



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
Instituto de Neurobiología

**Neuroprotección del hipocampo de roedores macho: el efecto de la paternidad y del
tratamiento con prolactina.**

TESIS
Que para optar por el grado de
Doctora en Ciencias

Presenta:

M. en C. Ilektra Anagnostou

Directora de Tesis:

Dra. María Teresa Morales Guzmán, Instituto de Neurobiología, UNAM

Miembros del Comité Tutor:

Dra. María de la Luz Torner Aguilar, IMSS, Morelia

Dra. Limei Zhang Ji, Facultad de Medicina, UNAM

Instituto de Neurobiología.
UNAM, Juriquilla, Querétaro, México

20 de noviembre 2019



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.

RECONOCIMIENTOS

El presente proyecto de doctorado se realizó en el laboratorio de Neuroanatomía Funcional y Neuroendocrinología del Departamento de Neurobiología Celular y Molecular del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, en Juriquilla Querétaro, bajo la dirección de la Dra. María Teresa Morales Guzmán. La escritora de la tesis fue alumna del programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, de la UNAM.

Dicha investigación se realizó gracias al financiamiento otorgado por el programa UNAM-DGPA-PAPIIT (Número de Proyecto: IN204718 y IN202315) y el CONACYT (Número de Proyecto: 406166). La autora contó con beca otorgada por el CONACYT (CVU: 662561).

Contó con la guía constante del comité tutorial integrado por:

Dra. María Teresa Morales Guzmán

Dra. María de la Luz Torner Aguilar

Dra. Limei Zhang

Finalmente, agradecemos al apoyo técnico brindado por el personal de INB:

Biol. María Eugenia Ramos Aguilar

Dra. Alejandra Castilla León

M.V.Z. Martín García Servín

M. en C. Leonor Casanova Rico

Personal de apoyo del bioterio del INB

Lic. María de Lourdes P. Lara Ayala, Tec Académico, TC, Titular "A", responsable Unidad de Videoconferencia

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecerles profundamente a María Eugenia Ramos Aguilar, César David Solís García, Julio Daniel Reyes Mendoza, y Daniel Eduardo Muñoz Mayorga, por su apoyo, sugerencias y comentarios valiosos sobre mi proyecto de investigación, por nuestras pláticas largas, cuando divagábamos entre la ciencia y lo mundano, y por hacer mi vida diaria más alegre y definitivamente más interesante, sembrando, así, unos hermosos recuerdos de solidaridad y compañerismo en mi corazón.

ÍNDICE

Índice.....	4
Resumen.....	7
Abstract.....	9
CAPÍTULO I: Antecedentes.....	11
1. La hormona prolactina (PRL).....	11
1.1 La PRL y sus funciones principales.....	11
1.2 Los receptores a PRL.....	12
1.3 La vía de señalización JAK2/Stat5 y otras vías de señalización.....	12
1.4 La regulación de la síntesis y secreción de PRL.....	13
2. La conducta parental.....	15
2.1 Estímulos externos que participan en el desarrollo del cuidado parental.....	16
2.2 Estímulos internos que median el cambio de agresión a afiliación.....	16
2.3 Las estructuras cerebrales involucradas en la conducta parental.....	18
2.4 PRL y la conducta parental.....	21
2.5 Los topillos como modelo de paternidad natural.....	23
3. El hipocampo.....	24
3.1 Anatomía de la formación hipocampal.....	24
3.2 CA1 integra la información de las distintas vías de inervación en el hipocampo.....	26
3.3 Función electrofisiológica y plasticidad en el hipocampo.....	27
3.4 El hipocampo en la maternidad y paternidad.....	28
4. Excitotoxicidad.....	30
4.1 Excitotoxicidad por ácido kaínico (KA).....	31
5. PRL y neuroprotección.....	33
CAPÍTULO II: Planteamiento del problema.....	34
1. Preguntas de investigación.....	34
2. Hipótesis.....	34
3. Objetivos de investigación.....	34
4. La relevancia e impacto del proyecto propuesto en el área de estudio.....	35
CAPÍTULO III: Metodología.....	36
1. Animales y diseño experimental.....	36
2. Conducta parental.....	38

3. Inyección intracerebroventricular (i.c.v.).....	40
4. Administración de PRL.....	41
5. Histología.....	41
6. Fluoro-Jade C (FJC).....	42
7. Inmunohistoquímica en flotación.....	42
8. Tinción Nissl.....	42
9. Adquisición y análisis de imágenes.....	43
10. Western Blot.....	43
11. Análisis estadístico.....	44
CAPÍTULO IV: Resultados.....	45
1. El efecto de la paternidad en la neuroprotección del hipocampo.....	45
1.1 Los ratones C57BL/6J no expresan conducta parental.....	45
1.2 Los padres CD-1 expresaron cuidado paternal en la primera semana después del parto.....	46
1.3 La experiencia paternal disminuyó la neurodegeneración inducida por KA en las áreas CA3 y CA4 del hipocampo en ratones macho, independientemente de la expresión de cuidado parental.....	48
1.4 La sensibilización por exposición crónica a crías recién nacidas no disminuyó el efecto de KA en machos vírgenes.....	49
1.5 La experiencia de los padres cambió los niveles de las variantes de PRL y una vía de señalización intracelular relacionada con los PRLRs en el hipocampo de padres CD-1.....	51
1.6 Los padres topillos de la pradera expresan conducta parental pero no se protegen contra el daño excitotóxico.....	53
2. El tratamiento crónico con PRL protege el HP de ratones machos contra un daño excitotóxico.....	55
2.1 El tratamiento crónico de PRL tuvo un efecto neuroprotector en CA3 del hipocampo de ratones macho pero no en CA4.....	55
CAPÍTULO V: Discusión.....	58
1. La experiencia paternal protege el hipocampo de los machos CD-1 contra el daño excitotóxico.....	58
1.1 Los ratones C57BL/6J no muestran sensibilidad ante una lesión excitotóxica en el hipocampo, independientemente del grupo experimental.....	58
1.2 Los padres expresaron cuidado paternal la primera semana posparto.....	58
1.3 La interacción con las crías y la madre, pero no con la hembra embarazada,	

protegió el hipocampo contra la neurodegeneración inducida por KA en los padres CD-1...60

1.4 Los topillos de la pradera no se protegieron contra el daño causado por KA.....63

2. El tratamiento crónico con PRL protegió el hipocampo del ratón macho contra un daño
excitotóxico.....64

CAPÍTULO VI: Conclusiones.....67

Bibliografía.....69

Resumen

La experiencia parental impone neuroplasticidad en el hipocampo de ambas hembras y machos. En las ratas lactantes, el hipocampo está protegido contra el daño excitotóxico con ácido kaínico y este efecto está mediado por mecanismos relacionados con la prolactina (PRL). Tratamientos crónicos con PRL exógena tuvieron un efecto protector contra un daño excitotóxico en el hipocampo de la rata hembra virgen. Todavía se desconoce si la paternidad puede proporcionar tal protección a los roedores machos y si la PRL participa en este efecto.

Para evaluar el efecto de la paternidad contra lesiones excitotóxicas, cruzamos ratones macho con hembras, los cuales se alojaron en la misma caja hasta el día del parto (PPD0), cuando se asignaron aleatoriamente en dos grupos: (i) el grupo de embarazo (a los machos padres se les administraron 100 ng/1 μ L de ácido kaínico o vehículo el PPD1) y (ii) el grupo paternal (machos alojados con la hembra y las crías hasta el PPD8, cuando se les administró ácido kaínico i.c.v. después de la evaluación de la conducta paternal). En el grupo control se asignaron ratones macho adultos vírgenes alojados individualmente que se sometieron a lesión excitotóxica. Para evaluar si la PRL tiene efectos neuroprotectores en el hipocampo de los machos, como se ha visto en ratas hembras, ratones macho vírgenes se asignaron aleatoriamente en los siguientes grupos: (i) el grupo control (ratones macho alojados individualmente, sin ninguna manipulación hasta la administración i.c.v. de ácido kaínico o vehículo), (ii) el grupo tratado de manera crónica con salina (una inyección s.c. diaria de 100 μ l de solución salina por siete días consecutivos hasta el día de la inducción de la lesión excitotóxica), y (iii) el grupo tratado de manera crónica con PRL (una inyección diaria de 8 μ g de PRL/100 μ l de salina, hasta el día de la inducción de la lesión excitotóxica). Para ambos diseños experimentales se midieron marcadores de neurodegeneración (NeuN, Fluoro-Jade C) y astrogliosis (GFAP) en las áreas CA1, CA3 y CA4 del hipocampo dorsal.

El área CA1 no sufrió daño en ninguno de los grupos. El grupo paternal sufrió menor neurodegeneración y astrogliosis en las áreas CA3 y CA4 en comparación con sus respectivos controles, independientemente de la expresión de la conducta parental. Se realizó un análisis de los niveles proteicos para PRL, receptor de PRL y vías de señalización intracelulares relacionadas con los PRLRs. La PRL monomérica se disminuyó en el hipocampo de los padres en la primera semana posparto con un paralelo aumento de una isoforma dimerizada de 48 kDa en comparación con los controles vírgenes. La larga isoforma del receptor de PRL no cambió. Sin embargo, se notó un aumento en la pAkt, una molécula de señalización que participa en la supervivencia celular en el grupo paternal. Estos resultados indican que el hipocampo de los padres alojados con la madre y las crías son menos sensibles a las lesiones neurotóxicas que animales vírgenes.

En el caso de los experimentos con administración crónica de PRL, las mediciones anatómicas en el hipocampo arrojaron un efecto protector contra el daño excitotóxico en el área CA3 del hipocampo,

dónde el grupo experimental tratado con PRL tuvo menores niveles de muerte celular y menor neurodegeneración en comparación con los grupos control y control tratado con SAL. En el área CA4 los resultados no indican claramente algún efecto protector de la PRL, indicando que las acciones neuroprotectoras de la PRL no son globales en el hipocampo del ratón macho.

Abstract

Parental experience imposes neuroplasticity in the hippocampus of both females and males. In the lactating rat, the hippocampus is protected against excitotoxic damage with kainic acid and this effect is mediated by mechanisms related to prolactin (PRL). Chronic treatment with exogenous PRL had a protective effect against excitotoxic damage in the hippocampus of the virgin female rat. It is still unknown whether paternity can provide such protection to male rodents and if the PRL participates in this effect.

To assess the effect of paternity against excitotoxic lesions, we crossed male mice with females that shared the same box until the day of parturition (PPD0), when they were randomly assigned in two groups: (i) the pregnancy group (male fathers were given 100 ng/1 μ L of kainic acid or vehicle on PPD1) and (ii) the paternal group (males housed with the female and their pups until PPD8, when they were administered kainic acid i.c.v. after the evaluation of paternal behavior). In the control group, individually housed adult virgin male mice underwent excitotoxic lesion without further manipulation. To assess whether PRL had neuroprotective effects in the male hippocampus, as seen in female rats, adult virgin male mice were randomly assigned in the following groups: (i) the control group (individually housed male mice, without any manipulation until i.c.v. administration of kainic acid or vehicle), (ii) the group treated chronically with saline (a daily s.c. injection of 100 μ l of saline for seven consecutive days until the day of the excitotoxic lesion), and (iii) the group treated chronically with PRL (a daily injection of 8 μ g of PRL/100 μ l of saline, until the day of induction of the excitotoxic lesion). For both experimental designs, neurodegeneration markers (NeuN, Fluoro-Jade C) and astrogliosis (GFAP) were measured in the CA1, CA3 and CA4 areas of the dorsal hippocampus.

The CA1 area was not damaged in any of the groups. The paternal group suffered less neurodegeneration and astrogliosis in the CA3 and CA4 areas compared to their respective controls, regardless of the expression of the parental behavior. An analysis of the protein levels for PRL, PRL receptor and intracellular signaling pathways related to PRLRs was performed. Monomeric PRL was decreased in the hippocampus of the parents in the first postpartum week with a parallel increase in a dimerized isoform of 48 kDa compared to virgin controls. The long isoform of the PRL receptor did not change. However, an increase in pAkt, a signaling molecule that participates in cell survival, was noted in the paternal group. These results indicate that the hippocampus of male mice housed with the mother and their offspring is less sensitive to neurotoxic lesions than virgin animals.

In the case of experiments with chronic administration of PRL, anatomical measurements in the hippocampus showed a protective effect against excitotoxic damage in the CA3 area of the hippocampus, where the experimental group treated with PRL had lower levels of cell death and lower neurodegeneration in comparison with the control group and the group treated with SAL. In the CA4 area, the results do not clearly indicate any protective effect of PRL, proposing that the

neuroprotective actions of PRL are not global in the hippocampus of the male mouse. suffer from lower levels of neurodegeneration caused by excitotoxicity in the hippocampus. In addition, exogenously administered prolactin has neuroprotective action in the hippocampus of female rats, supporting the effect seen in lactating rats. The goal of this study is to verify the neuroprotective effect of this hormone in the male hippocampus as an exogenous treatment, and investigate the role of parental experience in the protection of the male brain. In the first part of the project, we describe that almost half of the CD-1 mice developed parental behavior towards their own pups. Mice with interaction with their offspring and the dam had lower levels of hippocampal neurodegeneration after excitotoxic damage compared to virgin males and males with sexual experience. This protection may be due to the activation of the Akt intracellular pathway, related to cell survival, since the parents had higher levels of said protein compared to the controls. Regarding the neuroprotective effect of prolactin, virgin CD-1 male mice were exogenously treated with prolactin for seven consecutive days and underwent intracerebroventricular treatment with kainic acid. The anatomical evaluation of the hippocampus yielded results that indicate a neuroprotective role for prolactin, preferentially located in the CA 3 area. The results of this project provide new insights into the understanding of the neuroprotective role of prolactin, as well as social neuroprotection, such as the one presented within the framework of paternal experience.

CAPÍTULO I: Antecedentes

1. La hormona prolactina (PRL)

1.1 La PRL y sus funciones principales

La prolactina (PRL) es una hormona peptídica compuesta por 199 aminoácidos y de masa molecular total de 23 kDa, que pertenece a la familia de la hormona de crecimiento (growth hormone - GH) y de lactógeno placentario (placental lactogen - PL) (Bole-Feysot et al., 1998). La PRL se produce en la hipófisis anterior y más específicamente en las células lactotropas que la sintetizan y liberan en el flujo sanguíneo, por donde alcanza los tejidos blanco en la periferia actuando de forma endócrina (Freeman et al, 2000). Sin embargo, la producción de PRL en sitios extrahipofisarios se ha comprobado en distintos tejidos: en diferentes regiones cerebrales, en el sistema reproductivo femenino (en la decida y el miometrio) y masculino (en la próstata), en el sistema inmune (en el timo, el bazo, los linfocitos circulantes, los linfocitos de la médula ósea), en la piel (los fibroblastos de la piel y las glándulas sudoríparas, las células epiteliales de la mama), y también en tumores. Además de estar presente en el suero sanguíneo, la PRL se halla en diferentes líquidos como el líquido cefalorraquídeo, el líquido amniótico, las lágrimas, la leche materna y el sudor. La PRL sintetizada en sitios periféricos puede actuar directamente sobre células adyacentes (acción paracrina) o sobre la misma célula que la produjo (acción autocrina) como factor de crecimiento, neurotransmisor, inmunomodulador, etc. (Bole-Feysot et al., 1998). Esta hormona regula numerosos procesos fisiológicos en el sistema nervioso, inmune y endocrino, entre otros, a través de su acción en los receptores de PRL (PRLR) (Monasterio, Vergara y Morales, 2014). Sin embargo, es mejor conocida por sus acciones durante la lactancia, cuando los niveles de PRL aumentan como respuesta al estímulo de la succión del pezón, de modo que promuevan la producción de leche en el seno materno (Monasterio, Vergara y Morales, 2014). Este proceso fisiológico está muy bien caracterizado y establecido. No obstante, la investigación sobre las funciones de PRL se ha ampliado en direcciones diferentes desde el descubrimiento de la dinámica de esta hormona y su papel multidimensional en numerosos procesos fisiológicos en los sistemas donde actúa (Freeman et al, 2000). Su participación en aspectos fisiológicos relacionados con la reproducción, la osmolaridad, el crecimiento y la sinergia con otras hormonas está bien documentada desde los años '60. Últimamente, se han añadido otros efectos de la PRL en esta lista, como el efecto en la conducta parental a través de su acción en varias regiones cerebrales, la inmunorregulación y la protección, la proliferación celular, e inclusive su papel en el crecimiento de tumores (Bole-Feysot et al., 1998).

Existen muchos variantes de la PRL con diferentes pesos moleculares. La PRL monomérica es de 23 kDa y es biológicamente activa. Sin embargo, existe una variante de la PRL entre 40 y 60 kDa (llamada "big prolactin") y otra de >100 kDa (llamada "big big prolactin"). Esas formas se consideran

inactivas. La PRL de >100 kDa se forma por la asociación de la PRL con IgG o IgA y la “big prolactin” puede ser producto de dimerización de la PRL o de la degradación de la “big big prolactin” (Lippi y Plebani, 2016). Los niveles de las variantes grandes de la PRL se encuentran más altos que lo normal en condiciones patológicas (p.ej. hiperprolactinemia, tumores hipofisarios y hipotireodismo) pero también en condiciones fisiológicas, como el embarazo y la lactancia (Lippi y Plebani, 2016).

1.2 Los receptores a PRL

La PRL ejerce sus efectos a través de los PRLRs, que son proteínas transmembranales que pertenecen a la superfamilia de receptores de citosina clase 1 (otros receptores de esta superfamilia son receptores para varias interleucinas, receptores a GH y a glucoproteína 130, entre otros). Se han encontrado distintas isoformas de este receptor en diferentes especies. Dependiendo del tamaño del dominio intracelular se dividen en tres grupos principales: el PRLR largo (long PRLR-l-PRLR), el PRLR intermedio (intermediate PRLR-i-PRLR) y el PRLR corto (short PRLR-s-PRLR). En el ratón se han encontrado solamente el l-PRLR y tres isoformas distintas para el s-PRLR; su diferencia principal es la secuencia de aminoácidos del extremo carboxilo. El sitio de unión 1 (binding site 1-BS1) de la PRL se une al dominio extracelular de un PRLR guiando a la formación de un complejo inactivo. Este complejo es prerrequisito para la interacción del sitio de unión 2 (binding site 2-BS2) con otro receptor, resultando a un complejo trimérico activo, compuesto por una hormona y un homodímero del receptor. Los PRLRs se expresan en varios tejidos en vertebrados desde la etapa embrionaria, indicando su importante papel en el crecimiento fetal, pero su nivel de expresión varía más adelante. En las hembras, el nivel de expresión de los receptores se relaciona con el ciclo estral, la gestación y la lactancia (Freeman et al, 2000).

1.3 La vía de señalización JAK2/Stat5 y otras vías de señalización

Una vez acoplada a sus receptores, la PRL induce la fosforilación de varias proteínas, incluso del propio receptor. Su vía de señalización canónica es la JAK2/Stat5, que se activa por todas las isoformas activas de los PRLRs. La activación de JAK2 (Janus cinasa 2) se realiza por la transfosforilación de tirosina, después de la unión del ligando al receptor, un proceso que aporta dos moléculas de JAK cercanas una a la otra. Una vez activada, la JAK2 fosforila residuos de tirosina en diferentes proteínas blanco, las más conocidas y principales son el mismo PRLR (salvo la isoforma corta del receptor) y la familia de proteínas Stat (signal transducer and activator of transcription), principalmente las Stat1, Stat3 y Stat5 (Bole-Feysot et al., 1998). Después de la fosforilación de Stat por la Jak2, la primera se disocia del receptor y se transloca al núcleo donde activa elementos específicos del ADN acoplándose en las secuencias activadas por interferona-gamma (INF γ). Las combinaciones de diferentes proteínas Stat, que forman hetero- o homo-dímeros, y la activación de otras señales transductoras dirigen la expresión de distintos genes (Ignacak et al, 2012).

Los PRLRs pueden activar otras vías de señalización, reclutando proteínas adaptadoras (p.ej. Shc/Grb2/SOS) que a su vez activan la cascada de proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK), vía relacionada con la proliferación celular. Otra vía de señalización intracelular que se activa por los PRLRs es la de Akt, importante para la supervivencia celular ante lesiones (Lai, Zhang y Wang, 2014). Asimismo, se ha documentado la activación de las vías c-src y Fyn en respuesta a PRL (Ignacak et al, 2012). En la Figura 1 se encuentra una representación esquemática de las vías de señalización intracelular relacionadas con los PRLRs.

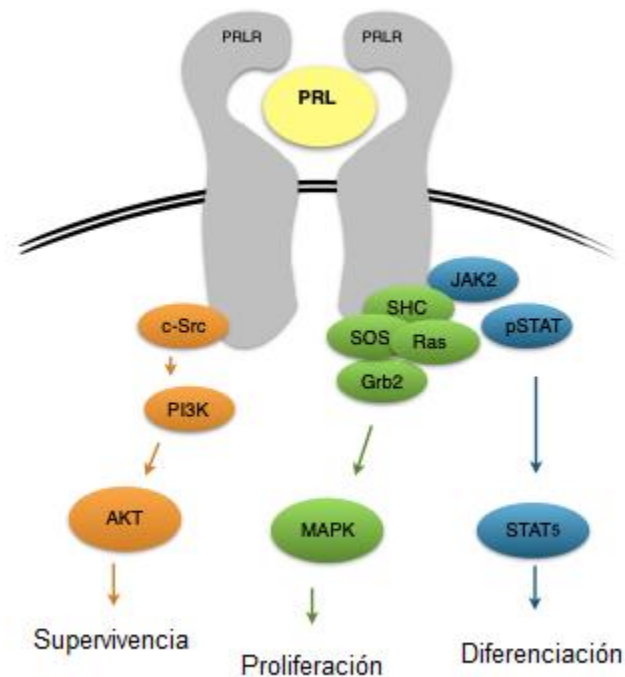


Figura 1: Las vías de señalización intracelular relacionadas con la activación de los PRLRs. La vía principal de los PRLRs es la JAK2/Stat5, que promueve la diferenciación celular. La vía MAPK promueve la proliferación y la Akt la supervivencia celular. Modificado de Binart et al., TIEM, 2010.

1.4 La regulación de la síntesis y secreción de PRL

Hay varios agentes que actúan como estimuladores o inhibidores de la producción de PRL por los lactotopos. Sin embargo, es la misma hormona la que regula su propia síntesis y secreción. La PRL se une a su receptor en neuronas dopaminérgicas tuberoinfundibulares del núcleo arcuato del hipotálamo (neuronas TIDA), causando una despolarización. La excitación de neuronas TIDA lleva a la producción y secreción de dopamina (DA) en la eminencia media, por donde llega a la hipófisis uniéndose a los receptores dopaminérgicos D₂ en las células lactotropas. La DA hiperpolariza las células resultando en la inhibición de la producción de PRL. Asimismo, la PRL se acopla a

autoreceptores en las células lactotropas inhibiendo tanto su síntesis a nivel transcripcional como también su secreción, y promoviendo la internalización de los PRLRs (Ferraris et al, 2013). Las moléculas principales que estimulan la producción de PRL son: la hormona liberadora de tirotrina (TRH), estradiol, progesterona, glucocorticoides, y testosterona. Las moléculas inhibitoras de la producción de la PRL (aparte de la DA) son: acetil-colina, ácido glutámico y prolactina (Freeman et al, 2000). En la Figura 2 se puede ver una representación esquemática de la regulación del ciclo de síntesis y secreción de la PRL.

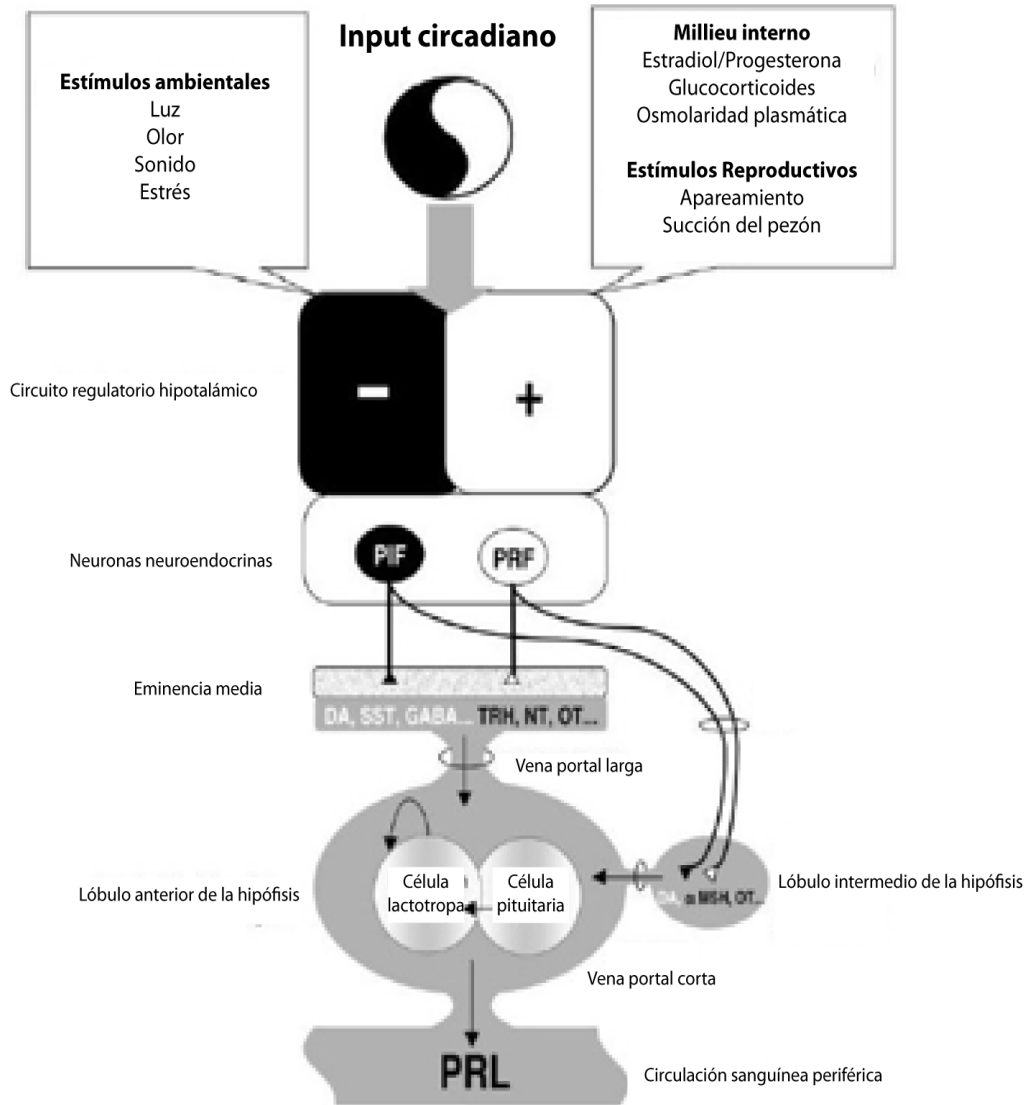


Figura 2: La regulación de la producción y secreción de PRL en la hipófisis anterior. Los estímulos del medio ambiente y también internos en conjunto con los ritmos circadianos regulan el hipotálamo, que a su vez regula la producción de moléculas estimuladoras o inhibitoras de la producción de PRL, incluyendo la misma PRL. PIF: factores de inhibición de la PRL; PRF: factores de liberación de PRL; DA: dopamina; SST: somatostatina; TRH: hormona liberadora de las tirotrinas; NT: neurotensina OT: oxitocina; MSH: hormona estimuladora de las melanotropinas. Imagen tomada y modificada de Freeman et al, 2000.

