad científica.

1.4.-Neuroprotección por prolactina ante daño excitotóxico

Respecto a la neuroprotección, se ha reportado que la PRL puede generar protección contra la excitotoxicidad inducida por el ácido kaínico (AK) y por el glutamato (Glu) en modelos *in vivo* e *in vitro* respectivamente (Vanoye-Carlo et al., 2008; Vergara-Castañeda et al., 2016; Rivero-Segura et al., 2017, 2019; Molina-Salinas et al., 2023). En general, se ha sugerido que los mecanismos involucrados en este efecto neuroprotector por PRL incluyen cambios en la neurotransmisión, efectos antiapoptóticos, antioxidantes, regulación de factores neurotróficos, cambios en la homeostasis de calcio (Ca^{2+}) y la sobrevivencia celular, entre otros (Torner, 2016; Cabrera-Reyes et al., 2017; Rivero-Segura et al., 2017, 2019; Molina-Salinas et al., 2023).

Uno de los primeros estudios *in vivo* que relaciona la lactancia con la neuroprotección contra excitotoxicidad es el Vanoye-Carlo et al. (2008). Donde se demostró que cuando se induce daño excitotóxico por AK a ratas en lactancia, se observa una mayor densidad de neuronas piramidales por tinción Nissl y un menor número de células positivas al Fluoro Jade (tinción derivada de fluoresceína polianiónica que se une de manera sensible y específica a las neuronas en degeneración (Ehara and Ueda, 2009)), en las regiones del hipocampo CA1, CA3 y CA4, con respecto a las ratas en diestro, que presentan un alto nivel en el número de células positivas a Fluoro Jade y menor número de células teñidas con Nissl. Los

resultados encontrados en este estudio indicaron que la lactancia podría ser un modelo interesante para comprender los mecanismos de acción que subyacen a la neuroprotección por hormonas, entre ellas la PRL.

1.5.-Modelos *in vivo* de neuroprotección por prolactina

Continuando con los estudios *in vivo* sobre los efectos neuroprotectores de la PRL ante excitotoxicidad, se ha reportado que la PRL puede actuar como un agente ansiolítico endógeno, capaz de inducir la supresión de los comportamientos de ansiedad, así como la respuesta al estrés agudo, en forma dependiente de la dosis (Grattan and Kokay, 2008; Dong et al., 2009; Torner et al., 2009; Torner, 2016). También, en el estudio Vermani et al. (2020) se demostró que la PRL reduce el área de infarto cerebral y regula la homeostasis de Ca^{2+} intracelular, esto en un modelo de isquemia cerebral en ratas.

Finalmente, en el estudio de Cabrera-Reyes et al. (2019) se realizó un análisis transcriptómico por RNASeq de la administración de PRL en ratas Wistar vírgenes adultas ovariectomizadas, revelando 162 genes expresados diferencialmente a lo largo de 24 horas, a continuación en el análisis de Gene Ontology mostro que el 37,65% de los genes, estaban involucrados en procesos cerebrales que están regulados por el hipocampo, como el aprendizaje, la memoria y el comportamiento, así como nuevos procesos que no se habían relacionado anteriormente, como la diferenciación glial, la axogénesis, la transmisión sináptica, el potencial postsináptico, la migración neuronal y glial. Asimismo, el análisis de inmunodetección demostró que la PRL modifica significativamente la morfología microglial, reduce la expresión de la proteína Cd11b/c, y altera la ubicación de las proteínas neuronales Tau, Map2 y Syp, que están involucradas en funciones axogénicas y sinápticas.

1.6.-Modelos *in vitro* de neuroprotección por prolactina

Luego de tener información sobre el posible efecto neuroprotector de la PRL frente a la excitotoxicidad inducida por Glu y AK, los estudios se han enfocado en determinar cuáles podrían ser los mecanismos moleculares que subyacen a la protección por esta hormona. Uno de los primeros fue el de Vergara-Castañeda et al. (2016), donde se sugiere que la acción protectora de la PRL frente a la

excitotoxicidad está mediada por sus receptores, esto se demostró en cultivos primarios de neuronas hipocampales.

Otro estudio que evaluó el efecto neuroprotector de la PRL es el de Rivero-Segura et al. (2017), donde se observó que la administración previa de PRL a un daño excitotóxico inducido por Glu, previene la muerte celular, la disfunción mitocondrial, inhibe el aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular provocado por el daño excitotóxico, promueve la activación del factor transcripcional NF- κ B que induce la sobreexpresión de la proteína antiapoptótica Bcl2 en las neuronas del hipocampo. Finalmente, en un estudio de Molina-Salinas et al.(2023), se demostró que la PRL activa la vía de señalización de PI3K/AKT durante la excitotoxicidad de Glu, lo que promueve la supervivencia neuronal a través de la activación de la regulación positiva de AKT y GSK3 β /NF- κ B, lo que resulta en la inducción de la expresión génica de Bcl-2 y Nrf2. Además, la inhibición de la vía de señalización de PI3K/AKT anuló el efecto protector de la PRL frente a la excitotoxicidad inducida por Glu. Estos estudios se han enfocado en el papel del factor transcripcional NF- κ B, debido a que este factor transcripcional puede estar involucrado en procesos tanto de muerte celular como de neuroprotección (Fridmacher et al., 2003; Kulms and Schwarz, 2006; Rivero-Segura et al., 2017; Molina-Salinas et al., 2023). Respecto a este último proceso, se ha descrito que la activación de 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). Asimismo, Fridmacher et al. (2003) demostraron que la supresión de p65 o la inhibición del NF- κ B neuronal por el supresor de I κ B provoca la pérdida de neuroprotección tras la administración de AK en cultivos organotípicos de cortes de hipocampo de ratones doblemente transgénicos.

Sin embargo, a pesar de que se ha mencionado que la PRL ejerce un efecto neuroprotector ante AK y Glu, el mecanismo de protección no está completamente descrito, además es necesario comprender los mecanismos de acción del AK y Glu en el organismo para poder comprender sus efectos en el organismo, los cuales pueden ser positivos o negativos.

1.7.-Glutamato

En el sistema nervioso central (SNC), el Glu es el aminoácido más abundante y se le considera el principal neurotransmisor excitatorio, aunque también puede servir como fuente de energía en ausencia de glucosa para la mayoría de las células (Zhou and Danbolt, 2014; Reiner and Levitz, 2018; Armada-Moreira et al., 2020; Hansen et al., 2021; Rodriguez-Chavez et al., 2021).

Su síntesis se lleva a cabo a partir del ciclo glutamina-Glu, donde se libera Glu desde las terminales presinápticas al espacio sináptico, internalizándose en los astrocitos a través de los transportadores de Glu (EAAT1 y EAAT2), los cuales pertenecen a una familia de transportadores de solutos 1, los cuales son una familia de transportadores de aminoácidos neutros de alta afinidad (Zhou and Danbolt, 2014; Rose et al., 2017). Una vez dentro, el Glu se convierte en glutamina (Gln) con la ayuda de la Gln sintetasa, una enzima citosólica expresada solo en astrocitos y oligodendrocitos, como parte del reciclaje de Glu liberado sinápticamente. A continuación, los astrocitos liberan la Gln, la cual es recuperada por las neuronas, quienes la transforman de nuevo en Glu (Nedergaard et al., 2002; Zhou and Danbolt, 2014; Rose et al., 2017). Cabe señalar, que los astrocitos sintetizan de *novo* la mayor parte del Glu que está presente en el cerebro (Nedergaard et al., 2002; Zhou and Danbolt, 2014).

En condiciones fisiológicas, el Glu se almacena en las vesículas presinápticas hasta que se libera al espacio sináptico (Zhou and Danbolt, 2014). Las neuronas contienen alrededor de 5mM de Glu en su citoplasma, mientras que las concentraciones en astrocitos son inferiores (alrededor de 2–3 mM). La menor concentración de Glu en los astrocitos se atribuye a la presencia de Gln sintetasa (Nedergaard et al., 2002). Finalmente, para llevar a cabo sus funciones, el Glu actúa a través de su interacción con sus receptores afines, que son ligando dependientes y se clasifican como receptores glutamatérgicos ionotrópicos (RsGluI) y metabotrópicos (RsGluM) (Niswender and Conn, 2010; Traynelis et al., 2010; Reiner and Levitz, 2018; Hansen et al., 2021); además, se ha reportado que ambos tipos de receptores de Glu producen distintas cascadas de señalización en las neuronas (Reiner and Levitz, 2018; Hansen et al., 2021).

1.8.-Receptores de glutamato

Los RsGlum son miembros de la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR) (Niswender and Conn, 2010; Reiner and Levitz, 2018; Spampinato et al., 2018). Los GPCR son proteínas unidas a la membrana las cuales son activadas por ligandos extracelulares como neurotransmisores (Niswender and Conn, 2010). Las subunidades de proteína G activadas pueden modular la función de varias moléculas efectoras, como enzimas, canales iónicos y factores de transcripción (Niswender and Conn, 2010; Reiner and Levitz, 2018; Hansen et al., 2021). En los RsGlum, las regiones intracelulares son importantes debido a que modulan el acoplamiento a la proteína G. Además, el dominio C-terminal de los RsGlum está sujeta a varias modificaciones como: splicing alternativo, regulación por fosforilación e interacciones moduladoras proteína-proteína (Niswender and Conn, 2010; Spampinato et al., 2018). Asimismo, los RsGlum se subclasifican en tres grupos en función de la homología de secuencia, el acoplamiento de la proteína G y la selectividad del ligando: el primero es el grupo I que incluye las subunidades RsGlum 1 y 5, el segundo es el grupo II que incluye las subunidades RsGlum 2 y 3, finalmente el tercero es el grupo III incluye las subunidades RsGlum 4, 6, 7 y 8 (Niswender and Conn, 2010; Reiner and Levitz, 2018). Contrario a los RsGlui, los RsGlum participan en la neurotransmisión lenta (Niswender and Conn, 2010).

Por otra parte, a diferencia de los RsGlum, los RsGlui se caracterizan por permitir el paso de iones a través de la membrana sináptica (Traynelis et al., 2010; Reiner and Levitz, 2018; Hanada, 2020), además, son ampliamente conocidos por mediar la mayoría de la señalización sináptica excitatoria rápida en el SNC (Frerking and Nicoll, 2000; Madden, 2002; Traynelis et al., 2010; Bissen et al., 2019). Se clasifican en tres subclases principales denominados según sus agonistas sintéticos, los cuales son: los receptores de ácido kaínico (RsAK), los receptores α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (RsAMPA) y los receptores N-metil-D-aspartato (RsNMDA) (Zheng et al., 2011; Reiner and Levitz, 2018; Bissen et al., 2019; Evans et al., 2019; Hansen et al., 2021). Asimismo, los RsNMDA se reconocen por ser los más permeables al Ca^{2+} , por otra parte los RsAMPA y RsAK también muestran

permeabilidad al Ca^{2+} según la composición de sus subunidades (Traynelis et al., 2010; Brini et al., 2014).

Los RsAMPA se ensamblan como homo o heterotetrámeros de cuatro subunidades homólogas (GluA1-A4) (Bissen et al., 2019; Hanada, 2020), los RsNMDA se ensamblan como heterotetrámeros con dos subunidades GluN1 que se unen a glicina o D-serina, esta subunidad se expresa en todas las regiones del cerebro y dos subunidades GluN2 que se unen a Glu o su agonista específico, estas son cuatro (GluN2A-2D) (Swanger et al., 2016; Reiner and Levitz, 2018; Hansen et al., 2021), también existen dos subunidades GluN3 (N3A-N3B) (Sanz-Clemente et al., 2013; Hanada, 2020). Por último, los RsAK están compuestos por cinco subunidades diferentes (GluK1-K5) (Carta et al., 2014; Iida et al., 2021; Pressey and Woodin, 2021).

Cada subunidad de los RsGluR presenta una región extracelular que comprende el dominio amino-terminal, el cual media el ensamblaje del receptor, la regulación funcional y la unión al agonista, seguido de un dominio transmembrana compuesto de cuatro regiones (M1-4), finalizando con un dominio C-terminal citoplásmico que dirige la localización y regulación del receptor, este último dominio es importante, debido a que puede tener modificaciones post-traduccionales (fosforilación y palmitoilación), además, puede variar en longitud y secuencia entre las subunidades de los RsGluR (Hansen et al., 2021; Rodríguez-Chavez et al., 2021).

A pesar de que se ha reportado que entre los receptores de RsGluR, los RsNMDA y los RsAMPA son los más estudiados en términos de sus funciones fisiológicas, el agonista AK ha sido utilizado comúnmente como modelo de sobre activación de los RsGluR y muerte celular, por lo que es importante conocer a fondo lo que se ha reportado de los RsAK (Wang et al., 2005; Zheng et al., 2011).

1.9.-Receptores de ácido kaínico

Aunque los RsAK se expresan ampliamente en el cerebro, se han estudiado mucho menos en comparación con RsAMPA y RsNMDA (Iida et al., 2021; Pressey and Woodin, 2021), a pesar de las similitudes estructurales y funcionales (Rodríguez-Moreno and Sihra, 2011; Carta et al., 2014; Iida et al., 2021). No obstante, también se ha reportado que los RsAK desempeñan funciones distintas a los otros tipos de

RsGluI, comúnmente se conoce que los RsAMPA y los RsNMDA median la mayor parte de la transmisión sináptica excitatoria basal al estar posicionados en mayor densidad en la postsinapsis. Por otra parte los RsAK parecen posicionarse y tener funciones en la regulación de la presinapsis y postsinapsis (Carta et al., 2014; Evans et al., 2019; Hansen et al., 2021).

Asimismo, los RsAK se reconocen por ser canales iónicos activados por Glu o su agonista específico, desempeñan un papel fundamental en la regulación de la excitabilidad neuronal y en las funciones en el cerebro (Andrade-Talavera et al., 2012; Carta et al., 2014), debido a que son mediadores de la transmisión sináptica postsináptica ionotrópica siendo esta su función canónica (Wang et al., 2005; Falcón-Moya et al., 2018). Por otra parte, los RsAK pueden activar una vía de señalización no canónica junto con los RsGluM presinápticos, donde modulan la excitabilidad neuronal, regulando la liberación de neurotransmisores como el Glu y el GABA (Andrade-Talavera et al., 2013; Sihra and Rodríguez-Moreno, 2013; Zamani et al., 2013; Falcón-Moya et al., 2018, 2021; Evans et al., 2019).

Los RsAK se ensamblan en homotetrámeros o heterotetrámeros de las subunidades GluK1-K5 las cuales están codificadas respectivamente por los genes Grik1-5 (Carta et al., 2014; Evans et al., 2019; Falcón-Moya et al., 2021; Pressey and Woodin, 2021). Se ha informado que las subunidades de los RsAK GluK1-K3 pueden formar homotetrámeros mientras que las subunidades K4-K5 forman heterotetrámeros con las subunidades GluK 1-3 (Carta et al., 2014; Hansen et al., 2021; Pressey and Woodin, 2021). Respecto a su afinidad por el ligando, las subunidades RsAK se han agrupado en como receptores de baja afinidad (GluK1-3) y alta afinidad (GluK4-5) (Carta et al., 2014; Evans et al., 2019). Además, se ha estudiado que las subunidades GluK1 y GluK2 pueden tener modificaciones de splicing alternativo, como la edición del sitio Q/R que recubre los poros de GluK2 que da como resultado un cambio del residuo de glutamina codificado genómicamente a una arginina. Este cambio altera las propiedades de los RsAK resultante, provocando que sea permeables al Ca^{2+} (Carta et al., 2014; Evans et al., 2019; Duan et al., 2023).

Finalmente, se ha reportado que el agonista endógeno de los RsAK es el Glu, por lo que se reconoce que los RsAK tienen funciones tanto en la sobrevivencia celular como en la muerte celular como lo hace el Glu.

1.10. Funciones del glutamato en el sistema nervioso central

Se sabe que el Glu media las sinapsis excitatorias entre las neuronas del SNC, por lo que, participa en procesos como la despolarización neuronal, la plasticidad sináptica, la diferenciación y la supervivencia neuronal (Nedergaard et al., 2002; Traynelis et al., 2010; Zhou and Danbolt, 2014).

La funcionalidad del Glu de forma simplificada comienza con su liberación desde vesículas presinápticas al espacio extracelular, lo que promueve la activación y apertura de los RsAMPA-RsAK al unirse a ellos, lo que provoca la entrada de iones entre los que se encuentran el sodio (Na^+) y el potasio (K^+), estos iones despolarizan la membrana postsináptica, induciendo la eliminación de los iones de magnesio (Mg^{2+}) que bloquean a los RsNMDA, permitiendo el flujo de iones como el Ca^{2+} (Sprengel, 2006; Hara and Snyder, 2007; Zhou and Danbolt, 2014; Wang and Peng, 2016).

A continuación, el Ca^{2+} puede producir una serie de cascadas de señalización, una de estas vías está implicada con la plasticidad neuronal (Lopez de Armentia et al., 2007; Alberini, 2009; Rodriguez-Chavez et al., 2021), esta cascada se induce cuando el Ca^{2+} se une a calmodulina activando a la proteína quinasa dependiente de calmodulina y a las proteínas quinasas A (PKA) y C (PKC), que son la base para activar la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK). Además, la MAPK activada puede transportarse al núcleo y activar la proteína de unión al elemento sensible del monofosfato de adenosina cíclico, lo que da como resultado la expresión de genes río abajo, como el activador del plasminógeno de tipo tisular y factor neurotrófico derivado del cerebro, entre otros (Alberini, 2009; Zhou and Danbolt, 2014; Wang and Peng, 2016).

Con base en esta información se reconoce que los tres subtipos de RsGluI están relacionados con los mecanismos de acción del Glu en el SNC, no obstante, el Glu es también conocido por su potencial para inducir excitotoxicidad por medio de la

sobreactivación de sus RsGlu1 (Mehta et al., 2013; Lewerenz and Maher, 2015; Rose et al., 2017; Armada-Moreira et al., 2020; Choi, 2020).

1.11.-Excitotoxicidad por glutamato

Es interesante conocer que la excitotoxicidad inducida por Glu se desencadena por la sobreactivación de los mismos RsGlu1 que median su acción fisiológica como neurotransmisor (Mehta et al., 2013; Lewerenz and Maher, 2015; Choi, 2020; Rodriguez-Chavez et al., 2021). La diferencia entre ambos procesos consiste en un exceso de Glu en el espacio extrasináptico que produce la activación excesiva de los RsGlu1 que llevan a que se induzca excitotoxicidad y muerte neuronal (Mehta et al., 2013; Armada-Moreira et al., 2020; Rodriguez-Chavez et al., 2021), fenómenos que están involucrados en una variedad de trastornos neurodegenerativos en el SNC, incluida la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica y la esclerosis múltiple (Hara and Snyder, 2007; Dong et al., 2009; Zheng et al., 2011; Mehta et al., 2013; Hayes, 2019).

