

Cambios en la plasticidad cortical auditiva inducidos por la prolactina

Alba Cáceres Rodríguez

Máster en Neurociencia



MÁSTERES
DE LA UAM
2019 – 2020

Facultad de Ciencias



Master en
Neurociencia
UAM



TRABAJO FIN DE MÁSTER

Cambios en la plasticidad cortical auditiva inducidos por la prolactina

Autora: **Alba Cáceres Rodríguez**

Madrid, 12 de marzo de 2020



Master en
Neurociencia
UAM



TRABAJO FIN DE MÁSTER

Cambios en la plasticidad cortical auditiva inducidos por la prolactina

Autora: **Alba Cáceres Rodríguez**

Director: **Eduardo Daniel Martín Montiel**

Afiliación: Instituto Cajal (CSIC).

Av. Doctor Arce, 37, Madrid.

Tutor: **David Fernández de Sevilla**

Afiliación: Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid

C/ Arzobispo Morcillo, 4, Madrid

Madrid, 12 de marzo de 2020

INDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	Conducta maternal	1
➤	Concepto de conducta maternal	1
➤	Lactancia	3
➤	Interacción madre-cría	4
1.2.	El papel de las hormonas. La prolactina	5
➤	Concepto de hormona	5
➤	La PROLACTINA	6
1.3.	Plasticidad de la corteza auditiva y su interacción con las hormonas	13
➤	Concepto de plasticidad sináptica	13
➤	Vías auditivas	14
➤	Plasticidad en la corteza auditiva	16
2.	OBJETIVOS	19
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	20
3.1.	Animales	20
3.2.	Protocolo experimental	20
3.3.	Tratamiento. Implante de bomba osmótica	21
3.4.	Grabación y procesamiento de las vocalizaciones de las crías	21
3.5.	Preparación e implante de electrodos	22
➤	Cirugía estereotáxica para el implante de electrodos.	22
3.6.	Electrofisiología <i>in vivo</i>	23
➤	Equipo de adquisición y de estimulación	23
➤	Protocolo de estimulación y registro	24
➤	Análisis de datos	24
3.7.	Extracción y conservación de hipófisis	30
3.8.	Histerectomía	30

3.9.	Análisis estadístico	31
4.	RESULTADOS	32
4.1.	Análisis de las vocalizaciones de las crías	32
4.2.	Comparación de los AEPs entre hemisferios	32
4.3.	Análisis de la respuesta inducida por las vocalizaciones de las crías	34
4.4.	Análisis de la respuesta evocada por estimulación con frecuencias puras	37
4.5.	Comprobación de la eficacia del modelo de hiperprolactinemia	40
5.	DISCUSIÓN	42
5.1.	Modificación de las frecuencias que componen el AEP. Correlato funcional	43
5.2.	Efecto no lateralizado de la prolactina	45
5.3.	Validez del modelo de hiperprolactinemia y lactancia	45
5.4.	Limitaciones	46
5.5.	Perspectivas futuras	47
6.	CONCLUSIONES	48
7.	BIBLIOGRAFIA	49

RESUMEN

Durante la gestación y la lactancia ocurren numerosas adaptaciones funcionales en el cerebro materno que son fundamentales para la supervivencia de la progenie. Evidencias clínicas y experimentales indican que los altos niveles de prolactina (PRL) circulante, presentes durante la lactancia, pueden contribuir al desarrollo de esos cambios adaptativos. Si bien es conocida la importante función que tiene el sistema endocrino sobre la actividad del sistema nervioso en etapas críticas de la vida, se desconoce el papel de hormonas como la PRL en la remodelación de la corteza auditiva (CA) en respuesta a estímulos sonoros emitidos por la progenie durante la lactancia. Por lo tanto, el objetivo de este proyecto es estudiar las modificaciones en la actividad neural de la CA en un modelo de hiperprolactinemia. Para la consecución de este objetivo, se emplearon técnicas electrofisiológicas con implantes de electrodos crónicos en A1. Se registraron potenciales auditivos evocados (AEP, del inglés *auditory evoked potential*) en animales despiertos tratados con domperidona (como modelo de hiperprolactinemia) y en animales control tratados con vehículo. Como estímulo auditivo se emplearon grabaciones de las emisiones sonoras de las crías durante la lactancia y tonos puros a distintas frecuencias. Los datos indican que el modelo de hiperprolactinemia, inducida por domperidona, modifica los AEPs en A1. En concreto, se observa una reducción de la potencia del componente 0.1-20 Hz en los AEPs subsecuentes a una estimulación con el audio de las vocalizaciones de las crías. Este cambio sugiere que la PRL (a concentraciones similares a las observadas durante la lactancia) condiciona la respuesta de la corteza auditiva ante el estímulo de las crías, lo que puede ser una consecuencia adaptativa clave para la supervivencia de éstas.

Palabras claves: Prolactina, vocalizaciones, conducta maternal, lactancia, corteza auditiva primaria, plasticidad cortical, potenciales auditivos evocados.

ABSTRACT

During pregnancy and lactation there are multiple adaptive changes in the mother's brain that are essential for the survival of the progeny. Clinical and experimental evidences indicate that prolactin (PRL), present during lactation, can contribute to the development of these adaptive modifications. While the importance of the endocrine system on the activity of neuronal networks in critical stages of life is well established, the role of PRL on the remodeling of the auditory cortex (CA) in response to sound stimuli emitted by the pups during lactation is still unknown. Therefore, the aim of this project is to study the modifications on neural activity of the CA in a model of hyperprolactinemia. To reach this objective, we used electrophysiological techniques with chronic electrode implants in the primary auditory cortex (A1) in order to record auditory evoked potentials (AEPs). The studies were conducted in awake animals treated with domperidone (as a model of hyperprolactinemia) and in control animals treated with vehicle. For the auditory stimuli we used recordings of pup's vocalizations during lactation, as well as trials of pure tones at different frequencies. Our data suggest that an increase in serum levels of PRL modifies the AEPs in A1. Specifically, there is a reduction of the frequencies between 0.1-20Hz of the AEP following stimulations with pups' vocalizations. This result suggests that an increase in the serum PRL levels in nulliparous females induces changes at A1 network in response to pups' vocalizations that may be relevant to the survival of the offspring.

Key words: Prolactin, vocalizations, maternal behaviour, lactation, primary auditory cortex, cortical plasticity, auditory evoked potentials.

ABREVIATURAS

A1/2	corteza auditiva primaria/secundaria
AAF	área anterior auditiva
ADH	vasopresina
AEP	potencial evocado auditivo
ARCN	núcleo arqueado
ATV	área tegmental ventral
CA	corteza auditiva
CNC	núcleos cocleares
COS	complejo olivar superior
CRH	hormona liberadora de corticotropina
DA	dopamina
DP	área dorsoposterior
GABA	ácido γ -aminobutírico
HPA	eje hipotálamo-hipofisiario-adrenal
kDa	(kilo)daltons
(k)Hz	(kilo)hercios
LFP	potencial local de campo
LH	hormona luteinizante
LTD	depresión a largo plazo
LTP	potenciación a largo plazo
mAMY	amígdala medial
mPOA	área preóptica medial
NE / E	norepinefrina / epinefrina
NGM	núcleo geniculado medial
OX	oxitocina
NLL	núcleo del lemnisco lateral

PRL	prolactina
PRL-R	receptor de prolactina
PVN	núcleo paraventricular
REM	movimientos oculares rápidos
S1	corteza somatosensorial primaria
SNC	sistema nervioso central
SON	núcleo supraóptico
SVZ	zona subventricular
TIDA	neuronas dopaminérgicas tuberoinfundibulares
TRH	hormona liberadora de tirotrópina
UF	área ultrasonidos
USVs	vocalizaciones ultrasonido
WC	vocalizaciones durante la lactancia

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Conducta maternal

➤ *Concepto de conducta maternal*

Durante la maternidad ocurren numerosos cambios fisiológicos en todo el organismo, incluido el sistema nervioso central (1–4). Estos cambios constituyen la base del comportamiento maternal, aumentando la predisposición de las hembras a detectar las necesidades de sus crías y satisfacerlas (5–13).

El comportamiento maternal engloba todas aquellas acciones y/o respuestas de la hembra que apoyan el desarrollo y crecimiento de su descendencia, y la consecuente supervivencia de la especie. La capacidad de responder con este tipo de conductas aparece desde la adolescencia, pero la respuesta maternal se acrecienta considerablemente después del parto. El control de estas conductas tiene una fuerte base neuroendocrina (14,15) y algunos ejemplos representativos son la construcción del nido, el aumento del apetito materno (16), la ingestión de la placenta, el aseo de las crías, el amamantamiento o la protección de las crías (14).

La respuesta de la madre está condicionada por el contexto, modificándose su comportamiento en función de los estímulos en su entorno más inmediato (5). La circuitería neural involucrada en ello es compleja y continúa siendo objeto de estudio. Como simplificación se puede afirmar que el área preóptica medial del hipotálamo (mPOA, del inglés *medial preoptic area*), es esencial en la integración de las señales hormonales para estimular la conducta maternal y cuidados asociados (14,17,18). Además, el mPOA interacciona con el área tegmental ventral (ATV), lo que permite estimular al circuito de recompensa y afianzar la conducta. Esto explica, por ejemplo, que la succión durante la lactancia estimule más el circuito de recompensa que la cocaína (14,19).

Mientras que en roedores la interacción de las hormonas es esencial para que se establezca el comportamiento maternal, en primates no humanos y tal vez en mujeres, el papel del sistema endocrino parece ser de carácter modulador. A su vez, con el aumento de la experiencia reproductiva, las hembras reducen su dependencia de dicha estimulación endocrina para llevar a cabo estas conductas (14). Las hormonas y/o neuropéptidos más importantes que condicionan al cerebro materno son: estrógenos, progesterona, oxitocina (OX) y hormonas lactogénicas como la prolactina (PRL) y el lactógeno placentario (14), que actúan de forma combinada para estimular el comportamiento maternal (20).

Los estrógenos son esenciales para la inducción de la conducta maternal y la progesterona regula tanto dicha conducta como la lactogénesis (14), mediante modificaciones en la expresión del receptor de prolactina (PRL-R) entre otros. De forma simplificada, durante el embarazo los niveles de progesterona y estradiol provocarían un descenso del ARNm del PRL-R en el mPOA (20) inhibiéndose la conducta maternal. La caída en los niveles de progesterona postparto provocaría el efecto contrario, estimulando la conducta maternal. El silenciamiento selectivo del gen de la progesterona parece estimular la conducta maternal, lo que imitaría la caída en los niveles de progesterona postparto (20,21).

En el mPOA también actúan las hormonas lactogénicas, influyendo en la conducta maternal (22). Tanto en roedores (23) como en humanos (24) el lactógeno placentario, al igual que la PRL, es capaz de llegar al líquido cefalorraquídeo, lo que permitiría una comunicación endocrina entre el feto y sus envueltas en desarrollo con el cerebro materno (23).

Los estudios en *knock-out* para estas hormonas permiten afirmar que no hay un único mediador de la conducta maternal, sino que una gran cantidad de factores endocrinos contribuye a aumentar la percepción sensorial de la hembra hacia estímulos relacionados con sus crías, para así poder cuidarlas correctamente. Desde el punto de vista evolutivo sería muy peligroso que el control de un patrón de conducta tan importante para la supervivencia de la especie estuviera regido por una única molécula. Por ello, en la regulación de la conducta maternal parece favorecerse la existencia de numerosos elementos moduladores, a pesar de su posible efecto redundante (14).

La memoria maternal se define como la retención a largo plazo de las conductas asociadas a la maternidad e interacción con las crías (25). Esto facilitaría el cuidado de subsecuentes camadas, pues múltiples partos tienen un efecto acumulativo para aumentar la atención y la efectividad con la que las madres atienden a sus crías (26,27), así como la activación de las áreas encargadas de las conductas de cuidado maternal (28,29). La memoria materna está claramente condicionada por la actividad del núcleo accumbens y la amígdala medial (mAMY, del inglés *medial amygdala*) (30,31). La implicación del área tegmental ventral (ATV) y su interacción con la mAMY también ha sido descrita más recientemente (32). Existe también una influencia epigenética sobre la memoria materna, que se desvela en cómo la hembra se ve condicionada por la experiencia que recibe de su propia madre en los primeros momentos de vida (33). Además, está en estudio el papel de la neurogénesis en el establecimiento de la conducta y la memoria maternal. La supresión de la neurogénesis se asoció con déficits en la conducta maternal y la aparición de dicha conducta está asociada a un aumento de la neurogénesis en la

zona subventricular (SVZ) (34), e incluso la PRL podría estar involucrada en esta modulación (35). Sin embargo esta relación aún no está clara, ya que no se sabe si la conducta genera neurogénesis para establecer una memoria de los patrones de cuidado, o si se necesita neurogénesis para la adquisición de dichos patrones (14).

➤ *Lactancia*

La lactancia es una de las conductas asociadas a la maternidad propia de mamíferos, en la que se secreta leche de las glándulas mamarias para alimentar a las crías. El proceso de síntesis de dicha leche se denomina lactogénesis o galactopoyesis y está regulado por la PRL. La lactogénesis hace referencia a la producción de leche los primeros días tras el parto y está controlada por el sistema neuroendocrino. Cuando se estabiliza el abastecimiento de leche se pone en marcha un control autocrino de la galactopoyesis (36).

Otras hormonas involucradas son la progesterona y los estrógenos, que estimulan el crecimiento de las glándulas mamarias e inhiben la secreción de leche durante el embarazo. A partir del parto y coincidiendo con la bajada en los niveles de estas hormonas se inicia la secreción de leche (14,36,37).

La OX (producida por los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo) es un neuropéptido que también está relacionado con la conducta maternal. Actúa a nivel de mPOA y ATV (38) incrementando la motivación para responder a las necesidades de las crías, mediante la disminución de la ansiedad. Por otra parte, la OX es esencial en la contracción de las células mioepiteliales del tejido mamario para la eyección de la leche en respuesta a la succión, lo que se denomina reflejo de eyección de la leche (39). También, se han propuesto los opioides como moduladores de la duración de la lactancia (40,41) y parece que pueden interferir en los cuidados maternos, pero no está claro su papel fisiológico (14).

La succión como tal provoca la activación de diversas áreas corticales (19,42,43), lo que puede sugerir que altos niveles de OX y PRL inducidos por la lactancia pueden tener un papel modificador de la plasticidad cortical, como veremos más adelante (5). Además del parto y la lactancia, no está claramente descrita la activación de las neuronas liberadoras de OX por otros estímulos relacionados con las crías, ya sean táctiles o sonoros (44), siendo posible que estos estímulos al no tener un patrón tan rítmico (45), resulten en un aumento sostenido de la liberación de OX en SNC (5).

Por otra parte, la conducta maternal está regida por numerosos eventos desencadenados por procesos que no tienen por qué ser complementarios. Por ejemplo, la reacción ante las llamadas de las crías y el acercamiento a ellas requiere una señalización dopaminérgica (46,47), mientras que durante la lactancia es esencial un descenso de dicha actividad dopaminérgica (46,48) puesto que la dopamina es el principal control inhibitorio de las células lactotropas (49). Por tanto, distintos estímulos sensoriales pueden inducir diferentes patrones de actividad en las neuronas productoras de PRL.

➤ *Interacción madre-cría*

La interacción de una madre con sus crías engloba una serie de comportamientos estereotípicos compartidos por muchas especies. Diversas señales provenientes de las crías desencadenan distintas respuestas en la madre (2,28). Por ejemplo, el contacto directo piel con piel inicia la conducta de lactancia, mientras que el llanto o los olores aumentan el estado de alerta de la madre hacia las crías. Es más, parece que la aparición de determinados aspectos de la conducta maternal son resultado de modificaciones del cerebro materno dependientes de la experiencia que facilitan el procesamiento de estímulos sensoriales de las crías (3,6,14).

El papel de las hormonas también es importante para que se dé una correcta interacción. Se ha comprobado que niveles bajos de OX se relacionan con madres que presentan depresión postparto y complicaciones en la lactancia (50,51). A su vez, dichas madres con depresión tienden a ser menos sensibles a las vocalizaciones de malestar de las crías y por tanto no pueden llevar a cabo una respuesta de cuidado correcta hacia éstas (52).

En relación con las vocalizaciones, las crías de ratón emiten cuatro tipos distintos durante sus primeros días de vida. Las más descritas son aquellas cuyo componente principal son los ultrasonidos (> 20 kHz), que utilizan para llamar a la madre cuando están aislados fuera del nido. Las crías también emiten vocalizaciones en presencia de la madre cuando buscan los pezones para mamar o trepan unos sobre otros en el nido (WC, del inglés *wriggling calls*). Los dos tipos restantes de llamadas se relacionan con los sonidos de dolor emitidos por las crías cuando son mordidos o heridos por un adulto; y las vocalizaciones post-parto cuando la madre los limpia nada más nacer (53).

Las WC son un tipo de vocalizaciones de baja frecuencia (4-20 kHz) (54) que las crías emiten entre los días P2 y P15. Su función sería captar la atención de la madre y potenciar el comportamiento maternal de ésta, por lo que son una forma efectiva de comunicación madre-cría. Las respuestas maternas más frecuentes observadas tras estas vocalizaciones son: limpiar

a las crías, cambiar la posición de lactancia y construcción de nido. Mientras que la comunicación ultrasonido prevalece durante la edad adulta, las WC aparecen durante las dos primeras semanas de vida para evitar la pérdida del comportamiento maternal y se van perdiendo conforme la cría madura, así como el ratio de respuesta de la madre a las mismas (55).

1.2. El papel de las hormonas. La prolactina

➤ *Concepto de hormona*

Inicialmente, el término hormona se definió como aquellos mensajeros químicos que conducían información rápidamente entre células a través del torrente sanguíneo; lo que permitiría coordinar las actividades y el crecimiento de diferentes partes del cuerpo (56). La secreción de dichas hormonas se lleva a cabo por el sistema endocrino, que engloba a un conjunto de órganos y tejidos que albergan glándulas de secreción interna (57).

Para el mantenimiento de la homeostasis del organismo es esencial la integración del sistema endocrino, productor de hormonas, con el sistema nervioso, encargado de detectar y responder ante modificaciones en el equilibrio del organismo y del exterior (56). En mamíferos tiene gran importancia el eje hipotálamo-hipofisiario, en el cual la hipófisis o glándula pituitaria, recibe información del cerebro, a través del hipotálamo, y envía señales a órganos endocrinos periféricos (tiroides, glándula suprarrenal y gónadas) para regular procesos implicados en el metabolismo, el crecimiento, la reproducción y el comportamiento (58).

La hipófisis se encuentra enclavada en la silla turca y conecta con el hipotálamo por la eminencia media. En la hipófisis se puede distinguir tres partes: la neurohipófisis (*pars nerviosa*), el lóbulo intermedio (*pars intermedia*) y la adenohipófisis (*pars distalis*) (59).

La neurohipófisis libera vasopresina (ADH) y OX, el lóbulo intermedio produce melanotropina (MSH) durante el desarrollo fetal humano, pero en adultos su extensión tiende a ser residual (59). Por último, la adenohipófisis sintetiza y libera PRL, tirotropina (TSH), hormona del crecimiento (GH), hormona adenocorticotropa (ACTH), hormona folículo-estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH) (*Figura 1*) (58–60).

Las células neurosecretoras del hipotálamo controlan la actividad de la hipófisis. En general, se podría afirmar que las neuronas parvocelulares secretan factores de liberación de hormonas que regulan la adenohipófisis, mientras que las neuronas magnocelulares sintetizan las hormonas que se liberarán en la neurohipófisis (61,62).