2. La conducta parental

El término “**conducta parental**” se refiere a la conducta de cuidado por parte de los progenitores hacia sus crías con el fin de aumentar la probabilidad de sobrevivencia del producto. Incluye conductas como la construcción del nido, acarreo de las crías hacia el nido, acicalamiento (grooming), mantenimiento de la temperatura de la camada, provisión de comida (en los mamíferos, conducta específica de la madre, ya que es la que lacta), vigilancia y mantenimiento de la seguridad de la camada, etc. (Lonstein y De Vries, 2000). La conducta maternal se refiere a la conducta parental por parte de la madre, y la paternal por parte del padre. La ocurrencia de la conducta maternal en el reino animal es amplia y se encuentra en varias especies, como, por ejemplo, en insectos, arácnidos, peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos (Dulac, O’Connell y Wu, 2014). Por otro lado, **la conducta paternal** (conducta parental por parte de los machos-padres hacia sus crías), aunque muy común en algunas especies como las aves, se encuentra solo en un 5-10% de los mamíferos, principalmente en roedores, primates y carnívoros. En esas especies el macho-padre participa en la crianza del producto tanto como la hembra (excepto la lactancia), y por eso dichas especies se definen como **especies biparentales** (donde ambos padre y madre cuidan de las crías). La participación puede ser indirecta (p.ej. asegurar los recursos alimenticios, la seguridad del territorio, la defensa de la camada), o directa a través del cuidado activo de las crías (p.ej. mantener el calor de la camada, acicalamiento o socializar y jugar con las crías). La conducta paternal conlleva cambios fisiológicos (niveles de hormonas, activación de vías neurales, etc.), aunque no son tan prominentes como los que ocurren en la hembra (Saltzman y Ziegler, 2014). A causa de la baja ocurrencia de paternidad en mamíferos, la mayoría de la investigación acerca del cuidado parental se ha enfocado en las hembras (revisiones indicativas sobre los cambios en el SNC de la hembra durante el embarazo y después del parto: Mann & Bridges, 2001; Leuner, Glasper & Gould, 2010; Pawluski, Lambert & Kinsley, 2016; Pereira & Ferreira, 2016). La gran diversidad natural de las estrategias parentales, ya sea en especies con distancia evolutiva, especies relacionadas filogenéticamente o incluso en poblaciones distintas que pertenecen a la misma especie, implica la existencia de vías neuronales conservadas que apoyan el desarrollo de la conducta parental (Dulac, O’Connell y Wu, 2014).

Mientras las costumbres sociales de nuestra especie van alterándose según las necesidades y las aspiraciones contemporáneas (p.ej. hoy en día la mujer-madre del mundo occidental es al mismo tiempo profesionalista), más hombres se involucran activamente en el cuidado y la crianza de los infantes, lo que hace necesario investigar la conducta paterna. Este tipo de estudios es útil para entender el papel del padre en la crianza de los niños, los cambios fisiológicos que dirigen la expresión de conductas de cuidado parental en los machos, los estímulos externos e internos que llevan a cabo ese cambio, la función específica de hormonas involucradas en este proceso y las estructuras cerebrales especializadas en el mantenimiento de esta conducta. .

2.1 Estímulos externos que participan en el desarrollo del cuidado parental

En lo general, el rechazo y la agresión dirigida hacia las crías se presenta entre mamíferos que no tienen experiencia reproductiva (hembras y machos), machos sexualmente activos y machos inexpertos con madurez sexual (sexually mature stranger males). No obstante, este rechazo y agresión es reemplazado por conductas de afiliación una vez que los animales tienen crías propias o se sensibilizan a crías propias o ajenas. Esto indica que los animales adultos pueden expresar cuidado o agresión dependiendo de su milieu hormonal/fisiológico interno y su medio ambiente. Esto ocurre debido a cambios funcionales que se presentan en las estructuras y las vías cerebrales que regulan dichas conductas (Dulac, O'Connell y Wu, 2014). Las adaptaciones dadas por la experiencia reproductiva están muy bien documentadas en los roedores hembras, y tales cambios regularmente se deben al entorno hormonal del embarazo en combinación con las pistas sensoriales emitidas por las crías después del parto. Sin embargo, se ha visto que ratones macho que conviven con la hembra durante el embarazo expresan conducta parental hacia sus crías (pero no a crías de otros progenitores) durante toda la lactancia hasta el destete. Se hipotetiza que este cambio se debe tanto al entorno hormonal del embarazo como a cambios transcripcionales y sinápticos en el cerebro del macho que se desencadenan después de la cópula (Dulac, O'Connell y Wu, 2014).

Se ha documentado que la estimulación sensorial es crucial para el desarrollo de la conducta parental en mamíferos. Más específicamente, señales olfativas, táctiles, auditivas y visuales por parte de las crías crean *sinérgicamente* una estimulación suficiente para guiar el cuidado parental en roedores hembras, con las primeras tres ocupando un lugar más importante que las señales visuales, ya que el sistema visual de los roedores no está tan desarrollado en comparación con los humanos. En cuanto a estímulos quimiosensoriales, la vía vomeronasal (VNO) y el sistema olfativo colaboran para facilitar el cuidado de las crías en animales parentales, a pesar de que en animales sin experiencia reproductiva esas señales guían a la agresión e infanticidio de las crías. Por otro lado, la estimulación auditiva causa neuroplasticidad en la corteza auditiva, probablemente para facilitar la representación de las vocalizaciones de las crías en el cerebro maternal. Tomando en cuenta que la actividad neuronal de la VNO después de exposición a las crías se ve disminuida en ratones padres en comparación con ratones vírgenes (Tachikaway, Yoshihara y Kuroda, 2013), y también que la ablación de la VNO resulta en la disminución de la agresión y el aumento del cuidado parental, se considera posible que haya un cambio dependiente del tiempo después de la cópula que provoque la disminución de la actividad de la VNO con el fin de favorecer el desarrollo del cuidado parental (Dulac, O'Connell y Wu, 2014).

2.2 Estímulos internos que median el cambio de agresión a afiliación

Desde los primeros años de la investigación acerca de la conducta parental se le ha dado un enfoque endocrinológico, ya que el entorno hormonal cambia radicalmente en las hembras

embarazadas y lactantes para apoyar la sobrevivencia de las crías a través del desarrollo de conductas adecuadas. En las hembras ya se sabe que varias hormonas regulan la conducta maternal (principalmente el estradiol, la progesterona y la prolactina) y la administración de esas hormonas en hembras vírgenes guía al cuidado de crías adoptivas (Dulac, O'Connell y Wu, 2014). Se han reportado cambios en los niveles de estradiol, progesterona, PRL y oxitocina, y también en la expresión de sus receptores durante la lactancia (revisado en Bridges, 2015). Por otra parte, los machos de especies biparentales también se ven afectados en cuanto a su entorno hormonal y se ha documentado una disminución en los niveles de testosterona (T) y corticosterona, mientras que hormonas como la progesterona (P4) y la PRL generalmente aumentan sus niveles y se correlacionan con la conducta paterna (Dulac, O'Connell y Wu, 2014).

Respecto a la PRL, se ha reportado un aumento en los niveles circulantes de esta hormona en machos padres de roedores biparentales que convivían con la hembra-madre y las crías, en comparación con machos vírgenes, machos con experiencia sexual y machos en convivencia con una hembra embarazada (Saltzman y Ziegler, 2014). En algunos primates macho no humanos, se demostró que los niveles de PRL circulante fluctúan elevándose durante el periodo de gestación y se elevan aún más después del parto, cuando los padres están directamente en interacción física con las crías (Saltzman y Ziegler, 2014). Este hallazgo se ha documentado también en hombres interactuando con sus hijos, en los que los niveles de PRL se encuentran significativamente más altos que en hombres sin hijos (Rilling y Young, 2014).

En contraste, la T tiene una relación negativa con la conducta parental en machos padres. En roedores y humanos padres se ha visto que los niveles de T varían durante el embarazo, pero en el período posparto bajan notablemente (Rilling y Young, 2014). En estudios de niveles circulantes de estrógenos (principalmente E) y P4, se ha visto que sus niveles y la expresión de algunos de sus receptores en centros cerebrales responsables de la conducta parental varía entre especies y por la etapa reproductiva de la hembra, así que todavía no hay resultados concluyentes y globales. Los niveles de glucocorticoides en machos en espera de ser padres se encuentran elevados en el periodo medio de la gestación pero después del parto bajan a niveles fisiológicos (Saltzman y Ziegler, 2014).

En cuanto a los sistemas de neurotransmisión, la noradrenalina (NA) es crucial para el inicio y la formación de una memoria social-conductual estable, mientras el sistema serotoninérgico participa en el desarrollo del cuidado parental involucrando el área preóptica media (MPOA) y el núcleo del lecho de la estría terminal (BNST) (véase: 5.3 Las estructuras cerebrales involucradas en la conducta parental) (Dulac, O'Connell y Wu, 2014). Entre los neuropéptidos más estudiados en la paternidad se incluyen la vasopresina (AVP) y la oxitocina (OT). Como en el caso de los estrógenos y la P4, en el caso de AVP tenemos resultados no concluyentes, debidos a las diferencias entre especies. Este neuropéptido se ha investigado principalmente en el modelo biparental de los topillos de la pradera y se ha visto que la densidad de los receptores a AVP V1a en el septo lateral (LS) y en el núcleo lateral

habenular está reducida en padres en comparación con machos en otra etapa reproductiva, ya sean vírgenes o durante el período de gestación. Por otro lado, se ha documentado un aumento en los niveles de mRNA de AVP en el núcleo paraventricular (PVN) y el núcleo supraóptico (SON) del hipotálamo en machos con experiencia paternal, a pesar de que en el ratón de California esos niveles en el PVN no difieren entre padres y no padres. Un perfil similar se presenta en el caso de OT, donde en algunas especies biparentales los cambios de los niveles o de la inmunoreactividad a la OT en núcleos cerebrales es irrelevante a la paternidad, mientras en otras especies, también biparentales, tiene relevancia fisiológica a la etapa reproductiva (Saltzman y Ziegler, 2014). En cuanto a las hembras, la OT se considera importante para la iniciación, pero no el mantenimiento, de la conducta parental, ya que ratones hembras deficientes de OT no son capaces de amamantar, a pesar de que en general la conducta maternal no sufre cambios significativos (Dulac, O'Connell y Wu, 2014). En conclusión, los cambios más universales y consistentes, ya que se pueden encontrar en varias especies, son los cambios en los niveles de PRL y de T, mientras los cambios de E, P4, AVP y OT parecen ser dependientes de las necesidades específicas de cada especie (Saltzman y Ziegler, 2014).

Aunque los machos no se someten al embarazo y la lactancia, se han notado fluctuaciones en el peso corporal de machos biparentales durante el embarazo de la hembra. Más específicamente, los machos de varias especies biparentales suben de peso el último periodo del embarazo, mientras que bajan de peso después del parto como respuesta al consumo de energía que se requiere para cuidar de las crías hasta que ellas son independientes de los padres para sobrevivir. Esos cambios en el peso corporal se relacionan con fluctuaciones en los niveles fisiológicos de varias hormonas, entre ellas la PRL, que se ha documentado que causa hiperfagia por acciones centrales y se considera orexigénica en las hembras gestantes también. Esos hallazgos sugieren que la paternidad es un proceso de costo energético dependiente del estado hormonal para el macho (Saltzman y Ziegler, 2014).

2.3 Las estructuras cerebrales involucradas en la conducta parental

Estudios hechos en animales han proveído información acerca de las estructuras cerebrales que se involucran en el cambio de la agresión hacia el cuidado; además, estudios en machos de especies biparentales o machos no parentales bajo protocolos de sensibilización a crías demuestran que muchas de las estructuras involucradas en el desarrollo de la conducta materna participan en la conducta paterna (Bales y Saltzman, 2016). Se ha demostrado que el área preóptica medial (MPOA) y el núcleo del lecho de la estría terminal ventral (vBNST) son cruciales para el desarrollo de la conducta materna (Dulac, O'Connell y Wu, 2014). El MPOA monitorea el curso del embarazo detectando la fluctuación en las concentraciones de hormonas esteroides y, posiblemente, es responsable del cambio de conducta aversiva a conducta de afiliación hacia las crías. El mecanismo

propuesto es que, al recibir la información de los niveles de hormonas, el MPOA reprime la actividad de la amígdala y aumenta la del sistema mesolímbico, para promover la atracción a los estímulos de las crías (Dulac, O'Connell y Wu, 2014). El MPOA se considera la estructura clave de la conducta materna, ya que lesiones en ésta causan la abolición del cuidado parental e infusiones de PRL, estrógenos, OT o dopamina en este núcleo hipotalámico de ratas hembras vírgenes estimula el desarrollo de cuidado parental (Rilling y Young, 2014). También, lesiones en el MPOA de roedores machos de especies biparentales causa déficits en varias conductas relacionadas con el cuidado parental y abolen el cuidado por sensibilización en especies no parentales (ratas), mientras que se ve un aumento significativo en cFos, que sugiere un aumento en la activación de esta estructura en roedores padres después de una interacción con la cría en comparación con la interacción con un objeto (Bales y Saltzman, 2016). Además, el LS y el área preóptica participan en la regulación del cuidado parental en ambos sexos de especies biparentales y su estimulación puede resultar en conducta parental en animales vírgenes en diferentes especies. Por ello, se considera que los circuitos y los mecanismos neuroendocrinos involucrados en esos procesos son conservados y pueden activarse repetitivamente para obtener conductas sociales, entre ellas la conducta parental (Dulac, O'Connell y Wu, 2014).

Las estructuras del sistema dopaminérgico mesolímbico participan en el aprendizaje por refuerzo y específicamente el área tegmental ventral (VTA) participa en la conducta materna, ya que lesiones en esa área provocan interrupción del cuidado parental. Además, depleción de la dopamina (DA) del VTA causa déficits en el acarreo de las crías, indicando que el sistema dopaminérgico participa en la iniciación y el mantenimiento de la conducta materna a través de mecanismos de motivación (Dulac, O'Connell y Wu, 2014). La DA tiene un papel importante en la regulación de la motivación maternal, ya que la administración de este neurotransmisor en el MPOA sin otro estímulo hormonal o ambiental provoca el desarrollo del cuidado parental. El efecto de la DA en las conexiones entre MPOA y el sistema mesolímbico, y más específicamente el VTA, se considera todavía más importante. La estimulación del VTA por la activación del MPOA provoca la liberación de DA en el núcleo accumbens (NAcc), una estructura implicada en la motivación. El mecanismo propuesto indica que después del parto el MPOA activa el VTA directa o indirectamente (a través del núcleo paraventricular del hipotálamo), elevando de esa manera los niveles de DA en el NAcc, guiando así a la inhibición del núcleo pálido ventral (VP), que se involucra en la modulación del movimiento como respuesta a estímulos de refuerzo (Rilling y Young, 2014).

Por otro lado, la amígdala medial (MeA) forma parte del sistema antagonista a la conducta parental inhibiendo el cuidado de las crías. La MeA recibe inervación directa del bulbo olfativo accesorio para reprimir el cuidado parental e iniciar las respuestas de aversión en ratas hembras vírgenes. Asimismo, otras áreas involucradas en conducta de defensa y agresión inhiben la conducta materna, indicando que la aversión hacia las crías puede compartir el sustrato neurobiológico con las conductas

defensoras. Eso resultó en la hipótesis de que existen dos vías competitivas que median activamente las respuestas de cuidado maternal y la conducta de aversión hacia las crías. La vía del VNO parece facilitar el circuito de aversión y agresión, el cual se silencia al mismo tiempo que el circuito de la conducta parental se activa por los cambios hormonales y neuromodulatorios y por factores ambientales (Dulac, O'Connell y Wu, 2014). Investigación en machos de especies biparentales mostró la participación de la MeA en la conducta parental, aunque existen diferencias en la manera que se involucra en esos procesos según la especie (Bales y Saltzman, 2016).

En humanos la investigación sobre los efectos de la paternidad se enfoca principalmente en respuestas de actividad cerebral a estímulos de infantes. Estudios de fMRI demostraron que los padres y las madres expuestas a estímulos visuales (imágenes) de infantes tuvieron mayor activación en el sistema límbico (NAcc, VTA y corteza orbitofrontal-OFC), un efecto visto también en sujetos control (sin experiencia parental), sugiriendo que las características de la cara son estímulos motivacionales que no se someten al control hormonal, al contrario de lo que ocurre en otras especies de mamíferos. Además, el sistema mesolímbico participa en la identificación del llanto del infante y el nivel de activación del VTA en esos casos se relaciona con el estado motivacional de la madre, quiere decir, madres con depresión en comparación con madres sin alguna enfermedad mental presentan bajos niveles de activación del VTA. Aparte del sistema mesolímbico, se activan también estructuras como la corteza prefrontal (PFC) y la ínsula anterior; ésta última participa en procesos empáticos. Un patrón de activación similar se ha documentado en los padres expuestos al llanto de sus hijos. La PFC participa en el control de la respuesta emocional negativa al llanto para involucrar a la madre en una conducta parental sensitiva. Aunque el hipotálamo se considera como una estructura con papel maestro en la conducta parental en varias especies, en humanos existen pocas investigaciones que apoyen esta noción, y se necesitan más estudios para confirmar la participación del hipotálamo en respuestas parentales (Rilling y Young, 2014).

En la Figura 3 se pueden ver las estructuras principales que participan en los circuitos de afiliación o agresión y las conexiones entre sí.

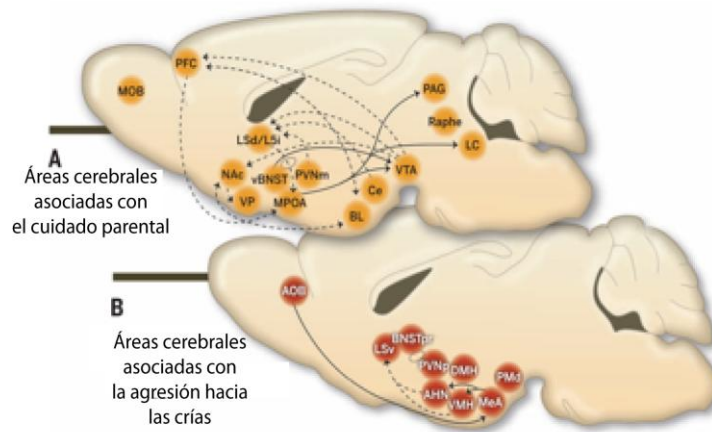


Figura 3: Estructuras involucradas en el cambio de conducta de agresión a conducta de afiliación hacia las crías. (A) El sistema cerebral involucrado en el cuidado parental comparte muchas estructuras, principalmente hipotalámicas, con el sistema de evitación y agresión hacia las crías (B). Las flechas de línea sólida representan conexiones ya conocidas entre estructuras de origen que regulan respuestas de las estructuras diana para llevar a cabo las distintas conductas. Las flechas de líneas discontinuas representan conexiones ya conocidas entre áreas cerebrales y que probablemente participen en la regulación de distintas partes de la conducta paterna vs la conducta agresiva hacia las crías. AHN: hipotálamo anteromedial; AOB: bulbo olfatorio accesorio; BL: amígdala basolateral; BNSTpr: núcleo del lecho de estría terminal, núcleo principal; vBNST: núcleo del lecho de estría terminal, ventral; Ce: amígdala central; DMH: núcleo dorsomedial del hipotálamo; LC: locus coeruleus, Lsd/Lsi: Septo lateral, parte dorsal/Septo lateral, parte intermedia; LSv: septo lateral ventral; MeA: amígdala medial; MOB: bulbo olfatorio medial; MPOA: área preóptica media; NAc: núcleo accumbens; PAG: materia gris periaqueductal; PFC: corteza prefrontal; PMd: núcleo premamilar, parte dorsal PVNm: núcleo paraventricular, parte magnocelular; PVNp: núcleo paraventricular, parte parvocelular; Raphe: núcleo de la raphe; VMH: hipotálamo ventromedial; VP: pálido ventral; VTA: área tagmental ventral. Adaptado de Dulac, O'Connell y Wu, 2014.

2.4 PRL y la conducta parental

Aparte de sus efectos en el cambio del estado fisiológico de distintos sistemas y tejidos durante el periodo de la gestación y de la lactancia, parece que la PRL en hembras participa también en la estimulación de conductas relacionadas con la maternidad. Se ha visto que la PRL en roedores aumenta el tamaño del MPOA del hipotálamo durante el embarazo (Rilling, 2013), cuya densidad en PRLRs es alta y se aumenta aún más durante la lactancia (Dobolyi et al, 2014). Asimismo, la administración de PRL directamente en el MPOA de ratas hembras vírgenes facilita la aceptación de crías adoptivas y elimina los ataques hacia ellas (Rilling y Young, 2014). La infusión de antagonistas para los PRLRs en el MPOA causó el retraso de conductas relacionadas a la maternidad en ratas vírgenes acondicionadas a crías adoptivas, un hallazgo adicional que fortalece el concepto de un papel importante de la PRL en la conducta materna. Es importante notar que ratas hembra heterocigotas para los PRLRs (PRLR^{+/-}) demuestran déficits en su conducta materna (en la prueba de acarreo y el tiempo de arqueamiento sobre la camada), aunque las ratas knockout para la PRL demuestran conductas parciales de cuidado parental posiblemente debido a la presencia de otras

hormonas con afinidad parcial a los PRLRs , como la PL y la GH (Dobolyi et al, 2014).

Al respecto, el ratón macho demuestra una conducta estereotipada hacia las crías: los machos vírgenes normalmente atacan las crías, mientras que los machos con experiencia sexual presentan cuidado parental (Wu et al, 2014). A pesar de esta regla general, hay que mencionar que existen diferencias entre cepas debido al fondo genético, la domesticación, la exposición a las hormonas gonadales en el periodo periparto, etc. (Lonstein y De Vries, 2000). Tanto en investigaciones donde se utilizaron roedores monógamos biparentales (Gettler, 2014; Saltzman y Ziegler, 2014) como en estudios con sujetos humanos (Gordon et al., 2010), se ha visto que los niveles de PRL en machos se aumentan al interactuar con el producto después del parto. Además, los cambios en los niveles de PRL están relacionados con la proliferación celular y la supervivencia celular del hipocampo y de los bulbos olfatorios en esos roedores. Esta participación de la PRL no se debe solamente a los olores de la hembra en gestación y lactancia, sino principalmente a la interacción del macho con las crías (Levy, Gheusi y Keller, 2011). En varias especies biparentales se ha demostrado un aumento en los niveles circulantes de PRL y en los niveles de PRLRs en el plexo coroideo, aunque manipulaciones farmacológicas de esta hormona no arrojaron resultados que mostraran el deterioro de la conducta parental (Bales y Saltzman, 2016). Recientemente, Mak y Weiss (2010) demostraron que la neurogénesis elevada en la zona subventricular (ZSV) y en el DG del hipocampo en ratones macho con experiencia parental fue mediada por la PRL y esas mismas neuronas participaron en el reconocimiento y la distinción de sus crías cuando ya eran adultos. Además, demostraron la expresión de conducta parental de parte de los ratones macho utilizando un protocolo de cohabitación de la hembra, el macho y las crías .

Los ratones hembra pueden emitir vocalizaciones ultrasonido de 38 kHz para involucrar al macho en el cuidado de las crías (Dulac, O'Connell y Wu, 2014), una conducta cuyo resultado depende de la cepa de ratones, de la cohabitación entre los dos padres durante el periodo del embarazo, de la presencia de la hembra o las crías, etc (Liang et al, 2014). La mayoría de los datos que proponen un papel principal de la PRL en la conducta paternal vienen de datos de investigaciones en aves, donde esta hormona es indispensable para la paternidad. En el caso de los ratones, los datos que se proporcionan por la bibliografía no son suficientes para apoyar la noción de que la PRL tiene un papel principal en la conducta paternal. Sin embargo, es una hormona que participa en aspectos del cuidado parental y por eso es de interés investigar la relevancia de la PRL en la conducta paternal en especies de mamíferos. La participación de la PRL en la conducta parental se ha estudiado principalmente en aves, de las cuales la mayoría de las especies son biparentales y los machos demuestran conducta parental espontáneamente. La PRL participa en todas las etapas del desarrollo parental y su acción se halla en distintas estructuras cerebrales. Por ejemplo, la PRL regula el compromiso parental y la temperatura de los huevos en incubación, o controla el periodo de estancia del padre en el nido en condiciones de escaseo alimenticio en los pingüinos Adélie (Thierry et al,

2013, Spée et al, 2010). La ventaja de los estudios en ratones es que este tipo de investigación se puede efectuar desde varios enfoques, por ejemplo, electrofisiología, neuroanatomía, biología molecular, conducta, etc., que al compararse con sujetos hembra nos dará información acerca de las diferencias y similitudes entre los dos sexos.

2.5 Los topillos como modelo de paternidad natural

El **topillo** (*Microtus ochrogaster*) es una especie de roedores que se encuentra en Norteamérica, principalmente en las praderas del centro de Estados Unidos, donde las fuentes de alimento y agua son escasas. Se propone que justo por ello este animal ha desarrollado una vida social, vive en grupos y emplea una estrategia de reproducción monógama, creando vínculos a largo plazo con su pareja: ambos viajan juntos, comparten el nido y el territorio destinado para la familia. Al parecer no cambian de pareja incluso en caso de fallecimiento de uno de los dos sin importar el sexo, y ambas partes desarrollan conductas relacionadas con cuidado parental hacia las crías (Young et al, 2011). En la naturaleza, los topillos se encuentran en madrigueras comunales o multigeneracionales. En cautiverio en laboratorios crecen y se reproducen sin problemas, comparten el nido, tienden a pasar mucho tiempo en contacto físico uno con el otro; las crías separadas de la familia expresan un nivel alto de aflicción (distress), y ambos sexos expresan conducta parental espontánea (Insel, Young y Wang, 1997). Como especie de laboratorio se ha usado principalmente en estudios de monogamia (sus diferentes etapas, su inicio, desarrollo y mantenimiento) y de sociabilidad, intentando a averiguar los distintos mecanismos moleculares de esas conductas. La mayoría de las investigaciones se han enfocado principalmente en dos agentes endógenos, la OT y la AVP, que aunque actúan de manera diferente en cada sexo parece que median las conductas relacionadas con la monogamia y la sociabilidad de los topillos. Más específicamente, se ha descrito una mayor cantidad de AVP (por medio de AVP-ir o medición de mRNA para la AVP) en células del BNST, del MeA y fibras positivas para AVP en el LS y el hipotálamo lateral (LH) en machos en comparación con hembras, y también esa inmunoreactividad parece depender de hormonas gonadales (Aragona y Wang, 2004). Datos similares se han documentado en el caso de la OT. Sin embargo, se desconoce completamente el efecto de la PRL en esos procesos, aunque en otras especies biparentales (p.ej. aves) ya se sabe que esta hormona media y puede explicar gran parte de las conductas parentales. De hecho, el único estudio publicado acerca de la PRL en topillos es el de Smale, Nelson y Zucker (1988) quienes estudiaron los niveles de PRL a lo largo del día en los topillos y encontraron que hay un incremento en los niveles de PRL en el plasma en animales hembras y machos que se expusieron a días largos (más horas de exposición a la luz) en comparación con los que se sometieron a un protocolo de días cortos. Sabiendo que la PRL puede participar en los procesos involucrados en la conducta parental normal, usamos esta especie para estudiar la paternidad natural, la neuroprotección mediada por la experiencia paternal y la participación de la PRL en este proceso.