El término excitotoxicidad fue utilizado por Olney et al. (1986) para referirse a la capacidad del Glu para destruir neuronas (Choi, 1992; Rodriguez-Chavez et al., 2021). Pero, en la actualidad se refiere a la lesión y muerte de las neuronas, inducida por la exposición prolongada a Glu y aminoácidos excitadores (Dong et al., 2009; Armada-Moreira et al., 2020; Choi, 2020; Rodriguez-Chavez et al., 2021). Asimismo, la excitotoxicidad inducida por la sobreactivación de los RsGlu1 (Wang et al., 2005; Hanada, 2020; Hansen et al., 2021), provoca un incremento en la concentración intracelular de Ca^{2+} que a su vez induce la activación de enzimas dependientes de Ca^{2+} y la generación de radicales libres (ROS) (Brini et al., 2014; Rueda et al., 2016; Hangen et al., 2018). Además, cuando hay un aumento excesivo de Ca^{2+} intracelular y de ROS, se produce el colapso del potencial de la membrana mitocondrial, la liberación de factores mitocondriales (Citocromo-C y factor inductor de apoptosis), la unión del Citocromo-C a Apaf-1 y la caspasa-9 forman el complejo apoptosoma, que lleva a la activación de la vía de la caspasa-3, la condensación nuclear y la fragmentación del ADN (Hara and Snyder, 2007; Dong et al., 2009; Brini et al., 2014; Bertero and Maack, 2018), conjuntamente con la sobreexpresión de proteínas

proapoptóticas como bax (McDonnell et al., 1996; Gross and Katz, 2017; Rivero-Segura et al., 2017).

Respecto al daño excitotóxico en la neuronas, actualmente se ha reportado que el Glu y el AK, son capaces de inducir muerte celular por apoptosis y necrosis en ambos modelos, *in vivo* e *in vitro* (Wang et al., 2005; Zheng et al., 2011; Armada-Moreira et al., 2020; Rodriguez-Chavez et al., 2021). La apoptosis y la necrosis, son dos mecanismos distintos de muerte celular, el primera se caracteriza por el encogimiento celular, la relocalización, la compactación de orgánulos, la condensación de cromatina y la producción de partículas encerradas en la membrana que contienen, material intracelular conocido como "cuerpos apoptóticos", el segunda es un proceso pasivo, tipificado por la inflamación de células y orgánulos con derrame del contenido intracelular al medio extracelular (Ankarcrona et al., 1995; Fujikawa et al., 2000; Hara and Snyder, 2007). La excitotoxicidad por Glu ha sido de interés científico, sin embargo, en la actualidad también se ha centrado el interés científico en el daño que el AK puede generar.

1.12.-Excitotoxicidad por ácido kaínico

Se ha reconocido al AK como un análogo excitotóxico del Glu, debido a que puede provocar la muerte neuronal en el cerebro (Wang et al., 2005; Evans et al., 2019), esto se ha reportado en modelos *in vivo* donde se observan cambios patológicos que imitan parcialmente a la neurodegeneración en el SNC como lo hace la excitotoxicidad por Glu. Por lo que el daño inducido por AK se ha utilizado como modelo para explorar la patogenia de la excitotoxicidad en los trastornos neurodegenerativos (Wang et al., 2005; Zheng et al., 2011; Hanada, 2020), la activación de los RsAK conduce a la despolarización de la membrana y al aumento de la entrada de Ca^{2+} extracelular, que son necesarios para desencadenar la cascada de muerte neuronal, provocando aumento en la producción de ROS, la disfunción mitocondrial, estrés del retículo endoplásmico (RE) y el aumento de Ca^{2+} intracelular, la condensación nuclear y fragmentación del ADN (Wang et al., 2005; Chong et al., 2018; Evans et al., 2019). Estos cambios llevan a la muerte en neuronas en muchas regiones del cerebro, particularmente en las subregiones del hipocampo como son CA1 y CA3, y en el hilio de la circunvolución dentada (Wang

et al., 2005; Zheng et al., 2011; Evans et al., 2019). Sin embargo, la excitotoxicidad por AK especialmente se ha empleado en modelos *in vivo* como en los modelos de epilepsia, donde se observa que la administración de este agonista aumenta las concentraciones de Na^+ y Ca^{2+} intracelulares (Korf and Postema, 1984; Wang et al., 2005; Zheng et al., 2011; Hanada, 2020)

1.13.-Participación del calcio en la excitotoxicidad

El Ca^{2+} es un segundo mensajero universal que regula las actividades más importantes de las células (Arundine and Tymianski, 2003; Brini et al., 2014; Hangen et al., 2018). Algunas de sus funciones se relacionan con el control del metabolismo a través de los procesos de fosforilación y desfosforilación de enzimas, actividad de la PKC, actividades enzimáticas reguladas por calmodulina, actividades que involucran calpaínas, procesos de motilidad como los que involucran el citoesqueleto, la secreción de moléculas en el proceso de exocitosis y el proceso de muerte celular (Mahanty and Sah, 1998; Silverman-Gavrila et al., 2013; Brini et al., 2014).

Se ha reportado que la entrada de Ca^{2+} en las neuronas se produce a través de receptores de membrana plasmática como los RsGlu1 y los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (VGCC) (Brini et al., 2014; Bano and Ankarcrona, 2018), de los cuales se ha demostrado que existen al menos cuatro tipos diferentes de VGCC, que se denominan (tipo L, N, P/Q y R) (Flores-Soto et al., 2013; Brini et al., 2014; Patil et al., 2014). Es relevante señalar que en las neuronas del hipocampo se expresan los RsGlu1, estos son importantes porque son sensibles a la despolarización de la membrana postsináptica que permiten un ligero flujo de Ca^{2+} a la célula (Hara y Snyder, 2007; Brini et al., 2014; Hangen et al., 2018).

Adicionalmente, se ha reportado que el Ca^{2+} intracelular libre citosólico permanece en concentraciones muy bajas (100 nM) en relación con el Ca^{2+} libre extracelular (2 mM) (Mark et al., 2001; Brini et al., 2014; Bertero and Maack, 2018; Hangen et al., 2018). Los dos orgánulos involucrados en la regulación del Ca^{2+} , son el RE y las mitocondrias. La liberación de Ca^{2+} del RE se produce en las neuronas a través de dos tipos de canales/receptores de Ca^{2+} : los receptores de rianodina (RyR) y los receptores de inositol-1,4,5-tris-fosfato (RsIP3). Los RsIP3 se expresan de manera

ubicua en muchos tipos de células, mientras que los RyR son más característicos de las neuronas y las células musculares. El aumento de la concentración citoplasmática de Ca^{2+} es un desencadenante de la liberación de Ca^{2+} a través de RyR, fenómeno conocido como liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (Arundine and Tymianski, 2003; Hara and Snyder, 2007; Brini et al., 2014; Hangen et al., 2018). Por otra parte, las mitocondrias son el segundo orgánulo que participa en la regulación del Ca^{2+} intracelular, están involucrados en el almacenamiento de Ca^{2+} así como en la formación de sitios de contacto especializados con el RE, lo que les permite aprovechar la liberación localizada de Ca^{2+} por los canales del RE adyacentes para acumular Ca^{2+} en la matriz. El Ca^{2+} regula la capacidad de las mitocondrias para aportar ATP a los procesos que demandan energía dentro de la célula (Brini et al., 2014; Bano and Ankarcrona, 2018; Hangen et al., 2018). Además dentro de la regulación del Ca^{2+} intracelular, dos sistemas se encargan de mantener la homeostasis del Ca^{2+} , el primero son los transportadores de Ca^{2+} de membrana plasmática (PMCA) que consisten en la bomba PMCA y el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, el segundo es la sarco/RE Ca^{2+} -ATPasa, todos los cuales mantienen el fuerte gradiente de concentración entre el RE y el citoplasma (Brini et al., 2014; Paupe and Prudent, 2018; Núñez and Hidalgo, 2019).

Respecto al Ca^{2+} intracelular se ha reportado que el Glu o AK inducen un incremento de este ion durante el fenómeno de la excitotoxicidad, llevando a las neuronas a muerte celular por necrosis o apoptosis (Lu et al., 1996; Zheng et al., 2011; Lewerenz and Maher, 2015; Bano and Ankarcrona, 2018; Armada-Moreira et al., 2020). Por lo que en la actualidad se requiere de compuestos que contrarresten el daño causado por la excitotoxicidad de los agonistas de RsGlui.

2.-JUSTIFICACIÓN

Se ha reportado que la hormona PRL induce un efecto neuroprotector ante excitotoxicidad. Sin embargo, los mecanismos moleculares implicados para contrarrestar el daño por estrés excitotóxico, no se han descrito completamente.

Por lo que el presente estudio está enfocado en describir el efecto de la PRL sobre la expresión y funcionalidad de los RsGlui en un modelo *in vitro* de excitotoxicidad en neuronas hipocampales. Con los datos generados en este estudio podremos avanzar en el entendimiento de los mecanismos moleculares implicados en la neuroprotección por PRL en el hipocampo y así poder diseñar nuevas estrategias dirigidas para contrarrestar el daño por estrés excitotóxico.

3.-HIPÓTESIS

En condiciones de excitotoxicidad la prolactina modifica la funcionalidad de los receptores glutamatérgicos ionotrópicos disminuyendo la concentración de Ca^{2+} intracelular e induciendo cambios en la expresión de las subunidades que los conforman, reduciendo la muerte de neuronas hipocampales en cultivos primarios.

4.-OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la PRL sobre la expresión de las subunidades de receptores glutamatérgicos ionotrópicos permeables Ca^{2+} , su funcionalidad y la viabilidad neuronal en cultivos primarios de neuronas hipocampales ante estrés excitotóxico.

4.1.-Objetivos particulares

- ❖ Evaluar el efecto de la administración de PRL, AK y Glu sobre la viabilidad celular en neuronas hipocampales
- ❖ Evaluar el efecto neuroprotector de PRL ante estrés excitotóxico en términos de viabilidad neuronal
- ❖ Evaluar el efecto de PRL sobre el Ca^{2+} intracelular ante estrés excitotóxico
- ❖ Evaluar la expresión de las subunidades de RsGlui permeables a Ca^{2+} y su asociación con la sobrevivencia neuronal

5.-MATERIALES

5.1.-Uso de animales de experimentación

Se utilizaron ratas Wistar preñadas con peso entre 280 y 300 gramos. Las ratas fueron adquiridas en el bioterio del Instituto de Fisiología Celular- Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Los animales se mantuvieron a temperatura constante y con un ciclo de luz/oscuridad de 12:12 horas, y se les proporcionó agua y alimento ad libitum, siguiendo las normas de cuidado del Comité de Bioética y Cuidado de Animales de Experimentación del Instituto de Fisiología Celular-UNAM. Todos los experimentos se realizaron en estricta conformidad con las normas internacionales de la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio de los Institutos Nacionales de la Salud (NIH publicación N.º 80-23 revisada en 1996).

5.2.-Cultivo primario de neuronas de hipocampo de rata

Se utilizaron cultivos primarios de neuronas del hipocampo obtenidas de embriones de rata Wistar a los 17-18 días de gestación de acuerdo con el protocolo descrito por de la Cadena et al. (2014), con algunas modificaciones que se describen a continuación. De cada rata gestante se obtuvieron de diez a doce embriones, los cuales se decapitaron, se les extrajo el cerebro, se diseccionaron los lóbulos con un microscopio estereoscópico (Leica, Wetzlar, Alemania) y se aislaron los hipocampos. Posteriormente, los hipocampos se desintegraron mecánicamente con la ayuda de unas tijeras pequeñas y el homogeneizado resultante se resuspendió en una solución de Krebs-Ringer enriquecida con tripsina (0,01%) (Gibco, EE.UU.) a 37 °C durante 10 min. La actividad de tripsina se inhibió con inhibidor de tripsina al 0,8 % (Gibco, EE.UU.) y ADNasa al 0,52 % (Sigma-Aldrich, EE.UU.). La suspensión se centrifugó a 1060 rpm durante 5 minutos, el sobrenadante se decantó y el homogeneizado se resuspendió en medio Neurobasal (Gibco, EE.UU.) enriquecido con suplemento B-27 al 0,2 % v/v (Gibco, EE.UU.), gentamicina (Gibco, EE.UU.) y L-glutamina (0,5 mM) (Sigma-Aldrich, EE.UU.). A continuación, la viabilidad celular se determinó por exclusión con azul de tripano. Finalmente, las células se sembraron a una densidad de 2×10^6 en placas de 6 pocillos tratadas con poli-L-lisina (5 µg/ml durante 2 horas, antes del cultivo primario) (Sigma-Aldrich, EE.UU.). Los cultivos celulares se mantuvieron a 37 °C con 5% de CO₂ en una

atmósfera humidificada. Las células se trataron con arabinósido de citosina (0,8 μM) (C1768, Sigma-Aldrich) para prevenir la proliferación de células gliales.

5.3.-Tratamientos

Los cultivos primarios de neuronas del hipocampo se dividieron en grupos: control (CTRL, salina de NaCl al 0,9 %), tratamientos excitotóxicos: AK o Glu (1, 5, 10, 20, 50 y 100 μM), PRL (1, 2.5, 5, 10 y 25 ng/ml), PRL+AK (20 ng/ml+20 μM) y PRL+Glu (20 ng/ml+ 20 μM), antagonista de los RsAMPA-RsAK (NBQX) o antagonista de los RsNMDA (MK-801) (1, 5, 10 y 20 μM), NBQX+AK o NBQX+Glu (20 μM +20 μM) y MK-801+AK o MK-801+Glu (20 μM +20 μM). Todos los tratamientos se administraron a los 7 días de iniciado el cultivo primario de neuronas hipocampales. En todos los experimentos se utilizó PRL (PRL ovina) obtenida del laboratorio del Dr. AF Parlow, National Hormone Peptide Program, NIH, EE. UU. Glu (Sigma Aldrich, EE. UU.), AK (Sigma Aldrich, EE. UU.), NBQX (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), MK-801 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.).

5.4.-Inmunofluorescencia del receptor de prolactina

Las células previamente tratadas (CTRL y PRL), se colocaron sobre cubre objetos redondos dentro de las placas de 6 pozos, se fijaron con PFA al 4% durante 15 minutos a 4°C, posteriormente se lavaron con PBS 1X (dilución del Buffer PBS 10X), a continuación se realizaron tres lavados de 10 minutos con Triton X-100 al 0.5 % con PBS 1X. Finalmente, se bloqueó las uniones inespecíficas de proteínas de las células con una solución al 10 % de suero fetal bovino y PBS 1X +Tween al 0.05% durante 1 h a 4°C. A continuación se retiró la solución de bloqueo y se incubó durante 24 horas con el anticuerpo primario RPRL (1:250; Santa Cruz Biotechnology), preparado en solución de bloqueo, después se realizaron tres lavados de 10 minutos con PBS +Tween 20 al 0.05% y se incubó con los anticuerpos secundarios, anticuerpo anti-conejo conjugado con Alexa fluor 568 (1:500, Invitrogen, EE. UU.) o anticuerpo anti-ratón Alexa fluor 488 (1:500 Invitrogen, EE. UU.). Posteriormente, se hicieron tres lavados con PBS + Tween al 0.05%, para finalmente incubar con Hoechst 12 ng/ml durante 5 minutos, nuevamente tres lavados con PBS +Tween y una vez con PBS 1X y se montaron las muestras sobre portaobjetos fijándolas con Dako. Finalmente, las muestras se analizaron por microscopia confocal utilizando

longitudes de onda de 488 y un láser de argón de la unidad de servicios y apoyo para la industria y la investigación (USAI, Facultad de Química, UNAM). La fluorescencia se procesó con el software Fiji ImageJ.

5.5.-Viabilidad celular por MTT

La viabilidad celular se determinó a partir de la reducción de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) a sal de formazán por NADPH deshidrogenasas mitocondriales, según el protocolo reportado por Rivero-Segura et al. (2017). Se añadió solución de MTT (0,2 mg/ml) a las neuronas sembradas en placas de 24 pocillos y se incubaron a 37 °C durante 50 minutos en total oscuridad. Después de la incubación, se eliminó el medio de cultivo y los cristales de formazán se solubilizaron con isopropanol acidificado. La absorbancia de la sal de formazán se cuantificó a 570 nm en un lector de placas (EPOCH).

5.6.-Ensayo de concentración de calcio intracelular

La concentración de Ca^{2+} intracelular se midió con un microfotómetro D-104 (Photon Technology International, Princeton, NJ), como se describió previamente por Flores-Soto et al. (2013). El día 7 del cultivo celular, las células se cargaron con Fura 2-AM (2.5 μM , Thermo Fisher Scientific) en una concentración baja de Ca^{2+} (0.1 mM) y a 20–22 °C. Las células se incubaron durante 1 hora a 37 °C y en una atmósfera con 5 % de CO_2 /95 % de aire. A continuación, las células se transfirieron a una cámara de perfusión montada en un microscopio invertido (Nikon). Las células se registraron con perfusión continua y burbujeo de carbógeno (para mantener el pH a 7 ± 4) a una velocidad de $2 \pm 2,5$ ml/minuto con tampón de Ringer-Krebs (NaCl 118 mM, NaHCO_3 25 mM, KCl 4.7 mM, KH_2PO_4 1.2 mM, MgSO_3 1.2 mM, Glucosa 11 mM y CaCl_2 2.5 mM) a 37 °C. Después de registrar la fluorescencia basal, las células se expusieron a AK (20 μM), Glu (20 μM), oPRL (20 ng/ml), NBQX (20 μM)+AK o Glu (20 μM), MK-801 (20 μM)+AK o Glu (20 μM), y oPRL (20 ng/ml)+AK o Glu (20 μM). Las neuronas cargadas con Fura 2-AM se sometieron alternativamente a lámpara Xe a 340 nm y 380 nm de luz de excitación, y la emisión de fluorescencia se midió a 510 nm. Se midió la fluorescencia a intervalos de 0,5 segundos durante 10 minutos y se calculó la concentración de Ca^{2+} intracelular según la fórmula de Grynkiewicz:

$$\text{Ca}^{2+} \text{ intracelular} = b \cdot Kd (R-R_{\text{min}}) / (R_{\text{max}} - R)$$

Donde Kd es la constante de disociación de Fura-2AM, b es la proporción de señales fluorescentes (R) a 380 nm para colorantes libres de Ca^{2+} y saturados de Ca^{2+} , R_{min} es R en ausencia de Ca^{2+} externo y R_{max} es R en saturación de Ca^{2+} intracelular. Estos parámetros se determinaron *in vitro*. Las proporciones medias de fluorescencia de 340–380 nm para R_{max} (6,06) y R_{min} (0,39) se obtuvieron exponiendo las células a Ca^{2+} (10 mM) en presencia de ionomicina (10 μM) y Krebs sin Ca^{2+} con EGTA (10 mM), respectivamente. La relación de fluorescencia a 380 nm de excitación con luz en medio libre de Ca^{2+} y células saturadas de Ca^{2+} fue de 4,23. Se supuso que la Kd de Fura 2-AM era 386 nM.