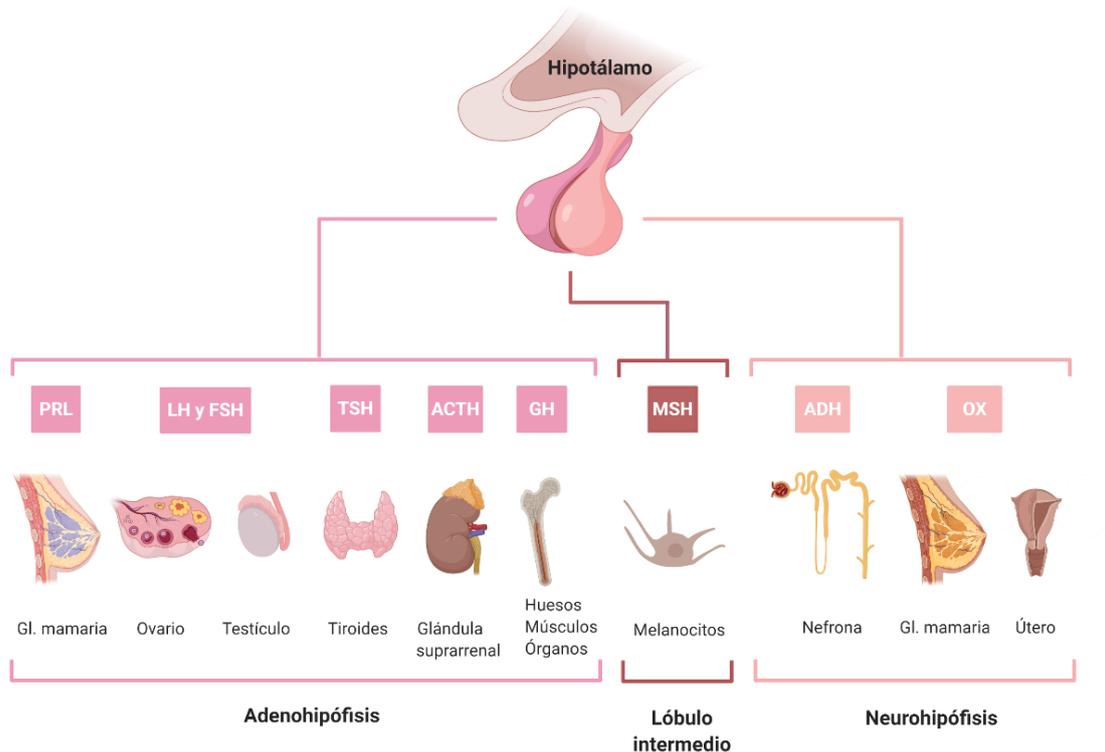


Figura 1: Estructura de la hipófisis y resumen de la secreción hipofisiaria (63). Realizado con BioRender.com.

➤ La PROLACTINA

La PRL es una hormona polipeptídica de secreción pulsátil, controlada mayormente por el hipotálamo. Las células lactotropas o mamotropas de la adenohipófisis sintetizan la mayor parte de PRL del sistema (64); pero en humanos también se encuentran reductos de síntesis en el epitelio mamario, el cerebro, la próstata o la piel; aunque estos presentan una regulación distinta (65,66).

Las células mamosotropas son un tipo celular intermedio entre las células somatotropas y las lactotropas, que pueden secretar PRL además de GH (67). Estas células predominan en neonatos y se diferencian según las necesidades del organismo (68). En concreto, los estrógenos y la presencia de estímulos maternos favorecen su diferenciación a células productoras de PRL (64).

La PRL forma parte de la familia génica de la hormona de crecimiento (somatotropina) y lactógeno placentario (69). En circulación el 80-95% de la PRL se encuentra en forma monomérica (23kDa), que es la forma biológicamente activa y la restante se agrupa en forma de polimérica (50-60kDa) o constituyendo agregados de macroprolactina (más de 100 kDa). El gen de la PRL está conservado en todos los vertebrados y en humanos se localiza en el cromosoma 6 (69). Como resultado del *splicing* alternativo o de las modificaciones proteolíticas y

postraduccionales, se han descrito variantes de la PRL de las que se desconoce su función biológica (64).

Como función principal se conoce a la PRL por su papel esencial en la producción de la leche durante la lactancia. Sin embargo, existen numerosas funciones en las que está involucrada, como reproducción, comportamiento, balance hidroelectrolítico, metabolismo, desarrollo, carcinogénesis e inmunidad (64,65,70–72).

→ Regulación de la síntesis y secreción de prolactina

Las neuronas dopaminérgicas tubero-infundibulares (TIDA) del núcleo arqueado del hipotálamo constituyen el principal control de la secreción de las neuronas lactotropas situadas en la adenohipófisis (64,73). La dopamina (DA) participa en este proceso como inhibidor de la PRL, ya que se libera y es transportada por el sistema porta hipofisario hasta la adenohipófisis, donde inhibe la secreción y la proliferación de células lactotropas (49).

El control dopaminérgico inhibitorio parece estar mediado por su interacción con los receptores de dopamina D2, que se encuentran en la membrana de las células lactotropas. Al inhibirse la señalización dopaminérgica se desinhibe la hipófisis y se libera PRL (64,73). A su vez la propia PRL controla su secreción por un bucle de retroalimentación negativa, estimulando la acción de las neuronas dopaminérgicas (Figura 2).

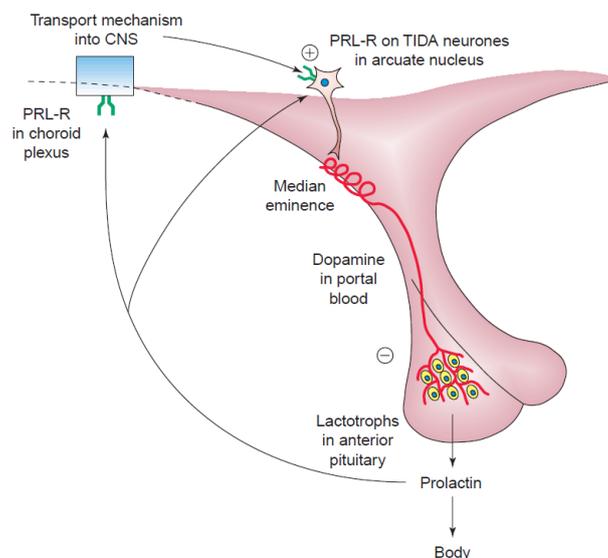


Figura 2: **Regulación de la secreción de prolactina.** Las neuronas tubero-infundibulares ejercen una inhibición tónica de la secreción de PRL a través de la liberación de dopamina a la eminencia media, que es transportada a la adenohipófisis por el sistema porta. A su vez, la PRL regula su propia secreción estimulando a los PRL-R de las neuronas TIDA (74).

Tradicionalmente se ha tenido al control dopaminérgico como el único encargado de la regulación de la secreción de la PRL. Sin embargo, numerosos estudios coinciden en que eso no sería suficiente y se han descrito numerosos factores liberadores/inhibidores de la PRL (64,75). Por ejemplo, la TRH (proveniente del núcleo paraventricular) tiene un papel estimulante en la secreción de PRL; aunque con menor intensidad. La OX también es un factor estimulante de la liberación de PRL (76).

Curiosamente, entre un 20-50% de las células de la adenohipófisis son lactotropas (64) y dependiendo de su disposición son más o menos sensibles a los factores controladores de liberación de la PRL. Por ejemplo, las células que se encuentran en la parte más externa responden mejor a la TRH, y las de la parte interna (más cercana al lóbulo medio), son más sensibles a la dopamina (64)

No se conoce claramente la regulación de la PRL de síntesis extrapituitaria, en parte porque las concentraciones son mucho menores y los ensayos de cuantificación para esta hormona no están muy refinados (77,78).

→ Patrón de liberación de la prolactina. Secreción hormonal en la maternidad

La liberación de PRL fuera del embarazo está regulada por el ritmo circadiano, teniendo la mayor concentración en plasma sanguíneo por la noche en humanos (64,75). En concreto, los niveles máximos de liberación coinciden con la fase REM (79) y la liberación de la dopamina de las neuronas TIDA también conserva este patrón (73).

El patrón circadiano se mantiene durante el ciclo estral; los niveles se mantienen bajos hasta que se da un pico de secreción. En los roedores el pico de liberación se da a finales del proestro y principios del estro, coincidiendo con la liberación de LH (66,80) y en humanos se da en la fase ovulatoria (66,81). Esto se asocia con el aumento de estradiol en sangre (64). Además, si se produce un apareamiento, la PRL tiene una función luteotrófica que favorece que se produzca el embarazo, por un aumento de la progesterona (64).

Tras la fecundación aparecen dos picos diarios de liberación de PRL (82). Los niveles de hormonas lactogénicas (PRL y lactógeno placentario) permanecen elevados durante todo el embarazo y la lactancia, presumiblemente por su papel neuroprotector, ya que estimulan la neurogénesis (83) y disminuyen el daño neuronal asociado a altos niveles de glucocorticoides presentes en el embarazo (84).

Con el desarrollo de la placenta se incrementa secuencialmente la producción de lactógeno placentario, que se une al receptor de PRL debido a su parecido estructural (85,86). Además, condiciona la actividad de las neuronas TIDA, aumentando el tono dopaminérgico, lo que suprime de manera progresiva la secreción de PRL en la adenohipófisis (64,87,88). Por eso a mitad de la gestación la secreción de los dos picos de PRL se sustituye por un aumento de los niveles de lactógeno placentario.

Finalmente, durante la lactancia, la succión del pezón por el neonato disminuye la actividad de las neuronas dopaminérgicas, lo que produce una hiperprolactinemia asociada a la lactancia (66,74), que permanece mientras se mantenga el estímulo (89). La succión del pezón durante la lactancia es un reflejo neuroendocrino que interrumpe la secreción circadiana de la PRL (64). La succión produce un descenso en la liberación de DA, que relaja el tono inhibitorio sobre las células lactotropas de la adenohipófisis (5,90). Sin embargo, la PRL en sangre se multiplica más de lo que podría ocasionar la desinhibición del sistema (66), por ello, es factible que haya más factores involucrados, como la OX, TRH, ADH o péptidos opiáceos (91). Los niveles de estrógenos son muy importantes en todo este proceso. Favorecen la producción de PRL ya sea directamente o inhibiendo la liberación de DA, al actuar sobre el núcleo arqueado (92,93). Pero niveles muy altos de estrógenos inhiben la acción de la PRL a nivel de la glándula alveolar. Por ello, es con el descenso de los estrógenos y progesterona en el parto cuando se comienza a producir leche en la mama (66,94).

Como ejemplo importante de la función de los estrógenos en el desarrollo, se ha probado que el estradiol es capaz de ejercer su regulación a nivel hipofisiario de las células lactotropas modificando directamente su sensibilidad a estímulos fisiológicos o potenciando la diferenciación de células mamosomatotropas a lactotropas (64,68,95). Cabe destacar que para que la PRL o el lactógeno placentario estimulen la aparición del comportamiento maternal es necesaria una previa exposición (*priming*) a progesterona y estrógenos en el mPOA. Esto es relevante de cara a los tratamientos con PRL para simular el embarazo (96).

Además del ciclo luz-oscuridad, existen otros factores externos que condicionan la liberación de PRL (*Figura 3*). El olor de la cría constituye un estímulo que favorece la secreción de PRL y el amamantamiento (97). Los estímulos auditivos, como las vocalizaciones ultrasonido (USVs>20kHz) que emiten las crías de ratones cuando son incapaces de mantener su temperatura corporal o al estar en contacto con adultos (53,98), aumentan la secreción de PRL incluso en ratas vírgenes (99).

Es importante tener en cuenta que los patrones de secreción de PRL no solo dependen de muchos factores, sino que además estos son distintos según el tejido donde se libera. Por ejemplo, la PRL hipotalámica parece no estar influida por la TRH (70,91), aunque es difícil diferenciar entre los efectos de la PRL hipofisaria y la hipotalámica, dado que la primera atraviesa con facilidad la barrera hematoencefálica (70).

Por otra parte, los tejidos del sistema reproductor femenino también son fuente de PRL y lactógeno placentario, aunque su actividad está supeditada a la fase del ciclo estral y especialmente a la presencia de embarazo, con los subsecuentes niveles de hormonas como los estrógenos o la progesterona (64,71).

Por ejemplo, la PRL presente en la leche materna es principalmente de origen adenohipofisario pero se ha descubierto que también proviene de la secreción de las células epiteliales de las glándulas mamarias (65,100).

→ Receptores de prolactina

El receptor de PRL pertenece a la familia de receptores de citoquina tipo I, al igual que el receptor de GH también transmembrana, y está codificado en el cromosoma 5. La expresión de sus diversas isoformas está sujeta al estado fisiológico del animal, ya sea la etapa del ciclo estral, el embarazo o la lactancia (101). No solo se expresa en las glándulas mamarias, los ovarios y el útero, también se ha descrito su presencia en el sistema reproductor masculino como la próstata, los testículos y la vesícula seminal (102).

Los receptores de PRL tienen una distribución muy diversa. En el sistema nervioso se encuentra en la propia hipófisis, en el hipotálamo, la corteza cerebral, la amígdala, el tronco del encéfalo, los ganglios basales, el cerebelo y la médula espinal (64,71). También se ha descrito su presencia en hígado, glándula adrenal, corazón, piel, tejido adiposo y linfocitos (103).

No está claro como la PRL hipofisaria presente en sangre puede cruzar la barrera hematoencefálica, puesto que no se ha identificado un transportador que sería necesario debido a su tamaño. Algunos estudios especulan que dicho transportador ha de encontrarse en los plexos coroideos porque han encontrado allí una gran densidad de PRL-R (64,70,104). También se sospecha de una posible difusión retrograda de la hipófisis al hipotálamo a través de la circulación portal (101). Estudios recientes apuntan que el transporte de PRL al cerebro no depende de su receptor; pero si requeriría la existencia de un transportador en la vasculatura cerebral (71,105).

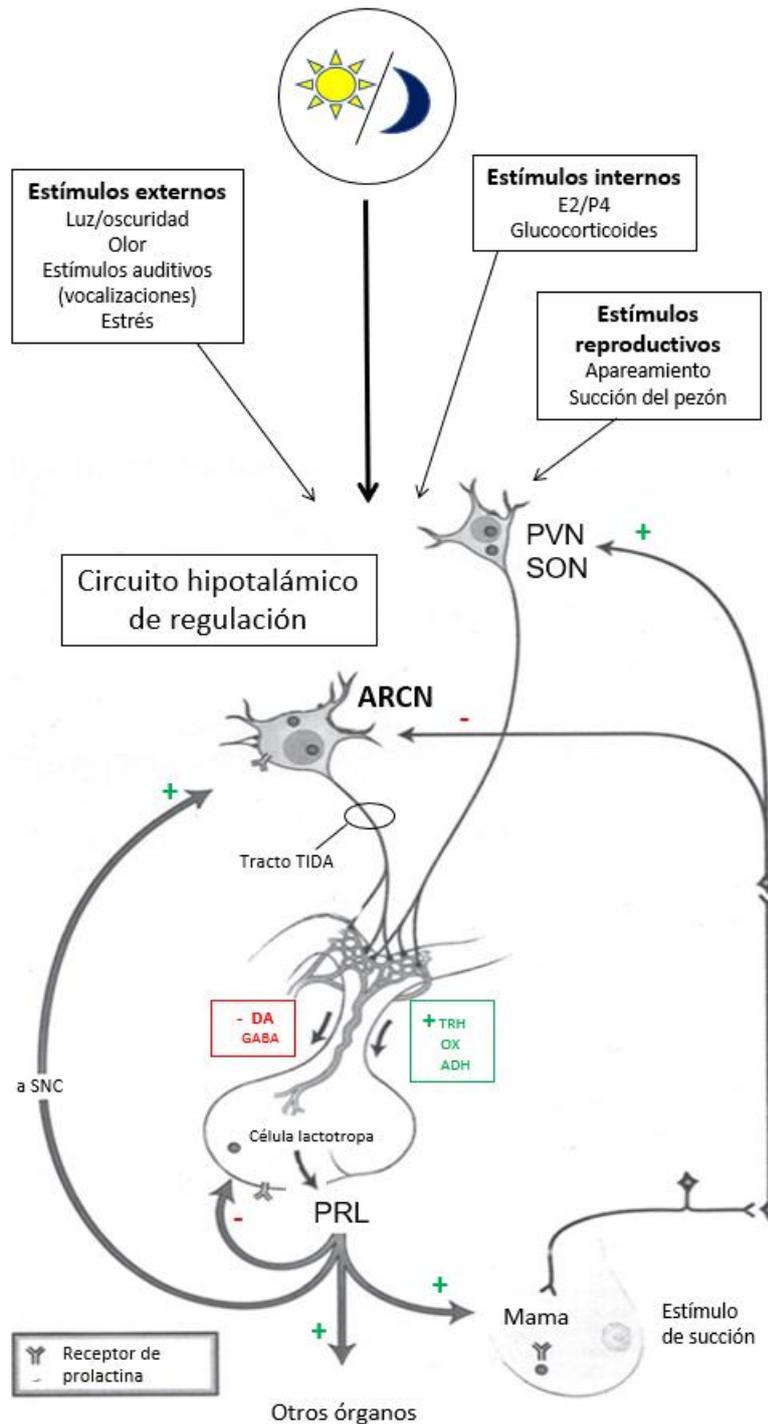


Figura 3: Factores que intervienen en la secreción de prolactina. El conjunto de estímulos internos, externos y reproductivos, junto con el ritmo circadiano, estimulan la actividad de diversos núcleos hipotalámicos: núcleo paraventricular (PVN), núcleo supraóptico (SON) y núcleo arqueado (ARCN). Las neuronas TIDA del ARCN liberan DA a la eminencia media, que ejerce el principal control inhibitorio de la secreción. Modificado de Freeman et al. 2000 (64,106) y de Riecher-Rössler et al. 2013 (107).

→ Acción de la prolactina

La PRL pituitaria por vía endocrina pasa al torrente sanguíneo para llegar a tejidos periféricos. También tiene una acción paracrina y autocrina sobre las células circundantes o las propias secretoras (70). La PRL está implicada en el balance hidroelectrolítico, función que se conserva prácticamente en todos los vertebrados, asociándose con la osmorregulación del sudor (103,108). También parece condicionar la proliferación celular; se ha descrito por ejemplo su efecto en la angiogénesis, aunque no existe consenso en si la inhibe (72) o la estimula (109). Por otra parte, durante el embarazo y lactancia induce resistencia a insulina para promover la hiperfagia (16,110). Estimula la proliferación de células B y T (111,112) y se han sugerido efectos protectores en procesos inflamatorios (113).

La PRL durante la lactancia es esencial para el desarrollo de la glándula mamaria (mamogénesis), la síntesis de leche materna (lactogénesis) y el mantenimiento de la secreción de leche durante todo el periodo de lactancia (galactopoyesis) (64,70). Sobre el cuerpo lúteo tiene una acción bifásica. Si se ha producido el apareamiento, tiene un efecto luteotrófico y estimula la secreción de progesterona. En caso contrario, tiene un efecto luteolítico, favoreciendo la muerte celular en el cuerpo lúteo (64,70). Es más, la PRL es responsable del “efecto Bruce” en roedores, por el cual una hembra preñada sufre un aborto espontáneo en presencia de un macho distinto al que la ha fecundado. Esto se debe a una inhibición en la síntesis de PRL durante la primera fase del embarazo, cuando todavía se daban los picos dobles diarios de PRL (114). Por tanto, se considera una hormona esencial para la implantación del óvulo fecundado (junto con los estrógenos y la progesterona), el mantenimiento del embarazo, y la inhibición de la ovulación (115). Por otra parte, también tiene efecto en el aparato reproductor masculino. La PRL se ha relacionado con la estimulación de las funciones testiculares y metabólicas de órganos como la próstata y la vesícula seminal (70); y está relacionada con el mantenimiento de las células de Leydig (116).

En un estado no fisiológico, la producción anormal de PRL puede condicionar a numerosas funciones del organismo. La hiperprolactinemia, originada o no por prolactinomas (117), puede derivar en problemas en el ciclo menstrual (amenorrea), infertilidad e hipogonadismo; además de osteoporosis (72).

→ Acción de la PRL en el cerebro

La PRL y su receptor tienen una amplia distribución por el SNC (118). Parece que está implicada en la receptividad de las hembras en el apareamiento, dado que el núcleo ventromedial del

hipotálamo, implicado en la actividad sexual expresa PRL-R (16,96). También aumenta la lordosis en ratas hembras ovariectomizadas (119) y la conducta sexual en ratas macho (119).

Como ya se ha mencionado anteriormente, la conducta materna de roedores, como la construcción del nido, la limpieza y el cuidado de las crías depende de la PRL y parece estar mediado por el mPOA del hipotálamo (120). Es más, la eliminación de los receptores de PRL en el mPOA deriva en el abandono de las crías por parte de la madre (121). No están claros, sin embargo, los efectos de la PRL sobre la conducta paternal (15,122). La PRL se ha relacionado con la neurogénesis en adultos. Al actuar en la zona subventricular (SVZ) se generan nuevas neuronas, que migran al bulbo olfatorio (123,124). Esto podría sugerir una respuesta adaptativa para mejorar la discriminación de estímulos olfativos esenciales para el cuidado de las crías (123), pues al final del embarazo también se produce un aumento de la expresión del receptor de PRL en el bulbo olfatorio que parece preparar a la madre para responder a estos nuevos estímulos relevantes (71).