3. El hipocampo

El **aprendizaje** es el proceso de adquisición de conocimiento, mientras que la **memoria** es el proceso de codificación, almacenamiento y más adelante recuperación de dicho conocimiento. El aprendizaje es crucial para la sobrevivencia de los seres vivos ya que nos permite adaptarnos al medio ambiente, a través de la adquisición información nueva y habilidades de varios tipos (p.ej. motores, lingüísticas, emocionales). El famoso caso clínico del paciente H.M. indicó la importancia del hipocampo en la codificación y la retención de información que llevan a cabo la formación de memorias, dando pauta para experimentar con animales de laboratorio, investigar la función de la formación hipocampal en su fisiología y patología. Los animales lesionados en diferentes áreas de esa estructura tuvieron déficits en la memoria anterógrada explícita (reconocimiento de objetos, memoria espacial, etc.) parecidos en calidad a los de H.M., lo cual mostró que el hipocampo es la estructura clave en procesos de adquisición de nuevos recuerdos explícitos (Kandel et al, 2000, 1227-1233).

3.1 Anatomía de la formación hipocampal

La formación hipocampal es una estructura subcortical que recorre el cerebro a lo largo extendiéndose en forma de C desde los núcleos del septo del prosencéfalo pasando por la parte dorsal del diencefalo hasta el lóbulo temporal caudoventricular (Figura 4) (Li y Pleasure, 2014). Se ha documentado un gradiente de expresión de proteínas y moléculas químicas de las neuronas a través del eje longitudinal del hipocampo, tanto como un gradiente de conexiones intracerebrales que guían a una distinción anatómica entre el hipocampo dorsal, intermedio y ventral y especialización funcional entre el hipocampo dorsal (codificación de memoria espacial y contextual) y ventral (memoria emocional y conducta relacionada a eventos estresantes) (Basu y Siegelbaum, 2015). La formación hipocampal comprende el hipocampo que se divide tradicionalmente en tres áreas (CA1, CA2 y CA3), el giro dentado (DG), el subículo (S), el presubículo (PrS) y el parasubículo (PaS), que juntos se agrupan bajo la nomenclatura de complejo subicular, y la corteza entorrinal (EC) (Li y Pleasure, 2014). La entrada de información al hipocampo es la EC que se conecta al DG a través de la vía perforante (vía unidireccional). Las células del DG proyectan al CA3 a través de la vía unidireccional de las fibras musgosas. Las células del CA3 inervan a las células piramidales del CA1 a través de la vía unidireccional de colaterales de Schaffer. De ahí la información pasa al S por donde se dirige al PrS/PaS, al EC o a regiones corticales. La corteza cerebral inerva la corteza perirrinal a través de la cual llega a la EC para enviar información al hipocampo. Sin embargo, hay conexiones bidireccionales entre las partes de la formación hipocampal (entre EC y CA1 y entre S y EC) y también conexión directa entre el EC y CA3 (unidireccional) (Figura 5) (Amaral y Witter, 1995, 450-460).

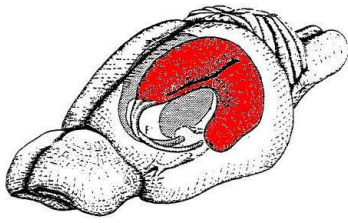


Figura 4: Representación gráfica del hipocampo (rojo y gris oscuro) en el cerebro de la rata. Se puede ver que el hipocampo comprende una región subcortical grande en tamaño que recorre el cerebro desde el prosencéfalo (hipocampo dorsal) hasta el mesencéfalo (hipocampo ventral).

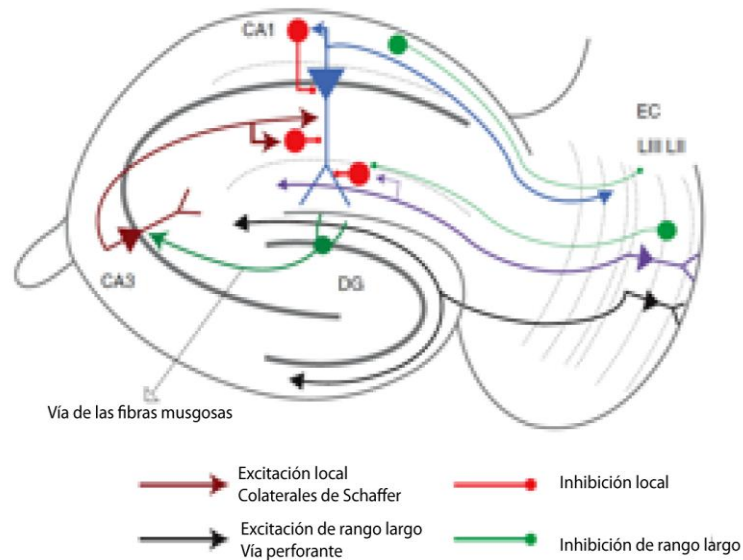


Figura 5: Representación de las conexiones excitatorias e inhibitorias de la EC a las distintas áreas del hipocampo dorsal (DG, CA1, CA3). Flecha café: excitación local de las colaterales de Schaffer; flecha negra: excitación de rango largo de la vía perforante; línea roja: inhibición local; línea verde: inhibición de rango largo. Imagen adaptada de Basu y Siegelbaum (2015).

El DG contiene tres capas organizacionales (Figura 6): la capa molecular (ML) y la capa granular (GL) que juntas forman una estructura de forma de U o V que envuelve a la capa polimórfica (PL o CA4). La ML consta principalmente de dendritas de células granulares, en canasta y polimórficas provenientes de la GL. La GL contiene principalmente células granulares cuyas arborizaciones dendríticas se extienden hacia la ML y células en canasta, la mayoría de las cuales son interneuronas GABAérgicas y principalmente se hallan en la parte subgranular de la GL. Por otro lado la PL contiene una gran variedad de tipos de neuronas aunque las más destacadas son las células musgosas y las células fusiformes. Sus dendritas conectan las células de la GL y sólo rara vez llegan hasta la ML. La GL inerva la PL por colaterales y también el área CA3 por la vía de fibras musgosas (Amaral y Witter, 1995, 451-454).

El área CA3 se divide en cuatro capas distintas (Figura 6): la capa piramidal que comprende todos los somas de las neuronas piramidales, la capa stratum radiatum que se halla en las áreas interiores

y más profundas de la capa piramidal donde se encuentran principalmente fibras (colaterales de Schaffer), la capa stratum lucidum ubicada entre el stratum radiatum y la capa piramidal donde se encuentran los terminales de las fibras musgosas que proceden del GD, y la capa stratum oriens exteriormente del stratum lucidum o la región suprapiramidal donde se encuentran las conexiones asociacionales de CA3 a CA3, las proyecciones comisurales al CA3 contralateral y las conexiones de las colaterales de Schaffer entre CA3 y CA1. Las áreas CA1 y CA2 consisten en esas mismas capas salvo el stratum lucidum (Figura 6), dado que carecen de invasión de fibras musgosas. Superficial al stratum radiatum se encuentra el stratum lacunosum-moleculare donde terminan los axones de la vía perforante (Amaral y Witter, 1995, 460-464).

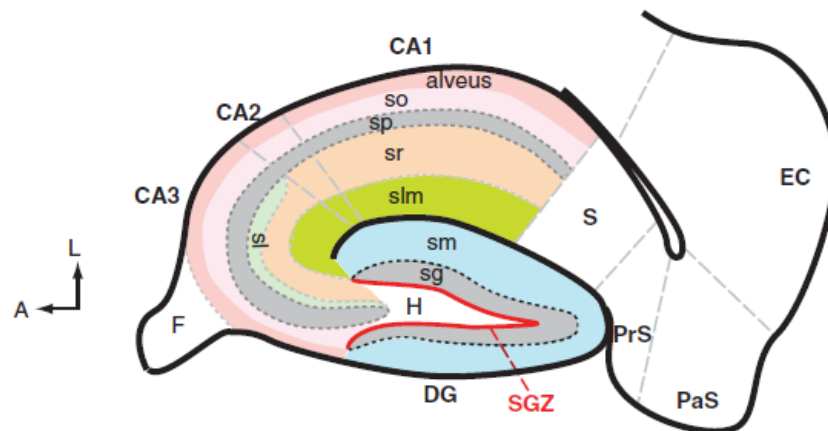


Figura 6: Representación de las distintas capas del hipocampo dorsal. EC: corteza entorrinal; PrS: presubiculo; PaS: parasubiculo; S: subículo; so: stratum oriens; sp: stratum pyramidale; sr: stratum radiatum; sl: stratum lucidum; slm: stratum lacunosum-moleculare; sm: stratum moleculare; sg: stratum granulosum; H: hilo de DG o CA4, DG: giro dentado, SGZ: zona subgranular. Adaptado de Li y Pleasure, 2014.

La capa piramidal de CA1, CA2 y CA3 consiste en somas de neuronas piramidales (la gran mayoría) y neuronas en canasta que extienden su arborización hasta el stratum lacunosum-moleculare. La mayoría de los somas encontrados en el stratum oriens, aunque pocas, son interneuronas y están considerados parte de circuitos locales (Amaral y Witter, 1995, 460). Las neuronas inhibitorias del hipocampo llegan a contar entre 10 y 20% del número total de las neuronas excitatorias. Una neurona excitatoria de CA1 recibe un promedio de casi 30000 conexiones glutamatérgicas y 1700 conexiones GABAérgicas en todas sus ramificaciones dendríticas (Basu y Siegelbaum, 2015).

3.2 CA1 integra la información de las distintas vías de invasión en el hipocampo

La CA1 se considera la principal área de salida de información hacia otras estructuras cerebrales y recibe invasión de varias regiones de la formación hipocampal. La EC envía la información directamente a la CA1 a través de la vía temporoammónica (excitación de baja eficacia).

Específicamente, la información sensorial no espacial proviene de la LEC (corteza entorinal lateral) y la información espacial de la MEC (corteza entorinal media). Las células de las capas II y III de la EC se llaman células de red (grid cells), cuyos patrones de disparo se activan en una matriz hexagonal que representa el espacio bidimensional. Un disparo diferencial entre poblaciones de neuronas de red crea una interferencia que se traduce como información precisa en una neurona de lugar (place cell) en la CA1 del hipocampo. No obstante, la entrada de información de la EC a la CA1 puede realizarse a través de la vía perforante (excitación de alta eficacia), que es bien estudiada y caracterizada. La EC contacta al DG a través de la vía perforante, de ahí las células contactan a la CA3 a través de la vía de fibras musgosas para llegar al SR (stratum radiatum) de la CA1 usando la vía de colaterales de Schaffer (Figura 4). Por otro lado, las neuronas de CA2 proveen inervación directa a las neuronas de CA1, transfiriendo información de la inervación directa de la EC a sus dendritas distales (inervación de alta eficacia) e indirectamente, a través de la vía de colaterales de Schaffer, a sus dendritas proximales (inervación de baja eficacia) y por la inervación directa de la vía de fibras musgosas, aunque ésta última no tiene alto nivel de eficacia (Basu y Siegelbaum, 2015).

Como la CA1 recibe inervación directa de varias áreas/estructuras distintas de la formación hipocampal, se considera el área de integración de información, un proceso que se ha propuesto que se lleva a cabo comparando los distintos inputs. Varias teorías existen acerca del tipo de integración de información, algunas proponiendo que la comparación realizada por la CA1 es entre estímulos ya codificados y novedosos o comparación temporal debida al retraso de las señales recibidas por distintas rutas de inervación (inervación directa de la EC e inervación indirecta de CA3 y CA2) (Basu y Siegelbaum, 2015).

3.3 Función electrofisiológica y plasticidad en el hipocampo

El aprendizaje requiere la asociación de informaciones provenientes de distintas áreas cerebrales que actúen simultáneamente o cooperen mientras se procesan las experiencias sensoriales o durante el reprocesamiento de las representaciones internas, un procedimiento que se realiza a través de cambios plásticos en las conexiones sinápticas y las funciones celulares que permiten la formación de ensambles celulares interconectados (Basu y Siegelbaum, 2015).

La fuerza de las conexiones corticohipocampales depende de la plasticidad dependiente de la actividad neuronal, que se refiere a la regulación de la fuerza de una sinapsis modulada por distintos patrones de actividad durante largos períodos de tiempo. Esa plasticidad La plasticidad homosináptica fue descrita por Donald Hebb el 1949: "Cuando el axón de una célula A está lo suficientemente cerca de una célula B para poder excitarla y participa repetida y persistentemente en su disparo, ocurre algún proceso de cambio metabólico o de crecimiento en una o ambas células así que la eficiencia de A, como una de las células que dispara la B, se incrementa". Esta forma de plasticidad Hebbiana es la base de la potenciación a largo plazo (LTP), que se refiere a un aumento

de larga duración en la fuerza de la transmisión excitatoria en una sinapsis como respuesta a un estímulo grande (tétano). La LTP Hebbiana depende de la actividad de los NMDARs, los cuales en condiciones de potencial de reposo negativo están bloqueados por un ion de Mg^{2+} y requieren la despolarización de la membrana aparte de la presencia del neurotransmisor glutamato para poder activarse. El glutamato al unirse a los AMPARs causa la despolarización de la membrana, la cual provoca la expulsión del Mg^{2+} del poro del NMDAR y permite la entrada de Ca^{2+} al interior de la célula, activando de esa manera varias vías de señalización. (Kandel et al, 2000, 1254-1264).

Hay diferentes procesos plásticos que ocurren en el hipocampo, aparte de la LTP, y de los más estudiados son: la neurogénesis en la capa granular del DG y la sinaptogénesis. No obstante, hay otros procesos que también implican plasticidad en el cerebro, como el cambio en los niveles de receptores en cierta estructura (p.ej. aumento en la densidad de PRLRs en varios núcleos hipotalámicos durante la lactancia), o la producción de neuromoduladores y/o neurotransmisores, como respuesta a ciertos eventos (p.ej. baja en la producción de dopamina en el sistema mesolímbico en personas adictas a sustancias psicoactivas). Estos cambios ocurren como respuesta a estímulos externos (p.ej. aprendizaje) e internos (p.ej. acción de hormonas, insultos y trastornos).

Amplia literatura en los campos del aprendizaje, la memoria y la interacción social documenta la neuroplasticidad causada por la experiencia y las hormonas sexuales en roedores machos (revisiones indicativas: Frick et al, 2015; Hamson, Roes & Galea, 2016; Mahmoud, Wainwright & Galea, 2015). Sin embargo, pocos estudios se centran en interacciones paternas. La paternidad representa un entorno complejo y enriquecido por las señales externas proporcionadas por las crías y la madre. Se sabe que los ambientes enriquecidos afectan sustancialmente la función cerebral de varias maneras. En particular, los animales que se expusieron a ambientes enriquecidos antes de una lesión, son más resistentes al daño hipocampal, con un aumento concomitante en la tasa de neurogénesis y resiliencia a la muerte celular (Young et al, 1999).

3.4 El hipocampo en la maternidad y paternidad

El cerebro de la hembra se somete a cambios funcionales y estructurales por la experiencia reproductiva, los estímulos sensoriales de las crías, el cambio del entorno hormonal, etc., resultando en modificaciones de varias conductas con el fin de apoyar la sobrevivencia de las crías. Los cambios más robustos y estudiados se han documentado en regiones del hipotálamo y del sistema límbico, ya que la mayoría de los núcleos y las estructuras que llevan a cabo la expresión, el desarrollo y el mantenimiento de la conducta materna se hallan en esos sistemas. Sin embargo, el hipocampo se ha estudiado también en esa condición de neuroplasticidad fisiológica, porque es una estructura clave que participa en funciones y conductas de planeamiento y estrategias de proveer recursos metabólicos a las crías (Kinsley y Amory-Meyer, 2011).

Estudios con animales de laboratorio han demostrado un aumento en la expresión de IGF (insulin-

like growth factor) en el HP de lactantes en comparación con hembras vírgenes o nulíparas. Se ha visto que la IGF participa en varios procesos mnemónicos mejorando el desempeño de los animales en pruebas de memoria. Asimismo, se ha visto un aumento significativo en los niveles de sinucleína en el hipocampo de animales lactantes, una proteína implicada en patologías y cambios fisiológicos relacionados con la edad. Ese hallazgo se supone que refleja el alto nivel de reorganización y desarrollo que ocurre en el cerebro materno. El hipocampo de la rata lactante es resistente a daños excitotóxicos (Monasterio et al, 2014), probablemente por la acción directa de hormonas de la lactancia en el hipocampo, o/y por la disminución de la expresión de proteínas relacionadas a la neurodegeneración (p.ej. APP). Se ha demostrado que la actividad excitatoria en el hipocampo de las hembras lactantes, relacionada a la LTP, se aumenta, aunque no se sabe si esta modulación prosigue después del destete. También, se conoce un aumento en la expresión del gen de la calmodulina (CaM), una molécula involucrada en el establecimiento de la LTP en el hipocampo, que podría mediar el aumento de la transmisión excitatoria. Todos estos hallazgos apoyan los resultados obtenidos en pruebas conductuales de varios tipos de memoria, que demuestran una mejora en la memoria espacial y olfativa, en el reconocimiento de objetos y en la memoria de planeación o prospectiva (prospective memory) que involucra procesos de anticipación de recursos en el futuro en un medio ambiente dado (Kinsley y Amory-Meyer, 2011).

El cuidado paternal, como no es tan común en el reino animal (véase: Conducta parental), no se ha estudiado tan extensivamente como el cuidado maternal y aún menos los cambios plásticos que ocurren en el hipocampo en función a este cambio conductual. Sin embargo, hay unos pocos estudios que demuestran que el hipocampo es una de las estructuras cerebrales que se modifica en machos con experiencia paternal durante el periodo posnatal. En un estudio en ratones monógamos de California que expresan cuidado paternal espontáneamente, se evaluó la activación del hipocampo mediante la expresión de c-fos en función a la memoria espacial relacionada con las habilidades de forraje en una prueba de *laberinto de tierra seca*, que se considera de importancia primordial durante el periodo posnatal. Los padres tuvieron significativamente menor latencia para acercarse al cebo (premio de comida) escondido en el laberinto seco comparada con los grupos control y una respuesta mucho más específica a lo largo de las pruebas (quiere decir, se acercaban específicamente al lugar donde estaba el cebo y, una vez aprendido el lugar, no probaban diferentes lugares). Además, expresaron significativamente mayor número de células positivas para c-fos, en comparación con los grupos control, en las áreas CA1, CA3 y DG del hipocampo, con mayor efecto en el área CA1 (Franssen et al, 2011). En otro estudio usando la misma especie, los padres demostraron menor nivel de ansiedad en una prueba del laberinto en T en comparación con los controles, y este efecto se acompañó de un aumento en el número de espinas dendríticas de la capa granular del DG y de las dendritas basales del CA1 (Glasper et al, 2016). Hyer et al (2016) evaluaron la ansiedad en ratones de California en función a la neurogénesis, se confirmó que la ansiedad de los sujetos con

experiencia paternal es de más bajo nivel comparada a sus controles, aunque los niveles de neurogénesis no cambiaron durante los primeros 16 días posparto. Sin embargo, la supervivencia de esas nuevas células se mantuvo a lo largo del periodo experimental mientras los sujetos controles sufrieron una pérdida significativa en esas nuevas células. Además, en el DG de los padres hubo un aumento significativo en el número de células positivas para BrdU (marcador de proliferación celular) colocalizadas con el marcador neuronal TuJ-1 en comparación con el grupo control, demostrando que la paternidad puede afectar la neurogénesis, la supervivencia y la diferenciación celular en el hipocampo (Hyer et al, 2016). En contraste, otra investigación que evaluó la neurogénesis en el DG de la misma especie, encontró una reducción significativa en las células positivas para BrdU en dicha región en padres y parte de esas nuevas células fueron positivas para el marcador de neuronas NeuN, aunque el número de células que coexpresaban ambos marcadores no fue diferente entre los padres y los controles. Esta reducción en la tasa de neurogénesis no cambió la funcionalidad del hipocampo, al medirse en una prueba de reconocimiento de objetos (Glasper et al, 2011). En los topillos de la pradera, una de las especies monógamas más estudiadas en el caso de la paternidad, se documentó una reducción en las células positivas para BrdU en el DG de los padres en comparación con los controles (Lieberwirth et al, 2013). Sin embargo, hay que notar que el protocolo de administración de BrdU en este último estudio se llevó a cabo antes del apareamiento de los sujetos, indicando que la correlación entre neurogénesis y paternidad en este caso debería de tomarse con precaución.

4. Excitotoxicidad

El glutamato (Glu) es el principal neurotransmisor excitatorio del SNC que participa en la generación de la LTP (véase: 3.3 Función electrofisiológica y plasticidad en el hipocampo). Se acopla a tres distintas clases de receptores: los receptores AMPA, los NMDA (N-methyl-D-aspartate receptors) y los receptores a kainato (Bortolotto et al, 2005). Los AMPARs se forman por cuatro subunidades (GluR1-4); las subunidades más potentes son las GluR1, 3 y 4 (Lau y Tymianski, 2010). Existen cinco subunidades de los receptores a kainato: GluR5, GluR6, GluR7 (de baja afinidad), KA-1 y KA-2 (de alta afinidad) (Pinheiro y Mulle, 2006). Al activarse, tanto los AMPARs como los KARs despolarizan la membrana y permiten que se elimine el Mg^{2+} del canal de los NMDARs.

La **excitotoxicidad** por Glu es una condición en la cual el glutamato extracelular en exceso causa disfunciones y degeneración. Se ha visto que tal condición se puede generar con inyección de Glu u otros agentes que se acoplan a los receptores glutamatérgicos (NMDARs, AMPARs y KARs). Sin embargo, también se ha visto en estados patológicos del SNC, como insultos agudos (trauma cerebral, infartos etc) (Lau y Tymianski, 2010) o enfermedades crónicas neurodegenerativas (esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Parkinson, enfermedad de

Huntington, isquemia e infarto) (Miladinovic, Nashed y Singh, 2015). La presencia de excitotoxicidad en enfermedades del SNC indica la importancia de este evento celular en un amplio abanico de patologías. Se ha comprobado que en isquemia y lesiones traumáticas del cerebro, en varios modelos experimentales, se produce neurodegeneración y altos niveles de glutamato extracelular en diferentes regiones del cerebro, indicando la presencia de eventos excitotóxicos. La neurodegeneración en esos modelos se puede controlar con la administración de antagonistas a receptores de glutamato (Lau y Tymianski, 2010).

La excitotoxicidad por glutamato se produce por altos niveles de Ca^{2+} intracelular y causa disfunción mitocondrial aguda, la cual resulta en masiva pérdida de energía. Se demostró que el flujo del Ca^{2+} a través de los NMDARs determina la neurodegeneración y no la cantidad de Ca^{2+} en el entorno extracelular (Tymianski et al, 1993). Otras investigaciones han propuesto que el Ca^{2+} intracelular se secuestra por las mitocondrias, un hecho que puede guiar a acidosis metabólica (un exceso de ácidos que afecta de manera negativa los procesos metabólicos) y generación de especies reactivas de oxígeno por la disfunción mitocondrial. Aparte del daño mitocondrial, los altos niveles de Ca^{2+} pueden estimular la activación de la sintasa de ácido nítrico y de proteasas sensibles al Ca^{2+} . Una de las características de la excitotoxicidad es la producción de óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) que parece ser responsable de la neurodegeneración causada por excitotoxicidad, ya que en animales KO para la nNOS tratados con compuestos excitotóxicos no sufren de neurodegeneración. El NO tiene varios blancos intracelulares que llevan a cabo la fragmentación del DNA y la muerte celular. Otra consecuencia de la excitotoxicidad es el aumento en la cantidad de especies reactivas de oxígeno en las mitocondrias por un exceso de Ca^{2+} , provocando el deterioro de los mitocondrias. Además se pueden acoplar a otros radicales en el citoplasma produciendo potentes oxidantes (Lau y Tymianski, 2010). La muerte celular en estas condiciones involucra varias vías de señalización que guían no solamente a necrosis, sino también a mecanismos apoptóticos y a autofagia (Wang y Qin, 2010).

4.1 Excitotoxicidad por ácido kaínico (KA)

El ácido kaínico (KA) se aisló de una alga marina en 1953 y en los años 70 se comprobó su efecto en el sistema nervioso central (CNS) de mamíferos después de investigaciones en especies de laboratorio (ratas), a través de las cuales se indicó la presencia de receptores especializados para esta sustancia. En los años 90 se clonaron las subunidades de los receptores a kainato y se caracterizó su afinidad al KA (Pinheiro y Mulle, 2006). El KA se ocupó para generar modelos experimentales de epilepsia del lóbulo temporal (temporal lobe epilepsy-TLE) desde antes de la caracterización de los receptores a kainato, ya que los efectos conductuales de la administración sistémica o central de KA simulan los del TLE, generando actividad epileptiforme en el CA3 del hipocampo, que es el área hipocámpal con mayor densidad a receptores a kainato, y llevando a cabo

la neurodegeneración en el hipocampo y el sistema límbico (Vincent y Mulle, 2009).

Los receptores a kainato son proteínas transmembranales que forman un poro, con un dominio terminal N extracelular, un dominio “p-loop” que se hunde en la membrana celular y uno terminal C intracelular. Son receptores permeables a cationes que se activan en muy bajas concentraciones de kainato. Las subunidades forman tetrámeros intramembranales y se someten a empalme alternativo (alternative splicing) (excepto las KA-1 y KA-2); ya se han descrito varias subunidades empalmadas, que difieren entre sí en el terminal intracelular C. La distribución y abundancia de los subtipos de los receptores a kainato en el cerebro varían según la región, y tanto la potencia del agente agonista como las propiedades rectificantes de la permeabilidad a Ca^{2+} dependen de la combinación de las subunidades (Pinheiro y Mulle, 2006).

Los receptores a kainato una vez activados causan la despolarización de la membrana de la neurona postsináptica o permiten la activación de receptores en la densidad postsináptica (NMDARs) que provoca la inducción de la corriente eléctrica al interior (inward) como se puede observar en neuronas piramidales del área CA3 del hipocampo, en concentraciones de kainato desde 100 nM (Pinheiro y Mulle, 2006), provocando los efectos de excitotoxicidad en los procesos celulares y moleculares de la célula (véase: 3. Excitotoxicidad). Recientemente, se documentó la inducción de LTP en CA1 por activación de los KARs postsinápticos, de manera independiente de la activación de los NMDARs. Este efecto se dio por acciones metabotrópicas, que llevaron a cabo la activación de PKC y consiguientemente se observó un aumento en el Ca^{2+} intracelular. Éste facilitó el aumento del largo de los procesos y del tamaño de las cabezas de las espinas dendríticas, indicando que esta acción puede causar cambios plásticos en el hipocampo (Petrovic et al, 2017).