5.7.-Extracción de ARN

El ARN se extrajo de cultivos primarios de neuronas del hipocampo utilizando el reactivo TRIZOL (ABP Biosciences, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ARN resultante se eluyó en 30 μl de agua libre de ARNasa, la calidad y el rendimiento del ARN aislado se determinaron mediante KIT RNA (Thermo Scientific, Waltham, EE. UU.). El ARN se cuantificó en un NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, EE. UU.). Para la síntesis de cDNA, 1 μg de RNA se transcribió inversamente utilizando el kit de síntesis de cDNA First Strand de Revert Aid (Thermo Scientific, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, utilizando cebadores oligo(dT).

5.8.-RT-qPCR

Los genes analizados fueron: *Gria1*, *Gria 2*, *Grik 2*, *Grin1* y *Grin2b*, con los tratamientos CTRL, PRL (20 ng/ml), Glu (20 μM), y PRL (20 ng/ml)+ Glu (20 μM), (tratamientos administrados 24 horas antes de analizar los genes de las subunidades de los RsGluR). La RT-qPCR se realizó usando 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*. Se utilizó el software de detección de secuencias CFX maestro (Bio-Rad) para el

análisis de datos. Se evaluó usando el método CT comparativo ($2-\Delta\Delta CT$) para calcular los cambios relativos en la expresión del gen diana. El promedio y la desviación estándar de $2-\Delta\Delta CT$ se calcularon para los cuatro experimentos independientes por triplicado. Todas las sondas se compraron en Applied Biosystems.

5.9.-Análisis estadístico

Todos los datos se analizaron con el software Graphpad Prism5 (RRID: SCR_002798, EE. UU.). Los datos de la Figura 1 se analizaron por una prueba (t), no pareada, en la Figura 2 se analizaron con un ANOVA unidireccional para comparar el efecto entre grupos, seguido de la prueba de comparación múltiple post hoc de Dunnett para encontrar diferencias con el CTRL. las Figuras 3,4,5,6,7,8, se analizaron usando un ANOVA unidireccional para comparar el efecto entre grupos, seguido de la prueba de comparación múltiple post hoc de Bonferroni para encontrar diferencias entre grupos. Los valores se expresan como media \pm DE y la significación estadística se fijó en $p < 0,05$.

6.-RESULTADOS

6.1.-Receptor de prolactina en neuronas hipocampales

Antes de comenzar analizando el efecto neuroprotector de la PRL, el primer objetivo del proyecto fue estudiar la expresión del RPRL en los cultivos primarios de neuronas hipocampales, debido a que la presencia de este receptor es necesaria para determinar la funcionalidad de la PRL en nuestras neuronas hipocampales. Para llevar a cabo este análisis se evaluó la expresión del RPRL mediante inmunofluorescencia con los siguientes tratamientos: CTRL y PRL 20 ng/ml (2horas previas), en los cultivos primarios de neuronas hipocampales. Determinamos que el RPRL se observa todos los tratamientos administrados.

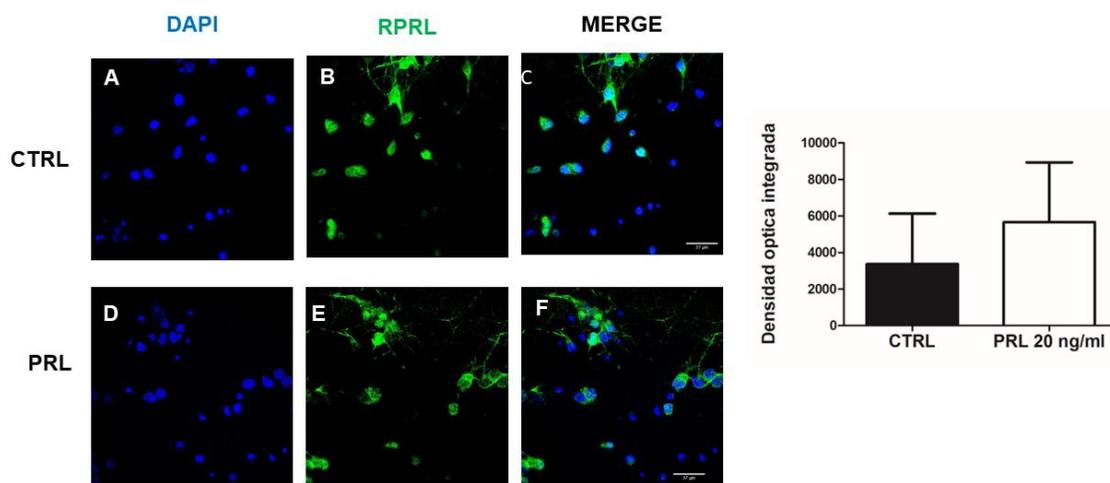
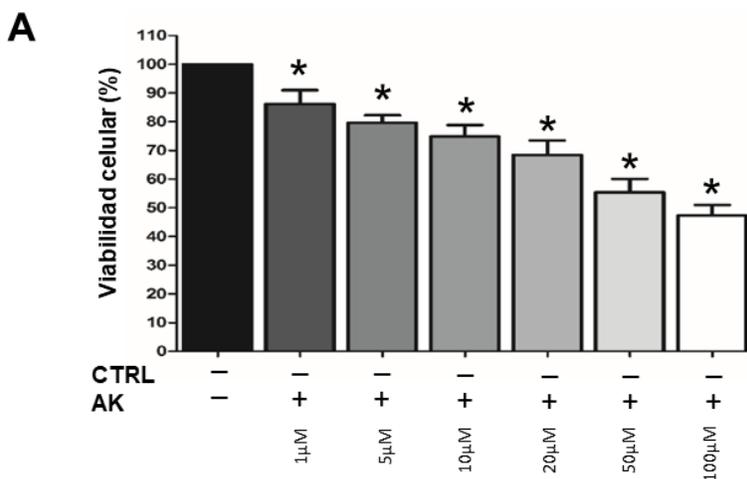


Fig. 1 Expresión del RPRL en neuronas hipocampales. Imágenes representativas de neuronas de los cultivos primarios, los cuales se dividieron en tratamientos: CTRL (paneles A-C) y PRL (paneles D-F), y se procesaron por inmunofluorescencia para revelar la expresión de RPRL (verde) y núcleos (azul). Analizados con una prueba (t) no pareada. Plano sencillo de reconstrucción en plano Z con microscopia con focal, aumento 40x. Bara de escala 37 μ m, n=3.

6.2.-Efecto del ácido kaínico, glutamato y prolactina sobre la viabilidad neuronal

Con la información previa sobre la expresión del RPRL en los cultivos primarios de neuronas hipocampales, el siguiente objetivo fue caracterizar el efecto de AK, Glu y PRL en las neuronas del hipocampo. Debido a que estudios previos reportan que la constante de disociación (K_d) del AK ($K_d=4-16$ nM), Glu ($K_d= 2.23-4.2$ nM) y PRL ($K_d=0.113-0.216$) (London and Coyle, 1979; Harigaya et al., 1982; Sakai et al., 1985; Gallo et al., 1990; Crawford et al., 1999; Forsyth et al., 2002), puede variar entre tejidos, en conjunto con que se ha reportado que la IC50 para AK es 50 μ M y para Glu la IC50 es 100 μ M (Gallo et al., 1990). Se realizó un análisis del efecto del AK, Glu y PRL en curvas dosis-respuesta de cada tratamiento en los cultivos primarios. En los paneles 2A y 2B se muestra una curva dosis-respuesta de AK o Glu administrados durante una hora con las concentraciones: 1, 5, 10, 20, 50 y 100 μ M. En el panel 2C se administró PRL durante dos horas en cultivos primarios de neuronas del hipocampo en los siguientes tratamientos: 1, 2.5, 5, 10, 20 y 25ng/ml. Se observa que la administración de AK y Glu produce un decremento de la viabilidad celular, el cual es mayor cuando se incrementa la concentración de AK o Glu, por otra parte, la administración de diferentes concentraciones de PRL no generaron cambios en la viabilidad celular con respecto al CTRL. Los efectos de estas concentraciones sobre la viabilidad neuronal se evaluaron a través de un ensayo de MTT.



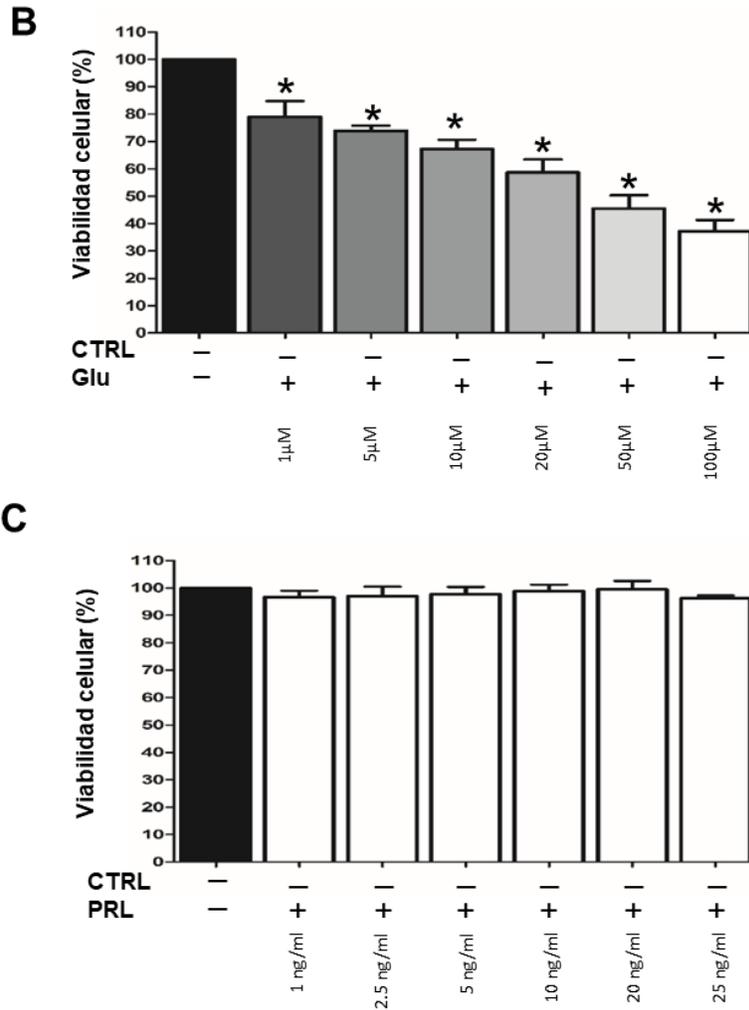
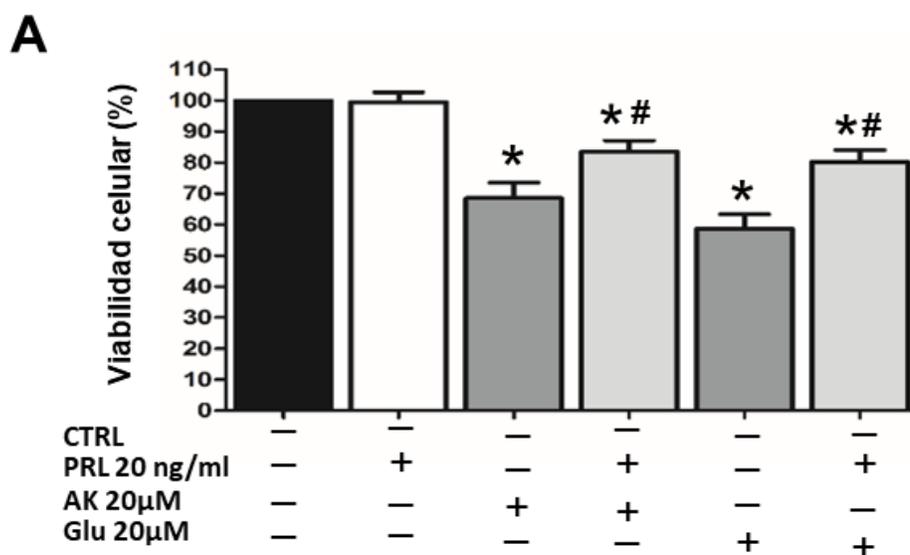


Fig.2 AK y Glu reducen la viabilidad celular mientras que PRL no produce cambios sobre la viabilidad neuronal. En los paneles A-B se muestra una curva dosis respuesta a AK y Glu durante una hora, en el panel C se muestra una curva dosis respuesta a PRL administrada durante 2 horas. Los datos se analizaron mediante análisis de varianza unidireccional (ANOVA), seguido de la prueba de comparación múltiple post hoc de Dunnett. $p \leq 0.05$, $n=4$. *CTRL vs a AK o Glu.

6.3.-Efecto neuroprotector de la prolactina ante la excitotoxicidad inducida por ácido kaínico o glutamato

A partir de los resultados previos se seleccionaron las concentraciones de 20 μM y 50 μM para evaluar el efecto excitotóxico de AK y Glu. Asimismo, se seleccionó la concentración de 20 ng/ml para determinar el efecto neuroprotector de PRL. Primero, se evaluó el efecto del tratamiento simultaneo de PRL (20ng/ml) con AK 20 μM o Glu 20 μM . Demostrando que la administración simultanea de la PRL con AK o Glu genera un efecto protector en las neuronas hipocampales. A continuación, se determinó el efecto de la administración previa de PRL (20ng/ml, 2 horas) a un evento excitotóxico causado por AK 20 μM y Glu 20 μM . Determinando que la administración previa de PRL ante un evento excitotóxico puede provocar una recuperación mayor que cuando se administra simultáneamente. Finalmente, se determinó el efecto de la administración previa de PRL (20 ng/ml, 2 horas) a un incremento en la concentración de AK (50 μM) o Glu (50 μM). Se encontró que la recuperación de la viabilidad celular por parte de PRL es menor que cuando se administra con una concentración de 20 μM . La viabilidad celular se evaluó mediante un ensayo de MTT.



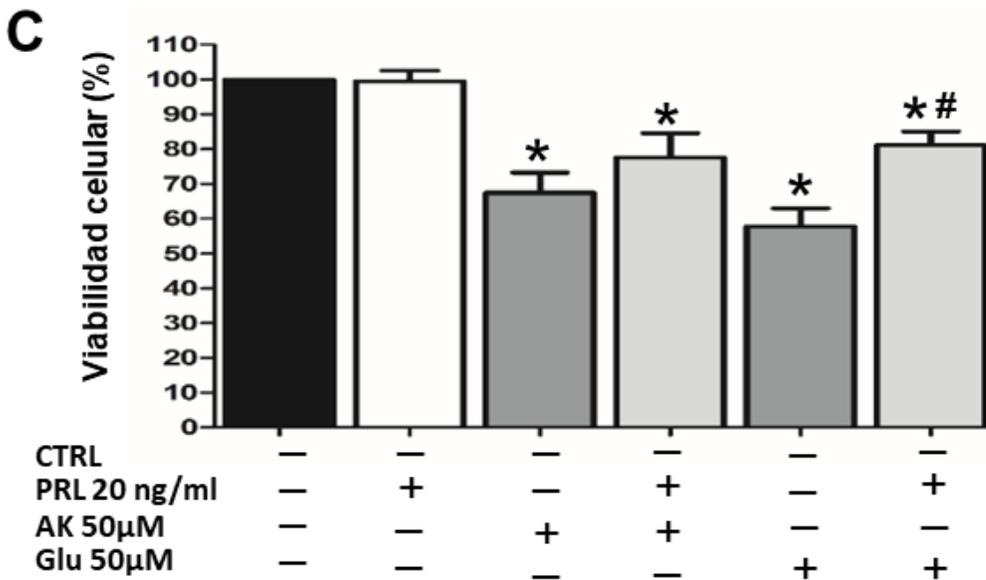
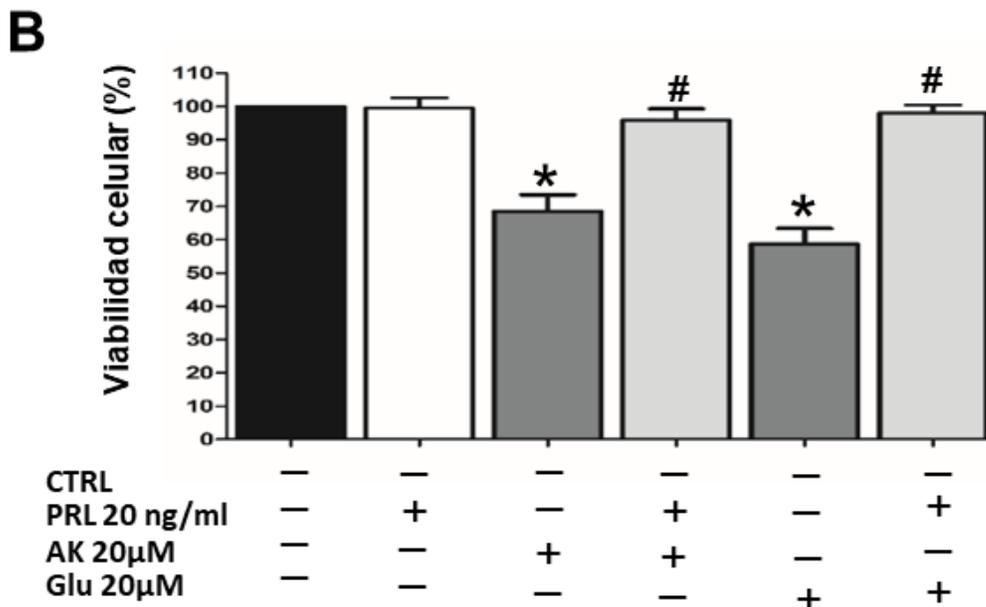


Fig 3. La PRL recupera la viabilidad celular ante el daño excitotóxico por AK o Glu. En el panel 3A se observa que ambos tratamientos mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto a CTRL, al igual que los tratamientos con AK 20 μM vs PRL 20 ng/ml+AK 20 μM y Glu 20 μM vs PRL 20 ng/ml+Glu 20 μM, En el panel 3B, se observa que los tratamientos con AK 20 μM y Glu 20 μM vs CTRL

tuvieron diferencias estadísticamente significativas, como también se observa en los tratamientos de AK 20 μ M vs PRL 20 ng/ml+AK 20 μ M y Glu 20 μ M vs PRL 20 ng/ml+Glu 20 μ M. Finalmente, en el panel 3C se muestran que todos los tratamientos tuvieron diferencias estadísticamente significativas con respecto a CTRL y solo PRL 20ng/ml+ Glu 50 μ M con respecto a Glu 50 μ M. Los datos se analizaron utilizando una prueba de análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguida de una prueba de comparación múltiple post hoc de Bonferroni. $p \leq 0.05$, $n=4$. *todos los tratamientos vs CTRL, #tratamientos vs AK o Glu.