Por otro lado, el estrés limita la neurogénesis del giro dentado del hipocampo (125), lo cual puede degenerar en problemas de aprendizaje. Es conocido que el estrés supone un gran estímulo para la secreción de PRL adenohipofisiaria (64) haciendo que disminuya la expresión hipotalámica de CRH y ejerciendo una inhibición del eje HPA a través del PVN (126). Esto supondría un mecanismo de protección por el que la PRL contrarresta los efectos del estrés crónico (propio del embarazo y la maternidad) en la neurogénesis del hipocampo (125,127).

La PRL también podría participar en la neuroplasticidad observada durante el embarazo y la lactancia. Las espinas dendríticas son una de las estructuras condicionadas por la plasticidad subsecuente a la experiencia y la estabilidad sináptica (128). Varios estudios apuntan que el incremento de PRL al final del parto hace que aumente el número de espinas dendríticas en CA1 y CA3 (129,130). Además, los cambios en la plasticidad derivados por los altos niveles de PRL durante la gestación y la lactancia en humanos, como la pérdida de sustancia gris, parecen conservarse tras dos años (131).

1.3. Plasticidad de la corteza auditiva y su interacción con las hormonas

➤ *Concepto de plasticidad sináptica*

La plasticidad sináptica es una propiedad del sistema nervioso que define los cambios en las propiedades electrofisiológicas, estructurales y moleculares en las sinapsis en respuesta a un determinado estímulo o dependiente de experiencia (132). Existen distintas formas de este

fenómeno que se diferencian en los mecanismos utilizados y su duración (133). La más conocida es la potenciación a largo plazo (LTP, *long-term potentiation*), en la que la estimulación continuada de una sinapsis resulta en un aumento de su eficacia. Otro fenómeno con efectos a largo plazo es la depresión a largo plazo (LDP *long-term depression*), por la cual disminuye la eficacia sináptica. Debido a que la LTD y la LTP persisten en el tiempo, han sido asociadas como modelo de aprendizaje y memoria a nivel celular, siendo un mecanismo muy conservado en el cerebro pese a su gran diversidad (134,135). Los fenómenos plásticos también pueden ser de corta duración, menor de segundos, tanto de potenciación (*short-term potentiation*) como de depresión (*short-term depression*) (136).

➤ *Vías auditivas*

De forma similar a como ocurre en el resto de los mamíferos, en ratones las ondas sonoras se transmiten de manera mecánica a través del oído externo y oído medio hasta las células sensoriales del órgano de Corti, en la región coclear del oído interno. A partir de la cóclea la información se transmite de manera eléctrica a través del nervio coclear o auditivo hasta el complejo de los núcleos cocleares (CNC), situado en el tronco del encéfalo en la unión pontino-medular. Cada CNC recibe aferencias del oído ipsilateral. Éste complejo es el primer relevo sináptico de la vía auditiva ascendente. En él se lleva a cabo un primer procesamiento de las señales, que posteriormente ascienden por diferentes vías hasta la corteza (137).

En las vías monoaurales de roedores, los axones procedentes del CNC decusan y ascienden a través del núcleo paraolivar superior y el núcleo del lemnisco lateral ventral hasta el colículo inferior contralateral. En las vías biaurales, los axones del CNC sinaptan con neuronas de los núcleos lateral y medial del complejo olivar superior (COS). Éste es el primer relevo de la vía ascendente que recibe información procedente de los dos oídos para la localización del sonido. El COS envía aferencias a los colículos inferiores bilaterales de forma directa o indirecta haciendo relevo en el núcleo del lemnisco lateral dorsal (137) (*Figura 4*).

Todas las vías auditivas ascendentes procedentes de los centros auditivos inferiores acaban convergiendo en el colículo inferior, que recibe información mono y binaural. El CI proyecta a su vez al núcleo geniculado medial ipsilateral (NGM). El NGM es el principal centro auditivo del tálamo, y el último centro de procesamiento auditivo subcortical de la vía ascendente. Presenta una organización tonotópica que se mantiene en la corteza auditiva, la cual es su principal proyección (137).

La corteza auditiva del ratón está localizada en la mitad caudal de la corteza parietal. Se compone de 5 regiones: corteza auditiva primaria (A1), corteza auditiva secundaria (A2), área auditiva anterior (AAF), área de ultrasonidos (UF) y área dorsoposterior (DP). De todas éstas son A1 y AAF las que presentan una organización tonotópica clara (137,138).

La corteza auditiva ejerce un control descendente sobre el resto de núcleos de la vía auditiva. De esta manera, se puede modular el procesamiento de determinados estímulos antes de que sea hagan conscientes (137,139–141).

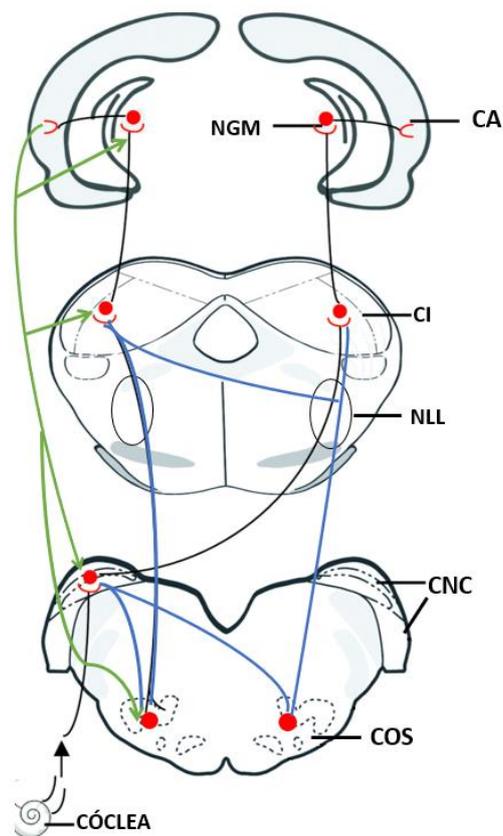


Figura 4: **Vías auditivas en roedores.** Se representan las vías auditivas ascendentes monoaurales (negro) y binaurales (azul); así como las vías de control descendente (verde). Adaptado de Caspary 2018 et al. (142).

El estudio de la vía auditiva *in vivo* se puede llevar a cabo mediante distintos abordajes experimentales. En el registro unitario o multiunitario (*single-unit/multiple-unit recordings*) la información obtenida proviene principalmente de actividad producida por los potenciales de acción de una o muy pocas neuronas (*output*). Por otra parte, los registros de potenciales locales de campo (LFP, del inglés *local field potentials*), parecen ser reflejo de los *inputs* y del procesamiento intracortical. Los LFPs engloban la actividad de una población mayor de neuronas y están constituidos por una superposición lineal de todos los procesos iónicos de una región

concreta, en especial por actividad sináptica (potenciales postsinápticos excitatorios e inhibitorios) y potenciales de acción (143). Las características de los LFP dependen de la contribución temporal de dichos procesos iónicos, la localización de los electrodos de registro y la geometría del tejido cerebral (144). Este tipo de medida, además de proporcionar una visión general del funcionamiento cortical, parece estar bien conservada evolutivamente entre las distintas especies (134).

➤ *Plasticidad en la corteza auditiva*

Publicaciones recientes demuestran que determinados aspectos de la conducta maternal se deben a fenómenos de plasticidad del cerebro de la madre derivados de la experiencia durante el embarazo y postparto. Estos cambios permiten un mejor procesamiento de los estímulos sensoriales de las crías (3,6,14) y una mejor respuesta a sus necesidades. Dichos cambios se han observado sobre todo en la corteza somatosensorial primaria (S1) (145) y A1 (146–150).

En S1 se encuentra la representación más simple del propio cuerpo (151), que cambia con la maternidad. En A1 se codifican en primera instancia las vocalizaciones de las crías, observándose por ejemplo un aumento temprano de *c-Fos* tras la estimulación auditiva con este tipo de señal (152).

Durante la gestación se observan cambios en el territorio de la representación somática del vientre en S1, sin embargo en A1 no se expande la representación cortical de las frecuencias asociadas a las vocalizaciones de las crías (153) y tampoco hay una modificación en la distribución tonotópica de A1 subsecuente a la maternidad (145,150,154). Esto podría deberse a que las neuronas que responden a las llamadas de las crías se encuentran dispersas en A1 independientemente de la frecuencia (5,138). Otra posible razón sería que la frecuencia de las vocalizaciones de las crías solapa con las vocalizaciones de los adultos, por lo que una expansión del mapa tonotópico para una determinada frecuencia sería contraproducente porque también aumentaría la representación de estímulos con menor importancia (140,153). Una tercera hipótesis sobre la falta de expansión podría ser que de manera innata la representación cortical de las USVs ya esté expandida (140,155), y/o que las hormonas maternas activen un mecanismo auditivo sintonizado para responder ante USVs (156,157).

Durante la lactancia, la corteza somatosensorial primaria (S1) sufre una remodelación que permite un incremento del área que representa los pezones y la areola, debido a la estimulación táctil al amamantar. Este cambio no se observa si la camada se separa de la madre al nacer, pues no se daría la plasticidad dependiente de actividad (154,158,159). De la misma forma, como

estos cambios dependen de los estímulos táctiles de la lactancia, se pierden poco después de su cese (145,154).

Por su parte la plasticidad neuronal en A1 aumenta la respuesta ante emisiones ultrasonido de las vocalizaciones de las crías durante la lactancia (147,148) y parece mantenerse semanas después del cese de la misma (13,146,153,160) incluso cuando las crías ya no necesitan los cuidados básicos de la madre. Este mantenimiento en el tiempo podría deberse a que con la maternidad los estímulos olfativos y auditivos toman especial importancia; pero no solo los de las crías, sino también los de posibles amenazas. Esto se debe a que los estímulos pueden codificarse de manera distinta en función del contexto (161).

Investigaciones más recientes presentan resultados contradictorios sobre la plasticidad de la corteza auditiva subsecuente a la maternidad. En roedores, durante el periodo de lactancia, las USVs de las crías aumenta la actividad de la CA materna de las zonas que procesan ultrasonidos, mientras que disminuye la respuesta en áreas que responden a sonidos de baja frecuencia (150). También disminuye la respuesta espontánea de las neuronas una vez que se cesa la lactancia (162,163). Esto permitiría por tanto aumentar el contraste, favoreciendo el reconocimiento de sonidos naturales inherentes a la especie. Por otra parte, nuevos datos obtenidos a partir de registros de una única neurona determinan que la respuesta a las llamadas de las crías desaparece 10 días después del destete (149).

Sin embargo, estudios en humanos apoyan la primera evidencia, pues demuestran que el aumento de la respuesta ante el llanto se mantiene a lo largo de la vida y este incremento de sensibilidad se va potenciando subsecuentemente con la experiencia. Es decir, aumenta la eficacia en el procesamiento de los llantos cuanto más experimentadas son las madres (1,10), lo que podría mejorar su comprensión y respuesta de cuidado asociada (5,9).

En cuanto a la naturaleza de estos cambios en la plasticidad de la corteza auditiva, gran parte de la investigación se ha centrado en la selectividad de neuronas corticales en la comunicación intra-especie. Sin embargo, las neuronas no parecen tener una respuesta específica ante la llamada de las crías (164) aunque sí pueden codificar la información de tal manera que se potencie (165).

Según se adquiere mayor experiencia en el cuidado de la descendencia mejora el reconocimiento de las vocalizaciones ultrasonido de las crías (163). La respuesta de la corteza auditiva a las USVs se modifica en diversos aspectos (153) tales como la codificación temporal

(146,165), la plasticidad inhibitoria (162,163), la dinámica poblacional (166) y la integración multimodal de diversos estímulos de las crías (olor + estímulos auditivos) (148).

Se puede concluir que la respuesta cortical auditiva de la madre, frente a la de hembras nulíparas, es mayor ante la llamada de las crías. Estos cambios no se observan con la exposición a sonidos no naturales fuera del rango de vocalizaciones. Esto se podría interpretar como una respuesta de la corteza que permite mejorar el procesamiento destacando la señal con relevancia comportamental y emocional, frente al ruido (165). La mejora en la discriminación de las llamadas de las crías se debe a un aumento de la eficacia en la codificación neuronal en frecuencias de las vocalizaciones. De tal manera que las vocalizaciones desencadenan un procesamiento distinto al de un estímulo de igual frecuencia, pero sin componente emocional. Este fenómeno estaría condicionado por la experiencia o por mecanismos hormonales (165).

Como ya se ha mencionado, la OX tiene un papel neuromodulador de la actividad cortical que es esencial para el comportamiento sexual y la conducta maternal (13,154,155). La influencia de la OX sobre la corteza auditiva se intuye con el hecho de que A1, al igual que S1, presenta gran densidad del receptor de OX. Variaciones en la expresión del receptor de OX se asocian con diferencias en la sensibilidad al llanto de las crías (165). Además, su distribución suele estar lateralizada en el hemisferio izquierdo, especialmente en las interneuronas de somatoestatina y parvoalbúmina (13,157). Por acción de la OX estas neuronas inhibitorias cesan su actividad facilitando la excitabilidad de A1 (13,157). Esto concuerda con las evidencias que determinan que el procesamiento de la percepción del llanto se da en la corteza auditiva izquierda en humanos (166,167).

La OX favorece la plasticidad de A1 in vivo, lo que permite aumentar las respuestas a distintos estímulos acústicos como puede ser las vocalizaciones de las crías o los tonos puros, y favorece la adquisición de un comportamiento maternal por el aumento de la relevancia de ciertos estímulos (13,157). Pero, ¿tiene la prolactina efectos similares?

En este experimento se realizó un registro en A1 de la actividad de la vía auditiva evocada por un estímulo sonoro. Los potenciales auditivos evocados (AEPs) se detectan como variaciones en el potencial eléctrico de las distintas estructuras que conforman la vía auditiva en respuesta a un estímulo auditivo. Por lo tanto, se pueden registrar a lo largo de toda la vía auditiva, en puntos como el CI del tronco del encéfalo o la corteza auditiva. De esta manera, utilizamos los AEPs con el fin de inferir si la PRL es capaz de modificar la audición.

2. OBJETIVOS

Durante la gestación y la lactancia ocurren numerosas adaptaciones funcionales en el cerebro materno, fundamentales para la supervivencia de la descendencia. Evidencias clínicas y experimentales indican que el sistema neuroendocrino tiene un papel esencial en la remodelación de la circuitería cortical, lo que condiciona la conducta maternal. Sin embargo, se desconoce el papel de hormonas como la prolactina en la remodelación de la corteza auditiva en respuesta a las vocalizaciones de la progenie durante la lactancia.

Por ello, el objetivo general de este trabajo de fin de máster ha sido **determinar si la prolactina es capaz de provocar cambios en la plasticidad de la corteza auditiva primaria en un modelo animal de hiperprolactinemia fisiológica.**

Para la consecución del mismo, se propusieron los siguientes objetivos específicos:

1. Desarrollar un modelo *in vivo* de hiperprolactinemia en hembras nulíparas como una aproximación al cerebro materno durante la lactancia.
2. Puesta a punto de un protocolo de estimulación artificial con las vocalizaciones de las crías y registro de los potenciales evocados en la corteza auditiva.
3. Desarrollo de un análisis bioinformático específico para el análisis de los AEPs.
4. Determinar el efecto del modelo de hiperprolactinemia sobre la plasticidad cortical de la corteza auditiva primaria en respuesta a la comunicación WC (4-20kHz).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Animales

Para el modelo experimental, se utilizaron ratones silvestres de la cepa RjHan:NMRI de 7-8 semanas, que fueron estabulados en el animalario del Instituto Cajal del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Los animales se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura (20-24°C), presión atmosférica y flujo de aire, con ciclos de luz y oscuridad de 12h cada uno (7:30-19:30h). Se alojaron 4 animales por jaula o de manera individual, dependiendo de las condiciones experimentales, con acceso ad libitum a comida y agua. En los experimentos se emplearon un total de 16 hembras. Los procedimientos relativos al manejo y sacrificio de los animales se ciñeron a las directrices de la Comisión Europea (2010/63/EU) y fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal del Instituto Cajal (2013/53RD) y por el subcomité de ética de la UAM.

3.2. Protocolo experimental

Para la realización de este trabajo se emplearon técnicas electrofisiológicas de registro *in vivo*. Primero tuvo lugar la intervención quirúrgica para el implante de los electrodos. Tras dos semanas de recuperación, se registraron los AEPs previos al tratamiento. Al día siguiente se implantó la bomba osmótica que liberaría domperidona o vehículo durante 14 días. Durante este tiempo se repitieron los registros de AEPs a día 7 y día 14 de tratamiento. Finalmente, a día 15 tuvo lugar el sacrificio, la histerectomía y la extracción de las hipófisis (*Figura 5*).

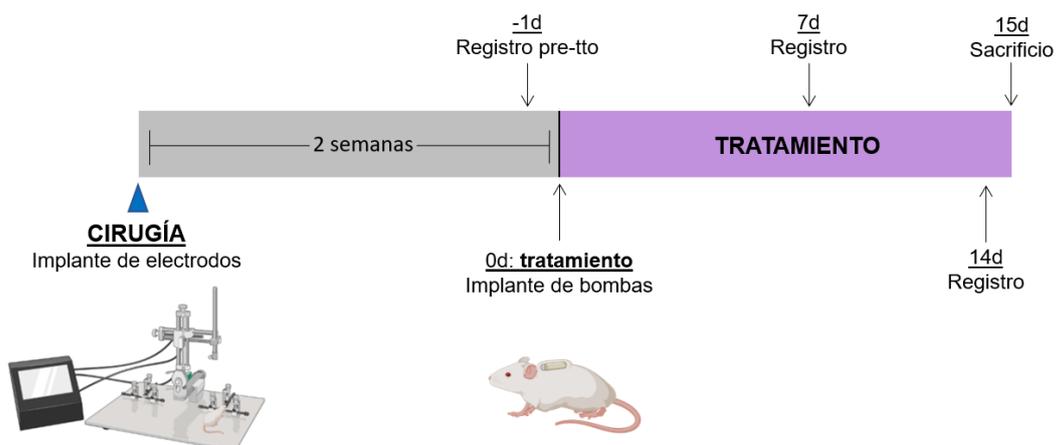


Figura 5: Planificación del abordaje experimental. Los electrodos se implantaron de manera crónica y se permitió que los animales se recuperasen de la operación durante dos semanas. El tratamiento duró otras dos semanas adicionales, en las que se llevó a cabo el registro electrofisiológico en tres puntos: el día previo al tratamiento (-1d), a la semana (7d) y a las dos semanas (14d) de tratamiento.

3.3. Tratamiento. Implante de bomba osmótica

Con el fin de estimular la producción de PRL se administró un tratamiento de domperidona (antagonista dopaminérgico) durante 2 semanas. Dicho tratamiento se dispensó mediante bombas osmóticas implantadas de manera subcutánea a la altura de las escápulas.

Se utilizaron bombas osmóticas Alzet modelo 1002 (DURECT Corporation, Cupertino, CA), que liberaban 0.25µl a la hora durante 14 días. En mitad de la muestra experimental se implantaron las bombas control con polietilenglicol (PEG400; Sigma). A la mitad restante se le administró domperidona diluida en PEG400, con el fin de obtener una liberación sostenida de 2 mg/kg al día (167,168).

Las bombas se llenaron con ayuda de una jeringa de 1ml y una punta roma de 27 G, evitando la formación de burbujas y después se colocó el controlador de flujo. Para verificar el correcto cargado de las bombas, se pesaron con el controlador de flujo antes y después del llenado. Con el fin de asegurar la correcta liberación de las bombas, se incubaron durante 6 h a 37°C en solución salina al 0.9%.

Posteriormente se realizó la cirugía para implantar dichas bombas. En todas las cirugías se empleó anestesia inhalatoria de isoflurano (IsoFlo, Zoetis) entre 0.8-1.5% con un flujo de oxígeno de 0.8%. Una vez anestesiado, se administró un analgésico (Metacam, 5 mg/kg) por vía subcutánea. Se situó al animal boca abajo sobre una manta calefactora, para poder acceder a la zona escapular. Se realizó una incisión en este área para después abrir un bolsillo subcutáneo, donde se introdujo la bomba con el controlador de flujo en sentido opuesto a donde estaba la apertura. Posteriormente se suturó la piel.