En el caso de la excitotoxicidad por KA, se ha documentado que se afectan directamente las neuronas, con un aumento en el estrés en y la fragmentación de la membrana del retículo endoplásmico, la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS respectivamente), la acumulación de Ca^{2+} intracelular, que constituyen el perfil de estrés oxidativo que lleva a la disfunción mitocondrial y la consiguiente fragmentación del ADN. El KA provoca la activación de los astrocitos y el fenotipo característico de la astrogliosis con niveles aumentados de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), promoviendo el estrés oxidativo y la producción de moléculas proinflamatorias y factores de crecimiento que van a actuar sobre la fase aguda de la inflamación. El KA causa la activación de la microglía, actuando directamente a sus receptores o indirectamente a través de los productos inflamatorios de los astrocitos. La microglía activada secreta agentes proinflamatorios, moléculas citotóxicas, quimioquinas, ROS y RNS, que contribuyen a la muerte neuronal y la inflamación del tejido cerebral (Zheng et al, 2011).

5. PRL y neuroprotección

La neuroprotección es la preservación relativa de la funcionalidad y estructura de las neuronas que ocurre por medio de agentes exógenos o mecanismos endógenos, para prevenir el daño cerebral por insultos vigentes o futuros (Casson et al, 2012). Varios compuestos naturales y artificiales se estudian por sus propiedades neuroprotectoras, entre éstos hormonas como la PRL.

Se ha demostrado previamente que la PRL tiene un impacto importante sobre el SNC donde puede actuar como un agente neuroprotector o mas aun como un mecanismo de reparación después de lesiones (Gregg, 2009; Mödersheim et al, 2007; Reyes-Mendoza y Morales, 2016). La mayoría de los estudios sobre neuroprotección han caracterizado el efecto de PRL en sujetos femeninos, ya sea vírgenes, o durante y después de la experiencia reproductiva, con el fin de determinar el efecto relativo de esta hormona, y asociar esta acción con la plasticidad del cerebro materno desde un punto de vista evolutivo. Como los niveles de PRL se aumentan naturalmente durante la gestación y la lactancia participando en diferentes aspectos de esos procesos dinámicos y plásticos (crecimiento de la glándula mamaria, osmorregulación del líquido amniótico, producción de la leche materna, promoción de conducta materna, etc) en los primeros modelos experimentales sobre su acción en neuroprotección se emplearon sujetos femeninos. La gestación es una condición que permite muchas modificaciones fisiológicas y promueve la plasticidad cerebral. Se ha comprobado la remielinización en modelos experimentales de esclerosis múltiple en ratas y ratones hembra embarazadas, y ese proceso se debe parcialmente a la PRL (Gregg, 2009). Cabrera et al (2013) demostraron que la activación de los astrocitos y la microglia en el hipocampo después de inducir excitotoxicidad por KA en ratas lactantes fue menor que en ratas vírgenes, alcanzando los niveles de la condición control (inyectadas con vehículo). El mismo grupo de investigación mostró que la PRL exógena puede disminuir la neurodegeneración causada por excitotoxicidad previniendo el daño visto en animales que no se trataron con PRL (Morales et al., 2014). Asimismo, el tratamiento con PRL disminuyó la muerte celular facilitando la supervivencia celular en el hipocampo después de daño causado por excitotoxicidad en ratas hembras vírgenes ovariectomizadas o intactas (Tejadilla et al., 2010). Todos esos resultados indican un papel neuroprotector de la PRL en el SNC, así que podría ser un objetivo farmacológico para muchas enfermedades o insultos externos. Aparte de eso, multitud de agonistas dopaminérgicos se usan en varias condiciones, como la enfermedad de Parkinson, afectando también los niveles de la PRL (Winkler et al, 2002), y posiblemente su acción neuroprotectora. Sin embargo, para su potencial uso terapéutico, se requiere determinar si los efectos protectores de la PRL son universales y conocer sus efectos en el SNC de sujetos del sexo masculino, donde al parecer podría tener una acción similar que en hembras, por lo menos en cuanto a la protección de neurogénesis (Torner et al., 2009) la proliferación celular y aspectos de la conducta parental (Mak, Weiss, 2010).

CAPÍTULO II: Planteamiento del problema

1. Preguntas de investigación

a) ¿Cómo se encuentran los niveles de PRL en el hipocampo de ratones macho con experiencia reproductiva o de ratones macho con experiencia parental y según la expresión de la conducta parental después de una lesión excitotóxica?

b) ¿La administración crónica de PRL exógena antes de una lesión excitotóxica ejercerá efecto neuroprotector en el hipocampo de ratones macho vírgenes?

c) ¿Cuáles vías de señalización intracelular están implicadas en procesos protectores en el hipocampo de ratones macho con experiencia parental y según la expresión de la conducta parental o a ratones vírgenes tratados con PRL exógena?

d) ¿Los niveles proteicos de las vías de señalización relacionadas con los PRLRs cambian en el hipocampo de ratones macho con experiencia paterna durante la primera semana posparto?

e) ¿Los efectos vistos en los experimentos de paternidad se deben a pistas sensoriales emitidas por parte de las crías?

f) ¿Qué pasa en el hipocampo de padres de una especie biparental sometidos a daño excitotóxico?

Mediante la realización de experimentos que contesten estas preguntas, podemos evaluar el efecto protector de la PRL exógena en machos vírgenes ante una lesión en el tejido cerebral, así como la influencia de la experiencia paterna en la neuroprotección del cerebro de machos.

2. Hipótesis

1) La experiencia paterna ejercerá un efecto neuroprotector en el hipocampo de ratones macho sometidos a excitotoxicidad por ácido kaínico.

2) La administración crónica de PRL exógena en ratones macho antes de provocar excitotoxicidad usando ácido kaínico, protegerá el hipocampo contra la neurodegeneración consiguiente.

3. Objetivos de investigación

a) Determinar la magnitud de la lesión en el hipocampo al provocar excitotoxicidad por medio de administración intracerebroventricular –i.c.v.- de KA en ratones macho con o sin experiencia paterna. Para este objetivo ocuparemos el modelo de ratones C57BL/6J y CD-1.

b) Determinar el efecto neuroprotector de la PRL administrada exógenamente en el hipocampo de ratones macho tratados con vehículo o KA (i.c.v.), midiendo la magnitud de la lesión en el hipocampo. Para este objetivo ocuparemos el modelo de ratones CD-1.

c) Determinar los niveles de PRL en el hipocampo de los ratones macho por medio de Western

Blot. Para este objetivo ocuparemos el modelo de ratones CD-1.

d) Determinar la participación de distintas vías de señalización intracelular, relacionadas con los PRLRs, en procesos neuroprotectores en el hipocampo de machos con experiencia paternal o de machos vírgenes tratados de manera crónica con PRL exógena, después de una lesión excitotóxica. Para este objetivo ocuparemos el modelo de ratones CD-1.

e) Determinar la participación de distintas de vías de señalización intracelular relacionadas con los PRLRs en ratones macho con experiencia paternal en la primera semana posparto. Para este objetivo ocuparemos el modelo de ratones CD-1.

f) Determinar si los efectos de la paternidad se deben a pistas sensoriales emitidas por parte de las crías. Para este objetivo ocuparemos el modelo de ratones CD-1.

g) Determinar si la posible neuroprotección ejercida por la paternidad en ratones puede ocurrir en un modelo de paternidad natural y si ésta se media por acciones de la PRL, usando el modelo de los topillos de la pradera.

4. La relevancia e impacto del proyecto propuesto en el área de estudio

Los experimentos realizados en este trabajo de tesis generaron conocimiento sobre los niveles de PRL en el SNC en ratones macho, y sobre el papel de la experiencia reproductiva en la posible resistencia del hipocampo del macho ante las lesiones por excitotoxicidad, como hemos documentado que ocurre en la hembra. Asimismo, se determinó que el tratamiento con PRL exógena sirvió como un mecanismo neuroprotector en machos vírgenes.

CAPÍTULO III: Metodología

1. Animales y Diseño Experimental

Se usaron ratones macho adultos de 2 meses de edad de las cepas C57BL/6J y CD-1. Al principio del proyecto se usaron ratones C57BL/6J, con base en el trabajo realizado por Mak y Weiss (2009), donde se demuestra que los PRLRs participan en aspectos de la conducta paternal. Los autores reportan un porcentaje de 100% de expresión de la conducta paternal. Sin embargo, en nuestros experimentos no obtuvimos más que 1/20 padres con conducta paternal, la cual, incluso, fue parcial. También, la administración de KA no produjo un daño estadísticamente significativo, por lo cual se decidió usar la cepa CD-1, que sí expresa conducta parental en porcentajes más altos que los C57BL/6J y también es sensible al KA. Estos hallazgos se discuten en la sección de discusión. En la Figura 7 se encuentra la representación esquemática del diseño experimental para todos los grupos.

Para los experimentos de paternidad los animales fueron divididos aleatoriamente en tres grupos: **a)** ratones macho alojados en la misma caja que la hembra desde el apareamiento, durante el embarazo y hasta un periodo de 48 horas después del parto (día posparto 2 –PPD2) para los C57BL/6J (N=3) y 7 días posparto (PPD7) para los CD-1 (N=9), tratados con KA el día PPD3 o PPD8 respectivamente, para estudiar el efecto de la interacción con las crías y la madre en la neuroprotección del hipocampo (grupo de experiencia parental –**P**); los ratones CD-1 del grupo P se dividieron en PR o PNR, según la expresión de la conducta paternal como esta se evaluó en la prueba de acarreo (véase sección “Conducta parental”), **b)** ratones macho alojados en la misma caja con la hembra desde el apareamiento, durante el embarazo e incluyendo el día de parto (hasta el día PPD0), tratados con KA el día PPD1 (N=3 para los C57BL/6J y N=9 para los CD-1), para estudiar el efecto de la exposición al embarazo como una condición externa que podría afectar la neuroprotección (grupo de experiencia del embarazo –**EMB**), y **c)** un grupo de controles (**C**), ratones macho vírgenes alojados individualmente tratados con KA o SAL (N=3 para los C57BL/6J y N=9 para los CD-1) (véase sección “Inyección intracerebroventricular”) (Figura 7A).

Para determinar si los niveles proteicos de las vías de señalización intracelular relacionadas a los PRLRs cambian en ratones macho con experiencia paternal durante la primera semana posparto, usamos ratones macho CD-1 que se cruzaron con hembras, se alojaron junto con la hembra durante todo el embarazo, el parto y hasta los días posparto: **a)** PPD1 (grupo P-PPD1, N=4), **b)** PPD4 (grupo P-PPD4, N=4), y **c)** PPD7 (grupo P-PPD7, N=4). No se evaluó la conducta paternal en ninguno de estos grupos). El razonamiento para elegir esos días posparto fue obtener mediciones en diferentes tiempos que fueran representativas para la primera semana posparto. El grupo control (C, N=4) fueron ratones macho de la cepa CD-1, vírgenes que no se sometieron a ninguna manipulación. Todos los animales se sacrificaron con decapitación rápida para obtener tejido fresco y sangre, entre las 10 am y las 12.00 pm (Figura 7B).

Para evaluar si la neuroprotección del hipocampo se debe a pistas sensoriales emitidas por las crías, un grupo independiente de ratones vírgenes machos de edad adulta (N=4) se expuso a tres crías recién nacidas (grupo **Sensibilización**). Las crías eran de edad del día posparto 1 a 8 -PPD1 a PPD8. Los ratones se alojaron individualmente y se expusieron a tres crías, que estaban dentro de una malla, durante dos horas por día, por siete días consecutivos, y una exposición continua de 24 h los días 7 a 8. Los ratones se eligieron aleatoriamente para cada macho y no eran siempre de la misma camada. Sin embargo, hay que notar que el día 1 de sensibilización se usaron crías de PPD1, el día 2 crías de PPD2 hasta el día 7-8 que se usaron crías de PPD7-8. El fin de este protocolo de sensibilización, era simular los estímulos emitidos por las crías durante la primera semana posparto, como en el caso de los ratones macho paternos del grupo P. Después de la última sesión, se evaluó la conducta parental con la prueba de acarreo. Los ratones se evaluaron como Retrievers (Rs si acarrearón las tres crías), Atacantes (si atacaron a las crías) o Non-Retrievers/Non-Attackers (NR/NA- si no desarrollaron ninguna de las dos conductas). Enseguida de la prueba de acarreo, el día de exposición 8, se sometieron al tratamiento i.c.v. y los ratones adultos se sacrificaron 48 h después de la cirugía (Figura 7C).

Para los experimentos de paternidad natural se utilizaron topillos de la especie *microtus ochrogaster*, adultos (entre 4 y 5 meses de edad), alojados en grupos de dos a tres animales por jaula (grupo C, N=3), o en pareja (un macho alojado con una hembra) durante todo el embarazo (grupos EMB y P) hasta el día de la cirugía para la inducción de excitotoxicidad (P1 y P8 para los grupos EMB y P respectivamente, N=3 por grupo). Se evaluó la conducta paterna en los topillos del grupo P, durante la fase de luz (entre las 10 am y las 2 pm), ya que estos animales son diurnos. Todos los animales fueron alojados en el Bioterio del INB-UNAM, sometidos a un ciclo de oscuridad-luz de 12 horas (luz de las 8 a.m. hasta las 8 p.m.), en temperatura y presión atmosférica estables y tuvieron acceso al alimento y al agua *ad libitum*. Los grupos experimentales corresponden a los de los experimentos con los ratones. Después de la cirugía los animales se alojaron individualmente (un topillo por jaula) por 48 h hasta el sacrificio (Figura 7A).

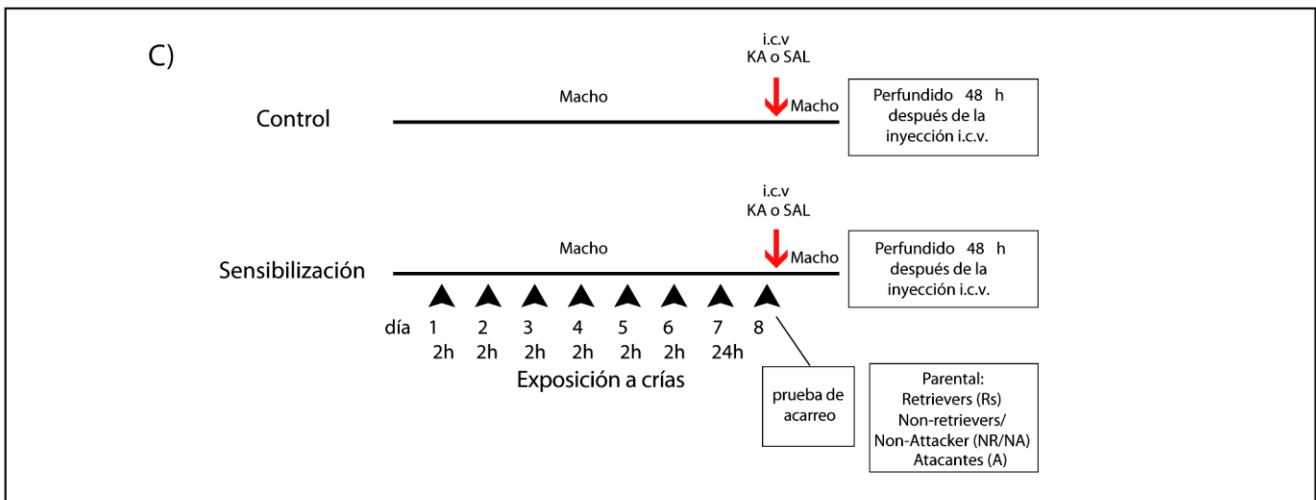
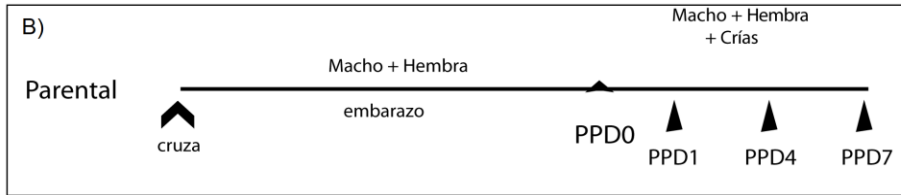
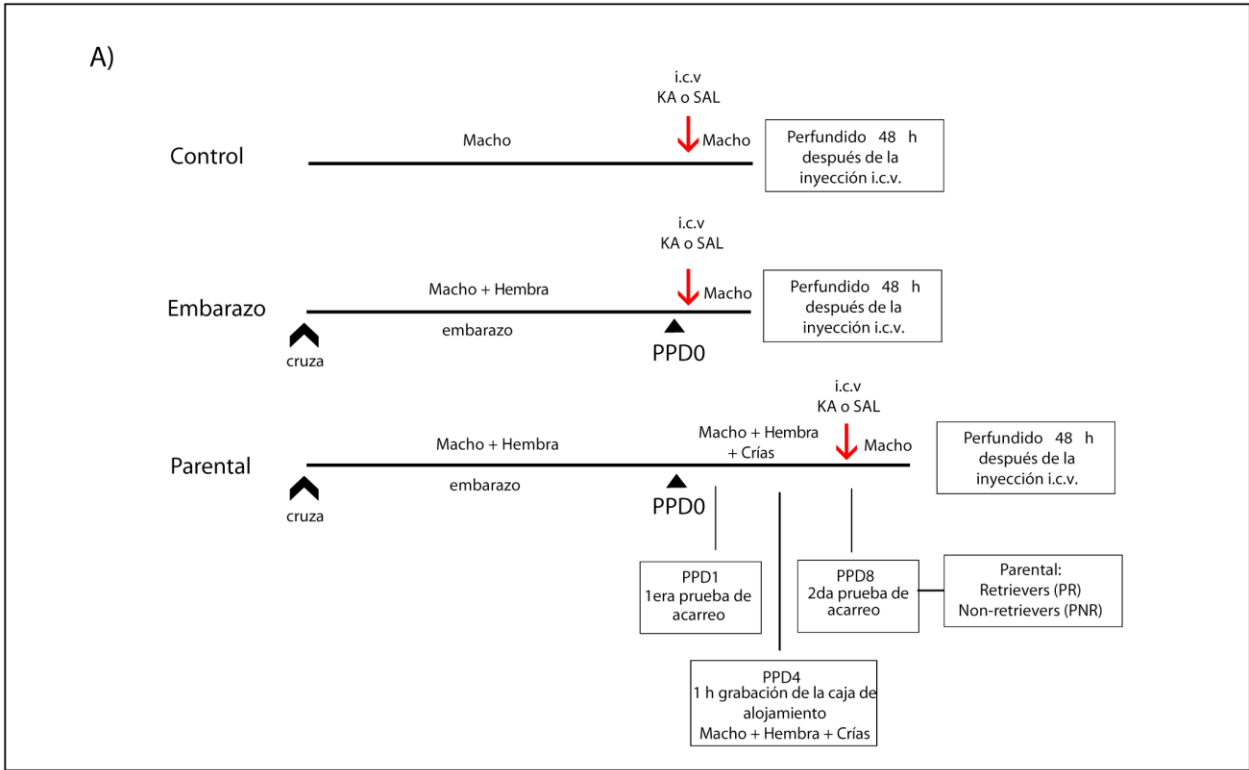
Para determinar los efectos neuroprotectores de la PRL (Figura 7D), ratones C57BL/6J (N=3) y CD-1 (N=5) se alojaron individualmente y se asignaron aleatoriamente a uno de los tres grupos siguientes: **a)** el grupo control (**C**), en el que los animales no recibieron ninguna manipulación por siete días, hasta el día de la lesión neurotóxica, **b)** el grupo tratado con solución salina (**CSAL**), en el que los animales fueron tratados con 100 µl de solución salina 0.9% (SAL) con una inyección s.c. durante siete días consecutivos antes de la lesión, y **c)** el grupo tratado con PRL (**CPRL**), en el que los animales se trataron con 100 µl de PRL (8 µg de PRL ovina (PRL_o)/100 µl SAL) durante siete días consecutivos antes de la lesión. La dosis se eligió con base en resultados sobre los efectos neurogénicos de PRL en el DG de ratones estresados (Torner et al, 2009).

Todos los animales fueron alojados en el Bioterio del INB-UNAM, sometidos a un ciclo de oscuridad-luz de 12 horas (luz de las 8 p.m. hasta las 8 a.m.), en temperatura y presión atmosférica estables y tuvieron acceso al alimento y al agua *ad libitum*. Todos los experimentos se realizaron en concordancia con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. El protocolo experimental fue aprobado por el Comité de Bioética del INB-UNAM (#049). Los cadáveres y los residuos biológicos se dispusieron según la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-1995. En la figura 7 se puede ver la representación esquemática del diseño experimental para todos los grupos.

2. Conducta parental

Para determinar la conducta parental se utilizó el protocolo de acarreo de crías descrito por Lonstein y Fleming (2002) con pocas modificaciones. Brevemente, en el día P3 y P8 para los C57BL/6 y los CD-1 respectivamente (antes de la cirugía y la administración de KA) la hembra y el macho se removieron de la caja de alojamiento y se alojaron juntos en una nueva caja por cinco minutos, cinco crías de la camada se apartaron en el lado opuesto al rincón del nido. Al final de los cinco minutos de espera el macho se movió a la caja de alojamiento, en el nido (punto de inicio), y de ahí tuvo la oportunidad de moverse libremente en la caja para acarrear las crías hasta el nido en un periodo máximo de 10 minutos. Las sesiones se grabaron en video y se anotó el número de crías acarreadas y la latencia al coleccionar la primera cría, así como la latencia de acarreo de las otras cuatro crías con respecto a la latencia de acarreo de la cría anterior. Conforme las normas de uso de animales de laboratorio, la prueba termina inmediatamente en caso que el macho ataque a las crías. Todas las pruebas se realizaron durante la fase de oscuridad entre las 08.00 a.m. y 12.00 p.m. en el cuarto oscuro de conducta de ratones del Bioterio del Instituto de Neurobiología.

Con el fin de determinar cómo los machos padres se comportaban interactuando con la camada y la hembra-madre y si desarrollaron otras conductas relacionadas con el cuidado parental, empleamos la grabación de una hora continua, donde los padres estaban en la caja de alojamiento junto con las crías y la madre el día PPD4. La caja de alojamiento se dividió en cuatro cuadrantes, con el cuadrante 1 siendo el cuadrante del nido, el cuadrante adyacente al ancho de la caja de alojamiento el cuadrante 2 (cuadrantes 1+2 se etiquetaron “cerca al nido”), el cuadrante al rincón contralateral al cuadrante 1 fue el cuadrante 3 y el adyacente a ese, el cuadrante 4 (cuadrantes 3+4 se etiquetaron “lejos del nido”). Se midió el tiempo que el macho pasó en cada uno de los cuadrantes. También se anotó la expresión de las siguientes conductas relacionadas con el cuidado parental: arqueamiento, acicalamiento corporal o anogenital, y acarreos cuando esos pasaron. Esos datos fueron observacionales y no cuantificados en términos de tiempo.



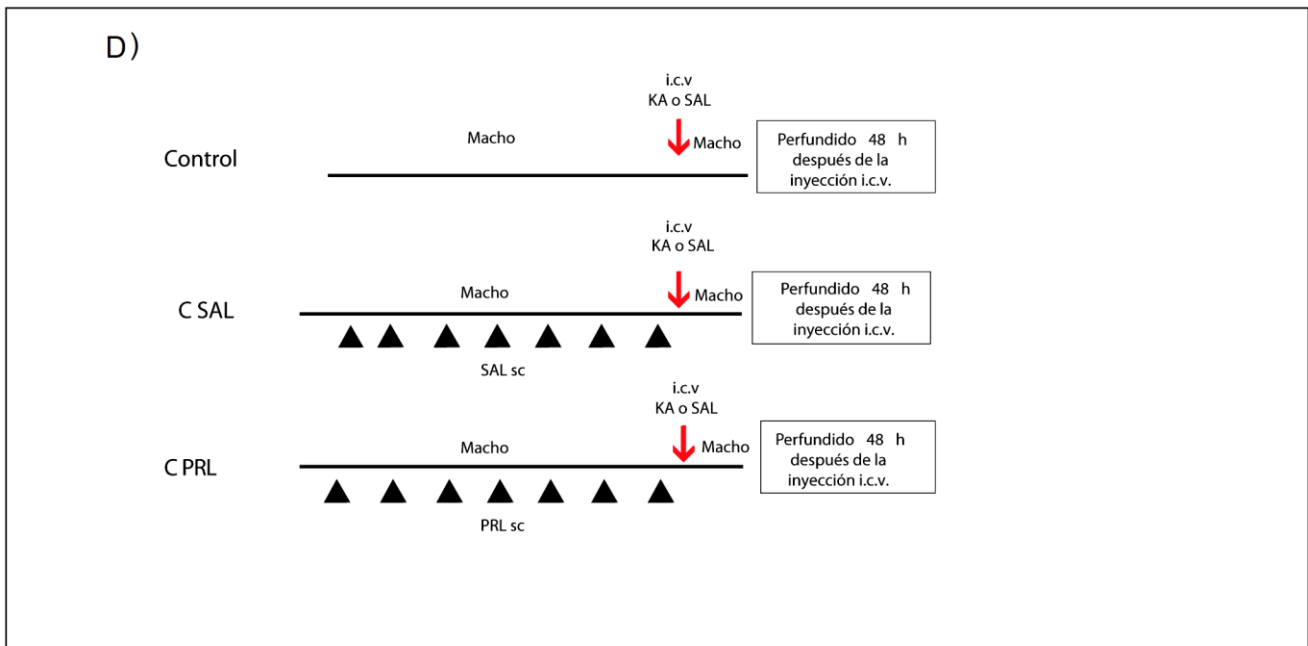


Figura 7: Cronograma de experimentos por grupo. A) Representación esquemática de los grupos experimentales con experiencia reproductiva y paternal. El protocolo de cohabitación se empleó como en la representación para los modelos de ratones CD-1 y los topillos de la pradera. En el caso de los ratones C57BL/6J la única modificación correspondiente es en el grupo paternal, donde los animales padres se alojaron junto con la hembra y la camada hasta el día posparto PPD3. B) Representación esquemática de los experimentos de medición de proteínas en el hipocampo de ratones machos CD-1 con experiencia paternal. Las flechas largas indican los días posparto cuando se sacrificaron los padres para la obtención de tejido fresco. C) Representación esquemática del diseño experimental de la sensibilización a crías recién nacidas en ratones vírgenes macho CD-1. D) Representación esquemática de los grupos experimentales tratados con PRL o SAL de manera crónica antes de la inducción de una lesión excitotóxica (ratones CD-1). P: Grupo con experiencia paternal; EMB: Grupo con experiencia de embarazo; C: Grupo control; C SAL: control tratado con SAL; C PRL: control tratado con PRL.