6.4. El antagonista de los RsAMPA-RsAK bloquea la excitotoxicidad de ácido kaínico y glutamato

Luego de que se demostró que el tratamiento con PRL recupera la viabilidad celular en condiciones de excitotoxicidad inducida tanto por AK o por Glu en las neuronas del hipocampo. Se prosiguió con la determinación de los subtipos de RsGluR presentes en los cultivos primarios de neuronas hipocámpales. Para lograr este objetivo se utilizó un antagonista de los RsAMPA-RsAK, el cual fue el 2,3-dioxo-6-nitro-7-sulfamoylbenzo(f)quinoxalina (NBQX), con una constante de disociación de $K_d = 47$ nM. Este antagonista fue evaluado en diferentes concentraciones: 1, 5, 10 y 20 μ M, una hora previa a los tratamientos de AK (20 μ M y 50 μ M). Se encontró que todas las concentraciones del inhibidor NBQX producen una recuperación de la viabilidad celular cuando se administra una hora antes que AK. Por otra parte, para comparar el efecto encontrado con las concentraciones de AK, el antagonista NBQX fue evaluado con las mismas concentraciones anteriores, pero con el efecto excitotóxico del Glu en dos concentraciones 20 μ M y 50 μ M. Se observó que la administración previa de NBQX al Glu genera una recuperación de la viabilidad celular, aunque cuanto mayor es la concentración de Glu menor es el efecto del antagonista NBQX. La viabilidad celular se evaluó mediante un ensayo de MTT.

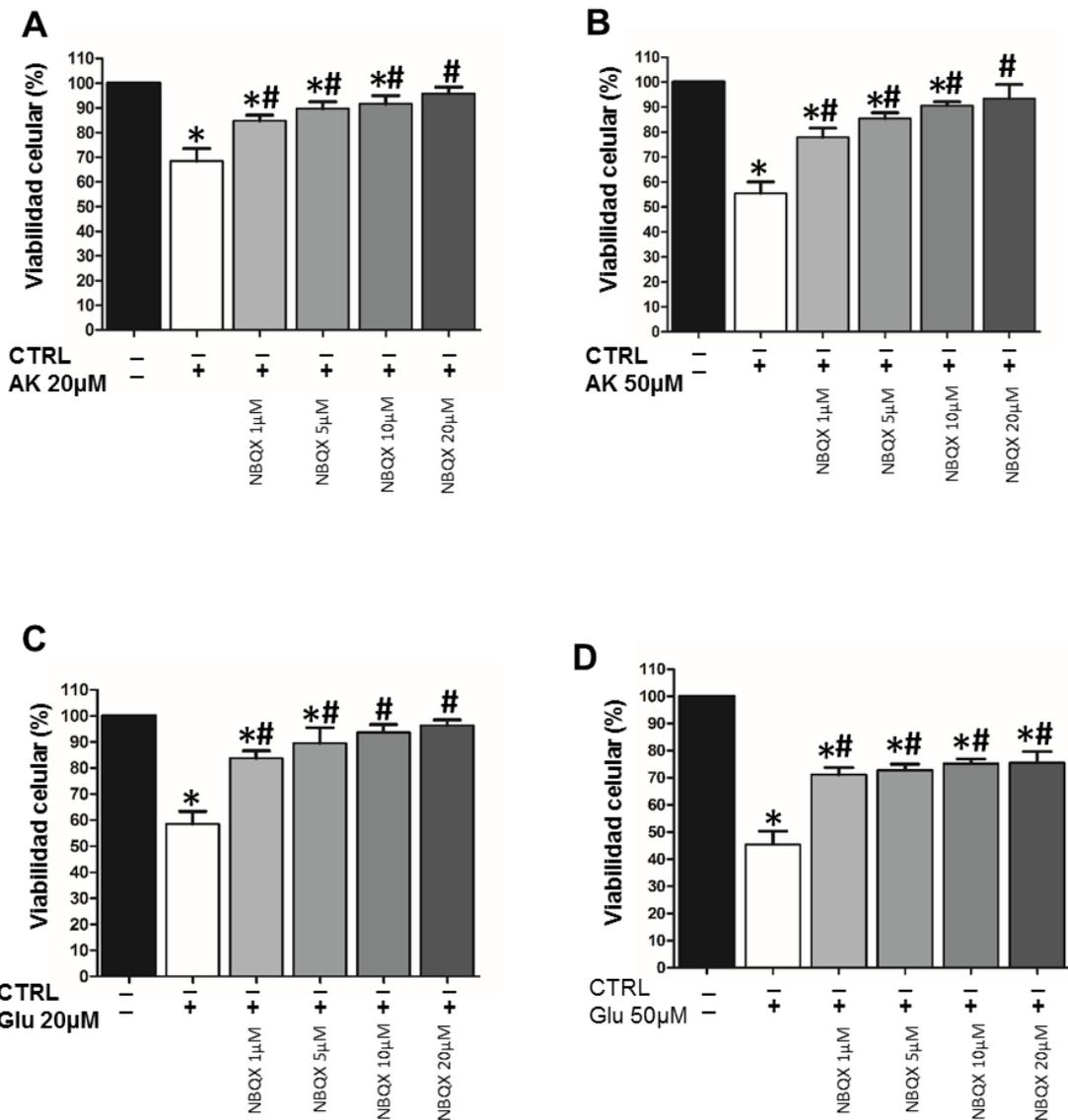


Fig. 4 El antagonista de los RsAMPA-RsAK bloquea el daño inducido por la administración de AK y Glu. En los paneles 4A y 4B se observa que los tratamientos de AK 20 μ M, AK 50 μ M, así como dosis crecientes del antagonista mostraron una reducción estadísticamente significativa en la muerte de neuronas del hipocampo. Por otra parte, en el panel 4C, se muestra que los tratamientos de Glu 20 μ M, NBQX 1 μ M+Glu 20 μ M, NBQX 5 μ M+Glu 20 μ M vs control, tuvieron diferencias estadísticamente significativas. Finalmente, en el panel 4D, se observa que todas las condiciones tuvieron diferencias estadísticamente significativas con

respecto a CTRL y con el tratamiento de Glu 50 μ M. Los datos se analizaron utilizando una prueba de análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguida de una prueba de comparación múltiple post hoc de Bonferroni. $p \leq 0.05$, $n=4$. * todos los tratamientos vs CTRL, # todos los tratamientos vs AK o Glu.

6.5.-El antagonista de los RsNMDA bloquea el daño causado por la administración de ácido kaínico y glutamato

Continuando con la caracterización de los subtipos de RsGluR presentes en los cultivos primarios de neuronas hipocámpales, el siguiente objetivo fue determinar la presencia de los RsNMDA. Para ello, se utilizó un inhibidor de los RsNMDA, el cual fue el malato de hidrógeno de dizocilpina (MK-801), con una constante de disociación de $K_d = 37.2$ nM. Este inhibidor se evaluó en las siguientes concentraciones: 1, 5, 10 y 20 μ M, siendo administrados una hora antes de las concentraciones de AK (20 μ M y 50 μ M). Se demostró que la administración del antagonista de los RsNMDA produce una recuperación de la viabilidad celular en condiciones de daño causado por AK. Con la intención de comparar el efecto del antagonista MK-801 con Glu, se utilizaron las concentraciones previas en este estudio del antagonista en dos concentraciones de Glu (20 μ M y 50 μ M). Asimismo, se encontró que la administración de MK-801 provoca una recuperación de la viabilidad celular cuando se administra previamente a un evento excitotóxico causado por Glu. La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo de MTT.

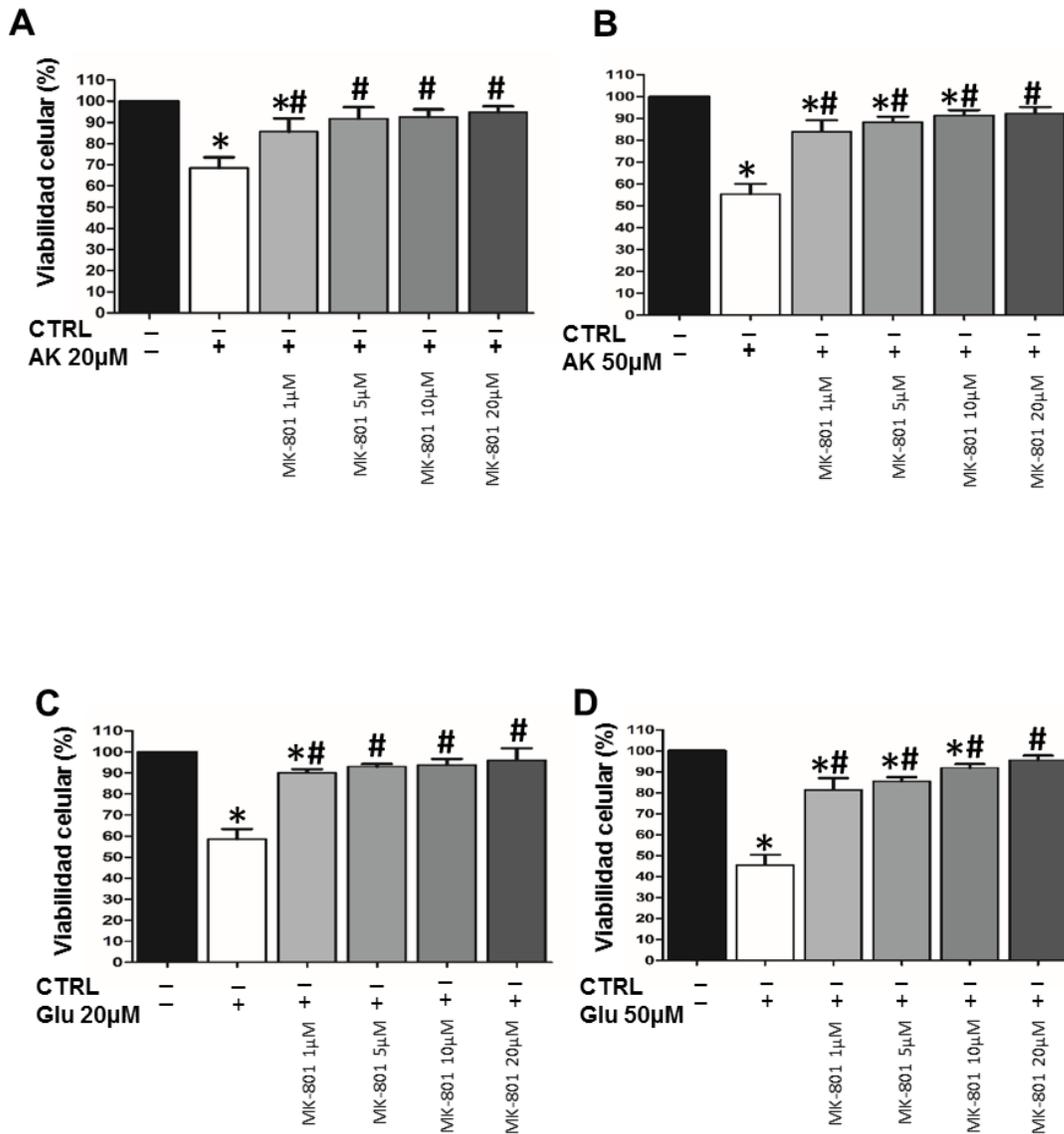
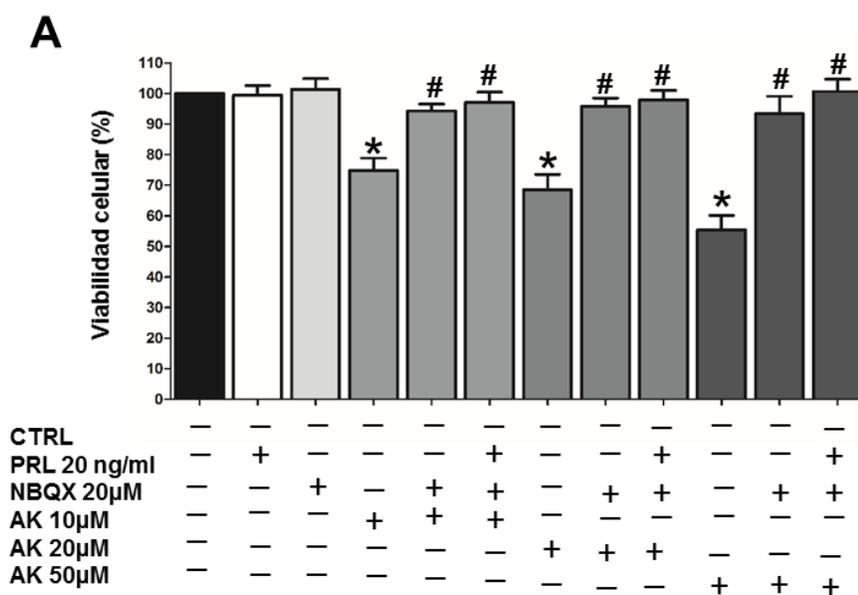


Fig 5. El antagonista de los RsNMDA bloquea el daño causado por la administración de AK y Glu. En el panel 5A, se muestra que los tratamientos de AK 20µM, MK-801 1µM+AK 20µM vs CTRL tuvieron diferencias estadísticamente significativas al igual que en el panel 5B los tratamientos AK 50µM, MK-801 1µM+AK 50µM, MK-801 5µM+AK 50µM y MK-801 10µM+ AK 50µM vs CTRL y todos los tratamientos del antagonista con respecto a AK 50µM. En el panel 5C se observa que los tratamientos de Glu 20µM, MK-801 1µM+Glu 20µM y MK-801 5µM+Glu 20µM vs CTRL tuvieron diferencias estadísticamente significativas, finalmente en el

panel 5D se muestra que los tratamientos Glu 50 μ M, MK-801 1 μ M+ Glu 50 μ M, MK-801 5 μ M+ Glu 50 μ M y MK-801 10 μ M+ Glu 50 μ M vs CTRL, tuvieron diferencias estadísticamente significativas, al igual que los tratamientos Glu 20 μ M y Glu 50 μ M vs MK-801. Los datos se analizaron mediante una prueba de análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguida de una prueba de comparación múltiple post hoc de Bonferroni. $p \leq 0.05$, $n=4$. * todos los tratamientos vs CTRL, # todos los tratamientos vs AK o Glu.

6.6.-Efecto de la prolactina sobre el antagonista de los RsAMPA-RsAK ante la excitotoxicidad por ácido kaínico y glutamato

Con la información anterior sobre el efecto neuroprotector de PRL y el causado por la administración de antagonista de los RsGlu1 sobre los cultivos primarios de neuronas hipocámpales, el siguiente objetivo fue analizar si la administración de PRL tiene un efecto sobre el antagonista de los RsAMPA-RsAK bajo diferentes tratamientos de daño excitotóxico por parte de AK y Glu. Se administraron PRL 20 ng/ml, NBQX 20 μ M en diferentes tratamientos de AK o Glu, las cuales fueron: 10, 20 y 50 μ M. Se encontró que la PRL no disminuye la viabilidad celular cuando se administra en conjunto con el antagonista de los RsAMPA-RsAK en condiciones excitotóxicas. Además, se encontró que la PRL, si incremento la viabilidad celular cuando se administró en conjunto con el NBQX en la concentración de Glu 50 μ M. La viabilidad celular se evaluó mediante un ensayo de MTT (Fig. 6).



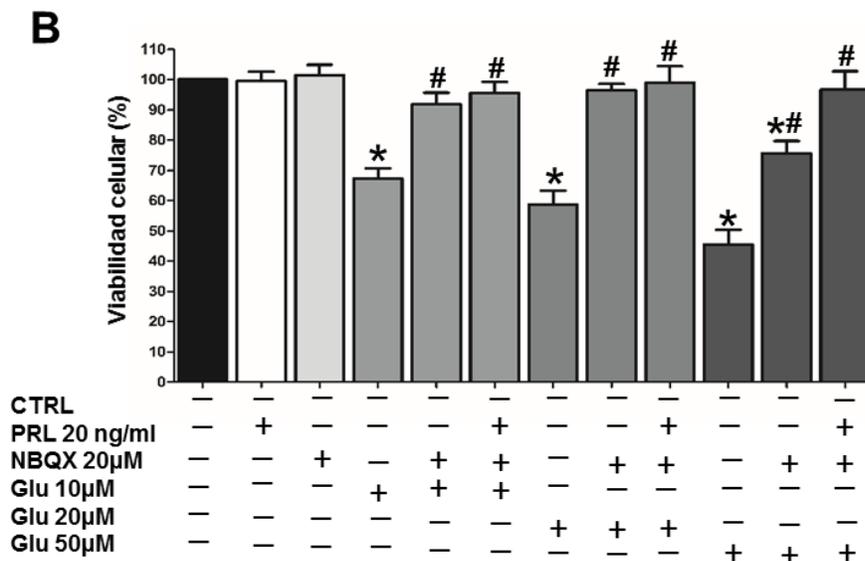
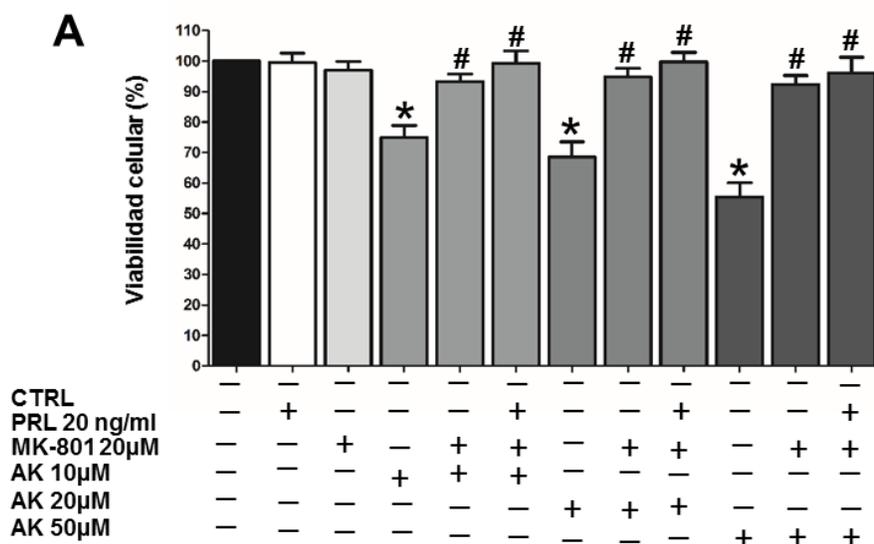


Fig 6. La PRL recupera la viabilidad junto con el antagonista de los RsAMPA-RsAK ante la excitotoxicidad por AK y Glu. En el panel 6A, se observa que las concentraciones de AK 10, 20 y 50µM vs CTRL tuvieron diferencias estadísticamente significativas, así como los tratamientos de AK 10µM vs NBQX 20µM+AK 10µM y PRL 20ng/ml+NBQX 20µM+AK 10µM, AK 20µM vs NBQX 20µM+ AK 20 µM y PRL 20 ng/ml+ NBQX 20 µM+AK 20 µM, AK 50 µM vs NBQX 20 µM+AK 50 µM y PRL 20 ng/ml+NBQX 20µM+AK 50 µM. En el panel 6B se muestra que las concentraciones de Glu 10, 20, 50 y NBQX 20µM+Glu 50µM vs CTRL tuvieron diferencias estadísticamente significativas, también hubo diferencias entre los siguientes tratamientos: Glu 10µM vs NBQX 20µM+Glu 10µM y PRL 20ng/ml+ NBQX 20µM +Glu 10µM, Glu 20µM vs NBQX 20µM+Glu 20µM y PRL 20ng/ml+ NBQX 20µM+Glu 20µM, Glu 50µM vs NBQX 20µM+Glu 50µM y NBQX 20µM +PRL 20 ng/ml+Glu 50µM, finalmente NBQX 20 µM+ Glu 50 µM vs NBQX 20 µM+PRL 20 ng/ml+Glu 50 µM. Los datos se analizaron mediante una prueba de análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguida de una prueba de comparación múltiple post hoc de Bonferroni. $p \leq 0.05$, $n=4$. * todos los tratamientos vs CTRL, # tratamientos vs AK 20 o Glu 20.