3.4. Grabación y procesamiento de las vocalizaciones de las crías

Las vocalizaciones de las crías se grabaron con una grabadora digital (TIE TX26). Se utilizó el software Audacity para su procesamiento y análisis. Dicho programa permitió editar la grabación y su análisis espectral mediante la transformada de Fourier. Para obtener una grabación con las vocalizaciones de manera continuada, se modificó el audio con el fin de reducir las pausas entre vocalizaciones. Dicha grabación continua se utilizó posteriormente como estímulo en los registros *in vivo*. El análisis de Fourier de las vocalizaciones permitió aislar 5 componentes de frecuencias principales acorde a su potencia relativa. Cuatro de estos valores (2, 4, 8, 10 kHz) fueron posteriormente utilizados para el protocolo de estimulación de frecuencias puras.

3.5. Preparación e implante de electrodos

En este trabajo, se realizó un registro en A1 de la actividad de la vía auditiva evocada por un estímulo sonoro *in vivo*. Los AEPs se detectan como variaciones en el potencial eléctrico de las distintas estructuras que conforman la vía auditiva en respuesta a un estímulo auditivo. De esta manera, utilizamos los AEPs con el fin de inferir si la PRL es capaz de modificar la vía auditiva.

➤ *Cirugía estereotáxica para el implante de electrodos.*

Para registrar los AEPs se implantó un pedestal con tres electrodos de acero inoxidable (MS333/1-A - Plastic One, Bilaney Consultants, Düsseldorf, Alemania), retirando el recubrimiento aislante del extremo más distal de cada electrodo para incrementar su conductividad.

Para implantar los electrodos, se anestesió al animal, como se ha descrito anteriormente (sección 3.3) y después se rasuró todo el pelo de la cabeza. A continuación, se posicionó al animal en el marco estereotáxico (RWD LifeScience), sujeto por barras auriculares y con el adaptador de anestesia modelo 923-B (Kopf). Se administró anestesia y analgesia (sección 3.3) y se aplicó vaselina sobre los ojos y povidona iodada en la cabeza antes de comenzar la cirugía. En ausencia de reflejos se realizó una incisión para exponer el cráneo y se retiró el periostio con una espátula. Con ayuda de un microtaladro (Microdrill, RWD LifeScience), se abrieron dos orificios parietales para acceder a la corteza auditiva primaria según las coordenadas (en mm relativas a Bregma), -2.5 A-P, ± 3.4 M-L, -1.8 D-V (169). Se utilizó un electrodo como activo y el contralateral como referencia. Finalmente, el electrodo de tierra se posicionó en la corteza frontal derecha. A su vez, se insertaron dos tornillos (Screw-Holding, PlasticOne) en el cráneo entre los electrodos parietales y el frontal. Dichos tornillos junto con cemento dental (Meron, VOCO) sirvieron para fijar el pedestal correctamente al cráneo de manera crónica (*Figura 6*).

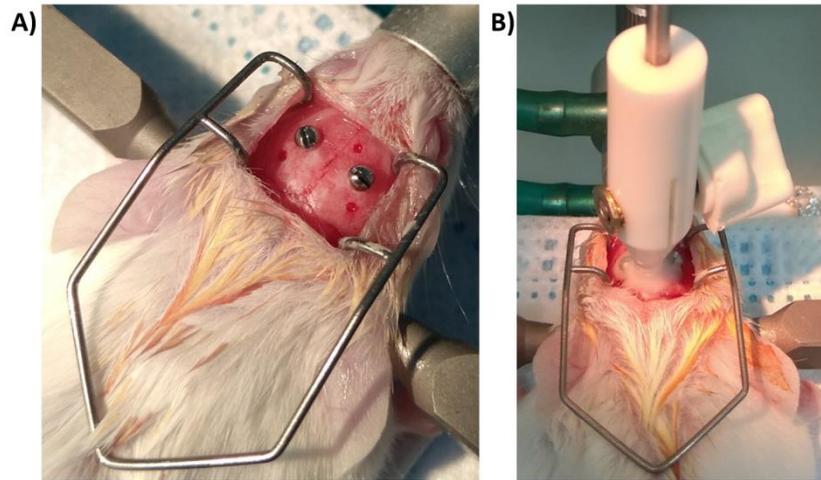


Figura 6: Cirugía de implante de electrodos. (A) Se pueden observar los tres orificios para los electrodos y los dos microtornillos que aseguran el pedestal. (B) En esta imagen se puede ver el electrodo sustentado por el soporte y una primera capa de cemento dental, que da forma al pedestal final.

3.6. Electrofisiología *in vivo*

➤ *Equipo de adquisición y de estimulación*

Se utilizó el sistema de adquisición de datos Powerlab4/25T (AD instruments) que posee un bioamplificador integrado que permite la conexión directa al pedestal implantado en el animal mediante un cable de baja impedancia. El registro obtenido se acondicionó con un filtro pasa banda (0.1 Hz – 300 Hz) utilizando una frecuencia de muestreo de 2500 Hz durante la estimulación con el sonido de las crías y de 1000 Hz para la estimulación con frecuencias puras.

El equipo de estimulación estaba compuesto por un generador de ondas (Wavetek), un amplificador de sonido y un sistema de altavoces TEBM 130H10-8 (Tectonics elements; Woodinville, USA). Para el registro el animal se introdujo en un vaso de precipitados (18cm de alto x 12cm de diámetro), incluido en una caja insonorizada (40x30x30 cm) con espuma corrugada (*Figura 7*).

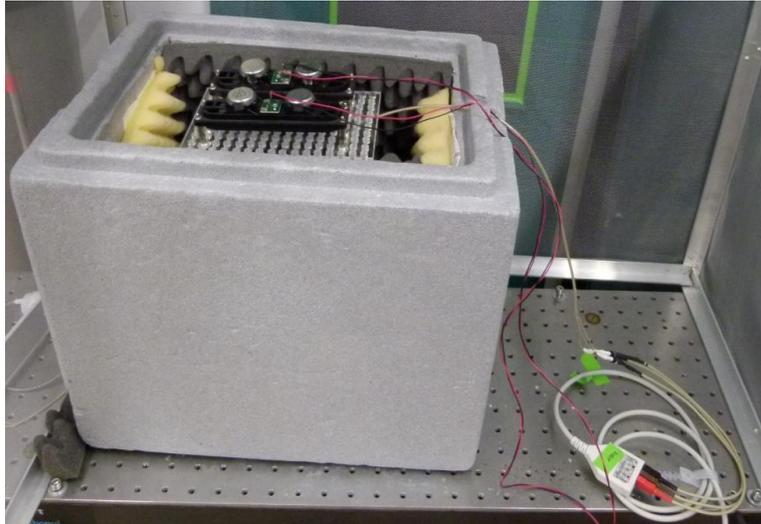


Figura 7: **Espacio de registro.** Se pueden apreciar los altavoces de estimulación, la caja aislada y los cables de salida que conectan al ratón

➤ *Protocolo de estimulación y registro*

Dos semanas después del implante de los electrodos, se comenzó con el registro *in vivo*. El registro electrofisiológico de los AEPs se llevó a cabo estimulando con un barrido de frecuencias puras (2, 4, 8, 10 kHz) y la reproducción de las grabaciones de las vocalizaciones de las crías. La duración de los estímulos fue de 250 ms para las frecuencias puras y continuo (durante todo el registro) para las vocalizaciones de las crías. La duración de cada sesión fue de 4 minutos con un período de descanso entre 30 y 60 segundos. Para cada tipo de estimulación, ya sean frecuencias puras o vocalizaciones de las crías, se registraron las cortezas auditivas primarias de ambos hemisferios realizando 4 mediciones. Se repitió el protocolo completo en tres días distintos. Se obtuvo un registro basal un día previo al implante de bombas osmóticas y los otros dos restantes al día 7 y 14 de tratamiento.

➤ *Análisis de datos*

Previo al análisis matemático de los datos se realizó una inspección visual de los registros obtenidos. Se realizó un cribado exhaustivo con el fin de escoger aquellos animales que mostraran AEPs con un claro componente biológico (Figura 8). De esta manera, de los 13 animales que presentaban los registros completos, finalmente se utilizaron 5 animales para el análisis de datos: 4 tratados con domperidona y 1 control. Dado que se adquirió la actividad de ambos hemisferios en forma alternada, se pudo analizar la señal de 10 hemisferios en los tres momentos del tratamiento. Una vez realizada esta selección de datos, los AEPs fueron procesados mediante la aplicación de un filtro para eliminar el ruido procedente de la corriente

alterna de red eléctrica doméstica. Posteriormente, se realizó un análisis espectral de la señal para poder identificar la potencia de las frecuencias que componen los AEPs en las distintas condiciones experimentales.

Los registros fueron procesados y analizados con el programa MATLAB R2018b mediante el desarrollo de un código en el laboratorio.

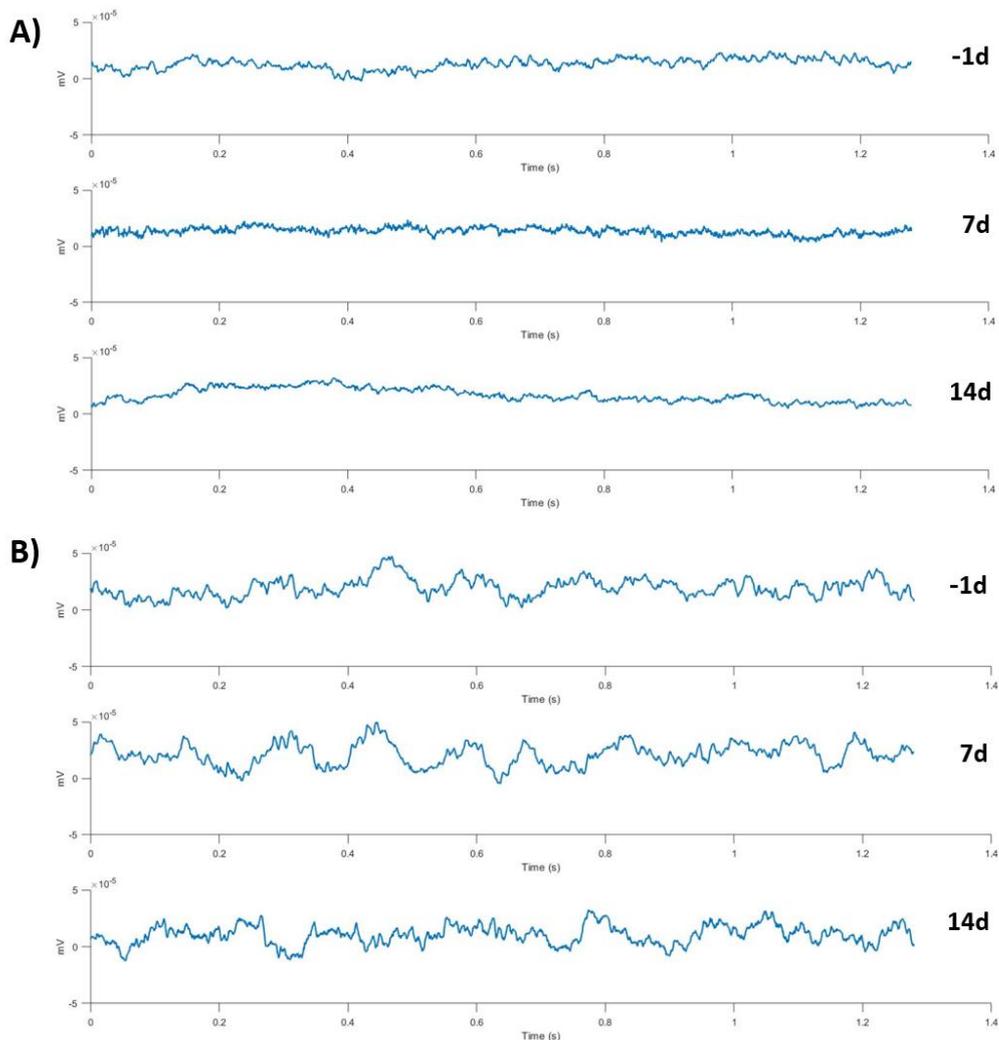


Figura 8: *Análisis visual de los AEPs inducidos por WC. Trazo representativo de (A) un animal excluido por exceso de ruido en la señal, frente al (B) AEP objeto de este estudio.*

→ Filtros

Para eliminar la frecuencia de 50 Hz que introduce el ruido de la red eléctrica, se filtró el AEP mediante el filtro digital Chebyshev de tipo II. Los filtros de Chebyshev son capaces de obtener una mayor pendiente en la respuesta en frecuencia gracias a que permiten la aparición de rizado (*ripple*) en su banda de paso o rechazo. Los filtros Chebyshev tipo II presentan este rizado en su

banda de rechazo y por ello se puede reducir su distorsión definiendo una mayor atenuación. En nuestro caso, este filtro fue diseñado mediante la función de MATLAB (*cheb2*). Se impuso un valor de 20 dB para la atenuación en la banda de rechazo, un orden de 4 y una banda de paso entre 48.2 y 51.8 Hz. El filtro fue aplicado en ambas direcciones utilizando la función de MATLAB (*filtfilt*) para así evitar posibles desfases.

→ Comparación de los AEPs de cada hemisferio

Para determinar la posibilidad de analizar de forma conjunta los AEPs obtenidos en ambos hemisferios, se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson. Dicho coeficiente es un índice que permite medir el grado de relación entre la tendencia de dos variables discretas que sean cuantitativas. Por ello, posibilita inferir el grado de similitud entre la forma en que una variable cambia respecto a la otra. Dicho de otra manera, el coeficiente nos indica qué porcentaje de la varianza de una variable puede ser explicada mediante la otra (170). Este coeficiente puede obtener un valor entre -1 y 1 $([-1, 1])$. Un valor positivo nos indica una correlación positiva entre las dos variables, es decir una relación directa de dependencia: siempre que una de ellas aumenta la otra también lo hace. Por el contrario, un valor negativo indica una correlación negativa entre las variables (relación de dependencia inversa): siempre que una de ellas aumenta, la otra disminuye. Del mismo modo, el módulo del coeficiente nos indica el grado de correlación: cuanto más cerca este el módulo de 1/-1, mayor es el grado de correlación (170). Si el coeficiente es igual a 0, no existe una relación lineal entre las dos variables; pero esto no implica que las señales sean independientes; puede existir otro tipo de relación que no sea lineal (170). Cabe hacer hincapié en que el índice de correlación de Pearson, como su propio nombre indica, da información sobre la correlación entre dos variables, y no sobre su causalidad.

En este trabajo la correlación de Pearson permitió calcular qué porcentaje de la varianza de un hemisferio puede ser explicado por el hemisferio contralateral. Es decir, si el AEP de ambos hemisferios se modifica de manera similar ante un mismo estímulo. Debido al tamaño muestral realizamos una segunda comprobación para reafirmar que los resultados del coeficiente de correlación no eran aleatorios. En este caso, en vez de comparar un hemisferio frente al contralateral del mismo animal, se realizó una comparación seriada de hemisferios aleatorizados, subsecuentes veces. Además, también se calculó la correlación entre ambos hemisferios del animal en ausencia de estímulo.

→ Transformada de Fourier como método de análisis espectral de los AEPs

La transformada de Fourier permite representar una señal periódica en el espectro de las frecuencias. Cuando se aplica esta transformada a una señal compleja, el resultado es una señal en tres dimensiones, siendo estas la frecuencia, la amplitud (o potencia si se calcula el módulo) y la fase (171). En nuestro análisis espectral, nos centramos principalmente en la frecuencia y la amplitud.

La transformada de Fourier parte del concepto que cualquier señal puede representarse como la combinación (suma) de oscilaciones fundamentales (senos). Por tanto, todas las señales se podrían descomponer como suma repetitiva de senos perfectos (171). Al realizar la transformada de Fourier, toda la información temporal de la señal se pierde en beneficio de obtener información de las frecuencias que la componen (principio de incertidumbre de Heisenberg). Por ello, para poder comprender la dinámica que sigue las frecuencias de la señal en un punto concreto del tiempo, nos podemos servir de la transformada de Fourier de tiempo reducido (*short-time Fourier Transform*) y del análisis *wavelet*, que mantienen cierta información temporal a cambio de perder resolución en las frecuencias (Figura 9).

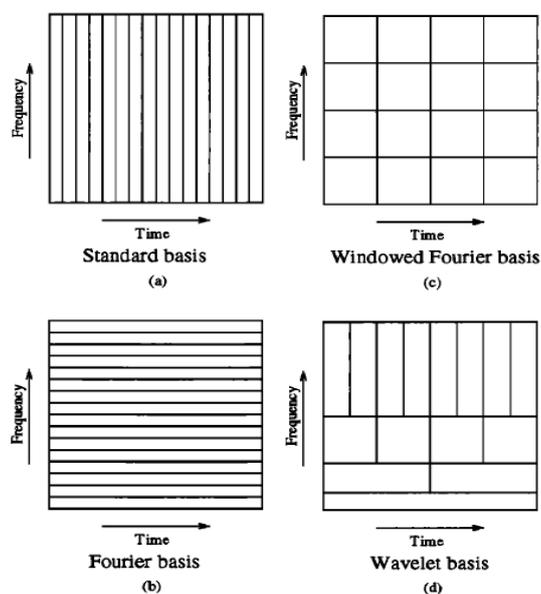


Figura 9: **Representación gráfica del dominio tiempo y frecuencia en función del tipo de análisis.** (a) En un registro electrofisiológico tenemos información del tiempo, pero menos información de las frecuencias que componen la señal. (b) Al realizar la transformada de Fourier se descompone la señal en las frecuencias que la constituyen; pero se pierde la resolución temporal. La transformada de Fourier de tiempo reducido (c) y la transformada wavelet (d), permiten dividir el análisis espectral en ventanas de tiempo y así poder obtener cierta información temporal del espectro de frecuencias (172).

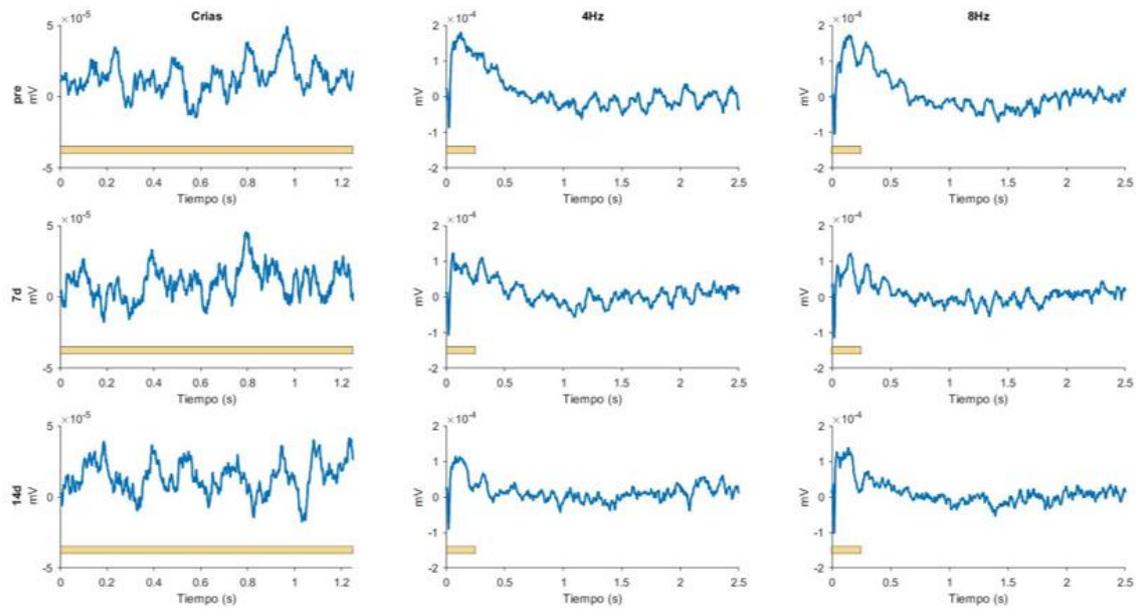
En este trabajo hemos empleado dos tipos de análisis derivados de la transformada de Fourier, la transformada *wavelet* y el método *multitaper*.

Transformada *wavelet*

Mientras que la señal electrofisiológica pura tiene una resolución de frecuencias nula; la transformada de Fourier no tiene resolución temporal. Sin embargo, en la transformada tipo *wavelet* se realiza un análisis espectral de innumerables secciones en el tiempo (con distintas duraciones) de la señal. Entonces, la transformada *wavelet* aporta información de la variación de las potencias de las frecuencias que componen el AEP a lo largo del tiempo.

En el protocolo de estimulación con frecuencias puras el estímulo auditivo no es continuo, se dan pulsos de 250 ms espaciados por silencios. En el análisis visual del AEP inducido por trenes de frecuencias puras se distinguieron dos secciones: una inicial que colocalizaba con el estímulo (primeros 250 ms, fracción intra-estímulo) y la fracción inter-estímulo (*Figura 10*). Para confirmar que este tipo de AEP se debía analizar por secciones se llevó a cabo una transformada de tipo *wavelet*.