3. Inyección intracerebroventricular (i.c.v.)

Los ratones macho se sometieron a una cirugía para inyectar KA y así inducir excitotoxicidad. Los ratones se anestesiaron con un coctel de ketamina y xilazina (2:1). Se les administró el coctel de anestesia i.p. en la dosis de 80 mg/kg de peso. Una vez anestesiados, los animales se colocaron en un aparato esterotáxico estándar, y se les realizó una perforación al nivel del ventrículo cerebral lateral derecho usando las coordenadas: AP: -0.40, ML: -1.15 y DV: -2.00 para ratones (Paxinos y Franklin, 2001). Con una jeringa Hamilton de 10 μ l se administró manualmente 1 μ l de solución de KA (100 ng de KA/ 1 μ l de solución salina al 0.9% (SAL) estéril) o bien, 1 μ l de SAL para el grupo control. Después de la administración, la aguja permaneció por 1 minuto en el ventrículo y su extracción se realizó gradualmente durante un periodo de cinco minutos para evitar flujo del KA en otras regiones cerebrales o en el cráneo. Después, se empleó el antiséptico iodopovidona en gel sobre la herida (Betadine®), la piel del cráneo se suturó y los animales se alojaron en cajas individuales por dos días

(48 horas). Los ratones del grupo P se trataron con KA el día P3 (C57BL/6) o el día P8 (CD-1), los del grupo EMB el día P1 y los del grupo C el día D0 (Figura 7A).

Para los experimentos con los topillos seguimos los mismos procedimientos con pequeñas modificaciones: la anestesia usada fue un coctel de ketamina (50 mg/kg de peso) y xylazina (5 mg/kg de peso) administrada por vía i.p. Después de experimentos piloto comprobando el efecto de varias concentraciones de KA (50 ng/ μ l, 75 ng/ μ l y 100 ng/ μ l) encontramos que la única concentración que causa daño cuantificable en el hipocampo fue la de 100 ng/ μ l, y por ello elegimos aplicarla en nuestros experimentos. En la condición control inyectamos 1 μ l de SAL. Las coordenadas del ventrículo cerebral derecho para los topillos son AP: -0.60 mm, ML: -1.00 mm, DV: -3.00 mm (Bosch et al, 2009).

4. Administración de PRL

Para estudiar el papel de la PRL en la prevención del daño causado por excitotoxicidad, los ratones macho se sometieron a inyecciones s.c. de 100 μ l de PRL (concentración: 8 μ g de PRL ovina/100 μ l de SAL estéril) o 100 μ l de SAL por siete días consecutivos hasta el día de la administración i.c.v. de KA o SAL (figura 7B).

5. Histología

Los animales se sacrificaron el día asignado por el protocolo y según su grupo experimental, 48 horas después de la administración de KA. Primero se anestesiaron con una sobredosis del mismo coctel de ketamina y xylazina usado para la cirugía estereotáxica, y se sometieron a perfusión cardíaca primero con solución salina y luego con paraformaldehído (PFA) 4%. Los cerebros se disecaron y se guardaron en PFA 4% por tres horas a 4 °C y luego se colocaron en 10 ml de solución de sacarosa 30% diluida en KPBS (solución amortiguadora de fosfatos de potasio) a 4 °C por 48 horas. Luego, los cerebros se cortaron en rebanadas coronales de 30 μ m de espesor en la extensión rostro-caudal del hipocampo utilizando un micrótopo de congelación estándar. Todas las rebanadas de cada cerebro (aproximadamente 100 rebanadas por cerebro) se colectaron en placas multipozos, en una serie de cinco pozos distintos y se guardaron en solución anti-congelante (30% etilenglicol, 20% glicerol en 0.05 mol⁻¹ de PBS) a los -20 °C. Las rebanadas se procesaron para identificar y medir distintos marcadores celulares. Se usó la tinción de Nissl como referencia anatómica.

En la cuantificación se utilizaron rebanadas que correspondieron al rango -1.22 mm hasta -2.70 mm con referencia a bregma. Los grupos usados para Western Blot se anestesiaron y rápidamente se decapitaron con el fin de obtener tejido fresco del hipocampo. Las muestras de hipocampo se colectaron en tubos eppendorf de 0.6 ml y se guardaron a -70 °C hasta el día de la homogenización (véase sección “Western Blot”).

6. Fluoro-Jade C (FJC).

La muerte celular se analizó por la técnica de tinción con Fluoro-Jade C (FJC) (EMD-Millipore; AG325-30MG), que marca ruptura de la membrana celular. Brevemente, las rebanadas correspondientes al hipocampo dorsal se montaron en portaobjetos de vidrio recubiertos con gelatina y se dejaron secar durante 14 días a temperatura ambiente. Posteriormente, el tejido se hidrató en las siguientes soluciones: NaOH al 1% durante 5 min, EtOH al 70% durante 2 min y agua destilada (dH₂O) durante 3 min. Las muestras se fijaron en una solución de KMnO₄ al 0,06% durante 10 min en un agitador, se enjuagaron en dH₂O durante 2 min y luego se incubaron en la solución de FJC 0,002% en ácido acético al 0,1% durante 20 min en un agitador. El tejido se enjuagó tres veces en dH₂O durante 5 min cada vez. Los portaobjetos se secaron a 50°C durante 10 min y se recubrieron con DPX.

7. Inmunohistoquímica en flotación.

Las secciones correspondientes al hipocampo dorsal se lavaron seis veces en solución de KPBS 0.02 M durante 10 min cada lavado. A continuación, las rebanadas se incubaron en anticuerpo primario anti-NeuN (anti-NeuN policlonal 1:10,000 en KPBS 0,02 M con Tritón 1%; EMD Millipore; # ABN90) durante 1 h a temperatura ambiente y luego durante 48 horas a 4°C, para detectar la inmunorreactividad de los núcleos neuronales. Después de lavar las rebanadas con KPBS 10 veces durante 6 min, se incubaron en el anticuerpo secundario (IgG biotinilada anti-guinea pig, generado en cabra, 1: 600 en Tritón 1%/KPBS 0.02 M, Vector Laboratories Inc.; BA-7000) durante 1 h a temperatura ambiente. Las rebanadas se incubaron luego en el complejo avidina/biotina (Vector Laboratories Inc.) y se enjuagaron en KPBS 0,02 M, se revelaron con diaminobencidina (Sigma, #1002523825) antes de ser montadas en portaobjetos de vidrio recubiertos con gelatina y cubiertas con DPX.

Para la detección fluorescente de astrocitos, las secciones flotantes se incubaron con anticuerpo policlonal primario anti-GFAP (1:10000, hecho en conejo - Abcam; ab7779). Las células positivas para GFAP se detectaron por el anticuerpo secundario anti-conejo, hecho en cabra, Alexa Fluor® 488 (1: 2000, Jackson ImmunoResearch; 111-545-047).

8. Tinción Nissl

Para determinar la extensión del daño causado por el KA en las diferentes áreas del hipocampo de los topillos de los ratones C57BL/6J, se empleó la técnica de tinción Nissl. Dos a tres rebanadas del hipocampo dorsal se montaron en portaobjetos y se dejaron secar durante una semana. El tejido se lavó en agua desionizada durante tres minutos. Luego, el tejido se deshidrató en alcoholes de concentración ascendente, durante tres minutos por cada concentración de alcohol (50%, 70%, 95% y 100%) y en xileno (dos veces durante cinco minutos). El tejido se bañó en las mismas soluciones de

alcohol en orden descendiente (tres minutos para cada concentración: 100%, 95%, 70% y 50%) y luego se lavó en agua desionizada durante 3 minutos. Luego, el tejido se tiñó en una solución violeta de cresilo durante 10 minutos en agitación. Después de eso, el tejido se lavó dos veces en agua desionizada durante un minuto y se volvió a deshidratar con alcoholes en orden ascendiente (un minuto para cada concentración: 50%, 70%, 95% y 100%) y en xileno (dos veces durante cinco minutos). Los portaobjetos se dejaron secar durante 48h y se cubrieron con DPX y cubreobjetos.

9. Adquisición y análisis de imágenes

Utilizando un microscopio Zeiss Scope A1 y el programa Zen Lite 2011 se adquirieron las imágenes de las áreas de interés (CA1, CA3, CA4 y DG del hipocampo) con los siguientes parámetros: lente 20x (magnificación de 200 veces), tiempo de exposición en la luz de 460 ms, resolución de imagen de 16 bit, formato de imagen tif. Para las fotografías del Nissl y NeuN se utilizó la lámpara de luz de color neutro y para las del Fluoro Jade C el modo de iluminación de fluorescencia LED (longitud de onda de excitación 470 nm y longitud de onda de emisión 590 nm).

El análisis de las imágenes se realizó en el programa ImageJ versión 1.48. El conteo se realizó en un área de 255 pixeles x 180 pixeles que corresponde a 690 μm x 490 μm (CA1), 240 pixeles x 200 pixeles que corresponde a 650 μm x 540 μm (CA3) y 255 pixeles x 200 pixeles que corresponde a 690 μm x 540 μm (CA4). Para la tinción Nissl se contaron todas las células de las áreas de interés de dos rebanadas del hipocampo dorsal por animal y para la inmunohistoquímica con NeuN de seis rebanadas, mientras que para la tinción Fluoro Jade C y la inmunoreactividad a GFAP las imágenes de seis rebanadas por animal se transformaron en formato de resolución 8 bit y luego en binarias (blanco y negro) y se empleó el análisis semicuantitativo midiendo el área positiva para FJC.

10. Western Blot

Las muestras de tejido fresco se pesaron y luego se homogeneizaron usando la solución RIPA (50 μl para 2 mg de tejido fresco) con inhibidores de proteasas (Roche Diagnostics GmbH, 05 892 970 001) en viales cónicos de vidrio por la técnica clásica de mortero (2-3 revoluciones por segundo durante 20 segundos). Los homogenados se colectaron en tubos Eppendorf de 0,6 ml y se centrifugaron rápidamente a 12700 rpm (centrífuga Sorvall RMC 14 DU PONT) durante 15 minutos a 4°C. Se recolectaron los sobrenadantes y se determinó la cantidad de proteínas por muestra con el ensayo de Bradford. Se usaron 30 μg de proteína total de hipocampo, se incubaron con un medio de condiciones reductoras (50% agua desionizada, 12.5% Tris HCl, 10% glicerol, 20% SDS al 10%, 5% β -mercaptoetanol, 2,5% azul bromofenol al 1%) y se cargaron en un gel SDS-PAGE de 12.5%. El gel se sometió a electroforesis a 150 V durante 15 min y luego a 100 V durante aproximadamente 2 h. Una vez separadas, las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (20 V por 40 min) y luego se bloquearon con BSA 5% diluido en TBS durante 2 h. Las membranas se lavaron con TBS tres veces

por 10 minutos y luego se incubaron con anticuerpos primarios diluidos en BSA 1% en TTBS por toda la noche a temperatura ambiente. Utilizamos anticuerpos primarios para detectar los niveles de las proteínas: PRLR (policlonal, hecho en conejo, 1:2500, Abcam; ab214303), PRL (policlonal, hecho en conejo, 1:1000, ThermoFisher; PA5-26006), pAkt (monoclonal, hecho en conejo, 1:5000, Abcam; ab78403), pMAPK (monoclonal, hecho en conejo, 1:3000, señalización celular; Cell Signaling Technology; D13.14.4E), pSTAT5 (monoclonal, hecho en conejo, 1:500, Cell Signaling Technology; C11C5), y β -actina (policlonal, hecho en conejo, 1: 4000, Abcam; ab1801), esta última sirvió como control de carga de proteínas. Después de la incubación en el anticuerpo primario, las membranas se enjuagaron con TTBS tres veces por 10 minutos y se incubaron en un anticuerpo secundario (anti-conejo IgG-HRP hecho en cabra, 1:4000, BioRad, #172-1019) para 2 h a temperatura ambiente. Después de la incubación en el anticuerpo secundario, las membranas se enjuagaron con TTBS tres veces por 10 min y luego con TBS, tres veces por 10 min. Las membranas se incubaron durante 5 minutos con sustrato quimioluminiscente (ECL) y se expusieron a placas de radiografía dentro de un cassette. Las placas expuestas se revelaron, se fijaron, se lavaron con agua, y se dejaron secar al aire. Luego, las placas se escanearon y se cuantificó la densidad óptica de cada banda que correspondía a los pesos moleculares para cada proteína en el programa ImageJ versión 1.48. El valor de la densidad óptica para cada proteína de interés (PRL de 23kDa, PRL de 48kDa, I-PRLR, MAPK, Akt) por sujeto, se expresó como cambio sobre la densidad óptica de la actina del mismo sujeto. Los resultados se expresan como promedio de todos los sujetos normalizados sobre actina por grupo experimental.

11. Análisis estadístico

Todos los datos se analizaron con Prism, versión 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EE.UU.). Se realizó la prueba de normalidad D'Agostino-Pearson por separado para cada conjunto de datos (análisis de comportamiento de grabaciones de 1 h, inmunohistoquímica, y Western Blot). Solo el análisis de grabaciones de 1 h no se ajustaba a una distribución gaussiana. Para ese análisis, aplicamos la prueba de Kruskal-Wallis. Para comparar el tiempo que los PRs y los PNRs pasaron en los diferentes cuadrantes, aplicamos la prueba U Mann-Whitney;. El análisis estadístico de los datos de los experimentos de excitotoxicidad se realizó utilizando una ANOVA de dos vías (factor 1: grupo experimental; factor 2: tratamiento i.c.v.) para cada región del hipocampo por marcador (evaluación inmunohistoquímica; N = 5) y por cada proteína por separado (evaluación de Western Blots; N = 4). Las comparaciones múltiples se evaluaron con una prueba post-hoc de Tukey. Para la expresión de proteínas durante la primera semana posparto (control vs grupos P no manipulados en PPD1 vs PPD4 vs PPD7), utilizamos una ANOVA de una vía y una prueba post-hoc Tukey, para las comparaciones múltiples. El valor $P < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. Todos los datos se presentan como el promedio \pm SEM.

CAPÍTULO IV: Resultados

1. El efecto de la paternidad en la neuroprotección del hipocampo

1.1 Los ratones C57BL/6J no expresan conducta parental.

En los experimentos con ratones de la cepa C57BL/6J, solamente el 17% de los padres acarrearon a las crías el día PPD8. De las 20 cruzas sobrevivieron las crías de cinco parejas y no se pudo determinar si fue la madre o el padre o ambos responsables del infanticidio. Durante las pruebas de acarreo no se notó agresión o ataques por parte de los machos, pero tampoco otras conductas relacionadas al cuidado parental.

En cuanto a la interacción con las crías y la madre y su efecto a la neuroprotección del hipocampo en el ratón padre, no se pudieron detectar cambios significativos entre tratamiento i.c.v. con KA o con SAL, en ninguno de los grupos experimentales, como se determinó por una tinción Nissl (Figura 8; $p > 0.05$, ns). El hecho de que no hubiera cambios significativos entre SAL y KA, en combinación con las dificultades de obtener una muestra grande con y sin expresión de conducta paternal, nos guió a la decisión de cambiar de cepa de ratones, a los CD-1. Sin embargo, esta cepa de ratón no es sensible al daño hipocampal con KA por lo que no fue útil en estos experimentos.

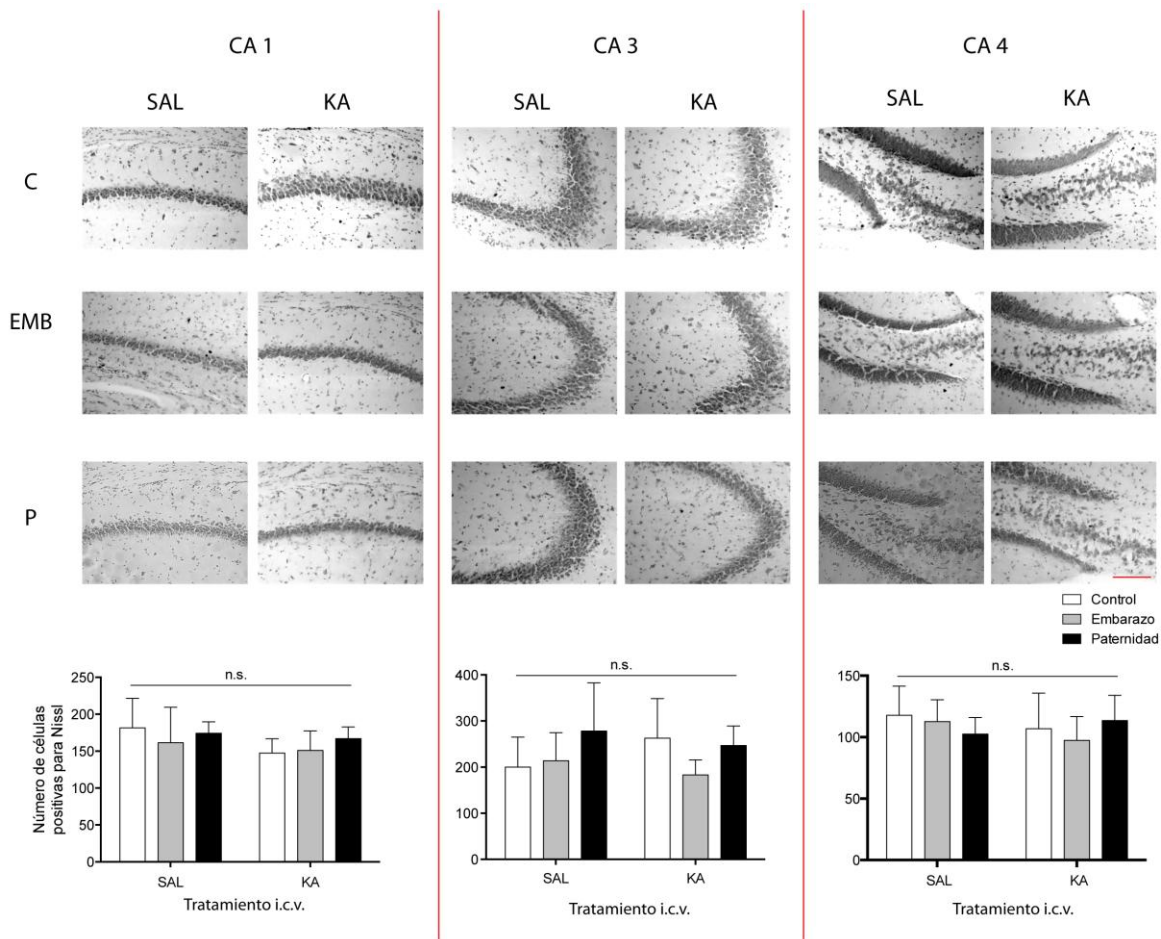


Figura 8: El hipocampo del ratón macho de la cepa C57BL6/J no se dañó después del tratamiento i.c.v. con KA. Microfotografías representativas de las áreas CA1, CA3 y CA4, teñidas con Nissl. La cuantificación del número de células muestra que ninguna de las áreas hipocámpales cuantificadas sufrió daño significativo. Microfotografías representativas de las áreas CA1, CA3 y CA4 del hipocampo dorsal teñidas para Nissl, 48 horas después de la inyección i.c.v. con SAL o KA. Las barras en las microfotografías representan 100 μ m. En las gráficas se representan: promedio \pm SEM; ANOVA de dos vías, N=3, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

1.2 Los padres CD-1 expresaron cuidado paternal en la primera semana después del parto.

Con la finalidad de determinar si los padres que expresaban conducta paternal mostraban diferencias en los niveles de neuroprotección o la expresión de proteínas relacionadas a ésta en comparación con los que no expresaron conducta paternal, se evaluó la conducta de acarreo de las crías. Cuarenta y uno por ciento (N=21/51) de los machos en el grupo P exhibieron conducta paternal, según la prueba de acarreo el día PPD8 (Retrievers-PR). De los 21 PR, cuatro no completaron la prueba de acarreo el día PPD1. Las latencias para acarrear la primera cría variaron entre los sujetos, desde unos pocos segundos al inicio hasta unos segundos antes del final de la prueba de 10 minutos. Sin embargo, una vez que acarrearon la primera cría, los padres completaron rápidamente la prueba, dentro de un rango de 32 a 163 segundos (Figura 9A).

El análisis de las grabaciones de video del PPD4 mostró diferencias significativas entre los grupos

PR y PNR grupos [Kruskal Wallis, $P = 0.0473$] (Figura 9B). los ratones del grupo PR pasaron significativamente más tiempo en el cuadrante del nido [$P = 0.0257$] y menos tiempo en el cuadrante 4 [$P = 0.0493$] que los ratones del grupo PNR (Figura 2B). Todos los PRs menos uno expresaron cuidado parental completo en la sesión de grabación (acicalamiento corporal y anogenital, arqueamiento, acarreo) durante más de 60 segundos continuos. El único PR que no expresó conductas de cuidado paternal durante la grabación, sí acarreo a las crías el día PPD8. En el caso de los Ps que no acarrearón las crías (Non-Retrievers-PNR), no hubo diferencias significativas en el tiempo que pasaron en cada cuadrante, aunque hubo una tendencia a que pasaran más tiempo lejos del nido (cuadrantes 3 y 4; Figura 9B). Ninguno de los PNRs exhibió conducta paterna o agresiva/infanticida durante las grabaciones de video.

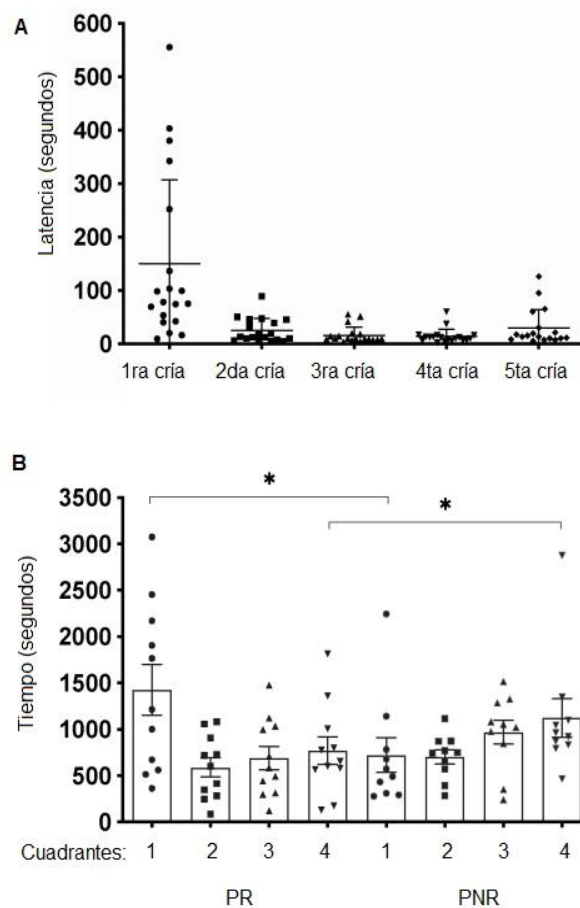


Figura 9: Los ratones padres expresan cuidado parental hacia sus crías la primera semana posparto. A) Las latencias para acarrear el primero de las cinco crías el día PPD8 variaron mucho entre los Rs, pero una vez que se acarreo la primera cría, completaron la prueba de acarreo rápidamente. La gráfica muestra las latencias para acarrear la primera cría, y para las crías 2 a 5 el tiempo que transcurrió desde el acarreo de la cría anterior. B) El grupo PR pasó significativamente más tiempo en el cuadrante del nido (cuadrante 1) y menos tiempo en el cuadrante 4 que el grupo PNR. Promedio \pm SEM; Pruebas Kruskal-Wallis y U Mann Whitney, $N = 10-11$, * $p < 0.05$.

1.3 La experiencia paternal disminuyó la neurodegeneración inducida por KA en las áreas CA3 y CA4 del hipocampo en ratones macho CD-1, independientemente de la expresión de cuidado parental

El efecto de la paternidad en una lesión por KA se evaluó con la tinción para FJC y la inmunorreactividad para NeuN y GFAP. En el área CA3, el análisis factorial para el FJC mostró significancia para ambos factores y la interacción entre ellos [factor grupo experimental $F_{(3,32)}=6.764$, $p=0.0012$; factor tratamiento i.c.v. $F_{(1,32)}=63,33$, $p<0,0001$; interacción $F_{(3,32)}=8,075$, $p=0,0004$] (Figura 9A). La tinción con fluorojade C reveló necrosis inducida por KA en los grupos C [$p<0,001$] y EMB [$p<0,01$], ya que exhibieron niveles elevados estadísticamente significativos de marca fluorescente en comparación con sus controles tratados con SAL. Además, se detectaron diferencias estadísticas entre los grupos tratados con KA: la marca positiva para FJC fue mayor en el grupo C-KA que en los grupos PR-KA y PNR-KA [$p<0,001$], y del grupo EMB fue mayor que la de los PR [$p<0,05$]. No hubo diferencias entre los grupos PR y PNR.

Para NeuN el análisis factorial arrojó como significativo el efecto del tratamiento con KA y la interacción entre factores [factor tratamiento i.c.v. $F_{(1,32)}=14,04$, $p=0,0007$; interacción $F_{(3,32)}=3,366$, $p=0,0305$], pero no hubo efecto significativo para el grupo experimental [$F_{(1,32)}=1.114$, ns]. La pérdida neuronal se demostró claramente en el grupo C tratado con KA [$p<0,01$] en comparación con el grupo C-SAL y no se detectó ningún efecto dañino del KA en los grupos PR y PNR. EMB-KA no fue significativamente diferente a su control EMB-SAL (Figura 10A, panel de NeuN). Para el marcador GFAP, solo el factor de tratamiento fue estadísticamente significativo en el análisis factorial [factor i.c.v. tratamiento $F_{(1,32)}=36,93$, $p<0,0001$]. El KA indujo un aumento claro de GFAP en el grupo control [C-SAL vs C-KA, $p<0,01$] y no se detectó algún efecto claro en todos los otros grupos experimentales tratados con KA (Figura 10A). Los grupos EMB y PNR tratados con KA exhibieron mayor astrogliosis que el grupo C-SAL [$p<0,05$] (Figura 10A, panel de GFAP). En conjunto, los datos del área CA3 muestran que KA no produjo daño significativo en los grupos PR y PNR (Figura 10A) en contraste con los grupos C y EMB sometidos a excitotoxicidad que exhibieron niveles elevados de neurodegeneración, pérdida celular y astrogliosis en comparación con su propio control o grupo C-SAL (Figura 10A).

En el área CA4, el análisis factorial para FJC mostró que hubo una contribución significativa tanto para todos los factores como para la interacción entre ellos [factor experimental grupo $F_{(3,32)}=6.802$, $p<0.0011$; factor tratamiento i.c.v. $F_{(1,32)}=88,95$, $p<0,0001$; interacción $F_{(3,32)}=4.641$, $p=0.0084$] (Figura 10B). Los grupos C-KA y EMB-KA tuvieron niveles de muerte celular significativamente elevados en comparación con sus controles C-SAL y EMB-SAL [$p<0,001$]. Sin embargo, también, el grupo PNR-KA presentó niveles elevados de muerte celular en comparación con su control PNR-SAL [$p<0,05$] (Figura 10B).

El análisis factorial para NeuN en CA4 solo arrojó significancia para el tratamiento i.c.v.

[$F_{(1,32)}=16,26$, $p<0,0003$] sin que hubiera significancia para la interacción entre los factores [$F_{(3,32)}=1.793$, $p=0.1683$]. Los grupos PR y PNR no sufrieron cambios significativos en el número de células positivas para NeuN después del tratamiento con KA. Sin embargo, se detectó una reducción clara en el número de neuronas debido al daño excitotóxico en el grupo EMB (Figura 10B) [EMB-KA vs los grupos C-SAL y EMB-SAL, $p<0.05$]. No se encontraron diferencias significativas para los niveles de GFAP en el área CA4 en ninguno de los grupos (Figura 10B). Las microfotografías para FJC, NeuN y GFAP en ambas las áreas CA3 y CA4 se muestran en las Figuras 9A y 9B, respectivamente. El área CA1 se analizó para los tres marcadores, pero no se observaron cambios.