6.7.-El efecto de la prolactina sobre el antagonista de los RsNMDA ante la excitotoxicidad por ácido kaínico y glutamato

A continuación, se evaluó el efecto de la administración de PRL sobre el antagonista de los RsNMDA bajo diferentes tratamientos de daño excitotóxico por parte de AK y Glu en cultivos primarios de neuronas hipocampales. Se administraron PRL 20ng/ml, MK-801 20μM y diferentes tratamientos de AK o Glu, las cuales fueron: 10, 20 y 50μM. Se encontró que la PRL y el inhibidor MK-801 recuperan la viabilidad celular cuando se administra en conjunto con el antagonista de los RsNMDA en las condiciones excitotóxicas por AK y Glu. La viabilidad celular se evaluó mediante un ensayo de MTT (Fig. 7).



B

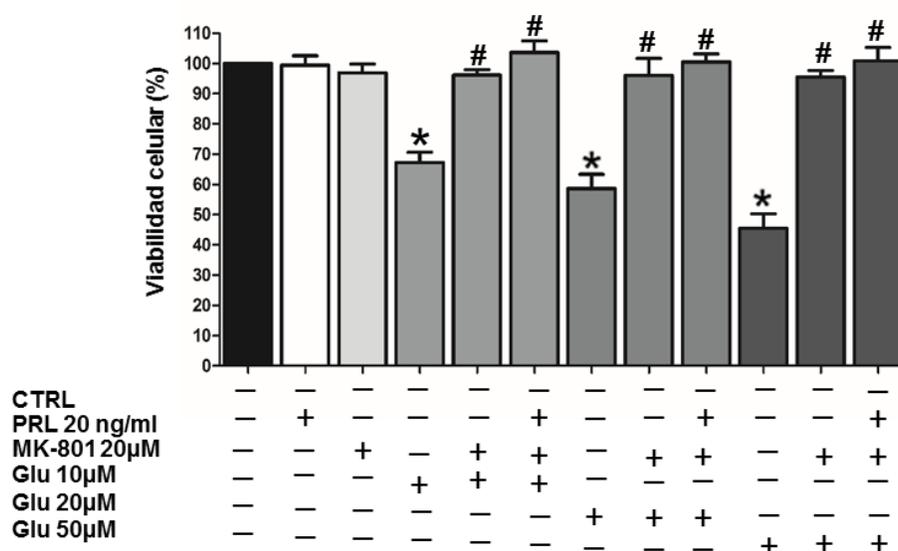
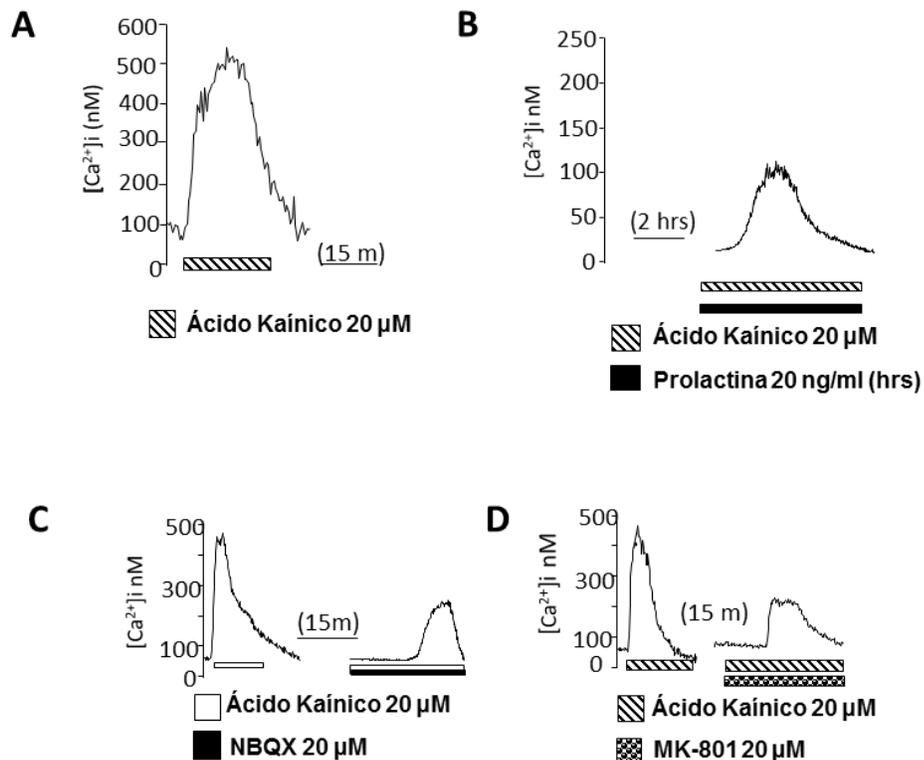


Fig 7. La PRL y el antagonista de los RsNMDA recuperan la viabilidad celular ante la excitotoxicidad por AK y Glu. Tanto en el panel 7A como en el panel 7B, los tratamientos de AK y Glu 10, 20 y 50µM vs CTRL tuvieron diferencias estadísticamente significativas. Al igual que en el panel 7A, los tratamientos AK 10µM vs MK-801 20µM+AK 10µM y PRL 20ng/ml+MK-801 20µM+AK 10µM, AK 20µM vs MK-801 20µM+AK 20µM y PRL 20ng/ml+ MK-801 20 µM+AK 20 µM, AK 50 µM vs MK-801 20 µM+AK 50 µM y PRL 20ng/ml+MK-801 20 µM+AK 50 µM y en el panel 7B, los tratamientos de Glu 10µM vs MK-801 20µM+Glu 10µM y PRL 20 ng/ml+MK-801 20µM+Glu 10 µM, Glu 20µM vs MK-801 20µM+Glu 20µM y PRL 20 ng/ml+MK-801 20 µM+Glu 20 µM, Glu 50 µM frente a MK-801 20 µM+Glu 50 µM y +PRL 20 ng/ml+ MK-801 20 µM+Glu 50 µM. La viabilidad celular se evaluó mediante un ensayo de MTT. Los datos se analizaron mediante una prueba de análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguida de una prueba de comparación múltiple post hoc de Bonferroni. $P \leq 0.05$, $n=4$. *todos los tratamientos vs CTRL, # tratamientos vs AK 20 o Glu 20.

6.8.-Efecto de la prolactina sobre la concentración de calcio intracelular inducida por ácido kaínico en neuronas del hipocampo

Luego de evaluar el efecto neuroprotector de la PRL sobre la viabilidad celular y determinar la expresión de los diferentes tipos de RsGlui en los cultivos primarios de neuronas hipocampales. El siguiente objetivo fue caracterizar la funcionalidad de los RsGlui, para lograrlo se hicieron ensayos de la concentración de Ca^{2+} intracelular. Utilizando como condición excitotóxica al tratamiento de AK 20 μ M (5 minutos), el efecto de la PRL 20ng/ml (2 horas previas) y los antagonistas de los RsGlui (NBQX 20 μ M y MK-801 20 μ M (5 minutos)). Se demostró que la PRL reduce la concentración de Ca^{2+} intracelular al igual que los antagonistas de los RsGlui. Los registros celulares para cada tratamiento fueron en célula única.



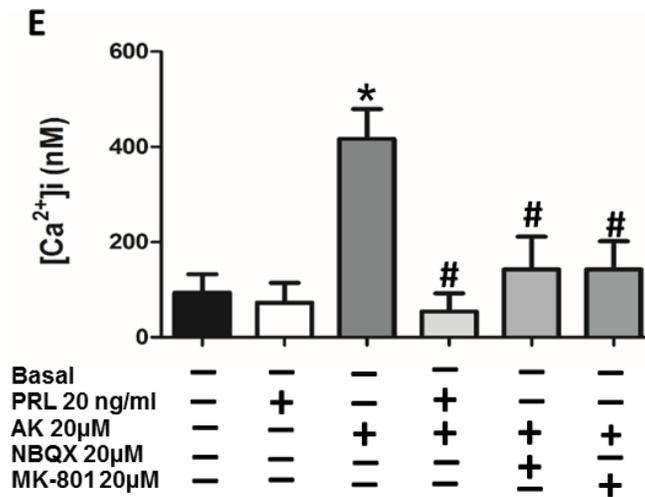
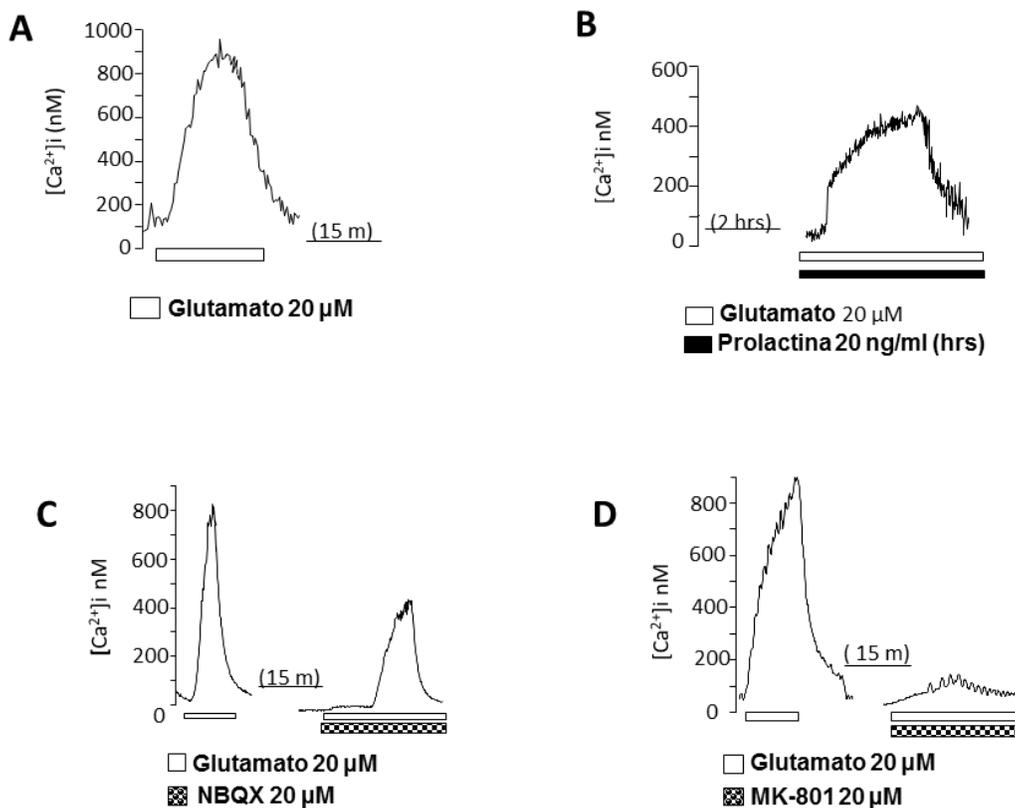


Fig 8. La PRL reduce la concentración de Ca²⁺ intracelular inducida por AK en neuronas del hipocampo al igual que los antagonistas de los RsGlu_i. En los paneles 8A-8D, se muestra los registros de Ca²⁺ intracelular de neuronas estimuladas con AK 20 μM, PRL 20 ng/ml, NBQX 20 μM y MK-801 20 μM en imágenes representativas de cada condición. Todos los tratamientos con PRL+AK, NBQX+AK y MK-801+AK frente a AK fueron estadísticamente significativos y solo AK frente a basal fue estadísticamente significativo (panel 8E). Cada registro se realizó en una célula. Los datos se analizaron utilizando una prueba ANOVA de una vía, seguida de una prueba de comparación múltiple post hoc de Bonferroni. P≤0.05, (Basal) n=5, (PRL)n=5, (AK) n=5, (PRL+AK) n=4, (NBQX+AK) n=5, (MK-801+AK) n=4. *todos los tratamientos frente a Basal, #todos los tratamientos frente a AK 20 μM.

6.9.-Efecto de la prolactina sobre la concentración de calcio intracelular inducida por el glutamato en neuronas del hipocampo

El siguiente objetivo fue analizar la funcionalidad de los RsGlu1, para lograrlo se hicieron ensayos de la concentración de Ca^{2+} intracelular. Se utilizó, como condición excitotóxica al Glu 20 μ M (5 minutos), a la PRL 20ng/ml (2 horas previas) y los antagonistas de los RsGlu1 (NBQX 20 μ M y MK-801 20 μ M (durante 5 minutos). Se demostró que la PRL reduce la concentración de Ca^{2+} intracelular al igual que los antagonistas de los RsGlu1. Los registros celulares para cada tratamiento fueron en célula única.



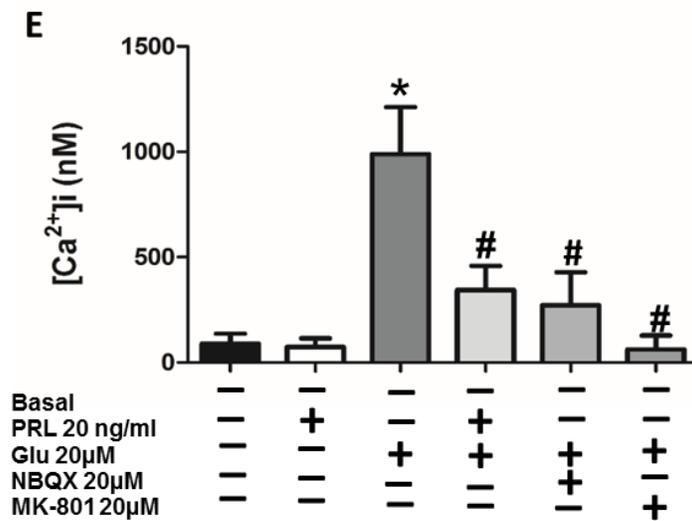
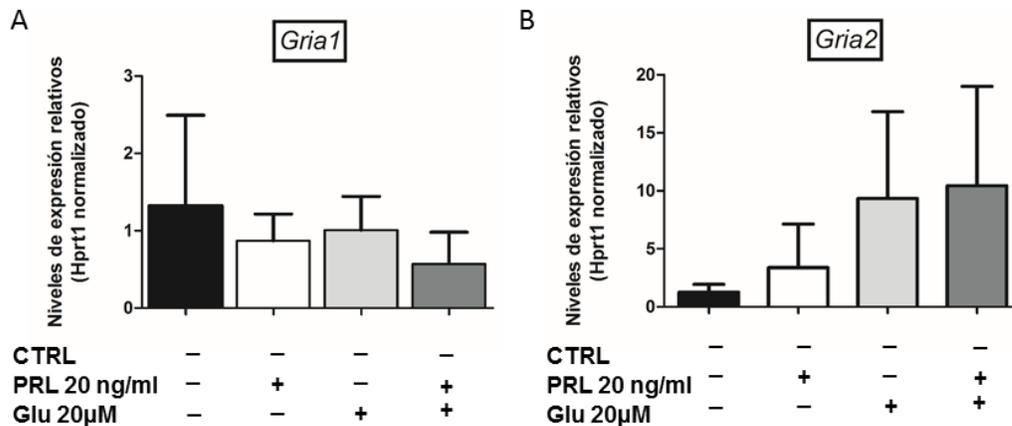


Fig 9. La PRL reduce la concentración de Ca²⁺ intracelular inducida por Glu en neuronas del hipocampo al igual que los antagonistas de los RsGlu_i. En los paneles 9A-9D. se muestra los registros de Ca²⁺ intracelular de neuronas estimuladas con Glu 20 μM, PRL 20 ng/ml, NBQX 20 μM y MK-801 20 μM en imágenes representativas de cada condición. Todos los tratamientos con PRL+Glu, NBQX+Glu y MK-801+Glu frente a Glu fueron estadísticamente significativos y solo Glu frente a basal fue estadísticamente significativo (panel 9E). Cada registro se realizó en una célula. Los datos se analizaron utilizando una prueba ANOVA de una vía, seguida de una prueba de comparación múltiple post hoc de Bonferroni. p≤0.05, (Basal) n=6, (PRL) n=5, (Glu) n=5, (PRL+Glu) n=5, (NBQX+Glu) n=4, (MK-801+Glu) n=4. *todos los tratamientos frente a PRL 20 ng/ml, #todos los tratamientos frente a Glu 20 μM.