A) AEPs animal control



B) AEPs animal con domperidona

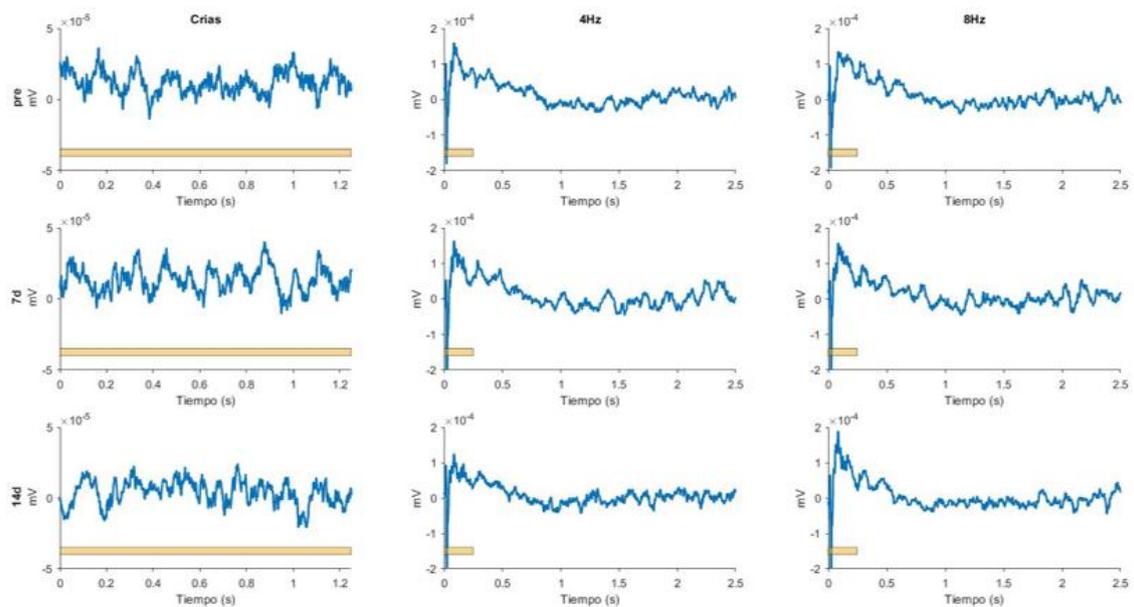


Figura 10: AEPs de una animal control (A) frente a un animal tratado con domperidona (B). Se representan tres tipos de estimulación auditiva: WC, 4 y 8 kHz. El rectángulo amarillo simboliza la duración de la estimulación auditiva.

Método multitaper

Se aplicó el método *multitaper* (MTM, del inglés *multitaper method*) para mejorar las estimaciones que da la transformada de Fourier sobre el espectro de potencias. La MTM crea a partir de una señal, varias señales independientes, multiplicando los datos por secuencias esfereoidales discretas de Slepian (*tapers* en inglés), en concreto las tres primeras de la imagen

(Figura 11). En nuestro caso, se obtuvieron tres análisis espectrales y se realizó una media de los tres para obtener un espectro de frecuencias medio de la señal electrofisiológica. La ventaja que otorga este tipo de análisis es que incrementa el ratio AEP (señal biológica/ruido), lo que nos ha permitido detectar pequeños eventos que para la transformada de Fourier tradicional habrían pasado desapercibidos.

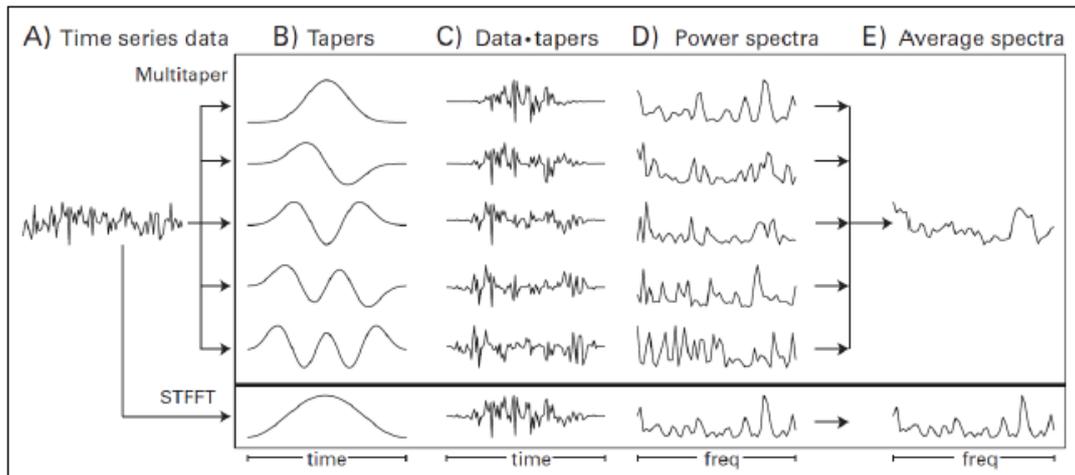


Figura 11: Comparación del método multitaper frente a la transformada de Fourier de tiempo reducido (STFFT). En este proyecto se utilizaron los primeros tres tapers (B).

3.7. Extracción y conservación de hipófisis

Posterior al sacrificio se extrajo el cerebro con constante irrigación de líquido cefalorraquídeo artificial (aCSF, en inglés *artificial cerebrospinal fluid*), enfriado a 4°C y con permanente burbujeo de gas carbógeno (95% O₂- 5% CO₂). La composición de la aCSF fue la siguiente (en mM): 124 NaCl, 2,69 KCl, 1,25 KH₂PO₄, 2 MgSO₄, 26 NaHCO₃, 2 CaCl₂ y 10 glucosa, ajustado a un valor de pH de 7,34 ± 0,02 (Ph-meter Basic 20+, Crison, España). La hipófisis, localizada en la base del cráneo, se extrajo rápidamente con ayuda de una aguja y una espátula. Se fijó en PFA al 4% durante 1h a temperatura ambiente. Tras la fijación, se hicieron tres lavados con PBS y se conservó en solución crioprotectora (3 Glicerol : 3 Etilenglicol : 3 H₂O : 1 PBS 10x) a -20 °C.

3.8. Histerectomía

Tras el sacrificio se procedió a extraer el útero. Se fijó al animal decúbiteo supino y se hizo una incisión a lo largo de la línea media abdominal. Se apartaron las vísceras para exponer el útero, mientras que se irrigaba permanentemente con solución salina fría. Previo a su extracción, era necesario eliminar correctamente la grasa circundante al útero con dos pinzas romas. Tras la eliminación de la grasa se extirparon los ovarios y se realizó un corte justo por encima de la

vagina para retirar el útero. Se utilizó la báscula (Denver Instrument) para pesarlo y calcular el ratio del peso del útero frente al peso del animal.

$$\text{Ratio} = \frac{\text{Peso del útero (g)}}{\text{Peso del animal} - \text{peso de la bomba}}$$

3.9. Análisis estadístico

Tanto en el análisis estadístico de las variaciones en el espectro de los AEPs por estimulación con la grabación de las crías, como para las comparaciones del ratio de los úteros, se aplicó el análisis de Kolmogorov-Smirnov, que es un test no paramétrico porque los datos no seguían una distribución normal. Se establecieron diferencias significativas con $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***).

4. RESULTADOS

4.1. Análisis de las vocalizaciones de las crías

Al realizar un análisis espectral de las WC de las crías se identificaron cinco picos de frecuencia predominantes en relación a su potencia. El espectro de frecuencias revela que la grabación de las crías consiste en una señal constituida principalmente por una banda de frecuencias entre 1kHz y 24 kHz, encontrando picos de potencia para las frecuencias de 2, 4, 5.5, 8, 10 kHz (Figura 12).

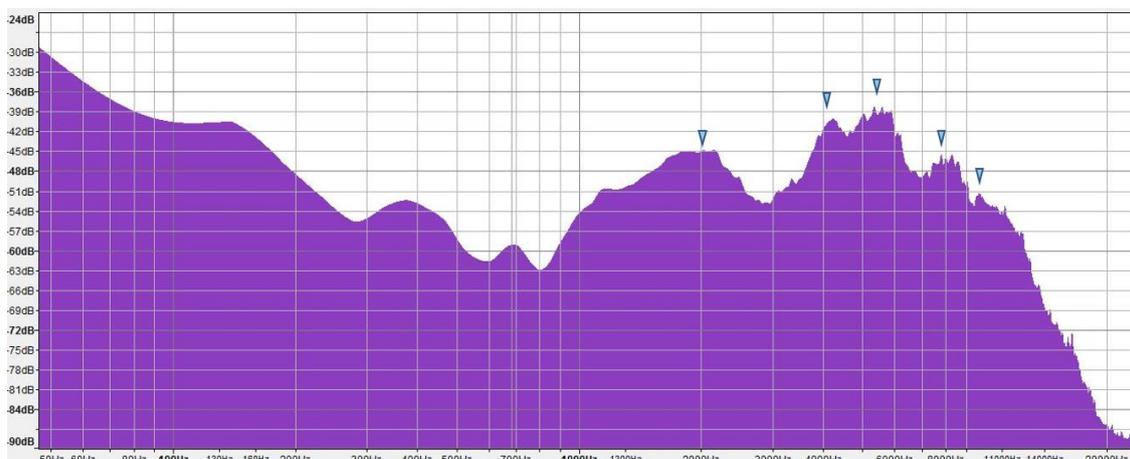


Figura 12: *Espectro de frecuencia de la grabación de las vocalizaciones de las crías.* En el eje X se observa que las frecuencias que componen la señal discurren hasta los 24kHz. El eje Y expresa la representación de la potencia en decibelios (dB), que corresponden con el logaritmo decimal de la potencia. Las flechas indican aquellos picos de frecuencia que se han utilizado posteriormente en la estimulación con tonos puros.

4.2. Comparación de los AEPs entre hemisferios

En cada animal se pudo registrar la respuesta de la corteza auditiva primaria en los dos hemisferios cerebrales. Previo al análisis y comparación de los AEPs, se comprobó que los AEPs del hemisferio izquierdo fueran comparables a los del hemisferio derecho para poder analizarlas de manera conjunta posteriormente. Como se puede ver en la figura 13 aparece un patrón similar entre los AEPs (en presencia de estímulo) de ambos hemisferios de un mismo animal, en comparación con hemisferios aleatorizados.

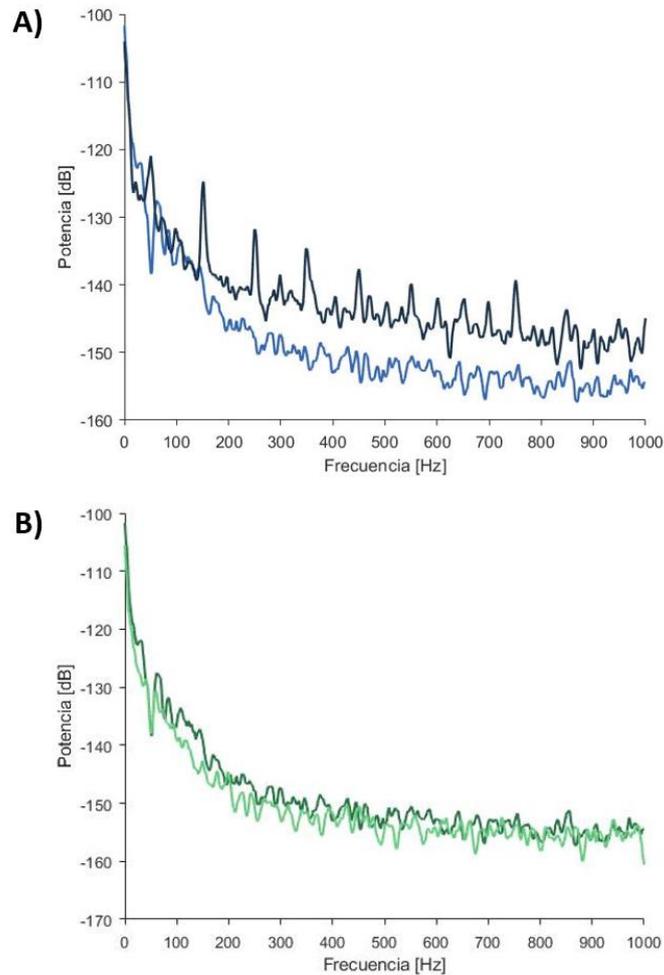


Figura 13: *Representación del espectro de frecuencias de los AEPs de dos hemisferios distintos. (A) comparación de dos hemisferios aleatorizados; (B) hemisferios contralaterales del mismo animal.*

El coeficiente de correlación de Pearson para los AEPs de los dos hemisferios de un mismo animal fue de 0.986 (Figura 14B). Este valor indica una correlación positiva muy cercana al máximo, por lo que se puede afirmar que las variaciones de un hemisferio se pueden comparar respecto al lateral, pues mostrará la misma tendencia de una manera directamente proporcional. También, se observó una correlación positiva en registros basales sin estimulación auditiva (0.93; Figura 14C)

Para intentar paliar el impacto que el bajo tamaño de la muestra pudiera haber tenido, se comparan con el índice de correlación de Pearson obtenido al contrastar los AEPs de hemisferios aleatorizados. La posible correlación de los AEPs agrupados de manera aleatoria es de 0.021 (Figura 14A). Dado que el valor del índice es cercano a cero, podemos afirmar que realmente es poco probable que la correlación de nuestros resultados se deba al azar.

Por otra parte, al comparar las correlaciones de hemisferios contralaterales de un mismo animal (con o sin estímulo auditivo) frente a hemisferios aleatorizados se confirma que la diferencia es significativa.

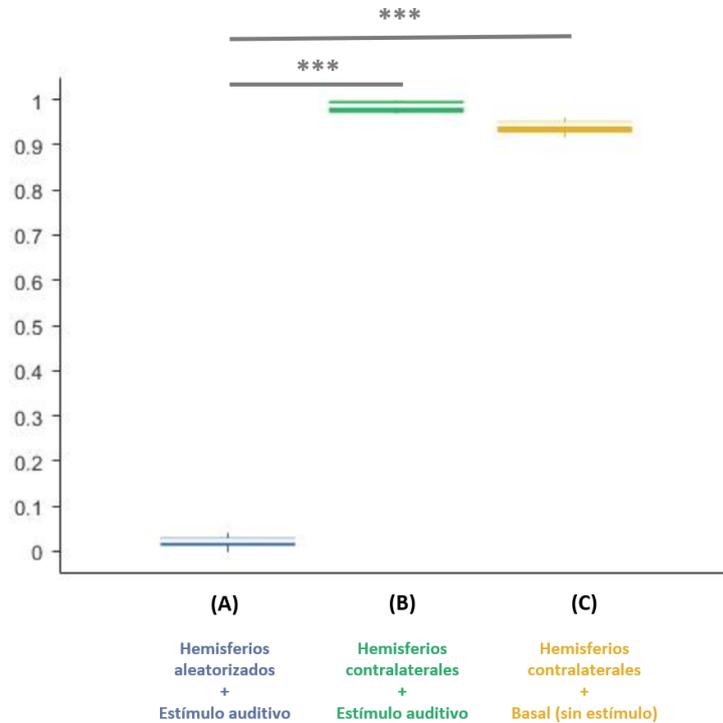


Figura 14: **Coeficiente de correlación de Pearson.** Comparación entre el coeficiente resultado de una (A) asociación aleatoria de hemisferios frente a la covarianza de interhemisférica de un mismo animal en presencia (B) y en ausencia (C) de estimulación auditiva.

4.3. Análisis de la respuesta inducida por las vocalizaciones de las crías

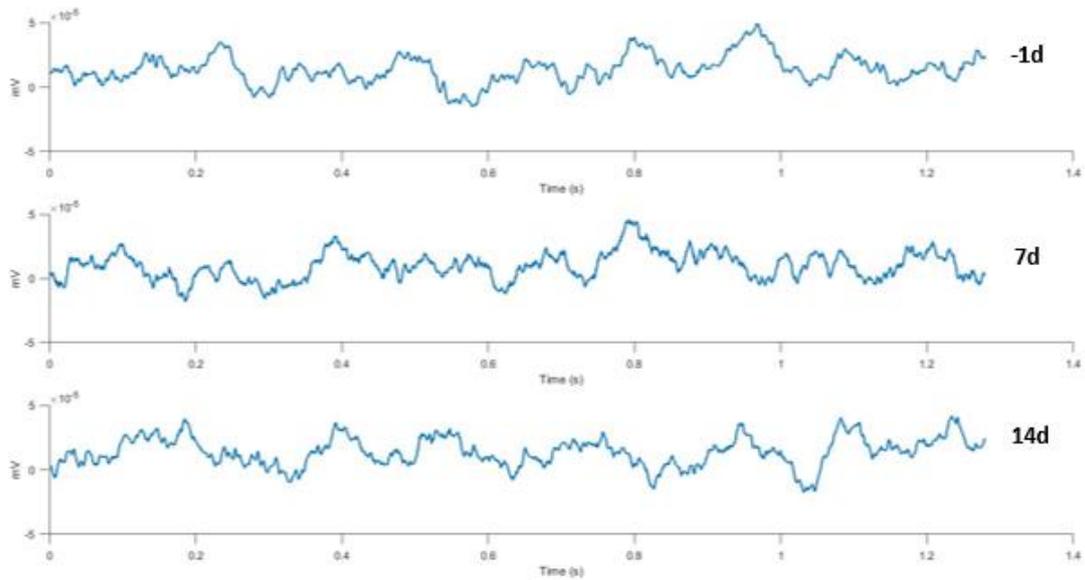
Tras el análisis visual de las señales (Figura 15), se realizó un análisis espectral de todas los AEPs en el día previo al implante de las bombas osmóticas (-1d) y a los días 7 (7d) y 14 (14d) de tratamiento. Con el fin de poder realizar una comparación entre los hemisferios de distintos animales, se utilizó el AEP -1d como basal y calculamos el coeficiente de cambio de cada una de las frecuencias respecto al valor basal para los datos de 7d y 14d. Es decir,

$$\left(\frac{\Delta F_i}{F_{io}}\right)_d = \frac{(F_i)_d - F_{io}}{F_{io}}$$

Donde $(F_i)_d$ es la potencia de la frecuencia i en el día estudiado d y F_{io} es la potencia de la frecuencia i en el día -1d. Por lo tanto, $\left(\frac{\Delta F_i}{F_{io}}\right)_{d=-1d}$ para cualquier frecuencia i es igual a 0.

En la *figura 16* se muestra el coeficiente de cambio de los animales tratados frente a los no tratados. Se puede observar una disminución en la potencia para las frecuencias de 0.1-20 Hz en los AEPs de la corteza auditiva en los animales tratados con domperidona.

A) AEPs animal control



B) AEPs animal con domperidona

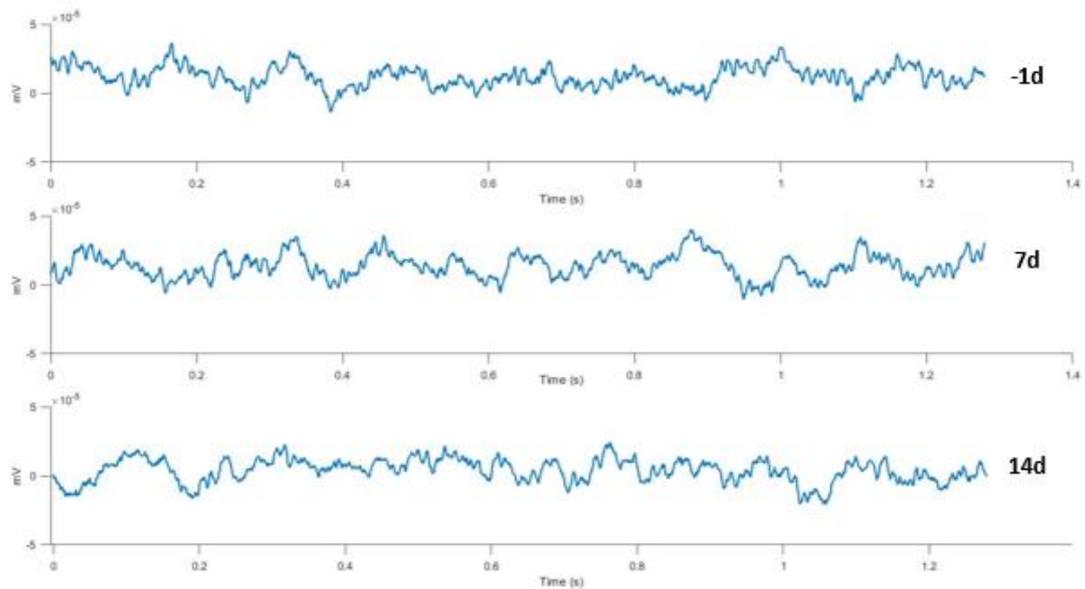


Figura 15: Ejemplo de registros de los AEPs obtenidos de (A) un animal control frente (B) un animal tratado con domperidona.