1.4 La sensibilización por exposición crónica a crías recién nacidas no disminuyó el efecto de KA en machos vírgenes.

Con el fin de determinar si la exposición crónica a crías evitaría el daño inducido por KA, los ratones vírgenes macho se expusieron por 2 horas diarias a crías recién nacidas, durante 7 días consecutivos y se sometieron a lesiones con KA. No se observó ningún efecto protector de la exposición a las crías en las áreas CA3 y CA4 según los resultados de inmunohistoquímica para NeuN (Figura 11). No se detectaron diferencias entre animales que demostraron la expresión de conducta de acarreo, ataque o no acarreo, por lo que los datos se muestran agrupados.

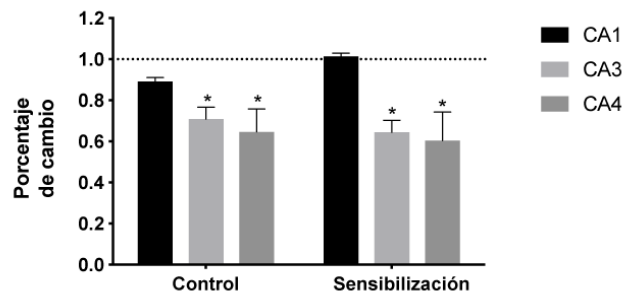


Figura 11: Los machos vírgenes sensibilizados a crías recién nacidas no están protegidos contra el daño excitotóxico, en las regiones CA3 y CA4 del hipocampo dorsal. Las gráficas representan el porcentaje de cambio células positivas para NeuN de los animales tratados con KA sobre su propio control (en la gráfica los controles tratados con SAL se representa como la línea discontinua que corresponde al 100%). N=4, Prueba t de Student comparando control- KA contra control-SAL y sensibilización-SAL contra sensibilización-KA, * $p<0.05$.

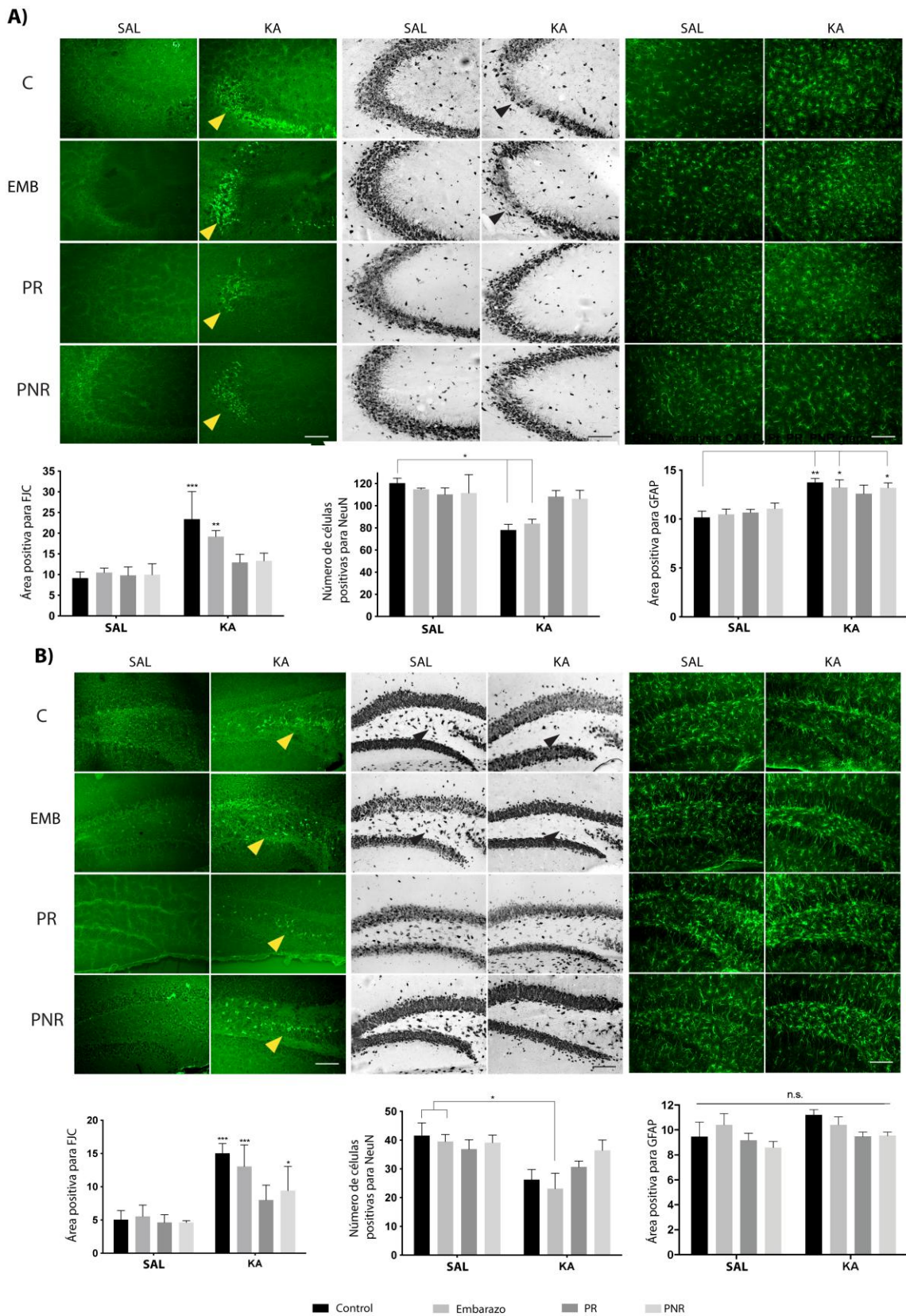


Figura 10: El hipocampo de los ratones macho con experiencia paterna se protege contra un daño excitotóxico, independientemente de la expresión de la conducta parental. **A)** Microfotografías representativas del CA3 del hipocampo dorsal teñidas para FJC, NeuN y GFAP, 48 h después de la inyección i.c.v. de SAL o KA. Las gráficas representan la cuantificación del área positiva para muerte celular (FJC), el número de neuronas (NeuN) y los niveles de astrogliosis (GFAP) no muestran ningún efecto perjudicial del KA en los grupos PR y PNR. **B)**

Microfotografías representativas del CA4 del hipocampo dorsal teñidas para FJC, NeuN y GFAP, 48 h después de la inyección i.c.v. de SAL o KA. La cuantificación del área positiva para la muerte celular (FJC), el número de neuronas (NeuN) y los niveles de astrogliosis (GFAP) mostraron que FJC y NeuN detectaron mejor los efectos neuroprotectores de la paternidad. Las barras en las microfotografías representan 100 μ m. En las gráficas se representan: promedio \pm SEM; ANOVA de dos vías, prueba post-hoc Tukey, N=5, * p <0.05; ** p<0.01; *** p <0,001. Las puntas de flecha indican la señal fluorescente positiva para FJC (muerte celular).

1.5 La experiencia paternal cambió los niveles de las variantes de PRL y una vía de señalización intracelular relacionada con los PRLRs en el hipocampo de padres CD-1.

Con respecto a los cambios hormonales que podrían ser relevantes para la protección contra el daño excitotóxico, la expresión de las variantes de PRL, el receptor de PRL (forma larga, I-PRLR) y las vías intracelulares relacionadas con los PRLRs se evaluaron en muestras de hipocampo de ratones machos los días PPD1, 4 y 7 (Figura 12). El análisis de ANOVA de una vía reveló una reducción significativa en la PRL de 23 kDa [$F_{(3,13)}=40.03$, $p<0.001$] en todos los puntos de tiempo postparto y un aumento significativo en la PRL dimerizada (48 kDa) (Figura 12) [$F_{(3, 13)}=7.282$, $p<0.01$] en el hipocampo de los padres en comparación con el grupo C. Sin embargo, no se encontraron cambios para el I-PRLR. Como la vía de señalización intracelular primaria para el I-PRLR es Stat-5, se estudió la expresión de la isoforma fosforilada de Stat5, pero no detectamos ninguna señal. Se evaluaron otras vías intracelulares activadas por los PRLRs y relacionadas con la supervivencia y proliferación celular. No se encontraron cambios estadísticamente significativos para pMAPK, pero hubo un aumento significativo en pAkt en todos los PPDs (Figura 12) [$F_{(3,13)}=11.06$, $p<0.01$].

Con respecto a los experimentos de excitotoxicidad inducida por KA, el análisis factorial para la PRL de 23 kDa mostró una significancia estadística solo para el grupo experimental [factor grupo experimental $F_{(3,24)}=6,784$, $p<0,01$; factor tratamiento i.c.v. $F_{(1,24)}=0,3164$, ns; interacción $F_{(3,24)}=2,878$, ns]. Se detectó una disminución estadísticamente significativa en los niveles de la PRL de 23 kDa en el grupo PR (en ambos tratados con SAL y KA) en comparación con el grupo PNR tratado con KA, como indica la ANOVA de dos vías (Figura 13) [PR-SAL vs PNR-KA, $p<0.05$; PR-KA vs PNR-KA, $p<0.05$].

En el caso de la PRL dimerizada (48 kDa), el análisis factorial arrojó como componente significativo el grupo experimental [factor grupo experimental $F_{(3, 24)}=12.26$, $p<0.001$; factor tratamiento i.c.v. $F_{(1, 24)}=0,3775$, ns; interacción $F_{(3, 24)}=0.06961$, ns]. Para esta isoforma, todos los grupos experimentales (EMB, PR y PNR) tuvieron niveles significativamente más altos en comparación con el grupo C, independientemente del tratamiento i.c.v. (Figura 13) [C-SAL vs EMB-SAL, $p<0.05$; PR-SAL, PNR-SAL, EMB-KA, PR-KA y PNR-KA vs C-KA : $p<0.05$], y estos resultados se asemejan a los resultados de la evaluación longitudinal en la primera semana postparto.

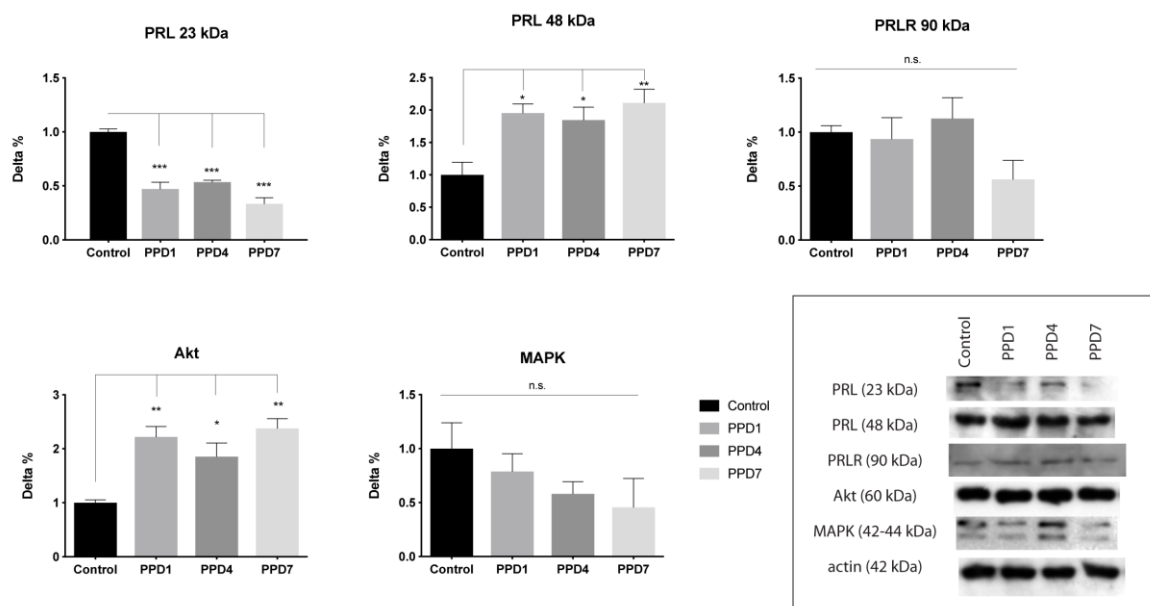


Figura 12: Los padres muestran cambios en los niveles de las variantes de PRL y la vía de señalización intracelular de pAkt en el hipocampo, durante la primera semana después del parto. La cuantificación de las proteínas en el hipocampo de ratones macho en los días posparto (PPD) 1, 4 y 7, reveló una disminución significativa en la PRL de 23 kDa y un aumento concomitante en la PRL de 48 kDa en comparación con el grupo control sin ningún tratamiento. No se encontraron cambios significativos para los I-PRLRs y pMAPK, pero se detectó un aumento claro de pAkt en los grupos con experiencia paternal en comparación con el control. Los datos representan el cambio (delta) sobre el grupo de control (Promedio \pm SEM). ANOVA con una prueba post-hoc Tukey, $N=4$, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs. El grupo control. Las imágenes representativas obtenidas por Western blot para todas las proteínas evaluadas en la primera semana posparto se presentan en el cuadro.

Para la vía intracelular pAkt, que está relacionada con la supervivencia celular, el análisis factorial arrojó como componentes significativos el grupo experimental y el tratamiento i.c.v. [factor grupo experimental $F_{(3, 24)}=10,23$, $p < 0,001$; factor tratamiento i.c.v. $F_{(1, 24)}=7,921$, $p < 0,01$], aunque no hubo interacción significativa entre los componentes [interacción $F_{(3, 24)}=0,8748$, ns]. Los niveles del pAkt fueron más altos en el hipocampo del grupo PR tratado con KA, en comparación con los grupos C, EMB y PNR tratados con SAL (Figura 13) [C-SAL vs PR-KA, $p < 0,01$; EMB-SAL vs PR-KA, $p < 0,001$; PNR-SAL vs PR-KA, $p < 0,01$; C-KA vs PR-KA, $p < 0,01$; EMB-KA vs PR-KA, $p < 0,05$]. En todos los grupos, independientemente del tratamiento i.c.v., no hubo cambios significativos en los niveles de las proteínas I-PRLR y pMAPK (Figura 13).

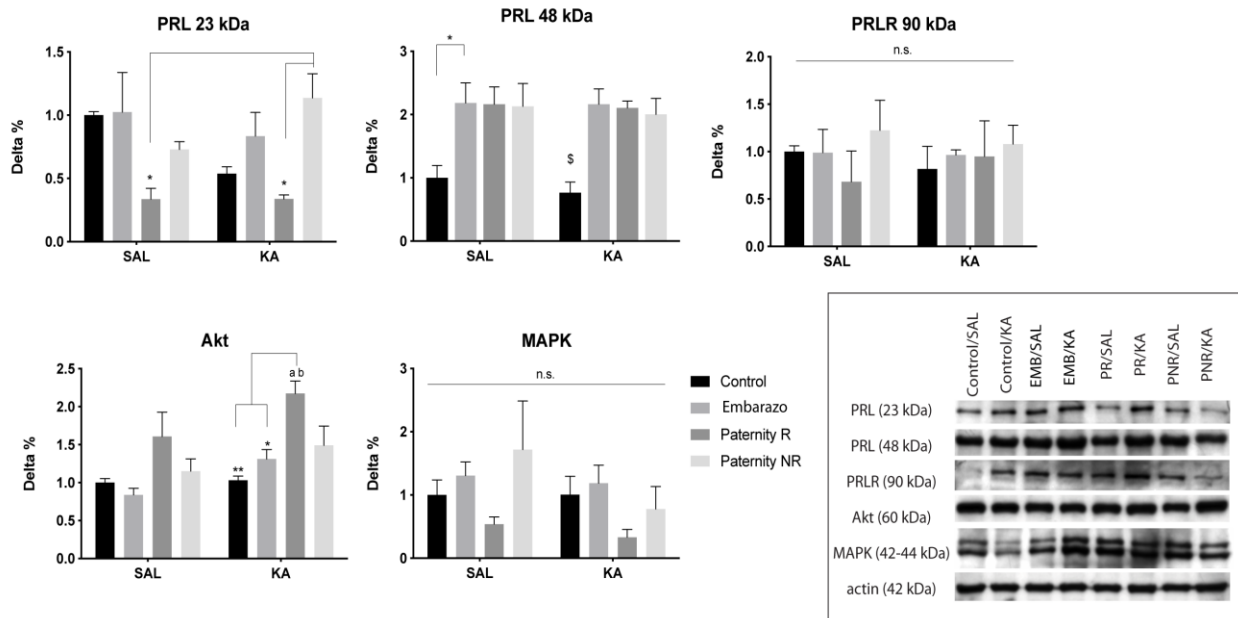


Figura 13: El grupo PR muestra niveles más bajos de PRL 23 kDa y niveles más altos de pAkt en el hipocampo 48 h después del tratamiento con KA. Cuantificación de los niveles de proteína obtenidos por Western blot a partir del hipocampo de ratones macho. Se encontró una disminución significativa en la PRL de 23 kDa en el grupo PR y un aumento concomitante en la PRL de 48 kDa en los grupos EMB, PR y PNR en comparación con los controles. No se encontraron cambios significativos para los I-PRLRs y pMAPK. ANOVA de dos vías seguida de la prueba post hoc para comparaciones múltiples Tukey, N = 4; * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; a: significativamente diferente a los grupos C y PNR tratados con SAL, p < 0.01; b: significativamente diferente al grupo EMB tratado con SAL, p < 0.001; \$: significativamente diferente a todos los grupos y condiciones, excepto para el grupo C tratado con SAL, p < 0.05. Las imágenes representativas obtenidas por Western blot para todas las proteínas evaluadas en el hipocampo se presentan en el cuadro.

1.6 Los padres topillos de la pradera expresan conducta parental pero no se protegen contra el daño excitotóxico.

La prueba de acarreo no se modificó para los experimentos de los topillos. Eso tuvo como resultado que no obtuviéramos datos de acarreo, ya que las crías de los topillos de la pradera tenían buena movilidad y se movían solas hacia el nido. De los cinco padres que se usaron para los experimentos piloto, solamente uno acarreo a una de sus cinco crías. Sin embargo, todos los padres topillo expresaron otras conductas relacionadas al cuidado parental durante los 10 minutos de la prueba de acarreo (arqueamiento por más que 60 segundos continuos, acicalamiento corporal y anogenital), por lo cual calificaron como paternas.

En los experimentos piloto con los topillos se determinó como dosis de KA la misma que se ocupó en los experimentos con los ratones CD-1, ya que con dosis más pequeñas (75 o 50 ng de KA en 1 µl de SAL) no se observó pérdida celular significativa. El grupo C tratado con KA tuvo una pérdida de células significativa en CA3 del hipocampo en comparación con su propio control (ANOVA de dos vías *p < 0.05) y en CA4 comparado con el grupo P tratado con SAL. En cuanto al grupo EMB,

después del tratamiento con KA tuvo una pérdida de células significativa en CA4, cuando comparado con el grupo P tratado con SAL (* $p < 0.05$) (Figura 14). Aunque los resultados no muestran diferencias significativas para los animales con experiencia paternal o de embarazo, cuando se comparan con sus propios controles, la gran dispersión de los datos muestra una variabilidad alta que no apoya conclusiones definitivas acerca de los efectos protectores de la experiencia paternal en los topillos de la pradera.

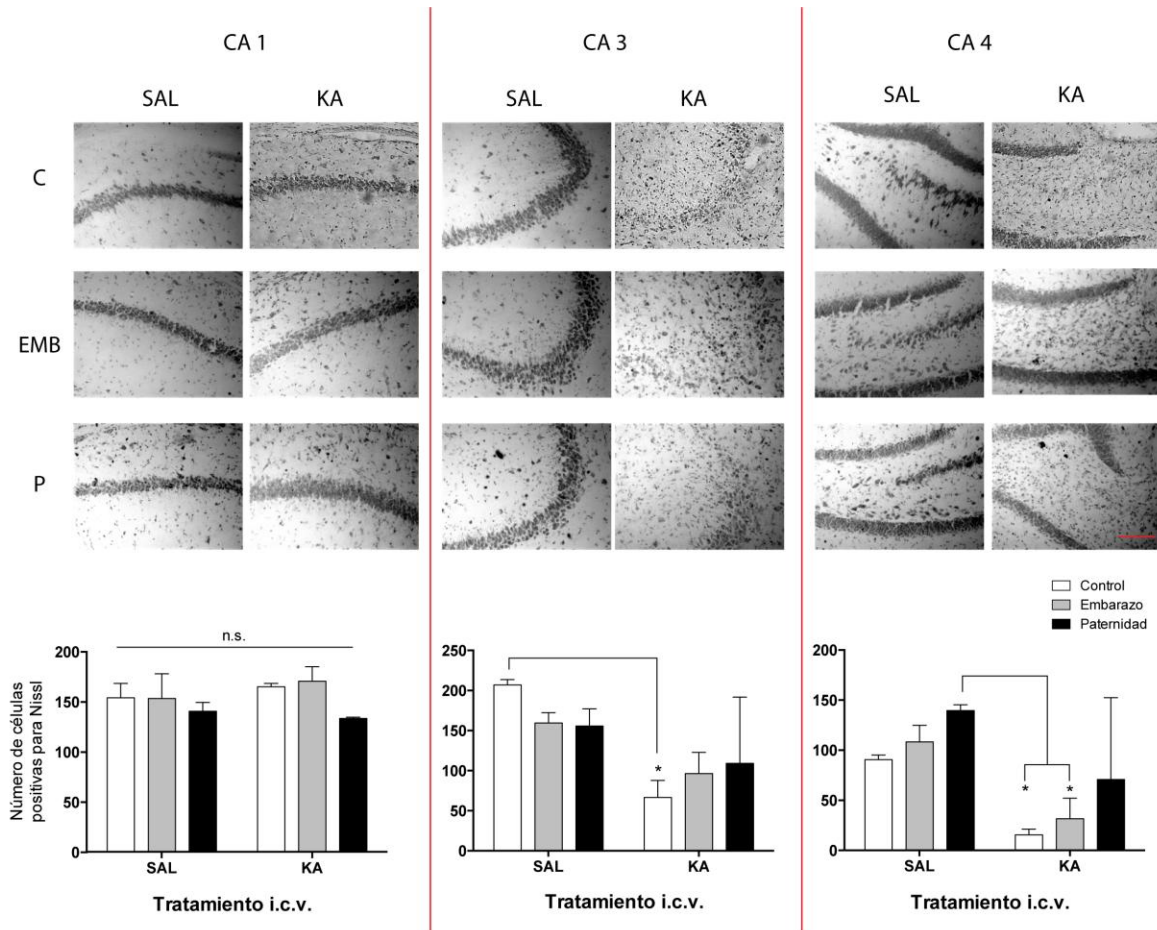


Figura 14: El hipocampo del topillo de la pradera con experiencia paternal no se protege contra el daño excitotóxico. Microfotografías de las áreas CA1, CA3 y CA4, teñidas con Nissl. La cuantificación del número de células muestra que CA1 no sufrió daño, pero CA3 y CA4 tuvieron una pérdida celular de altos niveles, en los tres grupos. Microfotografías representativas de las áreas CA1, CA3 y CA4 del hipocampo dorsal teñidas para Nissl, 48 horas después de la inyección i.c.v. con SAL o KA. Las barras en las microfotografías representan 100 μm . En las gráficas se representan: promedio \pm SEM; ANOVA de dos vías, $N=3$, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

2. El tratamiento crónico con PRL protege el hipocampo de ratones macho contra un daño excitotóxico

2.1 El tratamiento crónico de PRL tuvo un efecto neuroprotector en CA3 del hipocampo de ratones macho pero no en CA4.

Los efectos neuroprotectores de la PRL se evaluaron mediante la tinción de FJC, con el fin de medir los niveles de muerte celular y la inmunohistoquímica para NeuN (neuronas) y GFAP (astrogliosis). En la región CA3 del HP, el análisis factorial para FJC reveló un efecto significativo para el tratamiento i.c.v. y la interacción entre factores [tratamiento i.c.v.: $F_{(1, 24)} = 50,96$, $p < 0,0001$; interacción: $F_{(2, 24)} = 4.438$, $p < 0.05$] pero no se encontró un efecto significativo para el grupo experimental ($p > 0.05$, ns). Los grupos C y CSAL sufrieron un aumento estadísticamente significativo en los niveles de FJC después del tratamiento i.c.v. con KA (C-SAL vs C-KA: Dif. promedio: -14.25, $p < 0.001$; CSAL-SAL vs CSAL-KA: Dif. promedio: -9.919, $p < 0.01$), mientras que el grupo CPRL-KA no fue diferente a su control CPRL-SAL ($p > 0.05$, ns) (Figura 15A).

En la misma área hipocampal, el análisis factorial para NeuN produjo significancia para ambos factores y también para la interacción entre ellos [i.c.v. tratamiento: $F_{(1, 24)} = 56,16$, $p < 0,0001$; grupo experimental: $F_{(2, 24)} = 9.096$, $p = 0.0011$; interacción: $F_{(2, 24)} = 6.057$, $p = 0.0074$]. El grupo C tuvo una disminución significativa en el número de neuronas después del tratamiento con KA (C-SAL vs C-KA: Dif. Promedio: 42.38, $p < 0.0001$), un efecto observado también en el grupo CSAL después de la excitotoxicidad (CSAL-SAL vs CSAL-KA: Dif. promedio: 35.03, $p < 0.001$). El grupo tratado con PRL no tuvo diferencias estadísticas entre condiciones de tratamiento i.c.v. ($p > 0.05$, ns) (Figura 15A).

En cuanto al GFAP, los resultados son algo diferentes. El análisis factorial arrojó como significativo solo el tratamiento i.c.v. ($F_{(1, 24)} = 43,58$, $p < 0.0001$). Los tres grupos experimentales sufrieron un aumento significativo en los niveles de fluorescencia para GFAP en CA3 del HP (C-SAL vs C-KA: Dif. promedio: -3.582, $p < 0.01$; CSAL-SAL vs CSAL-KA: Dif. promedio: -3.423, $p < 0.01$; CPRL-SAL vs CPRL-KA: Dif. promedio: -2.65, $p < 0.05$) (Figura 15A).