6.10.-Efecto de la PRL o excitotoxicidad sobre la modulación de ARNm que codifican para las subunidades de los receptores glutamatérgicos ionotrópicos

Finalmente, para determinar si la PRL modula la expresión de los ARNm que codifican para las subunidades de los RsGluI en las neuronas del hipocampo. Se evaluó por RT-qPCR los genes *Gria1* y *Gria2*, que son dos subunidades de los RsAMPA, el gen *Grik2* perteneciente a la subunidad GluK2, y los genes *Grin1* y *Grin2b*, subunidades de los RsNMDA, 24 horas después de los tratamientos: CTRL, PRL 20ng/ml, Glu 20 μ M y PRL 20ng/ml+Glu 20 μ M. Como se observa en la Figura 10, todos los ARNm que codifican para las subunidades de RSGluI se expresan en las neuronas del hipocampo, pero no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de tratamiento para ningún gen.



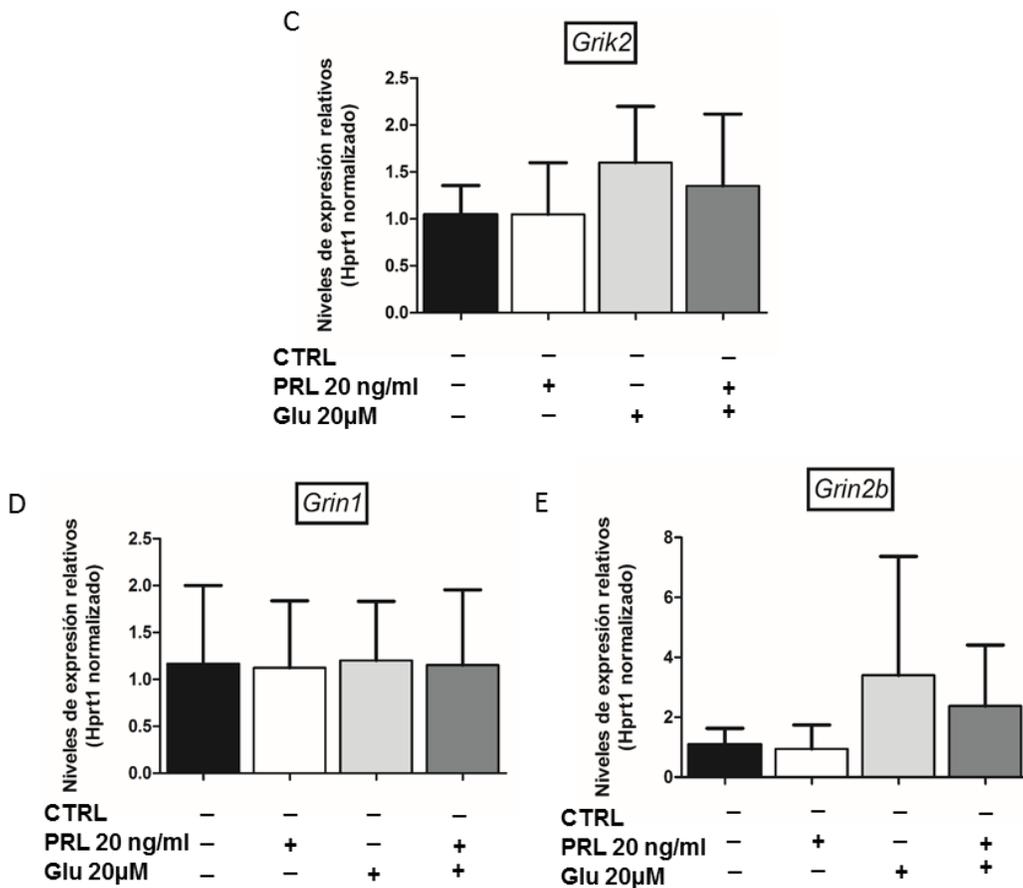


Fig 10. La expresión de los RsGlui en las neuronas del hipocampo no está regulada por prolactina o excitotoxicidad. Los paneles 10A-10E muestran graficas sobre la expresión de los ARNm de las subunidades de los RsGlui. La expresión de genes se realizó en cultivos primarios de neuronas hipocampales en los siguientes tratamientos: CTRL, PRL 20ng/ml, Glu 20 μ M, PRL 20ng/ml+Glu 20 μ M.

7.-DISCUSIÓN

En este estudio se demostró que la PRL reduce la excitotoxicidad inducida tanto por AK como por Glu, provocando neuroprotección en los cultivos primarios de neuronas hipocampales, evitando la muerte celular. Además, este efecto está mediado en parte por una regulación de la concentración de Ca^{2+} intracelular por PRL durante la excitotoxicidad inducida por AK y Glu. Asimismo, este efecto fue similar al que se encontró después de la administración de los antagonistas específicos de los RsGluI en cultivos primarios de neuronas del hipocampo. Finalmente, en las neuronas del hipocampo se expresaron los ARNm que codifican para las subunidades de los RsGluI, entre las que se encontraban una de los RsAK, dos de los RsAMPA y dos de los RsNMDA. Sin embargo, la expresión de ninguna de las subunidades de receptores cambió con los tratamientos de PRL o con agonistas de lo RsGluI.

En varios estudios se ha demostrado que la administración de AK y Glu inducen excitotoxicidad, mecanismo que conduce al daño neuronal y muerte celular (Vanoye-Carlo et al., 2008; Vergara-Castañeda et al., 2016; Rivero-Segura et al., 2017; Molina-Salinas et al., 2023). Cabe señalar que aunque el AK se ha utilizado principalmente en modelos *in vivo* de daño celular en varias estructuras cerebrales como el hipocampo (Vanoye-Carlo et al., 2008; Zheng et al., 2011; Iida et al., 2021), su mecanismo de acción durante la excitotoxicidad no ha sido completamente descrito (Wang et al., 2005; Zheng et al., 2011).

Debido a que el mecanismo de acción del AK en excitotoxicidad no está completamente claro. En este estudio, se realizaron una serie de experimentos de dosis–respuesta los cuales demostraron el efecto tóxico inducido por AK y Glu, solos o en combinación con PRL, en cultivos primarios de neuronas del hipocampo. Como se muestra en la Fig. 2, tanto AK como Glu provocaron la muerte de las neuronales, como se esperaba. Además, en este estudio, observamos que el Glu induce un daño celular mayor desde dosis más bajas en comparación con AK, este efecto se sugiere que puede ser debido a que el Glu se une a todos sus receptores (RsGluI y RsGluII) en comparación con el AK que es selectivo para los RsAMPA-

RsAK (Zheng et al., 2011; Carta et al., 2014; Armada-Moreira et al., 2020; Rodríguez-Chavez et al., 2021).

Respecto al AK se sugiere que este agonista de los RsGlu1 puede inducir excitotoxicidad y muerte neuronal a través de otros mecanismos, como los que reportan estudios previos, los cuales señalan que el RsAK puede tener un efecto dual activando una vía de señalización clásica que permite la entrada de iones y una vía de señalización no canónica a través de la interacción con RsGlu2 acoplados a proteínas G (Rodríguez-Moreno and Sihra, 2011; Pressey and Woodin, 2021). Además, se ha reportado que como canal iónico permite el ingreso de Ca^{2+} a las células (Wang et al., 2005; Zheng et al., 2011; Abushik et al., 2013).

Por otra parte, en la Fig 3. Se muestra que el daño neuronal causado por la excitotoxicidad inducida por AK o Glu se reduce significativamente cuando se administra PRL. Esta observación es consistente con informes previos de nuestro grupo donde se evaluó el efecto de la exposición prolongada de PRL contra la excitotoxicidad inducida por una concentración elevada de Glu (100 μ M) (Vergara-Castañeda et al., 2016; Rivero-Segura et al., 2017, 2019). En este estudio encontramos que la viabilidad celular se recuperó significativamente en las siguientes condiciones, cuando se administró PRL simultáneamente con agonistas de los RsGlu1. Sin embargo, este efecto fue más fuerte cuando se administró PRL dos horas antes de AK o Glu, por lo que se sugiere que la neuroprotección por PRL podría involucrar una vía intracelular modulada por la activación de los RsGlu1, debido a que son los receptores a los que se unen el AK y el Glu.

A raíz de la observación del efecto neuroprotector de la PRL contra la excitotoxicidad inducida por AK y Glu. El siguiente objetivo fue determinar cuáles eran los RsGlu1 específicos presentes en los cultivos primarios de neuronas hipocámpales. Para este objetivo se realizaron una serie de experimentos usando antagonistas de los RsGlu1. Primero, los RsAMPA y RsAK se evaluaron junto con el antagonista NBQX (2,3-dioxo-6-nitro-7-sulfamoylbenzo(f)quinoxalina), el cual bloquea específicamente la acción de ambos receptores (Libbey et al., 2016; Falcón-Moya et al., 2021) y para evaluar la presencia del RsNMDA se usó el antagonista MK-801 (malato de hidrógeno de dizocilpina) el cual bloquea a los

RsNMDA, porque se une a dos sitios del canal iónico del receptor, bloqueando la entrada de iones como el Ca^{2+} (Woodruff et al., 1987; Standley, 1999; Prius-Mengual et al., 2019). Como se esperaba, con el uso de antagonistas de los RsGluI, se evitó la toxicidad inducida por sus respectivos agonistas AK y Glu (Fig. 4 y 5). Los resultados sugieren que tanto los RsAMPA-RsAK como los RsNMDA son funcionales en los cultivos primarios de neuronas hipocampales, debido a que la administración de los antagonistas selectivos de estos receptores inhibieron los efectos excitotóxicos, como se ha reportado en otros estudios que evalúan su funcionalidad (Woodruff et al., 1987; Libbey et al., 2016). Finalmente se concluye que en todas las concentraciones administradas de los antagonistas de los RsGluI se recupera la viabilidad celular y se observa un efecto contrario cuando el AK y Glu se administraron sin el antagonista, demostrando la presencia de los tres tipos de RsGluI.

Asimismo, se encontró que cuando se combina la administración de la PRL con los antagonistas de los RsGluI, los efectos de recuperación de la viabilidad celular se mantienen o mejoran (Fig.6-7). Esta información respalda y amplía las investigaciones previas que demuestran que la administración de AK se asocia con excitotoxicidad y muerte neuronal en modelos *in vivo* (Nakai et al., 2000; Wang et al., 2005; Vanoye-Carlo et al., 2008; Zheng et al., 2011). Además, en este estudio se encontró que el efecto neurotóxico de AK se reduce cuando hay un tratamiento previo con PRL en neuronas hipocampales.

Cabe señalar que es interesante que en este estudio se encontró que el tratamiento donde se administró PRL previamente al antagonista de los RsAMPA-RsAK y a la concentración de Glu $50\mu\text{M}$, mostro una recuperación mayor de la viabilidad celular, que cuando solo se administra el antagonista NBQX a la concentración de Glu $50\mu\text{M}$. Esto sugiere que la PRL puede estar involucrada en la modulación funcional de RsGluI.

Por otra parte, el antagonista MK-801 también recuperó la viabilidad celular después de ambos tratamientos AK y Glu, en todas las concentraciones utilizadas y contrario al efecto con NBQX, la PRL no aumentó la recuperación de la viabilidad celular, probablemente porque el antagonista fue suficiente para bloquear completamente

los RsNMDA evitando que la PRL pudiera mostrar algún efecto en los cultivos primarios de neuronas hipocampales. Sin embargo, sorprendentemente se encontró que el antagonista MK-801 también afecta la función de los RsAK, bloqueando el daño excitotóxico, hasta el momento pocos estudios relacionan este inhibidor con el RsAK (Stafstrom et al., 1993, 1997).

Después de que se determinó la presencia de los tres tipos de RsGluI, se continuó con el siguiente objetivo, el cual consistía en evaluar la funcionalidad de los RsGluI. Con este propósito se evaluaron cambios en la concentración de Ca^{2+} intracelulares inducidos por el tratamiento con AK o Glu, junto con los antagonistas de los RsGluI o PRL. Se estudió el efecto de la PRL, debido a que se ha informado que esta hormona puede inducir modulación en la concentración de Ca^{2+} en las neuronas hipocampales y neuronas sensoriales, aunque esta función no está completamente descrita (Patil et al., 2014; Rivero-Segura et al., 2017). En este estudio, se encontró que el mayor aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular se produjo cuando se administró Glu, en comparación con AK (Fig. 8 y 9). Este aumento de Ca^{2+} intracelular fue similar a los reportados previamente en estudios de nuestro grupo en los que se utilizó Glu (Rivero-Segura et al., 2017).

Como se mencionó previamente, también se estudió el efecto de los antagonistas de los RsGluI sobre la funcionalidad de estos receptores, se encontró que los antagonistas NBQX y MK-801 reducen la concentración de Ca^{2+} intracelular cuando se administran junto con los agonistas de los RsGluI en los mismos cultivos. Las Fig. 8C y 9C muestran que la concentración de Ca^{2+} intracelular disminuye cuando se administra simultáneamente el antagonista NBQX con AK o Glu; además esta disminución fue mayor con la administración de Glu que con la de AK. De forma similar, la administración del antagonista MK-801 con el tratamiento con Glu provocó una disminución significativa en la concentración de Ca^{2+} intracelular. Por otra parte, también hubo un decremento de la concentración de Ca^{2+} intracelular cuando se administró el antagonista de los RsNMDA con AK (Fig. 8D). Esto es interesante porque sugiere que aunque el antagonista MK-801 es selectivo para RsNMDA (Woodruff et al., 1987; Standley, 1999), también puede bloquear el daño inducido por AK. No obstante, solo en algunos modelos de epilepsia se ha reportado los

efectos de MK-801 sobre la actividad del RsAK (Stafstrom et al., 1993, 1997). Por lo tanto, los efectos del antagonista MK-801 sobre la actividad del RsAK, como se han observado en el presente estudio, se deben explorar más a fondo para determinar un posible mecanismo de acción del antagonista MK-801 en la inhibición de la actividad de los RsAK.

Respecto a funcionalidad de los RsGlu, se determinó si la neuroprotección por PRL se debe a cambios en la concentración de Ca^{2+} intracelular. Un importante estudio de Patil et al. (2014) indicó que la PRL modificaba la funcionalidad neuronal por varios mecanismos, incluidos efectos rápidos de entre 1 y 5 minutos, lo que sugiere que la PRL puede causar la entrada de Ca^{2+} en las neuronas sensoriales somáticas a través de canales similares a TRP y de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje de tipo L. Sin embargo, el papel de la PRL en la modulación del Ca^{2+} intracelular no ha sido completamente descrito, pero se ha sugerido que la activación de las neuronas por parte de la PRL puede involucrar a PKC (Patil et al., 2014). En el presente estudio, hemos demostrado que la PRL tiene un efecto importante en la reducción de la concentración de Ca^{2+} intracelular en neuronas hipocámpales de cultivos primarios, lo que sugiere un papel diferencial entre las células. Sin embargo, se necesitan más estudios para explicar estas diferencias (Patil et al., 2014; Rivero-Segura et al., 2017). Sorprendentemente, se encontró que cuando se administra PRL dos horas antes de la excitotoxicidad causada por los tratamientos de AK y Glu, se observa una disminución en la concentración de Ca^{2+} intracelular cuando (Fig. 8 y 9). En particular, hubo una disminución de la concentración de Ca^{2+} intracelular mayor cuando se administró PRL junto con Glu en comparación con AK. El efecto neuroprotector de la PRL puede deberse a su capacidad para modular el aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular causado por eventos excitotóxicos inducidos por AK o Glu, lo que respalda los modelos *in vivo* e *in vitro* que utilizan estos agonistas glutamatérgicos, para ver el efecto neuroprotector que ejerce la PRL (Vanoye-Carlo et al., 2008; Vergara-Castañeda et al., 2016; Rivero-Segura et al., 2017). Sin embargo, los mecanismos por los cuales la PRL se relaciona con los cambios en la concentración de Ca^{2+} intracelular aún no están claros (Patil et al., 2014; Rivero-Segura et al., 2017).

Se propone que la PRL podría ejercer sus efectos neuroprotectores contra la excitotoxicidad inducida por AK y Glu y su modulación en la concentración de Ca^{2+} intracelular, a través de cambios en la activación de vías de señalización como PI3K/AKT, MAPK y PKC, que están también involucradas en los mecanismos de acción de los RsGluI (Patil et al., 2014; Molina-Salinas et al., 2021, 2023; Rodriguez-Chavez et al., 2021; Costa-Brito et al., 2022). Debido a que se ha relacionado el efecto de Glu en las neuronas con la activación de una vía de señalización de Ca^{2+} -calmodulina que desencadena la activación de las proteínas quinasas dependientes de calmodulina y las proteínas PKA y PKC, que a su vez activan a la proteína MAPK (Patil et al., 2014; Zhou and Danbolt, 2014; Wang and Peng, 2016; Rodriguez-Chavez et al., 2021; Molina-Salinas et al., 2023). Asimismo se ha reportado que los RsAK se encuentran en varias regiones cerebrales como el hipocampo, el tálamo y el cerebelo, donde activan diferentes cascadas de señalización como las que involucran a las proteínas G, las fosfolipasa C y PKC, aunado a que se ha informado que los RsAK regulan la transmisión sináptica mediante la activación de una cascada de señalización dependiente de Ca^{2+} -calmodulina y adenilil ciclasa/cAMP/PKA, independientemente de la vía de señalización por activación desde la proteína G (Andrade-Talavera et al., 2013; Xu and Smith, 2015; Chong et al., 2018; Falcón-Moya et al., 2018, 2021).

Finalmente se evaluó la expresión de varias subunidades de los RsGluI relacionados con la entrada de Ca^{2+} (Frerking and Nicoll, 2000; Wiltgen et al., 2010; Carta et al., 2014; Bissen et al., 2019; Prius-Mengual et al., 2019). Como se esperaba, en nuestro estudio se detectó la expresión de las subunidades GluA1 y GluA2 de los RsAMPA, ambas encontradas previamente en el hipocampo humano y de roedores (Carter et al., 2004; Isaac et al., 2007; Bissen et al., 2019; Hanada, 2020). También se encontró la subunidad GluK2 de RsAK, previamente reportada en el área CA3 del hipocampo en modelos *in vivo* (Carta et al., 2014; Iida et al., 2021; Duan et al., 2023), asimismo se encontraron expresadas las subunidades GluN1 y GluN2B de RsNMDA, también reportadas en el hipocampo y la subunidad GluN2B relacionada con excitotoxicidad (Sanz-Clemente et al., 2013; Parsons and Raymond, 2014; Swanger et al., 2016; Prius-Mengual et al., 2019; Armada-Moreira

et al., 2020). Sin embargo, en roedores la expresión de las subunidades específicas de los RsGluI no está completamente descrita aún.