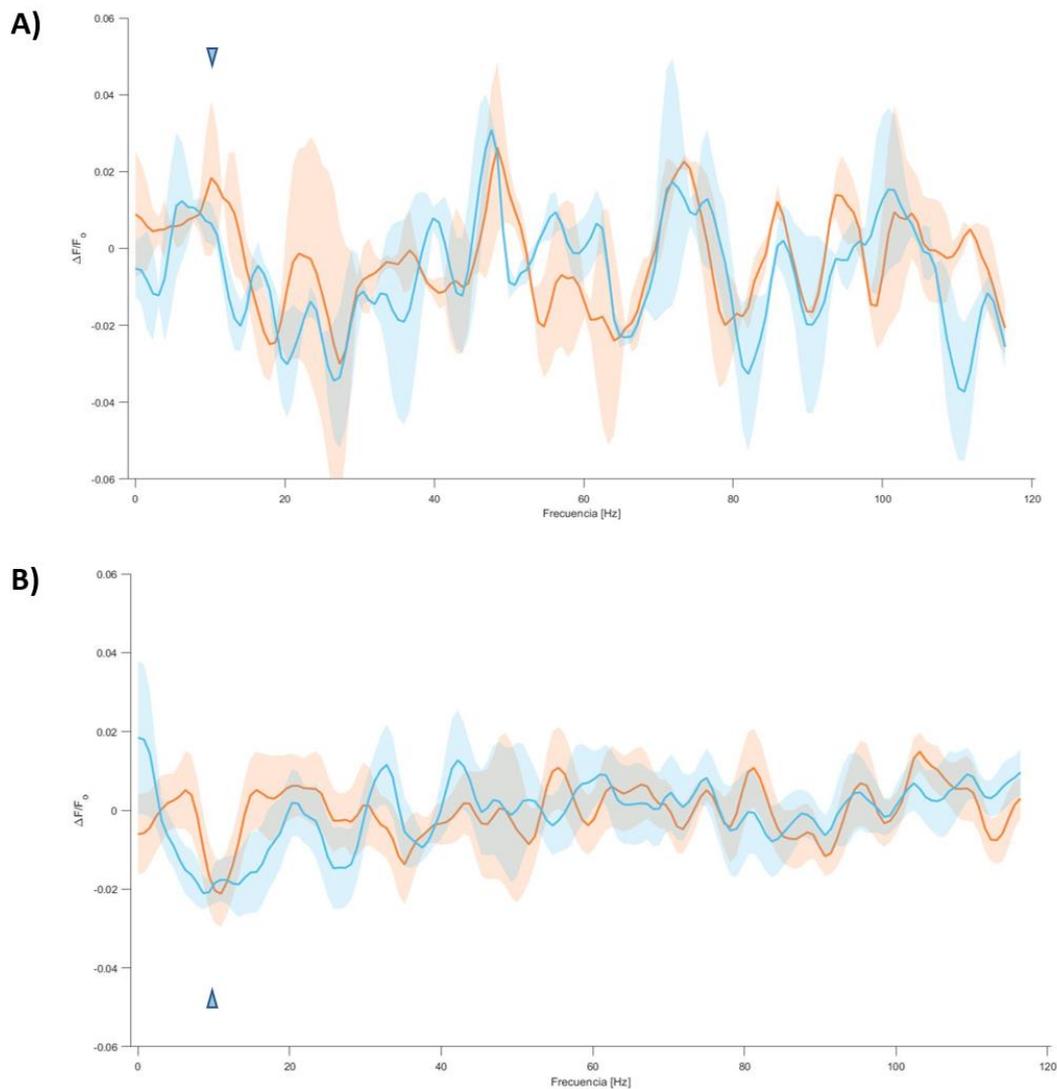


Figura 16: **Representación gráfica del coeficiente de cambio del espectro de los AEPs a 7d (naranja) y 14d (azul) de tratamiento con respecto al AEP basal (-1d).** (A) Coeficiente de cambio para el grupo control; (B) coeficiente de cambio para el grupo tratado. Nótese el descenso de la potencia para aquellas frecuencias del espectro incluidas entre 0.1-20Hz en los animales tratados con domperidona (flecha azul).

El análisis estadístico de las variaciones en los espectros de frecuencia de la actividad cortical ante el sonido de las crías mostró que aquellas que fueron tratadas con vehículo no presentaron diferencias significativas a días 7 y 14 de tratamiento (Figura 17). Sin embargo, las hembras tratadas con domperidona mostraron una reducción significativa del componente de 0.1-20 Hz del AEP, en comparación con su respectivo control, en el día 7 del tratamiento (*p=0.04; Figura 17).

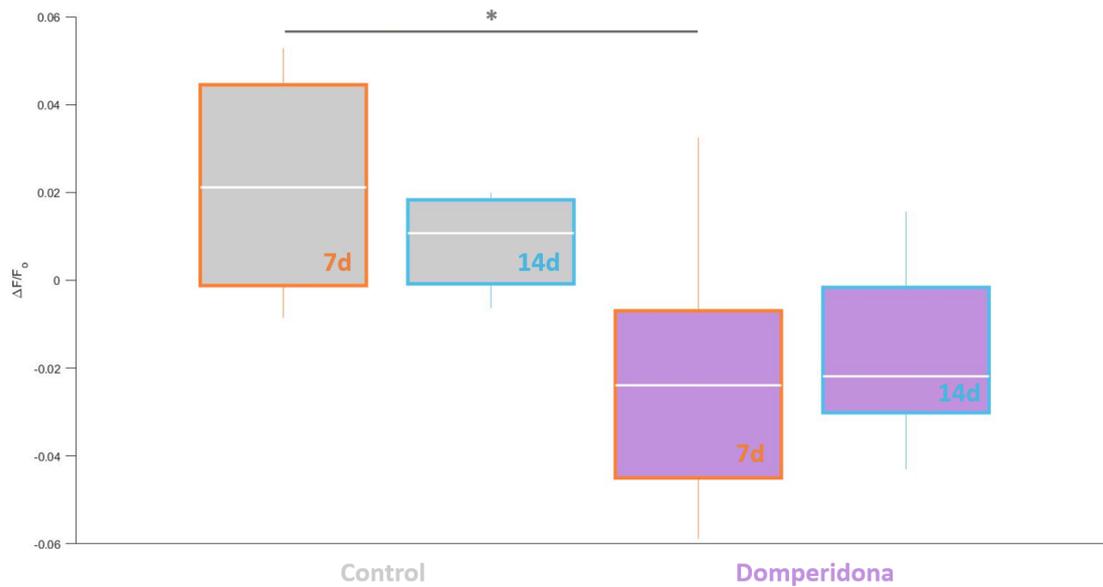


Figura 17: **Comparativa** (análisis estadístico Kolmogorov-Smirnov) **de las modificaciones en la composición de 0.1 a 20 Hz del AEP registrado en la corteza auditiva primaria a día 7 (naranja) y día 14 (azul) de tratamiento.** Véase la relación entre el tratamiento con domperidona y la reducción en la composición de la señal de frecuencias de 0.1-20Hz.

4.4. Análisis de la respuesta evocada por estimulación con frecuencias puras

En base a los resultados del análisis espectral de las vocalizaciones de las crías (Figura 12) decidimos realizar la estimulación de frecuencias puras utilizando aquellas frecuencias representativas obtenidas de la grabación de las vocalizaciones de las crías.

Para el estudio estimulando con frecuencias puras se realizó un promedio ($n = 100$) de trenes con una duración de 250 ms repetidos a un intervalo de 2.25 segundos. En el caso de las WC de las crías, se realizó un promedio de 200 adquisiciones mientras el sonido se reproducía de manera constante durante el tiempo de adquisición (1.4 s). Como se puede observar en el resultado del análisis *wavelet* (Figura 18), en los primeros 250 ms del AEP se aprecia una composición distinta al resto del potencial evocado. Además, se pudieron ver variaciones importantes en el espectro hasta 300Hz; pero nuestro análisis se centró en la respuesta hasta 120 Hz porque era más sostenida en el tiempo.

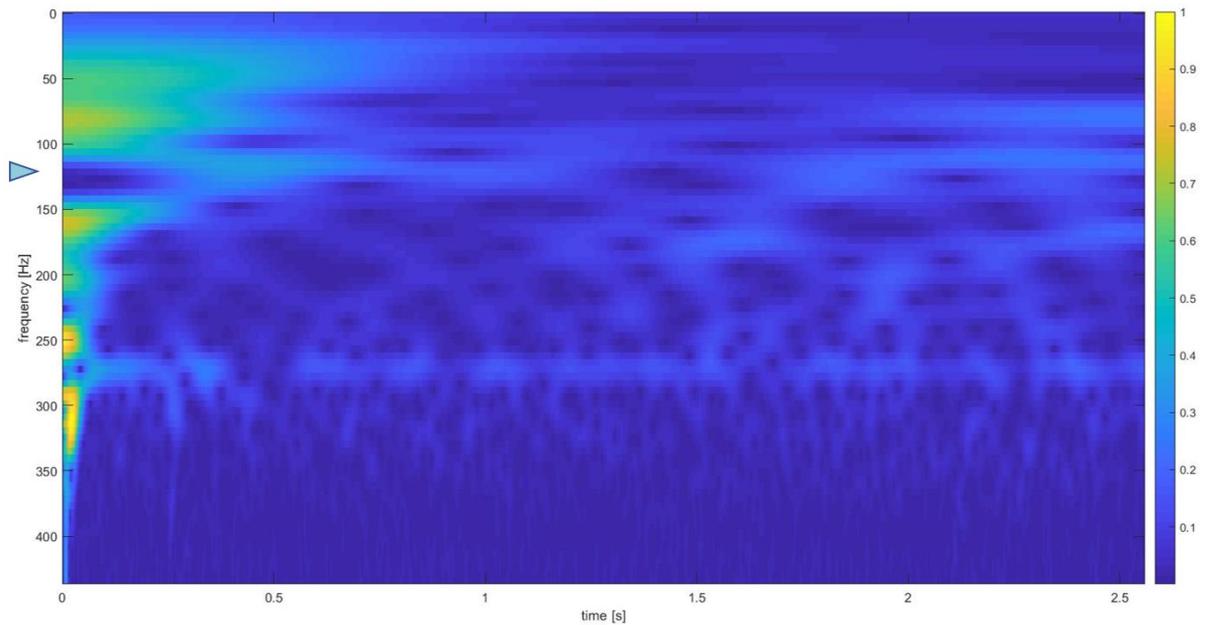


Figura 18: Análisis wavelet para estimulación con frecuencias puras. Se puede ver una representación en tres dimensiones del análisis espectral de un AEP por estimulación sistemática con un tono puro de 8kHz. En el eje X está representado el dominio tiempo, mientras que el eje Y representa las distintas frecuencias de las que se compone el espectro. Los colores representarían la potencia de cada frecuencia y la flecha azul indica la frecuencia límite para los sucesivos análisis (120 Hz).

Dado que el estímulo no estaba presente durante toda la adquisición (*Figura 10*), los AEPs inducidos por frecuencias puras se analizaron en dos partes: la fracción intra-estímulo (*Figura 19*) y la fracción inter-estímulo (*Figura 20*).

Los cambios más llamativos se detectaron en el análisis de los primeros 250 ms del AEP (la fracción intra-estímulo), observándose una disminución de la potencia del espectro comprendido entre 0.1-20 Hz del AEP pero que no fue estadísticamente significativa.

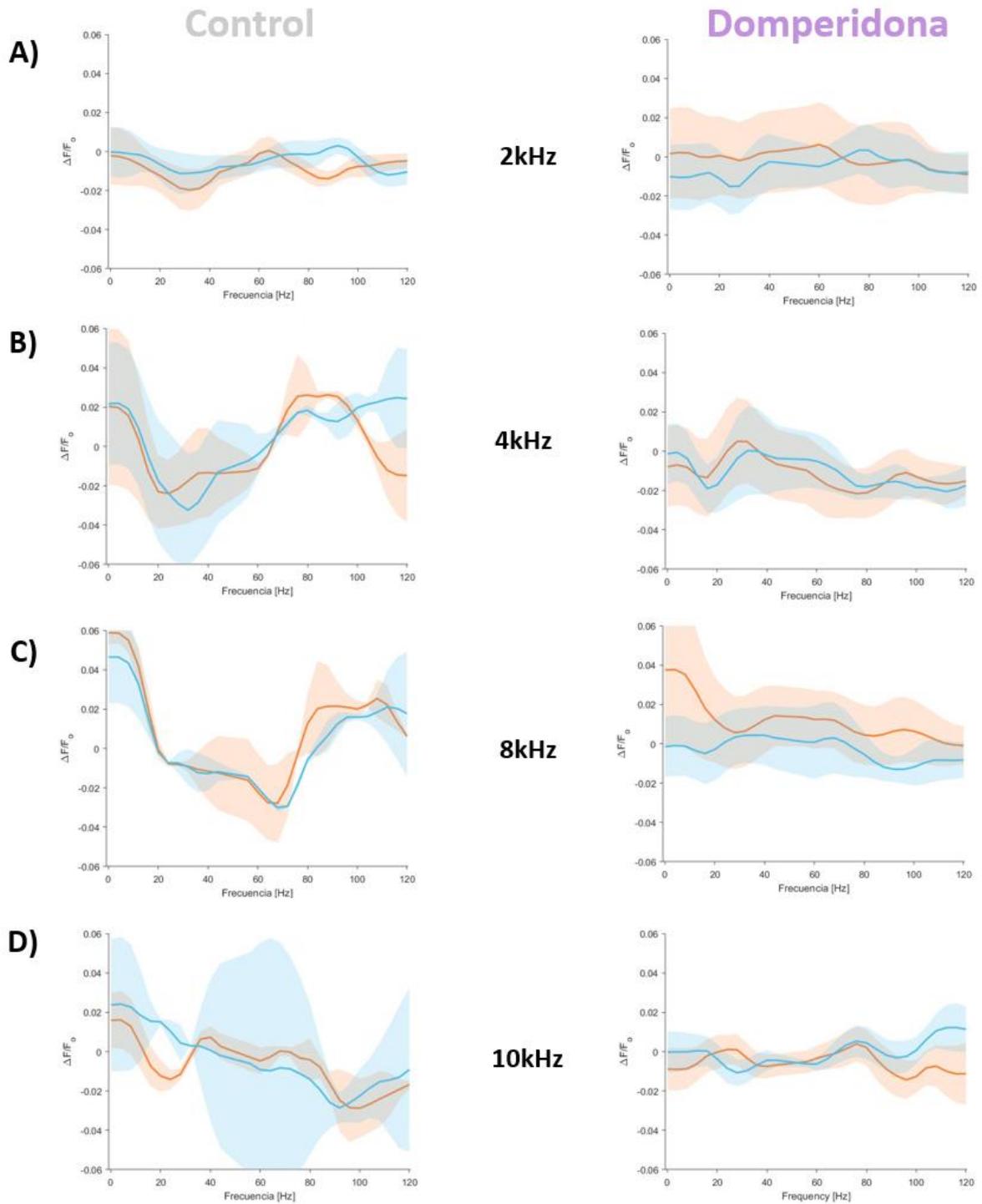


Figura 19: Coeficiente de cambio ($\Delta F/F_0$) de las frecuencias fundamentales intra-estímulo de los AEPs a día 7 (naranja) y 14 (azul) de tratamiento para distintas frecuencias puras: 2kHz (A), 4kHz (B), 8kHz (C) y 10 kHz (D). A 4kHz se observa un incremento del componente 0.1-20Hz del AEP en el grupo control frente al tratado. Con la estimulación de un tono puro a 8kHz también se observa el componente de 0.1-20 Hz aumentado, para disminuir progresivamente con el tratamiento de domperidona a día 14.

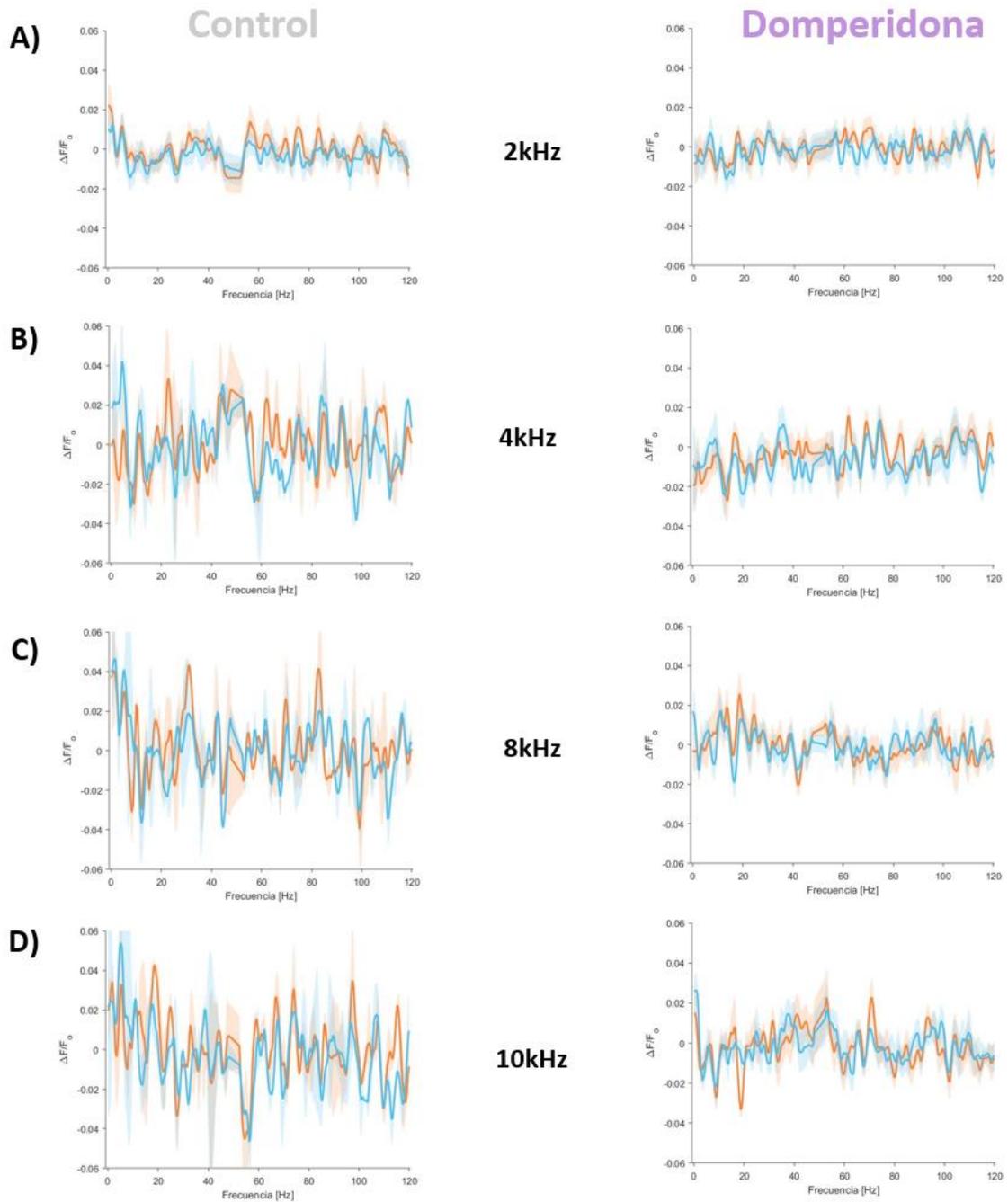


Figura 20: Coeficiente de cambio ($\Delta F/F_0$) de las frecuencias fundamentales inter-estímulo de los AEPs a día 7 (naranja) y 14 (azul) de tratamiento para distintas frecuencias puras: 2kHz (A), 4kHz (B), 8kHz (C) y 10 kHz (D).

4.5. Comprobación de la eficacia del modelo de hiperprolactinemia

Datos sin publicar del laboratorio relacionan modificaciones en el peso del útero tras el tratamiento con PRL. Tras el análisis estadístico de tipo Kolmogorov-Smirnov, se puede afirmar que el útero de los animales tratados con domperidona es significativamente mayor al de los controles (Figura 21), por lo que puede utilizarse como índice de efectividad del tratamiento.