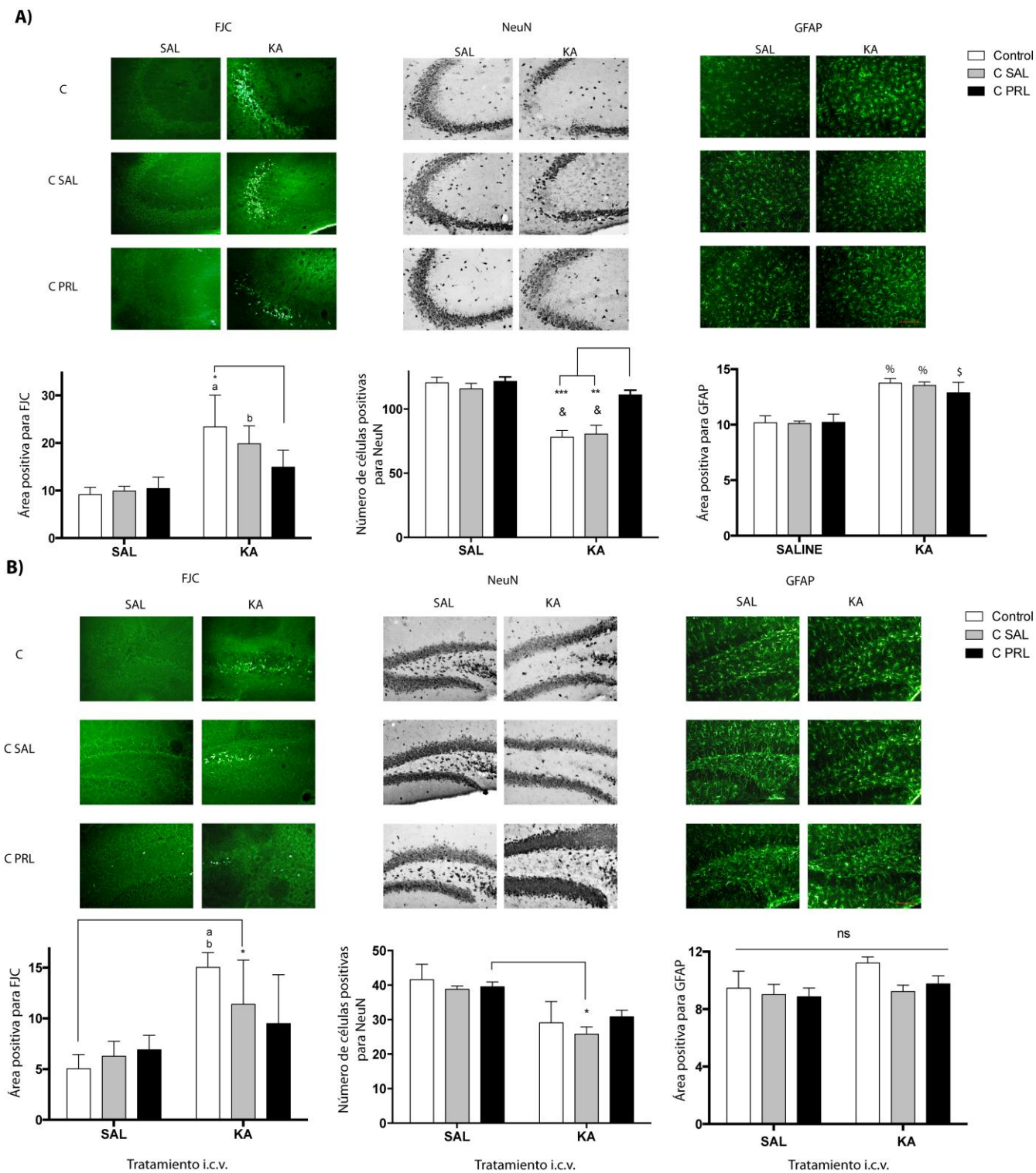


Figura 15: El área CA3 del hipocampo del ratón macho (CD-1) se protege contra el daño excitotóxico después de tratamiento crónico con PRL. **A)** Microfotografías del CA3 de ratones macho tratados con SAL o PRL por 7 días consecutivos, antes del daño excitotóxico. La cuantificación de los marcadores de muerte celular (FJC), neurodegeneración (NeuN) y astrogliosis (GFAP) muestra que el grupo tratado con PRL no sufre daño en comparación con su control respectivo. **B)** Microfotografías del CA4 de ratones macho tratados con SAL o PRL por 7 días consecutivos, antes del daño excitotóxico. La cuantificación de los marcadores de muerte celular (FJC) y neurodegeneración (NeuN) no coinciden entre

sí. Los niveles de astrogliosis no cambiaron respecto a sus controles, en ninguno de los grupos y condiciones de tratamiento i.c.v. Microfotografías representativas de las áreas CA3 y CA4 del hipocampo dorsal teñidas para FJC, NeuN y GFAP, 48 horas después de la inyección i.c.v. con SAL o KA. Las barras en las microfotografías representan 100 μ m. En las gráficas se representan: promedio \pm SEM; ANOVA de dos vías, N=5, * p <0.05; ** p<0.01; *** p <0,001; a: estadísticamente diferente a C y CSAL tratados con SAL i.c.v. (p<0.001); b: estadísticamente diferente al grupo C PRL tratado con SAL i.c.v. (p<0.01).

Los datos obtenidos del área CA4 no coincidieron con los del CA3. El análisis factorial para FJC reveló como componentes significativos el tratamiento i.c.v. y la interacción entre factores [i.c.v. tratamiento: $F_{(1, 24)}= 31.01$, $p<0.0001$; interacción: $F_{(2, 24)}= 4.207$, $p=0.0271$], pero el grupo experimental no alcanzó niveles de significancia. De los tres grupos, solo el grupo C tratado con KA tuvo niveles significativamente más altos de muerte celular (C-SAL vs C-KA: Dif. Promedio: -9.987, $p<0.001$). El grupo CSAL tuvo una tendencia a niveles más altos de FJC, aunque no fue estadísticamente diferente a su control correspondiente, pero solo al grupo C-SAL (C-SAL vs CSAL-KA: Dif. promedio: -6.342, $p<0.05$). En cuanto al número de neuronas, el análisis factorial para NeuN mostró que solo el tratamiento i.c.v. fue un factor estadísticamente significativo ($F_{(1, 24)}= 17.13$, $p=0.0004$). En la prueba post-hoc de comparaciones múltiples, la única diferencia significativa observada fue entre el grupo CPRL-SAL y el grupo CSAL-KA (Dif. promedio: 15.76, $p<0.05$), y no se encontraron otras diferencias, a pesar de que los tres grupos sufrieron una pérdida de neuronas, como puede verse en la Figura X. La astrogliosis en CA4 no fue diferente entre condiciones de tratamiento i.c.v., para ninguno de los grupos. El área de CA1 se analizó para los tres marcadores que se muestran aquí, pero no se encontraron diferencias significativas (Figura 15B).

CAPÍTULO V

Discusión

1. La experiencia paternal protege el hipocampo de los machos CD-1 contra el daño excitotóxico.

Este trabajo muestra que la interacción paternal con las crías induce neuroprotección en el hipocampo de ratones CD-1 después de un daño excitotóxico. Esta protección se observa tanto en los padres que acarrear como en los que no acarrear, y se observa en las áreas CA3 y CA4 del hipocampo.

1.1 Los ratones C57BL/6J no muestran sensibilidad ante una lesión excitotóxica en el hipocampo, independientemente del grupo experimental.

En nuestros experimentos los ratones C57BL/6J no sufrieron pérdida neuronal significativa después del tratamiento con KA, en ninguno de los grupos experimentales. Se sabe que los ratones C57BL/6J no presentan daño en el hipocampo por KA cuando éste es administrado por vía i.p. o i.v. (McKhann et al, 2003), y por la misma razón usamos el tratamiento i.c.v. Sorprendentemente, el daño causado no arrojó diferencia significativa cuando se evaluó con pruebas estadísticas de ANOVA de dos vías o Student's t-test. Se sabe que los C57BL/6J tienen menor densidad de KARs en el hipocampo, comparados con otras cepas de ratones, y son resilientes a la administración periférica de KA, pero se ha usado por años en experimentos con administración central, donde comúnmente se reporta que tiene efectos neurodegenerativos en el lóbulo temporal y el hipocampo. No obstante, en nuestros experimentos no pudimos detectar cambios cuantificables y significativos. Podría ser que una dosis mayor a la utilizada aquí sirviera para causar una neurodegeneración parecida a la que se vio en los experimentos con los CD-1 o los topillos de la pradera.

1.2 Los padres expresaron cuidado paternal la primera semana posparto.

Como se ha documentado anteriormente, encontramos que casi la mitad de los ratones macho CD-1 que fueron alojados con una hembra durante el embarazo expresaron cuidado paternal. Nuestros resultados son similares a los que reportó el grupo de Higashida en su estudio de conducta de acarreo en tres diferentes cepas de ratones padres (Liang et al, 2014). Encontraron que el 50% de los padres CD-1 acarrear sus crías en respuesta a vocalizaciones de ultrasonido emitidas por la hembra-madre. En contraste, la cepa BALB/c no acarreo en absoluto y solo el 20% de los padres C57BL/6J acarrear sus crías, pero los estímulos que llevaron a esta conducta quedaron

indeterminados. Inicialmente, en este proyecto utilizamos ratones de la cepa C57BL/6J, ya que en el trabajo de Mak y Weiss (2010) se reportó un porcentaje de acarreo de 100% por parte de los padres el PPD2. También, se documentó la interacción entre los PRLRs y la neurogénesis inducida por la convivencia con sus propias crías en el bulbo olfatorio y el DG del hipocampo. Sin embargo, obtuvimos resultados opuestos en la prueba de acarreo, ya que en nuestro estudio solo el 17% de los padres C57BL/6J concluyó la prueba, coincidiendo con los resultados reportados por Liang et al (2014). También encontramos que esta cepa de animales tenía un alto porcentaje de infanticidio (15/20 parejas). No pudimos determinar si el sujeto responsable de eso era la madre o el padre. Estas observaciones implican que el concepto tradicional, de que los ratones macho no expresan cuidado parental, podría deberse a las cepas utilizadas en los experimentos, algunas de las cuales no desarrollan conducta parental (p.ej. Los ratones macho de la cepa BALB no expresan cuidado parental y los C57BL/6J expresan cuidado parental en niveles bajos; Liang et al, 2014). Los experimentos presentados aquí demuestran que los CD-1 pueden ser una herramienta útil para la investigación de la conducta paterna.

Además, el registro de la conducta de acarreo fue apoyado por grabaciones de una hora, donde todos los machos del grupo PR menos uno (90%) expresaron cuidado parental completo en forma de arqueamiento sobre las crías en el nido, acicalamiento corporal y anogenital y acarreo cuando fue necesario. Los PRs pasaron más tiempo en el nido (cuadrante 1), mientras que los PNRs no mostraron ninguna preferencia, aunque tendieron a pasar más tiempo en los cuadrantes 3 y 4 (lejos del nido). Los padres del grupo PNR no expresaron cuidado parental u otra conducta de acercamiento a las crías, aparte de breves olfateos de las crías, y tampoco demostraron conducta agresiva hacia la camada. Estas grabaciones apoyaron las pruebas de acarreo, mostrando que el cuidado paternal no se limita solamente al acarreo, sino que comprende un amplio repertorio de conductas destinadas a garantizar el bienestar y la supervivencia de las crías.

Otro hallazgo interesante es que el comportamiento de acarreo no siempre estuvo presente el PPD1. Estas observaciones nos hicieron considerar la posibilidad de que el acarreo sea una habilidad que se desarrolla al mismo tiempo que el desarrollo postnatal de las crías y no es espontánea como se ve en las madres. Sin embargo, en algunos casos, los padres acarrearón a las crías el PPD1 pero no el día PPD8. Eso implica que los cambios ambientales que no se pudieron controlar juegan un papel importante en la expresión de la conducta parental en el macho. De hecho, el éxito de la prueba de acarreo en los padres CD-1 depende, no solamente de las vocalizaciones ultrasonido por parte de la hembra (Liu et al, 2013), sino también de otros factores ambientales (Liang et al, 2014; Akther et al, 2015) como la jaula (territorio vs no territorio) y la progenie de las crías, etc. Hay que tener en cuenta, entonces, que el acarreo está sujeto a muchas variables externas que podrían impedir la expresión de esta conducta.

1.3 La interacción con las crías y la madre, pero no la hembra embarazada, protegió el hipocampo contra la neurodegeneración inducida por KA en los padres CD-1.

En este estudio, por primera vez se demostró que la interacción de los padres con sus crías provee protección contra un daño excitotóxico en el hipocampo de los padres, incluso si ellos no expresan conducta paternal. Estudios desarrollados en nuestro laboratorio han utilizado el período de la lactancia como modelo de hiperprolactinemia fisiológica y han demostrado que la madre rata es menos sensible al daño neurotóxico durante la lactancia que sus conespecíficas vírgenes. Más específicamente, la rata lactante presenta un aumento local de los niveles de la proteína antiapoptótica Bcl-2 en comparación con las ratas vírgenes en diestro y menor muerte celular (FJC) y apoptosis (TUNEL) (Vanoye-Carlo et al, 2008), sin pérdida significativa de neuronas (NeuN), menor astrogliosis y respuesta microglial (inmunodetección de GFAP e Iba1 y análisis morfométrico de Scholl de los astrocitos individuales) después de la administración central y periférica de KA (Cabrera et al, 2009; Cabrera et al, 2013). Parte de estos efectos se atribuyen a la PRL, que se encuentra aumentada durante la lactancia, y se ha demostrado que tiene efectos protectores en experimentos *in vivo* (Morales et al, 2014; Reyes-Mendoza y Morales, 2016; Ortiz-Pérez et al, 2018) e *in vitro* (Ribero-Segura et al, 2017; Vergara-Castañeda et al, 2016).

Por años se ha considerado que las hormonas de la reproducción, en particular la PRL, desempeñan un papel importante en la expresión de la conducta parental en los machos mamíferos, ya que en varias especies esta hormona tiene niveles circulantes aumentados al final del periodo de gestación, después del nacimiento o al tener contacto físico con sus crías (Storey & Ziegler, 2016). Sin embargo, la relación causal entre la PRL y el cuidado paternal ha sido controversial los últimos años, puesto que el tratamiento con PRL no ha permitido o facilitado el cambio de conducta a los machos (revisado en: Wynne-Edwards y Timonin, 2007). Por otro lado, tradicionalmente, se considera que los cambios endocrinos en los padres mamíferos pueden permitir a los machos satisfacer las demandas específicas de cada especie al influir y modificar diversos aspectos de la conducta y la fisiología, de manera similar a muchos de los efectos que las hormonas y neuropéptidos tienen en las madres (Saltzman y Ziegler, 2014). En los ratones padres, los PRLRs median la neurogénesis inducida por la paternidad en los bulbos olfatorios y el DG del hipocampo (Mak y Weiss, 2010). Por estas razones, estudiamos la posibilidad de que los padres presenten resiliencia mediada por la PRL después de una lesión neurotóxica. En nuestros experimentos, la interacción con las crías tuvo un efecto positivo en la protección contra la excitotoxicidad por KA en las áreas hipocampales CA3 y CA4, lo que implica que la paternidad puede constituir un mecanismo protector. Esto se asemeja a la resiliencia observada en la hembra lactante, que se atribuye principalmente a los cambios hormonales y la expresión y distribución de receptores hormonales. Los niveles de estrógenos (o estradiol), PRL, progesterona y oxitocina, así como la expresión de sus receptores cambian durante la lactancia (revisado por Bridges, 2018) y participan en mecanismos de neuroprotección en diferentes

estructuras del SNC a través de diferentes vías intracelulares (Hoffman et al, 2003; Stein, 2008; Torner et al, 2009; Kaneko et al, 2016).

Con base en el trabajo de Mak y Weiss (2010) que propone la participación de la PRL en la conducta paternal (Bartke, 2004), en combinación con los trabajos de nuestro laboratorio que exploran los efectos neuroprotectores de la PRL en hembras (Morales et al, 2014; Reyes-Mendoza y Morales, 2016) y en roedores machos (véase: Discusión y Resultados), nuestra hipótesis fue que la PRL participaría en los efectos neuroprotectores de la paternidad como se describieron en nuestros experimentos. Curiosamente, los resultados del Western blot del hipocampo mostraron que la PRL monomérica se reguló a la baja en los padres en la primera semana postparto y se mantuvo más baja que los grupos control correspondientes después del tratamiento con KA. Por otro lado, la isoforma dimérica de la PRL (48 kDa) aumentó en el hipocampo de los machos en los grupos EMB y PR, en comparación con los controles. Dada la incertidumbre con respecto a la fuente de PRL y que la expresión de esta hormona en el cerebro ha sido controversial (Bridges y Grattan, 2019), el origen del aumento de la PRL de 48 kDa en muestras de hipocampo completo aún no se ha determinado.

Con respecto a la señalización de los PRLRs, no encontramos señal de la activación de Stat5 en el hipocampo en ninguno de los grupos. A pesar de la falta de cambios en los niveles de I-PRLRs, observamos niveles elevados de pAkt, una vía intracelular alternativa para los PRLRs, en ratones del grupo PR KA. Akt está implicada en los procesos de supervivencia celular después de un insulto excitotóxico. Aunque los mecanismos moleculares exactos que conducen a la supervivencia no están completamente aclarados, se sabe que Akt inhibe la activación de moléculas de señalización de la muerte, como GSK3 y BAD, o se acopla directamente a secuencias del DNA en el núcleo, promoviendo la sobrevivencia celular (Lai, Zhang y Wang, 2014; Zhao et al, 2016). No obstante, no exploramos la posibilidad de que otros cambios hormonales pudieran tener un impacto positivo en la supervivencia celular después de un insulto. Los niveles de estrógeno y oxitocina cambian en los padres (revisado por Bos, 2017). El efecto neuroprotector de estas hormonas ha sido estudiado con diferentes métodos de lesiones (trabajos y revisiones sobre neuroprotección mediada por: a) estrógenos: Chakrabarti et al, 2014; Engler-Chiurazzi, Singh y Simpkins, 2016; y b) oxitocina: Kaneko et al, 2016; Mairesse et al, 2018; Karelina et al, 2011). Debido a la complejidad de las adaptaciones que ocurren en el macho con experiencia paternal, más experimentos deben abordar la posibilidad de que estas hormonas, reguladas diferencialmente en los padres, tengan un papel en los efectos neuroprotectores que se observan aquí.

En nuestros experimentos, el grupo EMB sufrió neurodegeneración y muerte celular significativas en el área CA3 después del tratamiento con KA, lo que implica que la convivencia con las hembras durante el embarazo no impidió la muerte por excitotoxicidad. Estudios epidemiológicos en humanos (Salinas et al, 2017; Venna y McCullough, 2011) y algunos estudios en roedores (Craft et al, 2005; Karelina et al, 2011) han propuesto que la interacción social tiene un efecto protector en el desarrollo

de enfermedades neurodegenerativas o en la recuperación después de lesiones cerebrales, y mejor pronóstico de recuperación después de daño cerebral. Los ratones alojados individualmente sometidos a oclusión de la arteria carótida media (MCAO) tuvieron un tamaño de infarto más grande y un peor rendimiento cognitivo en comparación con los ratones que fueron alojados con otro sujeto (Craft et al, 2005). Los animales lesionados alojados con un conespecífico tenían niveles más bajos de la proteína reactiva C (CRP), pero los niveles de corticosterona no fueron significativamente diferentes entre las dos condiciones de alojamiento. En un estudio más reciente (Karelina et al, 2011) que utiliza el modelo MCAO de isquemia, los ratones alojados en pares tenían un tamaño de infarto más pequeño que los ratones aislados, niveles más altos de ARNm de oxitocina en el sitio del infarto y niveles más altos de interleucina-6 (IL-6), una molécula con acciones pro- y antiinflamatorias. El tratamiento con oxitocina revirtió el tamaño del infarto y los niveles de IL-6 en ratones alojados individualmente, mientras que el uso de un antagonista del receptor de oxitocina en animales alojados en pares revirtió la protección social. Basadas en estos datos, planteamos la hipótesis que el grupo EMB tendría al menos una protección parcial contra la excitotoxicidad, pero no lo confirmamos. Esto podría deberse a los diferentes protocolos de convivencia o de lesión. Otra diferencia importante entre estos estudios y el nuestro es que en los estudios de neuroprotección social alojaron a los machos con hembras OVX para controlar por variables relacionadas con la reproducción, como son los cambios hormonales inducidos por la cópula y el embarazo. De hecho, los perfiles hormonales de los futuros padres experimentan cambios, principalmente una regulación a la baja de la testosterona y una regulación al alza de los niveles circulantes de estrógenos antes del nacimiento (Berg y Wynne-Edwards, 2001; Edelstein et al, 2015). La investigación en especies biparentales y primates no humanos ha demostrado que los cambios hormonales en los padres parecen incluir cambios en la PRL circulante y los niveles de testosterona, y también en las concentraciones circulantes de estrógeno, progesterona y glucocorticoides, así como en los sistemas de vasopresina y oxitocina intracerebral (revisado por Saltzman y Ziegler, 2014). A nuestro entender, no hay datos sobre las fluctuaciones hormonales en ratones macho expuestos al entorno de embarazo de su pareja (futuros padres) que podrían explicar adecuadamente la falta de neuroprotección en el grupo EMB en este estudio.

En el área de CA4, los resultados fueron contradictorios: solo el grupo EMB sufrió una pérdida significativa de neuronas, con un aumento significativo en los niveles de fluorescencia correspondiente a la muerte celular, mientras que el grupo PR tuvo niveles significativamente elevados de FJC sin diferencia en el número de neuronas, medida por inmunoreactividad al NeuN, después de la inducción de neurotoxicidad. La astrogliosis determinada como el número de células positivas para GFAP no difirió entre las condiciones para ninguno de los grupos. Los altos niveles de astrogliosis en el tratamiento i.c.v. con SAL podrían explicar la falta de diferencias entre las condiciones. Este hallazgo implica que el área CA3 está protegida de manera preferencial contra el

daño excitotóxico en nuestro estudio.

Consideramos la posibilidad de que las señales de las crías pudieran formar un entorno enriquecido que se sabe que protege contra las convulsiones inducidas por KA (Young et al, 1999) y, por lo tanto, indujera la neuroprotección observada en nuestro estudio. Sin embargo, no se detectó protección contra la lesión por KA en nuestros experimentos de sensibilización del macho con exposición crónica a crías. Estos resultados deben interpretarse con cautela, ya que el protocolo de exposición (dos horas diarias, con una exposición única de 24 horas en el último día de sensibilización, exposición a crías de uno a siete días de edad) y el número de crías utilizadas fueron diferentes al del grupo P. Además, el paradigma de sensibilización impidió la interacción física directa entre machos y crías, porque las crías estaban dentro de una red metálica. El uso de malla metálica fue necesario ya que en unos experimentos pilotos, cuando los ratones macho se expusieron a crías en su caja las atacaron. Para evitar la muerte de crías se decidió usar una malla metálica que les protegiera de ataques por parte de los machos, pero no evitara los demás estímulos emitidos. Más estudios son necesarios para establecer si las interacciones con una hembra lactante y las crías fueron responsables de los efectos de la neuroprotección.

En resumen, este estudio muestra que la interacción paterna con las crías y/o la madre induce neuroprotección contra la lesión por neurotoxinas en el hipocampo de ratones macho. Es posible que la neuroprotección no esté mediada principalmente por la PRL, ya que se encontró que la isoforma monomérica bioactiva de esta hormona estaba regulada a la baja y no se encontró activación de los PRLRs a través de la fosforilación de su vía de señalización canónica, Stat-5. Sin embargo, la posible modulación de los mecanismos neuroprotectores a través de la PRL no se puede descartar por completo, ya que hubo una regulación al alza robusta y sostenida en el hipocampo de padres durante la primera semana postparto y después de la administración de KA.

1.4 Los topillos de la pradera no se protegieron contra el daño causado por KA.

Los topillos de la pradera son una especie biparental en la que ambos sexos desarrollan naturalmente cuidado parental. En nuestros experimentos de acarreo, solamente uno de los seis padres acarrió una de sus cinco crías. El día 8 las crías ya tenían desarrolladas sus habilidades motrices y se movían hacia el nido, independientemente de los padres. La falta de acarreos probablemente se deba a que no se modificó la prueba para las necesidades de la especie, con uso de separadores de piso para dificultar el movimiento de las crías, o con aumento del tiempo de espera del macho fuera de la caja de alojamiento, o con tiempos de prueba más largos. Al introducir al padre en la caja, éste se movía directamente al nido, y una vez presentes sus crías demostraba conducta paternal espontánea, con arqueamiento continuo que duró más que 60 segundos, acicalamiento corporal y anogenital. También, en momentos que no se evaluaba la conducta y estaba en el cuarto de alojamiento, los machos estaban en el nido cuidando activamente de la camada y la madre fuera

del nido. En caso de uso de especies distintas a las que usualmente se usan en experimentos de laboratorio, hay que tomar en cuenta las particularidades de cada especie, correr varios y diferentes experimentos pilotos y modificar cualquier variable que pudiera intervenir con la expresión de la conducta bajo investigación.

En el caso de los topillos de la pradera, no pudimos encontrar algún efecto positivo de la experiencia paternal ante una lesión excitotóxica. *Aunque en los experimentos pilotos se determinó que la dosis óptima era la de 100 ng de KA, no se puede descartar que una dosis menor hubiera tenido el efecto deseado para poder discernir algunos efectos positivos de la interacción.* Karelina et al (2011) demostraron que el alojamiento común con conespecíficos mejoró la recuperación después de un infarto experimental en ratones. En combinación con el hecho de que los topillos de la pradera son animales sociales, esto podría explicar parte de los resultados negativos que obtuvimos en estos experimentos. También, hay que considerar la posibilidad de que la convivencia y la conducta parental no sea una ventaja para los topillos de la pradera, ya que viven en condiciones de alojamiento social, y desde la pubertad expresan conductas aloparentales, un tipo de cuidado hacia los miembros recién nacidos de la camada que se asemeja mucho al cuidado parental. Eso podría significar que los circuitos y cambios hormonales de los padres topillos de la pradera no tengan un efecto protector tan drástico como el que se ve en el caso de los ratones, que no son animales que tradicionalmente expresan conductas de cuidado y parentales.

2. El tratamiento crónico con PRL protegió el hipocampo del ratón macho contra un daño excitotóxico.

En los experimentos de tratamiento crónico con PRL anteriormente a la exposición a neurotoxinas, mostramos que la región CA3 del hipocampo de ratones vírgenes macho está protegida de manera preferencial en comparación con el área CA4. CA1 no se encontró dañada por el tratamiento i.c.v. con KA, posiblemente debido a la vía de administración, o la cepa de ratón utilizada en nuestros experimentos, ya que diferentes cepas de ratón expresan resistencia variable a la excitotoxicidad (revisada en Zheng, Zhang y Zhu, 2011). Además, el HP contralateral no se vio afectado por la inyección de KA en términos de número de neuronas (NeuN) o células degenerativas (FJC), aunque parecía haber niveles de astrogliosis elevados (datos de observación).