En este estudio se observó que las funciones y la regulación de estas subunidades de los RsGluI son importantes para la neuroprotección neuronal por parte de PRL ante los agonistas de los RsGluI, debido se ha reportado que la expresión de la subunidad GluA2 de los RsAMPA se ha relacionado con la neuroprotección contra enfermedad de Alzheimer, debido a su papel en la inhibición de la entrada de Ca^{2+} (Carter et al., 2004). Sin embargo, en el presente estudio no se detectaron diferencias en la expresión de los ARNm que codifican a las diferentes subunidades de los RsGluI en nuestras condiciones experimentales. Por lo tanto, se necesitan más estudios para determinar el papel de la neuroprotección por parte PRL, conocer su posible regulación en la compleja red de funciones de los RsGluI y descubrir detalladamente el mecanismo por el cual esta hormona provoca una disminución del Ca^{2+} intracelular cuando se administra previamente a los agonistas de los RsGluI.

8.-CONCLUSIÓN

En este estudio se ha demostrado que tanto AK como Glu provocan excitotoxicidad en cultivos primarios de neuronas del hipocampo, misma que es inhibida cuando hay una administración de PRL simultáneamente o previa al evento excitotóxico, ya que la PRL mostró que es capaz de recuperar la viabilidad celular en los cultivos que fueron dañados con excitotoxicidad inducida por AK o Glu. Además, se encontró que los RsAMPA-RsAK también participan en la entrada de Ca^{2+} y excitotoxicidad debido cuando se administra AK se observa un aumento de Ca^{2+} , esto es relevante debido a que estos receptores han sido los menos relacionados con la entrada de Ca^{2+} en comparación con los RsNMDA. Asimismo, se encontró que la inhibición de la actividad de los RsGlui por antagonistas específicos induce neuroprotección. Sorprendentemente, la neuroprotección fue de manera similar a lo que se demostró con la administración previa de PRL ante a la excitotoxicidad causada por AK y Glu. Asimismo, se sugiere que la PRL puede jugar un papel clave en el proceso de neuroprotección, regulando la homeostasis de Ca^{2+} intracelular, debido a que se demostró que la concentración de Ca^{2+} intracelular disminuye, cuando esta hormona se administra previamente del daño excitotóxico de AK o Glu. Finalmente, con respecto a los ARNm que codifican para subunidades de los RsGlui. Se observó que los ARNm que codifican a las subunidades de los RsGlui se expresaron en las neuronas del hipocampo, pero no se modificaron significativamente por la PRL o el proceso de excitotoxicidad. Se concluye que el conocimiento de los mecanismos involucrados en el efecto neuroprotector de la PRL a través de la regulación de los RsGlui podría ser relevante para definir posibles dianas terapéuticas para diversos trastornos neurológicos y en la búsqueda de alternativas de neuroprotección.

9.-PERPECTIVAS

- ❖ Determinar si el cambio en la concentración de Ca^{2+} es por la entrada de Ca^{2+} a la neurona o es por cambios en los orgánulos que la almacenan.
- ❖ Estudiar a fondo la neuroprotección por parte de PRL contra la excitotoxicidad de AK.
- ❖ Analizar el efecto de PRL sobre la expresión y funcionalidad de los RsGlui utilizando los agonistas específicos para cada receptor.

10.-REFERENCIAS

- Abushik PA, Sibarov DA, Eaton MJ, Skatchkov SN, Antonov SM (2013) Kainate-induced calcium overload of cortical neurons in vitro: Dependence on expression of AMPAR GluA2-subunit and down-regulation by subnanomolar ouabain. *Cell Calcium* 54:95–104. Available at: 10.1016/j.ceca.2013.05.002.
- Alberini CM (2009) Transcription Factors in Long-Term Memory and Synaptic Plasticity. *Physiol Rev* 89:121 LP – 145 Available at: <http://physrev.physiology.org/content/89/1/121.abstract>.
- Andrade-Talavera Y, Duque-Feria P, Negrete-Díaz JV, Sihra TS, Flores G, Rodríguez-Moreno A (2012) Presynaptic kainate receptor-mediated facilitation of glutamate release involves Ca²⁺-calmodulin at mossy fiber-CA3 synapses. *J Neurochem* 122:891–899. Available at: 10.1111/j.1471-4159.2012.07844.x.
- Andrade-Talavera Y, Duque-Feria P, Sihra TS, Rodríguez-Moreno A (2013) Pre-synaptic kainate receptor-mediated facilitation of glutamate release involves PKA and Ca(2+) -calmodulin at thalamocortical synapses. *J Neurochem* 126:565–578. Available at: 10.1111/jnc.12310.
- Ankarcrona M, Dypbukt JM, Bonfoco E, Zhivotov sky B, Orrenius S, Lipton SA, Nicotera P (1995) Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* 15:961–973. Available at: 10.1016/0896-6273(95)90186-8.
- Armada-Moreira A, Gomes JI, Pina CC, Savchak OK, Gonçalves-Ribeiro J, Rei N, Pinto S, Morais TP, Martins RS, Ribeiro FF, Sebastião AM, Crunelli V, Vaz SH (2020) Going the Extra (Synaptic) Mile: Excitotoxicity as the Road Toward Neurodegenerative Diseases. *Front Cell Neurosci* 14:90 Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32390802>.
- Arundine M, Tymianski M (2003) Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium* 34:325–337 Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0143416003001416>.
- Avila J, Llorens-Martín M, Pallas-Bazarra N, Bolós M, Perea JR, Rodríguez-Matellán

- A, Hernández F (2017) Cognitive Decline in Neuronal Aging and Alzheimer's Disease: Role of NMDA Receptors and Associated Proteins. *Front Neurosci* 11:626. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29176942>.
- Bano D, Ankarcrona M (2018) Beyond the critical point: An overview of excitotoxicity, calcium overload and the downstream consequences. *Neurosci Lett* 663:79–85 Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030439401730695X>.
- Ben-Jonathan N, Mershon JL, Allen DL, Steinmetz RW (1996) Extrapituitary prolactin: Distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocr Rev* 17:639–669. Available at: 10.1210/edrv-17-6-639.
- Bernard V, Young J, Binart N (2019) Prolactin - a pleiotropic factor in health and disease. *Nat Rev Endocrinol* 15:356–365. Available at: 10.1038/s41574-019-0194-6.
- Bernard V, Young J, Chanson P, Binart N (2015) New insights in prolactin: pathological implications. *Nat Rev Endocrinol* 11:265–275. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrendo.2015.36>.
- Bertero E, Maack C (2018) Calcium Signaling and Reactive Oxygen Species in Mitochondria. *Circ Res* 122:1460–1478. Available at: 10.1161/CIRCRESAHA.118.310082.
- Bissen D, Foss F, Acker-Palmer A (2019) AMPA receptors and their minions: auxiliary proteins in AMPA receptor trafficking. *Cell Mol Life Sci* 76:2133–2169 Available at: <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03068-7>.
- Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly PA (1998) Prolactin (PRL) and Its Receptor: Actions, Signal Transduction Pathways and Phenotypes Observed in PRL Receptor Knockout Mice. *Endocr Rev* 19:225–268 Available at: <http://dx.doi.org/10.1210/edrv.19.3.0334>.
- Borba VV, Zandman-Goddard G, Shoenfeld Y (2019) Prolactin and autoimmunity: The hormone as an inflammatory cytokine. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 33:101324 Available at:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1521690X19300752>.

Brini M, Cali T, Ottolini D, Carafoli E (2014) Neuronal calcium signaling: function and dysfunction. *Cell Mol Life Sci* 71:2787–2814 Available at: <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1550-7>.

Bu G, Liang X, Li J, Wang Y (2015) Extra-pituitary prolactin (PRL) and prolactin-like protein (PRL-L) in chickens and zebrafish. *Gen Comp Endocrinol* 220:143–153 Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016648015000386>.

Cabrera-Reyes EA, Limón-Morales O, Rivero-Segura NA, Camacho-Arroyo I, Cerbón M (2017) Prolactin function and putative expression in the brain. *Endocrine*. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s12020-017-1346-x>.

Cabrera-Reyes EA, Vanoye-Carlo A, Rodríguez-Dorantes M, Vázquez-Martínez ER, Rivero-Segura NA, Collazo-Navarrete O, Cerbón M (2019) Transcriptomic analysis reveals new hippocampal gene networks induced by prolactin. *Sci Rep* 9:13765. Available at: [10.1038/s41598-019-50228-7](https://doi.org/10.1038/s41598-019-50228-7).

Carretero J, Sánchez-Robledo V, Carretero-Hernández M, Catalano-Iniesta L, García-Barrado MJ, Iglesias-Osma MC, Blanco EJ (2019) Prolactin system in the hippocampus. *Cell Tissue Res* 375:193–199. Available at: [10.1007/s00441-018-2858-2](https://doi.org/10.1007/s00441-018-2858-2).

Carta M, Fièvre S, Gorlewicz A, Mulle C (2014) Kainate receptors in the hippocampus. *Eur J Neurosci* 39:1835–1844 Available at: <https://doi.org/10.1111/ejn.12590>.

Carter TL, Rissman RA, Mishizen-Eberz AJ, Wolfe BB, Hamilton RL, Gandy S, Armstrong DM (2004) Differential preservation of AMPA receptor subunits in the hippocampi of Alzheimer's disease patients according to Braak stage. *Exp Neurol* 187:299–309 Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014488604000081>.

Choi DW (1992) Excitotoxic cell death. *J Neurobiol* 23:1261–1276. Available at: [10.1002/neu.480230915](https://doi.org/10.1002/neu.480230915).

- Choi DW (2020) Excitotoxicity: Still Hammering the Ischemic Brain in 2020. *Front Neurosci* 14:579953. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33192266>.
- Chong PN, Sangu M, Huat TJ, Reza F, Begum T, Yusoff AAM, Jaafar H, Abdullah JM (2018) Trkb-IP3 Pathway Mediating Neuroprotection in Rat Hippocampal Neuronal Cell Culture Following Induction of Kainic Acid. *Malays J Med Sci* 25:28–45. Available at: 10.21315/mjms2018.25.6.4.
- Clapp C, Aranda J, González C, Jeziorski MC, Martínez de la Escalera G (2006) Vasoinhibins: endogenous regulators of angiogenesis and vascular function. *Trends Endocrinol Metab* 17:301–307. Available at: 10.1016/j.tem.2006.08.002.
- Costa-Brito AR, Gonçalves I, Santos CRA (2022) The brain as a source and a target of prolactin in mammals. *Neural Regen Res* 17:1695–1702. Available at: 10.4103/1673-5374.332124.
- Costanza M, Pedotti R (2016) Prolactin: Friend or Foe in Central Nervous System Autoimmune Inflammation? *Int J Mol Sci* 17. Available at: 10.3390/ijms17122026.
- Crawford N, Lang TK, Kerr DS, de Vries DJ (1999) High-affinity [³H] kainic acid binding to brain membranes: a re-evaluation of ligand potency and selectivity. *J Pharmacol Toxicol Methods* 42:121–125. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S105687190000040X>.
- de la Cadena SG, 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. Available at: 10.1007/s10495-013-0930-7.
- Dong X, Wang Y, Qin Z (2009) Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol Sin* 30:379–387. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19343058>.
- Duan G-F, Tang X-H, Jia M, Wu D, Shi YS (2023) Kainate receptors GluK1 and GluK2 differentially regulate synapse morphology. *Synapse* 77:e22255. Available at: 10.1002/syn.22255. Epub 2022 Sep 26.

- Ehara A, Ueda S (2009) Application of Fluoro-Jade C in acute and chronic neurodegeneration models: utilities and staining differences. *Acta Histochem Cytochem* 42:171–179. Available at: [10.1267/ahc.09018](https://doi.org/10.1267/ahc.09018).
- Evans AJ, Gurung S, Henley JM, Nakamura Y, Wilkinson KA (2019) Exciting Times: New Advances Towards Understanding the Regulation and Roles of Kainate Receptors. *Neurochem Res* 44:572–584. Available at: [10.1007/s11064-017-2450-2](https://doi.org/10.1007/s11064-017-2450-2).
- Falcón-Moya R, Losada-Ruiz P, Sihra TS, Rodríguez-Moreno A (2018) Cerebellar Kainate Receptor-Mediated Facilitation of Glutamate Release Requires Ca(2+)-Calmodulin and PKA. *Front Mol Neurosci* 11:195. Available at: [10.3389/fnmol.2018.00195](https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00195).
- Falcón-Moya R, Martínez-Gallego I, Rodríguez-Moreno A (2021) Kainate receptor modulation of glutamatergic synaptic transmission in the CA2 region of the hippocampus. *J Neurochem* 158:1083–1093. Available at: [10.1111/jnc.15481](https://doi.org/10.1111/jnc.15481).
- Farrar VS, Harris RM, Austin SH, Nava Ultreras BM, Booth AM, Angelier F, Lang AS, Feustel T, Lee C, Bond A, MacManes MD, Calisi RM (2022) Prolactin and prolactin receptor expression in the HPG axis and crop during parental care in both sexes of a biparental bird (*Columba livia*). *Gen Comp Endocrinol* 315:113940. Available at: [10.1016/j.ygcen.2021.113940](https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2021.113940).
- Fitzgerald P, Dinan TG (2008) Prolactin and dopamine: what is the connection? A review article. *J Psychopharmacol* 22:12–19. Available at: [10.1177/0269216307087148](https://doi.org/10.1177/0269216307087148).
- Fleming JM, Ginsburg E, McAndrew CW, Heger CD, Cheston L, Rodriguez-Canales J, Vonderhaar BK, Goldsmith P (2013) Characterization of $\Delta 7/11$, a functional prolactin-binding protein. *J Mol Endocrinol* 50:79–90. Available at: [10.1530/JME-12-0201](https://doi.org/10.1530/JME-12-0201).
- Flores-Soto E, Reyes-García J, Sommer B, Montaña LM (2013) Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ refilling is determined by L-type Ca²⁺ and store operated Ca²⁺ channels in guinea pig airway smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 721:21–28

Available at:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299913007243>.

Forsyth WR, Antosiewicz JM, Robertson AD (2002) Empirical relationships between protein structure and carboxyl pKa values in proteins. *Proteins* 48:388–403. Available at: 10.1002/prot.10174.

Freeman ME, Kanyicska LA, Lerant A, Nagy G, Freeman ME, Marc E (2000) Prolactin: Structure, Function, and Regulation of Secretion *MOLECULAR BIOLOGY. Am Physiological Soc* 80:1523–1631. Available at: 10.1152/physrev.2000.80.4.1523.

Frerking M, Nicoll R (2000) Synaptic kainate receptors. *Curr Opin Neurobiol* 10:342–351. Available at: 10.1016/s0959-4388(00)00094-5.

Fridmacher V, Kaltschmidt B, Goudeau B, Ndiaye D, Rossi FM, 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. Available at: 10.1523/JNEUROSCI.23-28-09403.2003.

Fujikawa DG, Shinmei SS, Cai B (2000) Kainic acid-induced seizures produce necrotic, not apoptotic, neurons with internucleosomal DNA cleavage: implications for programmed cell death mechanisms. *Neuroscience* 98:41–53 Available at:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306452200000853>.

Gallo V, Giovannini C, Levi G (1990) Modulation of non-N-methyl-D-aspartate receptors in cultured cerebellar granule cells. *J Neurochem* 54:1619–1625. Available at: 10.1111/j.1471-4159.1990.tb01213.x.

Gorvin CM (2015) The prolactin receptor: Diverse and emerging roles in pathophysiology. *J Clin Transl Endocrinol* 2:85–91. Available at: 10.1016/j.jcte.2015.05.001.

Grattan DR, Kokay IC (2008) Prolactin: A Pleiotropic Neuroendocrine Hormone. *J Neuroendocrinol* 20:752–763. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2008.01736.x>.

- Gross A, Katz SG (2017) Non-apoptotic functions of BCL-2 family proteins. *Cell Death Differ*. Available at: [10.1038/cdd.2017.22](https://doi.org/10.1038/cdd.2017.22).
- Guh Y-J, Lin C-H, Hwang P-P (2015) Osmoregulation in zebrafish: ion transport mechanisms and functional regulation. *EXCLI J* 14:627–659. Available at: [10.17179/excli2015-246](https://doi.org/10.17179/excli2015-246). eCollection 2015.
- Gustafson P, Kokay I, Sapsford T, Bunn S, Grattan D (2017) Prolactin regulation of the HPA axis is not mediated by a direct action upon CRH neurons: evidence from the rat and mouse. *Brain Struct Funct* 222:3191–3204. Available at: [10.1007/s00429-017-1395-1](https://doi.org/10.1007/s00429-017-1395-1).
- Hanada T (2020) Ionotropic Glutamate Receptors in Epilepsy: A Review Focusing on AMPA and NMDA Receptors. *Biomolecules* 10. Available at: [10.3390/biom10030464](https://doi.org/10.3390/biom10030464).
- Hangen E, Cordelières FP, Petersen JD, Choquet D, Coussen F (2018) Neuronal Activity and Intracellular Calcium Levels Regulate Intracellular Transport of Newly Synthesized AMPAR. *Cell Rep* 24:1001-1012.e3. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.06.095>.
- Hansen KB, Wollmuth LP, Bowie D, Furukawa H, Menniti FS, Sobolevsky AI, Swanson GT, Swanger SA, Greger IH, Nakagawa T (2021) Structure, function, and pharmacology of glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 73:298–487. Available at: [10.1124/pharmrev.120.000131](https://doi.org/10.1124/pharmrev.120.000131).
- Hara MR, Snyder SH (2007) Cell Signaling and Neuronal Death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47:117–141 Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105311>.
- Harigaya T, Sakai S, Kohmoto K, Shoda Y (1982) Influence of glucocorticoids on mammary prolactin receptors in pregnant mice after ovariectomy. *J Endocrinol* 94:149–155. Available at: [10.1677/joe.0.0940149](https://doi.org/10.1677/joe.0.0940149).
- Hattori N, Adachi T, Ishihara T, Shimatsu A (2012) The natural history of macroprolactinaemia. *Eur J Endocrinol* 166:625–629 Available at: <https://doi.org/10.1530/EJE-11-1007>.