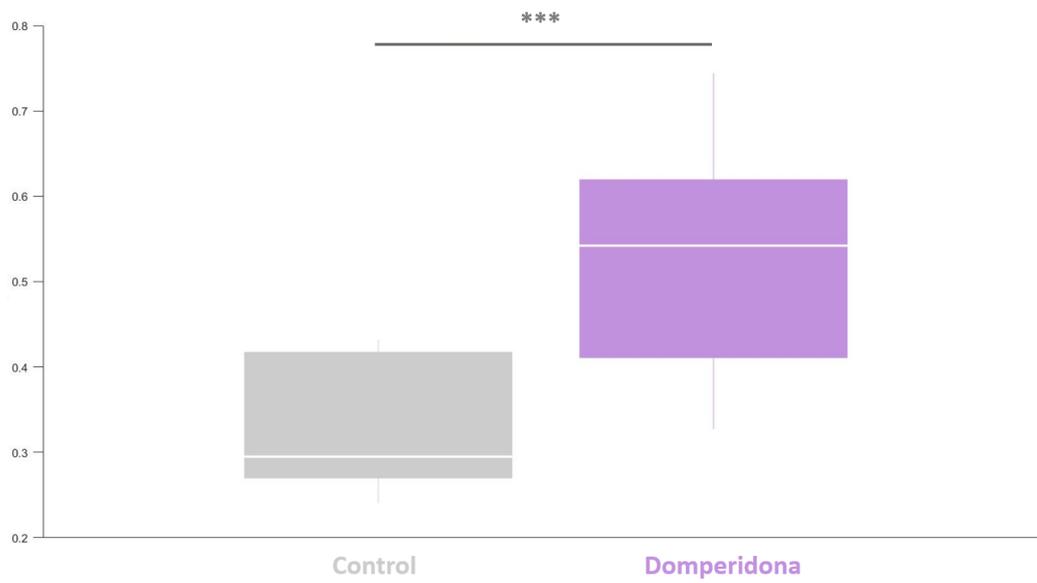


Figura 21: Comparativa de la modificación en el peso del útero entre controles frente a tratados. Se observa que el tamaño del útero es significativamente mayor en los animales tratados (N controles = 7, N domperidona = 7).

5. DISCUSIÓN

Conforme a un análisis funcional, la corteza auditiva de ratón se puede dividir en 5 áreas (138) entre las que se encuentran el A1, AAF y UF, que forman parte de lo que se denomina núcleo de la corteza auditiva (*core auditory cortex*). En A1 y AAF existe una representación tonotópica de los sonidos que llega hasta 45kHz, por lo que la representación de los ultrasonidos (emisiones >20kHz) sería incompleta. Es en el área de ultrasonidos (UF) donde se encuentra la representación no tonotópica de sonidos hasta 70kHz (138).

Gran parte de los estudios se centran en las vocalizaciones ultrasonido como la forma de comunicación principal entre ratones adultos y en la interacción madre-cría (53,98,173). Sin embargo hay evidencias de que también es importante la comunicación a frecuencias más bajas (55,138). En la mayoría de los estudios se analiza la respuesta a vocalizaciones ultrasonido de las crías que emiten cuando están aisladas durante las dos primeras semanas de vida (174,175). Específicamente se acota la grabación de crías entre P5 y P12 (175), porque a partir de esas fechas el crecimiento de pelo y aumento de masa puede modificar la capacidad de la cría para ajustar su temperatura, que puede afectar al ratio de vocalizaciones (175–177). En nuestro caso utilizamos grabaciones de vocalizaciones de toda la camada en P8 y en presencia de la madre. Por lo tanto, las vocalizaciones registradas se correspondían a las WC típicas durante la lactancia, que se encuentran dentro del espectro audible humano (55) y del rango de frecuencias al que responde A1 (138). En este trabajo se ha podido comprobar que dichas vocalizaciones (WC) modifican la respuesta de A1 de la madre. Esto concordaría con el hecho de que las neuronas de A1 y AAF responden idealmente a frecuencias de entre 10 y 30 kHz (147,148).

Por la manera tradicional de adquirir y analizar los potenciales de campo no se sabe con certeza el origen de las corrientes que los componen. Esto se debe a que los análisis centrados en el aspecto temporal dejan de lado el papel de la conducción en volumen del propio potencial. Es decir, para poder interpretar correctamente un LFP es esencial tener en cuenta el espacio por el que se transmiten los potenciales que lo conforman. De tal manera que es importante conocer la citoarquitectura de las neuronas que lo generan y su configuración espacial para poder distinguir si los componentes de un potencial de campo son realmente locales o hay actividad de centros lejanos interfiriendo en el LFP. Debido al factor espacial, un mismo campo eléctrico en un volumen genera tantos potenciales de campo distintos como diferentes puntos de registro sean empleados (144,178). Para poder cerciorarse de que la actividad registrada es puramente local sería deseable realizar los experimentos con mayor número de electrodos, lo que permitiría un análisis de componentes independientes (ICA, *independent component analysis*) y así poder

identificar claramente las fuentes y los sumideros de las corrientes iónicas que conforman el potencial de campo (144). Sin embargo, dado que este trabajo se proyectó como una primera prueba de concepto centrada en una pregunta biológica, se utilizó una aproximación experimental más simple. En este caso se ha evitado el problema de la localización espacial de los potenciales mediante el estudio de potenciales auditivos evocados. Dado que los AEPs comparados en este trabajo son resultado de la normalización de numerosos AEPs individuales, podemos inferir que la actividad no relacionada con el evento de interés será eliminada (144).

El uso más extendido de los AEPs se encuentra en la clínica como prueba diagnóstica de la sordera, que permite identificar qué punto de la vía auditiva se encuentra alterado (179). En estos casos, se analiza el AEP respecto al tiempo, pues muestra un patrón característico de ondas que se corresponden con cada una de las sinapsis de la vía auditiva (180). También se utiliza esta técnica en experimentación, ya sea registrando en corteza o en tronco del encéfalo, pero en este caso los animales se encuentran bajo anestesia (181–183). Al contrario que en estos procedimientos, en este trabajo se han registrado los AEPs en A1 de animales despiertos y su análisis se ha centrado en los cambios de las frecuencias fundamentales que componen el AEP. De esta manera, discernir el posible significado funcional de las modificaciones en el espectro de los AEPs basándonos en la literatura existente es metodológicamente inviable. Primero porque la señal adquirida en animales anestesiados es difícilmente comparable con los AEPs de animales que al estar despiertos presentan mucho más “ruido circuital”. Y segundo, porque no está descrito el significado biológico de las distintas frecuencias que componen un AEPs, dado que el análisis espectral no suele ser el objeto de estudio.

5.1. Modificación de las frecuencias que componen el AEP. Correlato funcional

El resultado más destacable de este trabajo es la reducción significativa de las frecuencias entre 0.1 y 20 Hz de los AEPs en A1 de hembras con hiperprolactinemia, en respuesta a la estimulación con las vocalizaciones de las crías. Sin embargo, su correlato funcional no está tan claro. Más allá del significado funcional del cambio en la distribución de las frecuencias del AEP cabe destacar que la PRL altera la respuesta de A1 a las WC de las crías.

Como se ha mencionado anteriormente, el cambio en la distribución de las frecuencias del análisis espectral del AEP no ha sido bien estudiado. Sin embargo, en el estudio de potenciales visuales evocados se ha asociado este tipo de cambios a un aumento de la atención hacia el estímulo relevante. En el sistema visual se ha observado un aumento de la sincronización a frecuencias de 35 a 90Hz y un descenso de la sincronización a frecuencias bajas (<17Hz) en

aquellas situaciones en las que es necesario un filtro atencional para seleccionar el estímulo relevante (184).

En este proyecto las hembras tratadas con domperidona muestran una reducción de las frecuencias entre 0.1 - 20 Hz que conforman el AEP subsecuente a la estimulación con las vocalizaciones de las crías. Si bien en este trabajo no se analiza la actividad oscilatoria, nuestros resultados tal vez se podrían considerar como una adaptación sináptica que favorezca la atención selectiva a estímulos auditivos concretos y relevantes en su situación. Esto también concordaría con la hipótesis propuesta por Ehret et al, basada en observaciones comportamentales, en la cual afirma que las WC dirigen la atención de la madre a las necesidades de las crías (53,55).

Por otra parte, también se observa una tendencia de pérdida de la representación espectral de las frecuencias entre 0.1 y 20 Hz de la señal en respuesta a estimulación con tonos de frecuencias puras. En este caso los resultados no son significativos; tal vez por limitaciones en nuestro sistema de estimulación auditiva. Gran parte de la bibliografía que estudia el efecto de las vocalizaciones en la corteza auditiva primaria A1 ha reportado resultados en los que la mejor frecuencia de respuesta se encuentra entre los 10-30kHz (147,148). Por lo tanto, no encontrar un resultado significativo para la estimulación con frecuencias puras se puede deber a que los tonos puros tenían una frecuencia menor de la necesaria. También es posible que los cambios observados en el AEP se produzcan ante una estimulación compleja de frecuencias, como son las vocalizaciones de las crías (WC), pero que no esté afectado cuando la madre escucha tonos puros aislados, a pesar de que se trate de frecuencias similares (165).

Por otro lado, la estrategia experimental predilecta para estudiar la modificación de la actividad en A1 condicionada por la maternidad suele consistir en el registro individual o de un pequeño número de neuronas (147,148). Sin embargo, el abordaje experimental de este trabajo es opuesto. En vez de analizar cambios puntuales en la fisiología de una neurona, se han aplicado técnicas de registro de campo. Una de las razones es que creemos que un comportamiento maternal tan extendido a través de las especies y la evolución, como es el aumento de la sensibilidad ante las vocalizaciones de las crías (185), no se pueda explicar por un cambio funcional en un tipo neuronal concreto, sino por la suma de sucesivas modificaciones dentro del propio circuito auditivo, que en última instancia se reflejarían en los AEPs.

5.2. Efecto no lateralizado de la prolactina

En el cerebro hay numerosas funciones lateralizadas, como puede ser el lenguaje o la atención (186,187). De la misma manera, en humanos la representación del llanto se encuentra en el hemisferio izquierdo (188), lo que parece estar asociado a una mayor distribución de receptores de OX en la corteza auditiva primaria izquierda (13,189). Es por ello que gran cantidad de los estudios de sensibilidad a las vocalizaciones de las crías se han realizado en la corteza auditiva primaria izquierda (138,147,148,153,165). Pese a su relación con la OX, en nuestro modelo de hiperprolactinemia no encontramos efecto de sensibilización diferente entre ambos hemisferios. Además, tampoco se ha descrito una distribución desigual de los receptores de PRL entre hemisferios. Esto nos ha permitido analizar todos los hemisferios de forma conjunta teniendo en cuenta solo la variable del tratamiento para determinar los grupos experimentales. Cabe destacar que la correlación entre los dos hemisferios es positiva en los AEPs con y sin estimulación auditiva; pero la correlación en basal (sin estímulo) es inferior. Esto puede deberse a que la estimulación auditiva siempre es igual, por lo tanto, al promediar los AEPs, tenderán a desaparecer los eventos no relacionados con dicha estimulación. Como los AEPs basales se obtienen sin una estimulación auditiva concreta, es más probable que interfieran los ruidos de fondo (i.e. fallos en la insonorización) en la generación del potencial.

5.3. Validez del modelo de hiperprolactinemia y lactancia

Al contrario de lo que sucede con otras hormonas, los análisis de niveles de PRL o de su receptor para validar la hiperprolactinemia tienen bastantes limitaciones (78). Aunque el radioinmunoensayo es la técnica ideal para ello (190) en el contexto del laboratorio no nos fue factible utilizarlo. Por ello se intentaron implantar otras medidas indirectas que indicasen aumento de PRL, como puede ser el ratio del peso del útero. Por otra parte, como medida adicional para estudios futuros convendría analizar si se produce una hipertrofia o hiperplasia de las células lactotropas secundario al aumento de su actividad, por estimulación de la domperidona. Esto podría realizarse mediante técnicas inmunohistoquímicas (191,192).

Por último, se podría cuestionar que en un modelo de lactancia sin las crías los fenómenos plásticos no deberían tener lugar. Sin embargo, la plasticidad como tal puede aparecer en ausencia de las crías, pues es mayoritariamente estímulo dependiente (42). Por lo tanto, nuestra propuesta de modelo de hiperprolactinemia junto con las WC podría tener validez, ya que imita dos eventos que concurren durante la lactancia. Si bien en un futuro sería interesante reforzarlo con una estimulación multimodal, ya que combinando hiperprolactinemia, vocalizaciones y

olores de las crías se podría potenciar la plasticidad asociada a la lactancia incluso en ausencia de crías.

5.4. Limitaciones

Según la fisiología de la vía auditiva, a partir del complejo de la oliva superior comienza el procesamiento de información binaural para la localización del estímulo. De tal manera que los centros auditivos por encima, incluyendo CI y A1 contendrán información auditiva procedente de ambos oídos (137). Dado que se han descrito cambios en la fisiología del CI subsecuentes a la maternidad (141,193), no podemos estar seguros de que los cambios registrados en A1 no se deban a modificaciones de centros inferiores que ya tengan información binaural. Por el contrario, puede que el control auditivo descendente aumente la sensibilidad de los centros subcorticales a estímulos relacionados con las crías.

La gran mayoría de la bibliografía se centra en un aumento muy significativo de la relevancia para las madres de las USVs de las crías sobre el resto de estímulos auditivos (150,176). Si bien en nuestro caso también se observa este efecto con las WC, los efectos no son tan grandes como era de esperar. Esto se puede deber a dos razones. En primer lugar, las vocalizaciones ultrasonido tienen lugar a lo largo de toda la vida del ratón, mientras que la comunicación a bajas frecuencias es un fenómeno asociado a los primeros días de vida (P2-P15) (55). Por ello, puede que el poco tiempo de exposición a este tipo de estímulo no sea suficiente como para derivar una respuesta de mayor amplitud. Además, en nuestra aproximación experimental solo hay tres días de estimulación con WC, mientras que en un contexto fisiológico están presentes durante las dos primeras semanas de vida de manera constante (55,194). El efecto fisiológico se vería por tanto potenciado con un mayor número de estimulaciones. En segundo lugar, se hace una estimulación unimodal, mientras que las madres responden mejor ante la presentación de estímulos auditivos junto con olfativos, ya que durante la lactancia percibe de manera simultánea las vocalizaciones de las crías y su olor (148,176). Además, cabe destacar que el modelo de estudio es una hembra nulípara a la que se le induce hiperprolactinemia. Tal vez para que poder observar un cambio significativo en la respuesta cortical se necesite la conjunción de todos factores hormonales que se encuentran durante la lactancia y el embarazo.

5.5. Perspectivas futuras

El cuidado paternal no ha sido extensamente estudiado a pesar de que los machos también sufren cambios endocrinos subsecuentes al nacimiento de sus crías, aunque en menor escala que las hembras (15). En concreto, los niveles de PRL se incrementan en roedores y primates con la paternidad (15); aunque los machos posean una concentración basal de PRL menor (195). Además, los padres también responden a las vocalizaciones ultrasonido de sus crías y a las vocalizaciones de las madres para ayudar en el cuidado de su descendencia (15,196,197). No solo eso, padres humanos tienen un incremento del 20% en los niveles de PRL durante las primeras tres semanas postparto, que además se relacionaban con una mayor reducción de testosterona y mejor respuesta ante el llanto de las crías (122,198,199). Nuevas evidencias confirman que los niveles de PRL son más altos en padres que en hombres sin hijos, por lo que este incremento parece mantenerse en el tiempo (122,200).

Es decir, al igual que en las madres, en los machos de varias especies se observan incrementos de PRL y responden a estímulos sensitivos relacionados con las crías, lo que condiciona la adquisición de un comportamiento paternal. Por ello, este proyecto se podría extender en un futuro con el estudio de machos.

También sería interesante extrapolar estos resultados a humanos. Se sabe que el llanto también es capaz de condicionar a la madre de manera física y emocional (28). Además, estudios en humanos describen cambios hormonales y variaciones en los resultados de neuroimagen durante el embarazo como, por ejemplo, patrones de activación típicos de ansiedad, que se atenúan con la experiencia. También con los subsecuentes embarazos se observa un incremento de la activación del circuito de recompensa (14,28). Todos estos cambios sugieren que la plasticidad y cambios a nivel cortical como resultado de la maternidad y los cambios hormonales derivados de esta podría ser un mecanismo conservado en la evolución.

6. CONCLUSIONES

En condiciones experimentales de hiperprolactinemia en hembras maduras nulíparas despiertas, se observa una modificación de la actividad de la corteza auditiva primaria en respuesta a vocalizaciones de las crías.

El análisis de las frecuencias fundamentales que componen el AEP muestra que estos cambios son significativos en la banda comprendida entre los 0.1 y 20 Hz.

No se evidencian cambios cuando se analizan frecuencias puras, sugiriendo que es necesario un determinado ancho de banda comprendido en el rango de emisiones de las WC de las crías (4-20 kHz).

Nuestros datos experimentales no indican que exista una lateralización de la corteza auditiva frente a la vocalización de las crías en roedores despiertos.

Los datos presentados representan una aproximación *in vivo* en la que el animal no está sedado ni sujeto a un marco estereotáxico durante la consecución de los registros. Por lo tanto, no hay una interacción de los agentes anestésicos y el conjunto del registro se da en un contexto más fisiológico.

Nuestro estudio pone de manifiesto el importante papel de la PRL como modulador de la actividad de la corteza auditiva primaria durante la lactancia. Además, centra su atención en otro tipo de comunicación madre-cría de baja frecuencia poco estudiada y que es relevante para un mejor cuidado de la descendencia.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Bornstein MH, Putnick DL, Rigo P, Esposito G, Swain JE, Suwalsky JTD, et al. Neurobiology of culturally common maternal responses to infant cry. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(45):E9465–73.
2. Bridges RS. Long-term alterations in neural and endocrine processes induced by motherhood in mammals. *Horm Behav* [Internet]. 2016;77:193–203. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yhbeh.2015.09.001>
3. Kim P, Strathearn L, Swain JE. The maternal brain and its plasticity in humans. *Horm Behav* [Internet]. 2016;77:113–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yhbeh.2015.08.001>
4. Olazábal DE, Pereira M, Agrati D, Ferreira A, Fleming AS, González-Mariscal G, et al. Flexibility and adaptation of the neural substrate that supports maternal behavior in mammals. *Neurosci Biobehav Rev* [Internet]. 2013;37(8):1875–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.04.004>
5. Valtcheva S, Froemke RC. Neuromodulation of maternal circuits by oxytocin. *Cell Tissue Res* [Internet]. 2019 Jan 30;375(1):57–68. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00441-018-2883-1>
6. Kohl J, Dulac C. Neural control of parental behaviors. *Curr Opin Neurobiol* [Internet]. 2018;49(1):116–22. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.02.002>
7. Dulac C, O'Connell LA, Wu Z. Neural control of maternal and paternal behaviors. *Science* (80-). 2014 Aug 15;345(6198):765–70.
8. Insel TR, Young LJ. The neurobiology of attachment. *Nat Rev Neurosci*. 2001;2(2):129–36.
9. Kurth E, Kennedy HP, Zemp Stutz E, Kesselring A, Fornaro I, Spichiger E. Responding to a crying infant - You do not learn it overnight: A phenomenological study. *Midwifery* [Internet]. 2014;30(6):742–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.midw.2013.06.017>
10. Parsons CE, Young KS, Petersen M V., Jegindoe Elmholdt EM, Vuust P, Stein A, et al. Duration of motherhood has incremental effects on mothers' neural processing of infant vocal cues: A neuroimaging study of women. *Sci Rep* [Internet]. 2017;7(1):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-01776-3>
11. Rickenbacher E, Perry RE, Sullivan RM, Moita MA. Freezing suppression by oxytocin in central amygdala allows alternate defensive behaviours and mother-pup interactions. *Elife*. 2017;6:1–17.
12. Rilling JK, Young LJ. The biology of mammalian parenting and its effect on offspring social development. *Science* (80-). 2014;345(6198):771–6.
13. Marlin BJ, Mitre M, D'amour JA, Chao M V., Froemke RC. Oxytocin enables maternal behaviour by balancing cortical inhibition. *Nature* [Internet]. 2015 Apr 15;520(7548):499–504. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature14402>
14. Bridges RS. Neuroendocrine regulation of maternal behavior. *Front Neuroendocrinol* [Internet]. 2015;36:178–96. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yfrne.2014.11.007>
15. Horrell ND, Hickmott PW, Saltzman W. Neural Regulation of Paternal Behavior in Mammals: Sensory, Neuroendocrine, and Experiential Influences on the Paternal Brain. In: *Current Topics in Behavioral Neuroscience* [Internet]. 2018. p. 111–60. Available from: http://link.springer.com/10.1007/7854_2018_55
16. Woodside B, Budin R, Wellman MK, Abizaid A. Many mouths to feed: The control of food intake during lactation. *Front Neuroendocrinol* [Internet]. 2012;33(3):301–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yfrne.2012.09.002>
17. Numan M. Medial preoptic area and maternal behavior in the female rat. *J Comp Physiol Psychol*. 1974;87(4):746–59.
18. Numan M. Maternal Behavior: Neural Circuits, Stimulus Valence, and Motivational Processes. *Parenting*. 2012;12(2–3):105–14.
19. Ferris CF, Kulkarni P, Sullivan JM, Harder JA, Messenger TL, Febo M. Pup suckling is more rewarding than cocaine: Evidence from functional magnetic resonance imaging and three-dimensional computational analysis. *J Neurosci*. 2005;25(1):149–56.
20. Bridges RS, Hays LE. Steroid-induced alterations in mRNA expression of the long form of the prolactin receptor in the medial preoptic area of female rats: Effects of exposure to a pregnancy-like regimen of progesterone and estradiol. *Mol Brain Res*. 2005;140(1–2):10–6.
21. Bridges RS, Rosenblatt JS, Feder HH. Serum Progesterone Concentrations and Maternal Behavior in Rats after Pregnancy Termination: Behavioral Stimulation after Progesterone Withdrawal and Inhibition by Progesterone Maintenance*. *Endocrinology* [Internet]. 1978 Jan;102(1):258–67. Available from: <https://academic.oup.com/endo/article->