Los resultados relacionados con los efectos neuroprotectores del tratamiento con PRL son similares, aunque no idénticos, a los de los experimentos realizados en ratas hembras. Las diferencias podrían deberse a la expresión diferencial de los receptores a kainato (KAR) o PRLRs entre especies, así como a los protocolos de administración de KA y PRL, que no eran idénticos a los de trabajos anteriores desarrollados en nuestro laboratorio. Además, se sabe que las ratas macho tienen una mayor densidad de KARs en el CA1 del hipocampo que las hembras en estro (Palomero-

Gallagher, Bidmon y Zilles, 2003). Eso implica que, aparte de las diferencias entre especies, las diferencias de sexo podrían explicar los resultados disímiles entre el trabajo anterior de nuestro laboratorio y los experimentos presentados aquí. En nuestros experimentos, los animales tratados con PRL mostraron una tasa de supervivencia para las neuronas más alta y un área positiva para muerte celular menor, en CA3, después de la excitotoxicidad inducida por KA, un resultado encontrado en ratas lactantes (Cabrera et al, 2009; Cabrera et al, 2013) y en ratas hembra OVX tratadas con PRL (Morales et al, 2014). Sin embargo, los niveles de astrogliosis fueron elevados en los experimentos presentes, en contraste con los resultados observados en trabajos anteriores con ratas hembra tratadas con PRL (Tejadilla et al, 2010). A pesar de que los niveles de astrogliosis o, generalmente, de GFAP se han interpretado durante mucho tiempo como un sello de la reacción del sistema al daño, no se puede concluir que el fenotipo reactivo de la astrogliosis sea perjudicial para el hipocampo, ya que existen diferentes estados de activación glial, pro y antiinflamatorio, principalmente, dentro de otros estados putativos que describen varios modelos de la astrogliosis reactiva, que afectan de manera diferencial el resultado después del daño del SNC (Liddelow y Barres, 2017). Además, debemos tener en cuenta que un área GFAP positiva mayor no significa en realidad un fenotipo de astrogliosis en el nivel de una sola célula; el análisis morfométrico de Scholl podría proporcionar información sobre el número y el largo de los procesos, una medida que aclararía si el aumento en los niveles de GFAP es el resultado de la activación reactiva de los astrocitos, al menos basados en su fenotipo morfológico.

Los resultados para el área CA4 no dieron respuestas claras, ya que las cuantificaciones para FJC, NeuN y GFAP no coincidieron y la protección que se vio aquí no está respaldada por los resultados de los grupos control utilizados en nuestro estudio. Los animales tratados con PRL expuestos a la neurotoxina no tuvieron un número significativamente menor de neuronas, o un aumento en los niveles de FJC. Sin embargo, los resultados para los grupos C y CSAL no fueron consistentes entre los marcadores de neurodegeneración, o cuando se compararon con su control correspondiente, lo que dificulta la obtención de conclusiones claras. Una posible razón para la falta de resultados consistentes en el área CA4 es la cepa de ratón utilizada en nuestros experimentos, que ha demostrado tener una gran variabilidad en los patrones de neurodegeneración después de la administración de KA, especialmente en el hilus del giro dentado (aquí etiquetado como CA4) (McLin et al, 2006). De hecho, en nuestros experimentos, la variabilidad es alta, como se puede apreciar por la dispersión de datos (barras SEM en las gráficas de la Figura 15). Otra razón de la falta de conclusiones sólidas en CA4 podría ser que la PRL no actúe en esta región, posiblemente debido a una menor densidad de PRLRs o una acción más determinante del KA en esta área.

En nuestros experimentos, la PRL se administró por vía periférica. El transporte de PRL en el SNC es un tema controversial. Tradicionalmente, se cree que la PRL se une a los PRLRs presentes en la barrera hematoencefálica y se transporta al parénquima cerebral a través de sus receptores, que se

encuentran abundantemente en el plexo coroideo, una región que cubre los ventrículos cerebrales y participa en la producción del líquido cefaloraquídeo (LCR). Sin embargo, un estudio reciente de Brown et al (2015) que investigó el sistema de transporte de PRL en el SNC mostró que la PRL no requiere de la presencia de PRLRs funcionales para su transporte en el cerebro, ya que en los ratones PRLR^{-/-}, la PRL radiomarcada fue detectada en el LCR del plexo coroideo. La difusión, como método de transporte pasivo, desde los vasos sanguíneos al LCR, no puede excluirse como un posible mecanismo para que la PRL ingrese al cerebro, a pesar de ser el método más común en el transporte de moléculas pequeñas y no de proteínas del peso molecular de la PRL. Además, otra molécula de transporte podría estar involucrada en el mecanismo de entrada de PRL, aún por identificar. En nuestros experimentos, usando el control sin manipulación y el control tratado con salina, vimos que la PRL tuvo un efecto protector, aunque no se evaluó la vía de transporte de la PRL al CNS.

CAPÍTULO VI

Conclusiones

En los experimentos presentados en esta tesis:

- Los ratones C57BL/6J no expresaron cuidado paternal hacia sus crías, al contrario de lo que se ha visto en trabajos de otros laboratorios. En el mismo modelo, los machos no presentaron daño cuantificable en el hipocampo después de la administración de ácido kaínico, indicando que no es un modelo adecuado para estudiar fenómenos relacionados con daño y neuroprotección en lesiones con KA. (Objetivo “a”)

– Aproximadamente la mitad de los ratones CD-1 con experiencia paternal desarrollaron conductas de cuidado hacia las crías, como antes reportado en la bibliografía. Los ratones padres que no desarrollaron conducta paternal, no exhibieron conductas de agresión hacia las crías.

– Los ratones padres de la cepa CD-1 se protegieron contra el daño excitotóxico en las áreas CA3 y CA4 del hipocampo. Esta protección no depende de la conducta paternal, ya que los ratones que no expresaron cuidado parental, no sufrieron cambios significativos en los marcadores de muerte celular, de neurodegeneración y de astrogliosis en comparación con sus controles. (Objetivo “a”)

– Los niveles de la PRL monomérica se regulan a la baja en el hipocampo de ratones padres CD-1 durante la primera semana posparto. Al mismo tiempo la PRL dimérica se regula a la alza. (Objetivo “e”)

– Los niveles de la PRL monomérica se regulan a la baja mientras la PRL dimérica se regula a la alza en el hipocampo de ratones padres CD-1 después de un daño excitotóxico. (Objetivo “c”)

– Aunque no se detectaron cambios en los niveles proteícos del I-PRLR y la vía de señalización MAPK, se detectó un aumento significativo en la vía de señalización intracelular pAkt después de la inducción de una lesión excitotóxica en el hipocampo de los ratones CD-1 con experiencia paternal. La pAkt está implicada en mecanismos de supervivencia celular que pudieran participar en la protección vista en los experimentos presentes. (Objetivo “d”)

– El hipocampo de ratones machos vírgenes expuestos a estímulos sensoriales por parte de las crías no proveó protección contra el daño excitotóxico. (Objetivo “f”)

– El hipocampo de los topillos de la pradera con experiencia paternal no se protegió contra el daño excitotóxico, indicando que los resultados que obtuvimos de los experimentos con los ratones padres CD-1, no son globales y no se pueden replicar en este modelo de paternidad natural. (Objetivo “g”)

– El tratamiento crónico con PRL exógena provee protección en el área CA3 del hipocampo de ratones macho vírgenes CD-1 ante una lesión excitotóxica. Sin embargo, no tiene un efecto protector claro en el área hipocampal CA4. (Objetivo “b”)

En el presente trabajo se encontró un efecto de la paternidad antes no conocido. Sin embargo, este proyecto tuvo varias limitaciones, ya que no se pudo descifrar el o los mecanismos específicos que participan en la neuroprotección del hipocampo de ratones-padres. Tampoco sabemos si esta protección en la primera semana posparto es un efecto transitorio o persistente. Futura investigación sobre este tema debería averiguar si otras hormonas implicadas en la conducta paternal (p.ej. oxitocina) son las responsables de la neuroprotección vista en este modelo. La participación de la PRL en este proceso no se puede descartar completamente, por lo cual en el futuro deberíamos enfocarnos en análisis más adecuados y puntuales (p.ej. la activación de Stat-5 en diferentes tipos de células) que pudieran dejar claras respuestas sobre el papel de esta hormona en el proceso de neuroprotección social. También, otro enfoque interesante de la paternidad sería los efectos neuroprotectores a largo plazo.

La PRL exógena tuvo efecto neuroprotector en el hipocampo de ratones macho vírgenes. Sin embargo, no se pudo concluir si los mecanismos implicados en este proceso son los mismos que en las hembras. Es de interés para la futura investigación encontrar las vías intracelulares que participan en este proceso. Tampoco pudimos investigar la razón por la neuroprotección específica en CA3 y no en CA4. Sería interesante analizar la expresión del PRLR en el hipocampo o la activación de las células positivas para PRLR de cada región hipocámpal específica. Eso nos proporcionaría respuestas sobre la especificidad de la protección por PRL exógena.

Bibliografía

Akther S, Huang Z, Liang M, et al. (2015) Paternal Retrieval Behavior Regulated by Brain Estrogen Synthetase (Aromatase) in Mouse Sires that Engage in Communicative Interactions with Paimates. *Frontiers in Neuroscience*, 9, 450.

Amaral D.G., Witter M.P. (1995). IV Forebrain, 21 Hippocampal Formation. In G. Paxinos, *The rat nervous system* (2nd ed., pp. 443-493). San Diego, California: Academic Press.

Aragona BJ, Wang Z (2004) The prairie vole (*Microtus ochrogaster*): an animal model for behavioral neuroendocrine research on pair bonding. *ILAR Journal*, 45(1), 35-45.

Bales KL, Saltzman W (2016) Fathering in rodents: neurobiological substrates and consequences for offspring. *Hormones and Behavior*, 77, 249-259.

Bartke A (2004) Prolactin in the male: 25 years later. *Journal of Andrology*, 25(5), 661-666.

Basu J, Siegelbaum S.A. (2015) The Corticohippocampal Circuit, Synaptic Plasticity, and Memory. *Cold Spring Biol*, 7:a021733.

Berg SJ, Wynne-Edwards KE (2001) Changes in testosterone, cortisol, and estradiol levels in men becoming fathers. *Mayo Clinic Proceedings*, 76(6), 582-592.

Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly PA (1998) Prolactin (PRL) and its receptors: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocrine Reviews*, 19(3), 225-268.

Bortolotto ZA, Nistico R, More JC, Jane DE, Collingridge GL (2005) Kainate Receptors and Mossy Fiber LTP. *Neurotoxicology*, 26, 769-777.

Bos PA (2017) The endocrinology of human caregiving and its intergenerational transmission. *Developmental Psychopathology*, 29, 971-999.

Bosch OJ, Nair HP, Ahern TH, Neumann ID, Young LJ (2009) The CRF system mediates increased passive stress-coping behavior following the loss of a bonded partner in a monogamous rodent. *Neuropsychopharmacology*, 34(6), 1406-1415.

Bridges SR (2015) Long-term alterations in neural and endocrine processes induced by motherhood in mammals. *Hormones and Behavior*, 77, 193-203.

Bridges RS, Grattan DR (2019) 30 years after: CNS actions of prolactin: Sources, mechanisms and physiological significance. *Journal of Neuroendocrinology*, 31, e12669.

Cabrera V, Cantú D, Ramos E, Vanoye-Carlo A, Cerbón M, Morales T. (2009) Lactation is a natural model of hippocampus neuroprotection against excitotoxicity. *Neuroscience Letters*, 461(2), 136-139.

Cabrera V, Ramos E, González-Arenas A, Cerbón M, Camacho-Arroyo I, Morales T (2013) Lactation reduces glial activation induced by excitotoxicity in the rat hippocampus. *Journal of Neuroendocrinology*, 25, 519-527.

Casson RJ, Childlow G, Ebner A, Wood JPM, Crownston J, Goldberg I (2012) Translational neuroprotection research in glaucoma: a review of definitions and principles. *Clinical and Experimental*

Ophthalmology, 40, 350-357.

Chakrabarti M, Haque A, Banik NL, Nagarkatti P, Nagarkatti M, Ray SK (2014) Estrogen receptor agonists for attenuation of neuroinflammation and neurodegeneration. *Brain Research Bulletin*, 109, 22-31.

Cooke SF, Bliss TVA (2006) Plasticity in the human central nervous system. *Brain*, 129, 1659-1673.

Craft TK, Ghasper ER, McCullough L, Zhang N, Sugo N, Otsuka T, Hurn PD, DeVries AC (2005) Social interaction improves experimental stroke outcome. *Stroke*, 36(9), 2006-2011.

Dobolyi A, Grattan DR, Stolzenberg DS (2014) Preoptic inputs and mechanisms that regulate maternal responsiveness. *Journal of Neuroendocrinology*, 26, 627-640.

Dulac C, O'Connell LA, Wu Z (2014) Neural control of maternal and paternal behaviors. *Science*, 345(6198), 765-770.

Edelstein RS, Wardecker BM, Chopik WJ, Moors AC, Shipman EL, Lin NJ (2015) Prenatal hormones in first-time expectant parents: Longitudinal changes and within-couple correlations. *American Journal of Human Biology*, 27(3), 317-325.

Engler-Chiurazzi EB, Singh M, Simpkins JW (2016) From the 90's to now: a brief historical perspective of more than two decades of estrogen neuroprotection. *Brain Research*, 1633, 96-100.

Ferraris J, Bernichtein S, Pisera D, Goffin V (2013). Use of prolactin receptor antagonist to better understand prolactin regulation of pituitary homeostasis. *Neuroendocrinology*, 98, 171-179.

Franssen CL, Bardi M, Shea EA, Hampton JE, Adam Franssen R, Kinsley CH, Lambert KG (2011) Fatherhood alters behavioural and neural responsiveness in a spatial task. *Journal of Neuroendocrinology*, 23, 1177-1187.

Freeman ME, La Kanyicka B, Lerant A, Nagy G (2000). Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiological Reviews*, 80, 1523-1631.

Frick KM, Kim J, Tuscher JJ, Fortress AM (2015) Sex steroid hormones matter for learning and memory: estrogenic regulation of hippocampal function in male and female rodents. *Learning and Memory*, 18(22), 472-493.

Gettler LT (2014) Applying socioendocrinology to evolutionary models: Fatherhood and Physiology. *Evolutionary Anthropology*, 23(146), 146-160.

Ghasper ER, Kozorovitskiy Y, Pavlic A, Gould E (2011) Paternal experience suppresses adult neurogenesis without altering hippocampal function in *peromyscus californicus*. *The Journal of Comparative Neurology*, 519, 2271-2281.

Ghasper ER, Schoenfeld TJ, Gould E (2012) Adult neurogenesis: optimizing hippocampal function to suit the environment. *The Journal of Comparative Neurology*, 227(2), 380-383.

Ghasper ER, Hyer MM, Katakam J, Harper R, Ameri C, Wolz T (2016) Fatherhood contributes to increased hippocampal spine density and anxiety regulation in California mice. *Brain and Behavior*, 6(1), e00416.

Gordon I, Zagoory-Sharon O, Leckman JF, Feldman R (2010) Prolactin, Oxytocin, and the development of paternal behavior across the first six months of fatherhood. *Hormones and Behavior*, 58(3), 513-518.

Gregg C (2009) Pregnancy, prolactin and white matter regeneration. *Journal of the Neurological Sciences*, 285, 22-27 .

Hanson DK, Roes MM, Galea LAM (2016) Sex hormones and cognition: Neuroendocrine influences on memory and Learning. *Comprehensive Physiology*, 6, 1295-1337.

Hoffman GE, Moore N, Fiskum G, Murphy AZ (2003) Ovarian steroid modulation of seizure severity and hippocampal cell death after kainic acid treatment. *Experimental Neurology*, 182(1), 124-134.

Hyer MM, Hunter TJ, Katakam J, Wolz T, Glasper ER (2016) Neurogenesis and anxiety-like behavior in male California mice during the mate's postpartum period. *European Journal of Neuroscience*, 43, 703-709.

Ignacak A, Kaztelnik M, Sliwa T, Korbut RA, Rajda K, Guzik TJ (2012) Prolactin – not only lactotrophin, a “new” view of the “old” hormone. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 63(5), 435-443.

Insel TR, Young L, Wang Z (1997) Molecular aspects of monogamy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 302-316.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (2000). *Principles of Neural Science* (4th ed.). New York, NY: McGraw-Hill.

Kaneko Y, Pappas C, Tajiri N, Borlongan CV (2016) Oxytocin modulates GABAAR subunits to confer neuroprotection in stroke in vitro. *Scientific Reports*, 6, 35659.

Karelina K, Stuller KA, Jarrett B, Zhang N, Wells J, Norman GJ, DeVries AC (2011) Oxytocin mediates social neuroprotection after cerebral ischemia. *Stroke*, 42(12), 3606-3611.

Kinsley CH, Amory-Meyer E (2011) Why the maternal brain? *Journal of Neuroendocrinology*, 23, 974-983.

Lai TW, Zhang S, Wang YT (2014) Excitotoxicity and stroke: Identifying novel targets for neuroprotection. *Progress in Neurobiology*, 115, 157-188.

Larsen CM, Grattan DM (2010) Prolactin-induced mitogenesis in the subventricular zone of the maternal brain during early pregnancy is essential for normal postpartum behavioral responses in the mother. *Endocrinology*, 151(8), 3805-3814.

Lau A, Tymianski M (2010) Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *European Journal of Physiology*, 460, 525-542.

Leuner B, Glasper ER, Gould E (2010) Parenting and plasticity. *Trends in Neuroscience*, 33(10), 465-473.

Levy F, Gheusi G, Keller M (2011) Plasticity in the parental brain: a case of neurogenesis. *Journal of Neuroendocrinology*, 23, 984-993.

Li G, Pleasure SJ (2014). The development of hippocampal cellular assemblies. *WIREs Dev Biol*, 3, 165-177.

Liang M, Zhong J, Liu H-X, Lopatina O, Nakada R, Yamauchi A-M, Higashida H (2014) Pairmate-dependent pup retrieval as parental behavior in male mice. *Frontiers in Neuroscience*, 8(186), 1-10.

Liddelow SA, Barres BA (2017) Reactive astrocytes: production, function and therapeutic potential. *Immunity*, 46, 957-967.

Lieberwirth C, Wang Y, Jia X, Liu Y, Wang Z (2013) Fatherhood reduces the survival of adult-generated cells and affects various types of behaviors in the prairie vole (*Microtus ochrogaster*). *European Journal of Neuroscience*, 38(9), 3345-3355.

Lippi G, Plebani M (2016) Macroprolactin: searching for a needle in the haystack? *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 54(4), 519-522.

Liu HX, Lopatina O, Higashida C, Fujimoto H, Akther S, Inzhutova A, Liang M, Zhong J, Tsuji T, Yoshihara T, Sumi K, Ishiyama M, Ma WJ, Ozaki M, Yagitani S, Yokoyama S, Mukaida N, Sakurai T, Hori O, Yoshioka K, Hirao A, Kato Y, Ishihara K, Kato I, Okamoto H, Cherepanov SM, Salmina AB, Hirai H, Asano M, Brown DA, Nagano I, Higashida H (2013) Displays of paternal mouse pup retrieval following communicative interaction with maternal mates. *Nature Communications*, 4, 1346.

Lonstein JS, De Vries GJ (2000) Sex differences in the parental behavior of rodents. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 24, 669-686.

Mairesse J, Zinni M, Pansiot J, Hassan-Abdi R, Demene C, Colella M, Charriaut-Marlangue C, Rideau Batista Novais A, Tanter M, Maccari S, Gressens P, Vaiman D, Soussi-Yanicostas N, Baud O (2018) Oxytocin receptor agonist reduces perinatal brain damage by targeting microglia. *Glia*, 67(2), 345-359.

Mahmoud R, Wainwright SR, Galea LAM (2015) Sex hormones and adult hippocampal neurogenesis: regulation, implications and potential mechanisms. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 41, 129-152.

Mak S, Weiss GM (2010) Paternal recognition of adult offspring mediated by newly generated CNS neurons. *Nature Neuroscience*, 13(6), 753-760.

Mann PE, Bridges RS (2001) Lactogenic hormone regulation of maternal behavior. *Progress in Brain Research*, 133, 251-262.

McKhann II GM, Wenzel HJ, Robbins CA, Sosunov AA, Schwartzkroin PA (2003) Mouse strain differences in kainic acid sensitivity, seizure behavior, mortality, and hippocampal pathology. *Neuroscience*, 122, 551-561.

Miladinovic T, Nashed MG, Singh G (2015) Overview of glutamatergic dysregulation in central pathologies. *Biomolecules*, 5, 3112-3141.

Mödersheim TAE, Gorba T, Pathipati P, Kokay IC, Grattan DR, Williams CE, Scheepens A (2007) Prolactin is involved in glial responses following a focal injury to the juvenile rat brain. *Neuroscience*,

145, 963-973.

Monasterio N, Vergara E, Morales T (2014) Hormonal influences on neuroimmune responses in the CNS of females. *Frontiers in Integrative Neuroscience*, 7(110), 1-8.

Morales T (2011) Recent findings on neuroprotection against excitotoxicity in the hippocampus of female rats. *Journal of Neuroendocrinology*, 23, 994-1001.

Morales T, Lorenson M, Walker AM, Ramos E (2014) Both prolactin (PRL) and a molecular mimic of phosphorylated PRL, S179D-PRL, protect the hippocampus of female rats against excitotoxicity. *Neuroscience*, 258, 211-217.

Ortiz-Pérez A, Limón-Morales O, Rojas-Castañeda JC, Cerbón M, Picazo O (2018) Prolactin prevents the kainic acid-induced neuronal loss in the rat hippocampus by inducing prolactin receptor and putatively increasing the VGLUT overexpression. *Neuroscience Letters*, 694, 116-123.

Pawluski JL, Lambert KG, Kinsley CH (2016) Neuroplasticity in the maternal hippocampus: Relation to cognition and effects of repeated stress. *Hormones and Behavior*, 77, 86-97.

Paxinos G, Franklin KBJ (2001). *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. San Diego: Academic Press.

Pereira M, Ferreira A (2016) Neuroanatomical and neurochemical basis of parenting: Dynamic coordination of motivational, affective and cognitive processes. *Hormones and Behavior*, 77, 72-85.

Petrovic MM, da Silva SV, Clement JP, Vyklicky L, Mulle C, González-González IM, Henley JM (2017) Metabotropic action of postsynaptic kainate receptors triggers hippocampal long-term potentiation. *Nature Neuroscience*, 20(4), 529-539.

Pinheiro P, Mulle C (2006) Kainate receptors. *Cell Tissue Research*, 326, 457-482.

Reyes-Mendoza J, Morales T (2016) Post-treatment with prolactin protects hippocampal CA1 neurons of the ovariectomized female rat against kainic acid-induced neurodegeneration. *Neuroscience*, 22(328), 58-68.

Rilling JK (2013) The neural and hormonal bases of human parental care. *Neuropsychologia*, 51, 731-747.

Rilling JK, Young LJ (2014) The biology of mammalian parenting and its effect on offspring social development. *Science*, 345, 771-776.

Rivero-Segura NA, Flores-Soto E, García de la Cadena S, Coronado-Mares I, Gomez-Verjan JC, Ferreira DG, Cabrera-Reyes EA, Lopes LV, Massieu L, Cerbón M (2017) Prolactin-induced neuroprotection against glutamate excitotoxicity is mediated by the reduction of [Ca²⁺]_i overload and NF-κB activation. *PloS One*, 12(5), e0176910.

Salinas J, Beiser A, Himali JJ, Satizabal CL, Aparicio HJ, Weinstein G, Mateen FJ, Berkman LF, Rosand J, Seshadri S (2017) Associations between social relationship measures, serum brain-derived neurotrophic factor, and risk of stroke and dementia. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*, 3, 229-237.

Saltzman W, Ziegler TE (2014) Functional Significance of Hormonal Changes in Mammalian Fathers. *Journal of Neuroendocrinology*, 26(10), 685-696.

Smale L, Nelson RJ, Zucker I (1988) Daylength influences pelage and plasma prolactin concentrations but not reproduction in the prairie vole, *Microtus ochrogaster*. *Journal of Reproduction and Fertility*, 83(1), 99-106.

Spée M, Beaulieu M, Dervaux A, Chastel O, Le Maho Y, Raclot T. (2010) Should I stay or should I go? Hormonal control of nest abandonment in a long-lived bird, the Adélie penguin. *Hormones and Behavior*, 58(5), 762-768.

Stein DG (2008) Progesterone exerts neuroprotective effects after brain injury. *Brain Research Reviews*, 57(2), 386-397.

Tachikawa KS, Yoshihara Y, Kuroda KO (2013) Behavioral transition from attack to parenting in male mice: a crucial role for the vomeronasal system. *The Journal of Neuroscience*, 33(12), 5120-5126.

Tejadilla D, Cerbón M, Morales T (2010) Prolactin reduces the damaging effects of excitotoxicity in the dorsal hippocampus of the female rat independently of ovarian hormones. *Neuroscience*, 169, 1178-1185.

Thierry AM, Brajon S, Massemin S, Handrich Y, Chastel O, Raclot T (2013) Decreased prolactin levels reduce parental commitment, egg temperatures, and breeding success of incubating male Adélie penguins. *Hormones and Behavior*, 64(4), 737-747.

Torner L, Karg S, Blume A, Kandasamy M, Kuhn HG, Winkler J, Aigner L, Neumann ID (2009) Prolactin prevents chronic stress-induced decrease of adult hippocampal neurogenesis and promotes neuronal fate. *Journal of Neuroscience*, 29(6), 1826-1833.

Tymianski M, Charlton MP, Carlen PL, Tator CH (1993) Source specificity of early calcium neurotoxicity in cultured embryonic spinal neurons. *Journal of Neuroscience*, 13(5), 2085-2104.

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. *Hormones and Behavior*, 53(1), 112-123.

Venna RV, McCullough LD (2011) "Won't you be my neighbor?" Deciphering the mechanisms of neuroprotection induced by social interaction. *Stroke*, 42(12), 3329-3330.

Vergara-Castañeda E, Grattan DR, Pasantes-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 Research*, 1636, 193-199.

Vincent P, Mulle C (2009) Kainate receptors in epilepsy and excitotoxicity. *Neuroscience*, 158, 309-323.

Wang Q, Yu S, Simonyi A, Sun GY, Sun AY (2005) Kainic Acid-Mediated Excitotoxicity as a Model for Neurodegeneration. *Molecular Neurobiology*, 31, 3-16.

Wang Y, Qin Z-H (2010) Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death. *Apoptosis*, 15, 1382-1402.

Winkler AS, Landau S, Chaudhuri KR (2002) Serum prolactin levels in Parkinson's disease and multiple system atrophy. *Clinical Autonomic Research*, 12, 393-398.

Wynne-Edwards KE, Timonin ME (2007) Parental care in rodents: Weakening support for hormonal regulation of the transition to behavioral fatherhood in rodent animal models of biparental care. *Hormones and Behavior*, 52, 114-121.

Wu Z, Autry AE, Bergan JF, Watabe-Uchida M, Dulac CG. (2014). Galanin neurons in the medial preoptic area govern parental behaviour. *Nature*, 509 (7500), 325-330.

Young D, Lawlor PA, Leone P, Dragunow M, During MJ (1999) Environmental enrichment inhibits spontaneous apoptosis, prevents seizures and is neuroprotective. *Nature Medicine*, 5(4), 448-453.

Young KA, Gobrogge KL, Liu Y, Wang Z (2011) The neurobiology of pair bonding: insights from a social monogamous rodent. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 32(1), 53-69.

Zhao EY, Efendizade A, Cai L, Ding Y (2016) The role of Akt (protein kinase B) and protein kinase C in ischemia-reperfusion injury. *Neurological Research*, 38(4), 301-308.

Zheng X-Y, Zhang H-L, Luo Q, Zhu J (2011) Kainic acid-induced neurodegenerative model: potentials and limitations. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, vol. 2011, Article ID 457079, 10 pages, 2011. doi:10.1155/2011/457079.

Zimberknopf E, Xavier GF, Kinsley CH, Felicio LF (2011) Prior parity positively regulates learning and memory in young and middle-aged rats. *Comparative Medicine*, 61(4), 366-377.