- Hayes MT (2019) Parkinson's Disease and Parkinsonism. *Am J Med* 132:802–807.
- Horseman ND, Gregerson KA (2014) Prolactin actions. *J Mol Endocrinol* 52:R95–R106. Available at: <https://jme.bioscientifica.com/view/journals/jme/52/1/R95.xml>.
- Iida I, Konno K, Natsume R, Abe M, Watanabe M, Sakimura K, Terunuma M (2021) A comparative analysis of kainate receptor GluK2 and GluK5 knockout mice in a pure genetic background. *Behav Brain Res* 405:113194. Available at: [10.1016/j.bbr.2021.113194](https://doi.org/10.1016/j.bbr.2021.113194).
- Isaac JTR, Ashby MC, McBain CJ (2007) The Role of the GluR2 Subunit in AMPA Receptor Function and Synaptic Plasticity. *Neuron* 54:859–871 Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.06.001>.
- Jayakumar P, Martínez-Moreno CG, Lorenson MY, Walker AM, Morales T (2022) Prolactin Attenuates Neuroinflammation in LPS-Activated SIM-A9 Microglial Cells by Inhibiting NF-κB Pathways Via ERK1/2. *Cell Mol Neurobiol* 42:2171–2186. Available at: [10.1007/s10571-021-01087-2](https://doi.org/10.1007/s10571-021-01087-2).
- Korf J, Postema F (1984) Regional calcium accumulation and cation shifts in rat brain by kainate. *J Neurochem* 43:1052–1060. Available at: [10.1111/j.1471-4159.1984.tb12843.x](https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1984.tb12843.x).
- Kulms D, Schwarz T (2006) NF-kappaB and cytokines. *Vitam Horm* 74:283–300. Available at: [10.1016/S0083-6729\(06\)74011-0](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(06)74011-0).
- Larsen CM, Grattan DR (2012) Prolactin, neurogenesis, and maternal behaviors. *Brain Behav Immun* 26:201–209. Available at: [10.1016/j.bbi.2011.07.233](https://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.07.233).
- Laud K, Gourdou I, Belair L, Peyrat JP, Djiane J (2000) Characterization and modulation of a prolactin receptor mRNA isoform in normal and tumoral human breast tissues. *Int J cancer* 85:771–776. Available at: [10.1002/\(sici\)1097-0215\(20000315\)85:6<771::aid-ijc5>3.0.co;2-y](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0215(20000315)85:6<771::aid-ijc5>3.0.co;2-y).
- Lewerenz J, Maher P (2015) Chronic Glutamate Toxicity in Neurodegenerative Diseases-What is the Evidence? *Front Neurosci* 9:469 Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26733784>.

Libbey JE, Hanak TJ, Doty DJ, Wilcox KS, Fujinami RS (2016) NBQX, a highly selective competitive antagonist of AMPA and KA ionotropic glutamate receptors, increases seizures and mortality following picornavirus infection. *Exp Neurol* 280:89–96 Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27072529>.

LONDON ED, COYLE JT (1979) Specific Binding of [3 H]Kainic Acid to Receptor Sites in Rat Brain. *Mol Pharmacol* 15:492 LP – 505 Available at: <http://molpharm.aspetjournals.org/content/15/3/492.abstract>.

Lopez de Armentia M, Jancic D, Olivares R, Alarcon JM, Kandel ER, Barco A (2007) cAMP Response Element-Binding Protein-Mediated Gene Expression Increases the Intrinsic Excitability of CA1 Pyramidal Neurons. *J Neurosci* 27:13909 LP – 13918 Available at: <http://www.jneurosci.org/content/27/50/13909.abstract>.

Lu YM, Yin HZ, Chiang J, Weiss JH (1996) Ca²⁺-permeable AMPA/kainate and NMDA channels: high rate of Ca²⁺ influx underlies potent induction of injury. *J Neurosci* 16:5457–5465. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8757258>.

Macotela Y, Ruiz-Herrera X, Vázquez-Carrillo DI, Ramírez-Hernandez G, Martínez de la Escalera G, Clapp C (2022) The beneficial metabolic actions of prolactin. *Front Endocrinol (Lausanne)* 13:1001703. Available at: [10.3389/fendo.2022.1001703](https://doi.org/10.3389/fendo.2022.1001703). eCollection 2022.

Madden DR (2002) The structure and function of glutamate receptor ion channels. *Nat Rev Neurosci* 3:91–101. Available at: [10.1038/nrn725](https://doi.org/10.1038/nrn725).

Mahanty NK, Sah P (1998) Calcium-permeable AMPA receptors mediate long-term potentiation in interneurons in the amygdala. *Nature* 394:683–687 Available at: <https://doi.org/10.1038/29312>.

Marano RJ, Ben-Jonathan N (2014) Minireview: Extrapituitary prolactin: an update on the distribution, regulation, and functions. *Mol Endocrinol* 28:622–633. Available at: [10.1210/me.2013-1349](https://doi.org/10.1210/me.2013-1349). Epub 2014 Apr 2.

- Mark LP, Prost RW, Ulmer JL, Smith MM, Daniels DL, Strottmann JM, Brown WD, Hacein-Bey L (2001) Pictorial Review of Glutamate Excitotoxicity: Fundamental Concepts for Neuroimaging. *Am J Neuroradiol* 22:1813–1824 Available at: <http://www.ajnr.org/content/22/10/1813.short>.
- McDonnell TJ, Beham A, Sarkiss M, Andersen MM, Lo P (1996) Importance of the Bcl-2 family in cell death regulation. *Experientia* 52:1008–1017 Available at: <https://doi.org/10.1007/BF01920110>.
- Mehta A, Prabhakar M, Kumar P, Deshmukh R, Sharma PL (2013) Excitotoxicity: Bridge to various triggers in neurodegenerative disorders. *Eur J Pharmacol* 698:6–18 Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299912009004>.
- Molina-Salinas G, Rivero-Segura NA, Cabrera-Reyes EA, Rodríguez-Chávez V, Langley E, Cerbon M (2021) Decoding signaling pathways involved in prolactin-induced neuroprotection: A review. *Front Neuroendocrinol* 61:100913 Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091302221000157>.
- 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. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196978123001006>.
- Nakai M, Qin Z, Chen J, Wang Y, Chase TN (2000) Kainic Acid-Induced Apoptosis in Rat Striatum Is Associated with Nuclear Factor- κ B Activation. *J Neurochem* 74:647–658. Available at: [10.1046/j.1471-4159.2000.740647.x](https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.740647.x).
- Nedergaard M, Takano T, Hansen AJ (2002) Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. *Nat Rev Neurosci* 3:748–755 Available at: <https://doi.org/10.1038/nrn916>.
- Niswender CM, Conn PJ (2010) Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50 Available at: <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.011008.145533>.

- Núñez MT, Hidalgo C (2019) Noxious Iron-Calcium Connections in Neurodegeneration. *Front Neurosci* 13:48. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30809110>.
- Olney JW, Price MT, Samson L, Labruyere J (1986) The role of specific ions in glutamate neurotoxicity. *Neurosci Lett* 65:65–71. Available at: 10.1016/0304-3940(86)90121-7.
- Pardo GVE, Goularte JF, Hoefel AL, de Castro AL, Kucharski LC, da Rosa Araujo AS, Lucion AB (2016) Effects of sleep restriction during pregnancy on the mother and fetuses in rats. *Physiol Behav* 155:66–76 Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031938415301967>.
- Parsons MP, Raymond LA (2014) Extrasynaptic NMDA Receptor Involvement in Central Nervous System Disorders. *Neuron* 82:279–293. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.03.030>.
- Patil MJ, Henry MA, Akopian AN (2014) Prolactin receptor in regulation of neuronal excitability and channels. *Channels (Austin)* 8:193–202. Available at: 10.4161/chan.28946.
- Paupe V, Prudent J (2018) New insights into the role of mitochondrial calcium homeostasis in cell migration. *Biochem Biophys Res Commun* 500:75–86 Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X17308987>.
- Popiolek-Barczyk K, Mika J (2016) Targeting the Microglial Signaling Pathways: New Insights in the Modulation of. *Curr Med Chem* 23:2908–2928. Available at: 10.2174/0929867323666160607120124.
- Pressey JC, Woodin MA (2021) Kainate receptor regulation of synaptic inhibition in the hippocampus. *J Physiol* 599:485–492. Available at: 10.1113/JP279645.
- Prius-Mengual J, Pérez-Rodríguez M, Andrade-Talavera Y, Rodríguez-Moreno A (2019) NMDA Receptors Containing GluN2B/2C/2D Subunits Mediate an Increase in Glutamate Release at Hippocampal CA3-CA1 Synapses. *Mol Neurobiol* 56:1694–1706. Available at: 10.1007/s12035-018-1187-5.

- Reiner A, Levitz J (2018) Glutamatergic Signaling in the Central Nervous System: Ionotropic and Metabotropic Receptors in Concert. *Neuron* 98:1080–1098. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896627318304161>.
- Rivero-Segura NA, Coronado-Mares MI, Rincón-Heredia R, Pérez-Torres I, Montiel T, Pavón N, Cabrera-Reyes EA, Massieu L, Cerbón M (2019) Prolactin prevents mitochondrial dysfunction induced by glutamate excitotoxicity in hippocampal neurons. *Neurosci Lett* 701:58–64. Available at: [10.1016/j.neulet.2019.02.027](https://doi.org/10.1016/j.neulet.2019.02.027).
- Rivero-Segura NA, Flores-Soto E, García de la Cadena S, Coronado-Mares I, Gomez-Verjan JC, Ferreira DG, Cabrera-Reyes EA, Lopes L V, Massieu L, Cerbón M (2017) Prolactin-induced neuroprotection against glutamate excitotoxicity is mediated by the reduction of $[Ca^{2+}]_i$ overload and NF- κ B activation. *PLoS One* 12:e0176910. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176910>.
- Rodriguez-Chavez V, Moran J, Molina-Salinas G, Zepeda Ruiz WA, Rodriguez MC, Picazo O, Cerbon M (2021) Participation of Glutamatergic Ionotropic Receptors in Excitotoxicity: The Neuroprotective Role of Prolactin. *Neuroscience* 461:180–193. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030645222100107X>.
- Rodríguez-Moreno A, Sihra TS (2011) Metabotropic actions of kainate receptors in the control of glutamate release in the hippocampus. *Adv Exp Med Biol* 717:39–48. Available at: [10.1007/978-1-4419-9557-5_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9557-5_4).
- Rose CR, Felix L, Zeug A, Dietrich D, Reiner A, Henneberger C (2017) Astroglial Glutamate Signaling and Uptake in the Hippocampus. *Front Mol Neurosci* 10:451. Available at: [10.3389/fnmol.2017.00451](https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00451).
- Rueda CB, Llorente-Folch I, Traba J, Amigo I, Gonzalez-Sanchez P, Contreras L, Juaristi I, Martinez-Valero P, Pardo B, del Arco A, Satrustegui J (2016) Glutamate excitotoxicity and Ca^{2+} -regulation of respiration: Role of the Ca^{2+} activated mitochondrial transporters (CaMCs). *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* 1857:1158–1166. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2016.08.011>.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000527281630086X>.

Sakai S, Kohmoto K, Shoda Y (1985) Correlation between mammary prolactin receptors of lactating mice and litter weight. *J Dairy Sci* 68:2565–2570. Available at: [10.3168/jds.S0022-0302\(85\)81138-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(85)81138-3).

Sangeeta Devi Y, Halperin J (2014) Reproductive actions of prolactin mediated through short and long receptor isoforms. *Mol Cell Endocrinol* 382:400–410. Available at: [10.1016/j.mce.2013.09.016](https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.09.016).

Sanz-Clemente A, Nicoll RA, Roche KW (2013) Diversity in NMDA receptor composition: many regulators, many consequences. *Neurosci a Rev J bringing Neurobiol Neurol psychiatry* 19:62–75. Available at: [10.1177/1073858411435129](https://doi.org/10.1177/1073858411435129).

Sihra TS, Rodríguez-Moreno A (2013) Presynaptic kainate receptor-mediated bidirectional modulatory actions: mechanisms. *Neurochem Int* 62:982–987. Available at: [10.1016/j.neuint.2013.03.012](https://doi.org/10.1016/j.neuint.2013.03.012).

Silverman-Gavrila LB, Prayer M, Mykles DL, Charlton MP (2013) Calcium, calpain, and calcineurin in low-frequency depression of transmitter release. *J Neurosci* 33:1975–1990 Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23365236>.

Spampinato SF, Copani A, Nicoletti F, Sortino MA, Caraci F (2018) Metabotropic Glutamate Receptors in Glial Cells: A New Potential Target for Neuroprotection? *Front Mol Neurosci* 11:414. Available at: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnmol.2018.00414>.

Sprengel R (2006) Role of AMPA receptors in synaptic plasticity. *Cell Tissue Res* 326:447–455. Available at: [10.1007/s00441-006-0275-4](https://doi.org/10.1007/s00441-006-0275-4).

Stafstrom CE, Holmes GL, Thompson JL (1993) MK801 pretreatment reduces kainic acid-induced spontaneous seizures in prepubescent rats. *Epilepsy Res* 14:41–48. Available at: [10.1016/0920-1211\(93\)90073-g](https://doi.org/10.1016/0920-1211(93)90073-g).

Stafstrom CE, Tandon P, Hori A, Liu Z, Mikati MA, Holmes GL (1997) Acute effects of MK801 on kainic acid-induced seizures in neonatal rats. *Epilepsy Res* 26:335–344. Available at: [10.1016/s0920-1211\(96\)00904-7](https://doi.org/10.1016/s0920-1211(96)00904-7).

- Standley CA (1999) N-methyl-d-aspartate receptor binding is altered and seizure potential reduced in pregnant rats. *Brain Res* 844:10–19. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006899399017989>.
- Swanger SA, Chen W, Wells G, Burger PB, Tankovic A, Bhattacharya S, Strong KL, Hu C, Kusumoto H, Zhang J, Adams DR, Millichap JJ, Petrovski S, Traynelis SF, Yuan H (2016) Mechanistic Insight into NMDA Receptor Dysregulation by Rare Variants in the GluN2A and GluN2B Agonist Binding Domains. *Am J Hum Genet* 99:1261–1280. Available at: [10.1016/j.ajhg.2016.10.002](https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.10.002).
- Tejeda GS, Esteban-Ortega GM, San Antonio E, Vidaurre ÓG, Díaz-Guerra M (2019) Prevention of excitotoxicity-induced processing of BDNF receptor TrkB-FL leads to stroke neuroprotection. *EMBO Mol Med* 11:e9950–e9950 Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31273936>. Available at: [10.15252/emmm.201809950](https://doi.org/10.15252/emmm.201809950).
- Torner L (2016) Actions of Prolactin in the Brain: From Physiological Adaptations to Stress and Neurogenesis to Psychopathology. *Front Endocrinol (Lausanne)* 7:25. Available at: [10.3389/fendo.2016.00025](https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00025).
- Torner L, Karg S, Blume A, Kandasamy M, Kuhn H-G, Winkler J, Aigner L, Neumann ID (2009) Prolactin Prevents Chronic Stress-Induced Decrease of Adult Hippocampal Neurogenesis and Promotes Neuronal Fate. *J Neurosci* 29:1826–1833 Available at: <http://www.jneurosci.org/content/29/6/1826.abstract>.
- Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, Hansen KB, Yuan H, Myers SJ, Dingledine R (2010) Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev* 62:405–496. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20716669>.
- Triebel J, Robles JP, Zamora M, Clapp C, Bertsch T (2022) New horizons in specific hormone proteolysis. *Trends Endocrinol Metab* 33:371–377. Available at: [10.1016/j.tem.2022.03.004](https://doi.org/10.1016/j.tem.2022.03.004).
- 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. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0018506X07002115>.

Vergara-Castañeda E, Grattan DR, Pasantés-Morales H, Pérez-Domínguez M, Cabrera-Reyes EA, 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. Available at: [10.1016/j.brainres.2016.02.011](https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.02.011).

Vermani B, Mukherjee S, Kumar G, Patnaik R (2020) Prolactin attenuates global cerebral ischemic injury in rat model by conferring neuroprotection. *Brain Inj* 34:685–693. Available at: [10.1080/02699052.2020.1726466](https://doi.org/10.1080/02699052.2020.1726466).

Walker TL, Vukovic J, Koudijs MM, Blackmore DG, Mackay EW, Sykes AM, Overall RW, Hamlin AS, Bartlett PF (2012) Prolactin Stimulates Precursor Cells in the Adult Mouse Hippocampus Karl MO, ed. *PLoS One* 7:e44371 Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3433411/>.

Wang H, Peng R-Y (2016) Basic roles of key molecules connected with NMDAR signaling pathway on regulating learning and memory and synaptic plasticity. *Mil Med Res* 3:26. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5006437/>.

Wang Q, Yu S, Simonyi A, Sun GY, Sun AY (2005) Kainic acid-mediated excitotoxicity as a model for neurodegeneration. *Mol Neurobiol* 31:3–16. Available at: [10.1385/MN:31:1-3:003](https://doi.org/10.1385/MN:31:1-3:003).

Wilson AB, Whittington CM, Meyer A, Scobell SK, Gauthier M-E (2023) Prolactin and the evolution of male pregnancy. *Gen Comp Endocrinol* 334:114210. Available at: [10.1016/j.ygcen.2023.114210](https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2023.114210).

Wiltgen BJ, Royle GA, Gray EE, Abdipranoto A, Thangthaeng N, Jacobs N, Saab F, Tonegawa S, Heinemann SF, O'Dell TJ, Fanselow MS, Vissel B (2010) A role for calcium-permeable AMPA receptors in synaptic plasticity and learning. *PLoS One* 5. Available at: [10.1371/journal.pone.0012818](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012818).

Woodruff GN, Foster AC, Gill R, Kemp JA, Wong EH, Iversen LL (1987) The

interaction between MK-801 and receptors for N-methyl-D-aspartate: functional consequences. *Neuropharmacology* 26:903–909. Available at: [10.1016/0028-3908\(87\)90068-2](https://doi.org/10.1016/0028-3908(87)90068-2).

Xu H, Smith BN (2015) Presynaptic ionotropic glutamate receptors modulate GABA release in the mouse dorsal motor nucleus of the vagus. *Neuroscience* 308:95–105. Available at: [10.1016/j.neuroscience.2015.09.009](https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.09.009).

Zamani M, Hassanshahi J, Soleimani M, Zamani F (2013) Neuroprotective effect of olive oil in the hippocampus CA1 neurons following ischemia: Reperfusion in mice. *J Neurosci Rural Pract* 4:164–170 Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23914093>.

Zamora-Moratalla A, Martín ED (2020) Prolactin enhances hippocampal synaptic plasticity in female mice of reproductive age. *Hippocampus*. Available at: [10.1002/hipo.23288](https://doi.org/10.1002/hipo.23288).

Zheng X-Y, Zhang H-L, Luo Q, Zhu J (2011) Kainic acid-induced neurodegenerative model: potentials and limitations. *J Biomed Biotechnol* 2011:457079. Available at: [10.1002/hipo.23288](https://doi.org/10.1002/hipo.23288).

Zhou Y, Danbolt NC (2014) Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. *J Neural Transm* 121:799–817. Available at: [10.1007/s00702-014-1180-8](https://doi.org/10.1007/s00702-014-1180-8).