lookup/doi/10.1210/endo-102-1-258

22. Bridges RS, Ronsheim PM. Prolactin (Prl) regulation of maternal behavior in rats: Bromocriptine treatment delays and prl promotes the rapid onset of behavior. *Endocrinology*. 1990;126(2):837–48.
23. Bridges RS, Robertson MC, Shiu RPC, Friesen HG, Stuer AM, Mann PE. Endocrine Communication between Conceptus and Mother: Placental Lactogen Stimulation of Maternal Behavior. *Neuroendocrinology* [Internet]. 1996;64(1):57–64. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/127098>
24. Peake GT, Buckman MT, Davis LE, Standefer J. Pituitary and placentally derived hormones in cerebrospinal fluid during normal human pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*. 1983;56(1):173–6.
25. Scanlan VF, Byrnes EM, Bridges RS. Reproductive experience and activation of maternal memory. *Behav Neurosci* [Internet]. 2006;120(3):676–86. Available from: <http://doi.apa.org/getdoi.cfm?doi=10.1037/0735-7044.120.3.676>
26. Moltz H, Robbins D. Maternal behavior of primiparous and multiparous rats. *J Comp Physiol Psychol*. 1965;60(3):417–21.
27. Moltz H, Robbins D, Parks M. Cesarean delivery and maternal behavior of primiparous and multiparous rats. *J Comp Physiol Psychol*. 1966;61(3):455–60.
28. Swain JE, Kim P, Ho SS. Neuroendocrinology of parental response to baby-cry. *J Neuroendocrinol*. 2011;23(11):1036–41.
29. Swain JE. Baby stimuli and the parent brain: functional neuroimaging of the neural substrates of parent-infant attachment. *Psychiatry (Edgmont)* [Internet]. 2008;5(8):28–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19727273> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2695737>
30. Lee A, Li M, Watchus J, Fleming AS. Neuroanatomical basis of maternal memory in postpartum rats: Selective role for the nucleus accumbens. *Behav Neurosci*. 1999;113(3):523–38.
31. Li M, Fleming AS. Differential involvement of nucleus accumbens shell and core subregions in maternal memory in postpartum female rats. *Behav Neurosci*. 2003;117(3):426–45.
32. Nephew BC, Bridges RS. Arginine vasopressin V1a receptor antagonist impairs maternal memory in rats. *Physiol Behav*. 2008;95(1–2):182–6.
33. Champagne FA. Interplay Between Social Experiences and the Genome: Epigenetic Consequences for Behavior [Internet]. 1st ed. Vol. 77, *Advances in Genetics*. Elsevier Inc.; 2012. 33–57 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-387687-4.00002-7>
34. Furuta M, Bridges RS. Effects of maternal behavior induction and pup exposure on neurogenesis in adult, virgin female rats. *Brain Res Bull*. 2009;80(6):408–13.
35. Larsen CM, Grattan DR. 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*. 2010;151(8):3805–14.
36. Capuco A V., Akers RM. Lactation: Galactopoiesis, Effects of Hormones and Growth Factors. *Encycl Dairy Sci Second Ed*. 2011;26–31.
37. Neville MC. Anatomy and physiology of lactation. *Pediatr Clin North Am*. 2001;48(1):13–34.
38. Pedersen CA, Caldwell JD, Walker C, Ayers G, Mason GA. Oxytocin activates the postpartum onset of rat maternal behavior in the ventral tegmental and medial preoptic areas. *Behav Neurosci*. 1994;108(6):1163–71.
39. Robinson ICAF. Oxytocin and the Milk-Ejection Reflex. 1986;6:153–72.
40. Byrnes EM, Rigero BA, Bridges RS. Opioid receptor antagonism during early lactation results in the increased duration of nursing bouts. *Physiol Behav*. 2000;70(1–2):211–6.
41. Cruz A de M, Maiorka PC, Canteras NS, Sukikara MH, Felicio LF. Morphine treatment during pregnancy modulates behavioral selection in lactating rats. *Physiol Behav* [Internet]. 2010;101(1):40–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2010.04.013>
42. Febo M, Stolberg TL, Numan M, Bridges RS, Kulkarni P, Ferris CF. Nursing stimulation is more than tactile sensation: It is a multisensory experience. *Horm Behav*. 2008;54(2):330–9.
43. Febo M, Numan M, Ferris CF. Functional magnetic resonance imaging shows oxytocin activates brain regions associated with mother-pup bonding during suckling. *J Neurosci*. 2005;25(50):11637–44.
44. Lincoln DW, Wakerley JB. Factors governing the periodic activation of supraoptic and paraventricular neurosecretory cells during suckling in the rat. *J Physiol* [Internet]. 1975 Sep 1;250(2):443–61. Available from:

<http://doi.wiley.com/10.1113/jphysiol.1975.sp011064>

45. Numan M. Motivational systems and the neural circuitry of maternal behavior in the rat. *Dev Psychobiol* [Internet]. 2007 Jan;49(1):12–21. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/dev.20200/abstract%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17299788>
46. Johns JMM, Joyner PWW, McMurray MSS, Elliott DLL, Hofler VEE, Middleton CLL, et al. The effects of dopaminergic/serotonergic reuptake inhibition on maternal behavior, maternal aggression, and oxytocin in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* [Internet]. 2005 Aug;81(4):769–85. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091305705002029>
47. Keer S. E, Stern J. M. Dopamine receptor blockade in the nucleus accumbens inhibits maternal retrieval and licking, but enhances nursing behavior in lactating rats. *Physiol Behav* [Internet]. 1999 Nov;67(5):659–69. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S003193849900116X>
48. Keer S. E, Stern J. M. Dopamine receptor blockade in the nucleus accumbens inhibits maternal retrieval and licking, but enhances nursing behavior in lactating rats. *Physiol Behav*. 1999 Nov;67(5):659–69.
49. Peters L, Hoefler M, Ben-Jonathan N. The posterior pituitary: regulation of anterior pituitary prolactin secretion. *Science* (80-) [Internet]. 1981 Aug 7;213(4508):659–61. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.7256264>
50. Brummelte S, Galea LAM. Postpartum depression: Etiology, treatment and consequences for maternal care. *Horm Behav* [Internet]. 2016;77:153–66. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yhbeh.2015.08.008>
51. Kim S, Soeken TA, Cromer SJ, Martinez SR, Hardy LR, Strathearn L. Oxytocin and postpartum depression: Delivering on what's known and what's not. *Brain Res* [Internet]. 2014;1580:219–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2013.11.009>
52. Esposito G, Manian N, Truzzi A, Bornstein MH. Response to infant cry in clinically depressed and non-depressed mothers. *PLoS One*. 2017;12(1):1–15.
53. Ehret G. Infant rodent ultrasounds - A gate to the understanding of sound communication. *Behav Genet*. 2005;35(1):19–29.
54. Ehret G, Riecke S. Mice and humans perceive multiharmonic communication sounds in the same way. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2002 Jan 8;99(1):479–82. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.012361999>
55. Ehret G, Bernecker C. Low-frequency sound communication by mouse pups (*Mus musculus*): wriggling calls release maternal behaviour. *Anim Behav*. 1986;34(3):821–30.
56. Tata JR. One hundred years of hormones. *EMBO Rep* [Internet]. 2005 Jun;6(6):490–6. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1038/sj.embor.7400444>
57. Crespo González I. *Fisiopatología general*. Paraninfo; 2016.
58. Treier M, Rosenfeld MG. The hypothalamic-pituitary axis: Co-development of two organs. *Curr Opin Cell Biol*. 1996;8(6):833–43.
59. Cocco C, Brancia C, Corda G, Ferri GL. The hypothalamic-pituitary axis and autoantibody related disorders. *Int J Mol Sci*. 2017;18(11).
60. Plant TM. 60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: The hypothalamo-pituitary-gonadal axis. *J Endocrinol* [Internet]. 2015 Aug;226(2):T41–54. Available from: <https://joe.bioscientifica.com/view/journals/joe/226/2/T41.xml>
61. Eliava M, Melchior M, Knobloch-Bollmann HS, Wahis J, da Silva Gouveia M, Tang Y, et al. A New Population of Parvocellular Oxytocin Neurons Controlling Magnocellular Neuron Activity and Inflammatory Pain Processing. *Neuron* [Internet]. 2016 Mar;89(6):1291–304. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S089662731600088X>
62. Armstrong WE, Warach S, Hatton GI, Mcneill TH. Subnuclei in the rat hypothalamic paraventricular nucleus: A cytoarchitectural, horseradish peroxidase and immunocytochemical analysis. *Neuroscience*. 1980;5(11):1931–58.
63. Mellado Valero S. *Correlato morfológico-funcional de los cambios en la plasticidad sináptica inducidos por la Prolactina*. Universidad Castilla la Mancha. Facultad de Medicina; 2019.
64. Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. Prolactin: Structure, Function, and Regulation of Secretion. *Physiol Rev* [Internet]. 2000 Jan 10;80(4):1523–631. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780125154000500373>
65. Marano RJ, Ben-Jonathan N. Minireview: Extrapituitary prolactin: An update on the distribution, regulation, and functions. *Mol Endocrinol*. 2014;28(5):622–33.

66. Ben-Jonathan N, LaPensee CR, LaPensee EW. What can we learn from rodents about prolactin in humans? *Endocr Rev.* 2008;29(1):1–41.
67. Stephen Frawley L, Boockfor FR, Hoeffler JP. Identification by plaque assays of a pituitary cell type that secretes both growth hormone and prolactin. *Endocrinology.* 1985;116(2):734–7.
68. Porter TE, Chapman LE, Van Dolah FM, Frawley LS. Normal Differentiation of Prolactin Cells in Neonatal Rats Requires a Maternal Signal Specific to Early Lactation*. *Endocrinology* [Internet]. 1991 Feb;128(2):792–6. Available from: <https://academic.oup.com/endo/article-lookup/doi/10.1210/endo-128-2-792>
69. Goffin V, Shiverick KT, Kelly PA, Martial JA. Sequence-Function Relationships Within the Expanding. *Endocr Rev.* 1996;17(4):385–410.
70. Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly PA. Prolactin (PRL) and its receptor: Actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev.* 1998;19(3):225–68.
71. Cabrera-Reyes EA, Limón-Morales O, Rivero-Segura NA, Camacho-Arroyo I, Cerbón M. Prolactin function and putative expression in the brain. *Endocrine* [Internet]. 2017;57(2):199–213. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s12020-017-1346-x>
72. Bernard V, Young J, Chanson P, Binart N. New insights in prolactin: Pathological implications. *Nat Rev Endocrinol* [Internet]. 2015;11(5):265–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2015.36>
73. Korshunov KS, Blakemore LJ, Trombley PQ. Dopamine: A modulator of circadian rhythms in the central nervous system. *Front Cell Neurosci.* 2017;11(April):1–17.
74. Grattan D. Behavioural significance of prolactin signalling in the central nervous system during pregnancy and lactation. *Reproduction.* 2002 Apr 1;123(4):497–506.
75. Roelfsema F, Pijl H, Keenan DM, Veldhuis JD. Prolactin secretion in healthy adults is determined by gender, age and body mass index. *PLoS One.* 2012;7(2):1–10.
76. Bertram R, Helena C V., Gonzalez-Iglesias AE, Tabak J, Freeman ME. A tale of two rhythms: The emerging roles of oxytocin in rhythmic prolactin release. Vol. 22, *Journal of Neuroendocrinology.* 2010. p. 778–84.
77. Gerlo S, Verdood P, Hooghe-Peters EL, Kooijman R. Modulation of prolactin expression in human T lymphocytes by cytokines. *J Neuroimmunol.* 2005;162(1–2):190–3.
78. Smith TP, Kavanagh L, Healy ML, McKenna TJ. Technology insight: Measuring prolactin in clinical samples. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2007;3(3):279–89.
79. Obál F, Garcia-Garcia F, Kacsóh B, Taishi P, Bohnet S, Horseman ND, et al. Rapid eye movement sleep is reduced in prolactin-deficient mice. *J Neurosci.* 2005;25(44):10282–9.
80. DeLeon DD, Zelinski-Wooten MB, Barkley MS. Hormonal basis of variation in oestrous cyclicity in selected strains of mice. *J Reprod Fertil.* 1990;89(1):117–26.
81. Tanner MJ, Hadlow NC, Wardrop R. Variation of female prolactin levels with menopausal status and phase of menstrual cycle. *Aust New Zeal J Obstet Gynaecol.* 2011;51(4):321–4.
82. Bethea CL, Neili JD. Prolactin secretion after cervical stimulation of rats maintained in constant dark or constant light. *Endocrinology.* 1979;104(4):870–6.
83. Cabrera V, Cantú D, Ramos E, Vanoye-Carlo A, Cerbón M, Morales T. Lactation is a natural model of hippocampus neuroprotection against excitotoxicity. *Neurosci Lett.* 2009;461(2):136–9.
84. Galea LAM, Leuner B, Slattery DA. Hippocampal plasticity during the peripartum period: Influence of sex steroids, stress and ageing. *J Neuroendocrinol.* 2014;26(10):641–8.
85. Gurtunca N, Sperling MA. Growth Hormone, Prolactin, and Placental Lactogen in the Fetus and Newborn [Internet]. Fifth Edit. *Fetal and Neonatal Physiology.* Elsevier Inc.; 2017. 1470-1476.e1 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-323-35214-7.00144-X>
86. Linzer DIH, Fisher SJ. The placenta and the prolactin family of hormones: Regulation of the physiology of pregnancy. *Mol Endocrinol.* 1999;13(6):837–40.
87. Voogt J, Robertson M, Friesen H. Inverse Relationship of Prolactin and Rat Placental Lactogen During Pregnancy1. *Biol Reprod.* 1982;26(5):800–5.
88. Grattan DR, Kokay IC. Prolactin: A pleiotropic neuroendocrine hormone. *J Neuroendocrinol.* 2008;20(6):752–63.

89. Byrnes EM, Bridges RS. Lactation reduces prolactin levels in reproductively experienced female rats. *Horm Behav.* 2005;48(3):278–82.
90. Selmanoff M, Gregerson KA. Suckling decreases dopamine turnover in both medial and lateral aspects of the median eminence in the rat. *Neurosci Lett [Internet]*. 1985 Jun;57(1):25–30. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0304394085900357>
91. Grattan DR. The hypothalamo-prolactin axis. *J Endocrinol.* 2015;226(2):T101–22.
92. Nolan LA, Levy A. The trophic effects of oestrogen on male rat anterior pituitary lactotrophs. *J Neuroendocrinol.* 2009;21(5):457–64.
93. Kansra S, Yamagata S, Sneade L, Foster L, Ben-Jonathan N. Differential effects of estrogen receptor antagonists on pituitary lactotroph proliferation and prolactin release. *Mol Cell Endocrinol.* 2005;239(1–2):27–36.
94. Capuco AV, Akers RM. Lactation | Galactopoiesis, Effects of Hormones and Growth Factors. In: *Encyclopedia of Dairy Sciences [Internet]*. Elsevier; 2011. p. 26–31. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B0122272358002340>
95. Murai I, Ben-Jonathan N. Acute stimulation of prolactin release by estradiol: Mediation by the posterior pituitary. *Endocrinology.* 1990;126(6):3179–84.
96. Bridges RS, Robertson MC, Shiu RPC, Sturgis JD, Henriquez BM, Mann PE. Central lactogenic regulation of maternal behavior in rats: Steroid dependence, hormone specificity, and behavioral potencies of rat prolactin and rat placental lactogen I. *Endocrinology.* 1997;138(2):756–63.
97. Mena F, Grosvenor CE. Effect of suckling and of exteroceptive stimulation upon prolactin release in the rat during late lactation. *J Endocrinol.* 1972;52(1):11–22.
98. Sewell GD. Ultrasonic Communication in Rodents. *Nature [Internet]*. 1970 Jul;227(5256):410–410. Available from: <http://www.nature.com/articles/227410a0>
99. Terkel J, Damassa DA, Sawyer CH. Ultrasonic cries from infant rats stimulate prolactin release in lactating mothers. *Horm Behav.* 1979;12(1):95–102.
100. Ellis LA, Mastro AM, Picciano MF. Milk-borne prolactin and neonatal development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 1996;1(3):259–69.
101. Grattan DR, Pi XJ, Andrews ZB, Augustine RA, Kokay IC, Summerfield MR, et al. Prolactin receptors in the brain during pregnancy and lactation: Implications for behavior. *Horm Behav.* 2001;40(2):115–24.
102. Bernard V, Young J, Binart N. Prolactin — a pleiotropic factor in health and disease. *Nat Rev Endocrinol.* 2019 Jun 21;15(6):356–65.
103. Ignacak A, Kasztelnik M, Sliwa T, Korbut RA, Rajda K, Guzik TJ. Prolactin—not only lactotrophin. A “new” view of the “old” hormone. *J Physiol Pharmacol [Internet]*. 2012 Oct;63(5):435–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23211297>
104. Walsh RJ, Slaby FJ, Posner BI. A receptor-mediated mechanism for the transport of prolactin from blood to cerebrospinal fluid. *Endocrinology.* 1987;120(5):1846–50.
105. Brown RSE, Wyatt AK, Herbison RE, Knowles PJ, Ladyman SR, Binart N, et al. Prolactin transport into mouse brain is independent of prolactin receptor. *FASEB J.* 2016;30(2):1002–10.
106. Moreno Ruiz B. Función de la Prolactina en la dinámica circuital del hipocampo durante el proceso de aprendizaje y memoria espacial. Universidad de Castilla La Mancha; 2019.
107. Riecher-Rössler A, Rybakowski JK, Pflueger MO, Beyrau R, Kahn RS, Malik P, et al. Hyperprolactinemia in antipsychotic-naïve patients with first-episode psychosis. *Psychol Med.* 2013;43(12):2571–82.
108. Truscott TG, Sinclair RS. *Advances in experimental medicine and biology.* Vol. 44, International Journal of Radiation Biology. 1983. 413–413 p.
109. Clapp C, Martínez de la Escalera L, Martínez de la Escalera G. Prolactin and blood vessels: A comparative endocrinology perspective. *Gen Comp Endocrinol [Internet]*. 2012;176(3):336–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2011.12.033>
110. Dave JR, Brown N V., Knazek RA. Prolactin modifies the prostaglandin synthesis, prolactin binding and fluidity of mouse liver membranes. *Biochem Biophys Res Commun [Internet]*. 1982 Sep;108(1):193–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0006291X82918502>

111. Savino W. Prolactin: An Immunomodulator in Health and Disease. *Front Horm Res.* 2017;48:69–75.
112. Recalde G, Moreno-Sosa T, Yúdica F, Quintero CA, Sánchez MB, Jahn GA, et al. Contribution of sex steroids and prolactin to the modulation of T and B cells during autoimmunity. *Autoimmun Rev* [Internet]. 2018;17(5):504–12. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2018.03.006>
113. Ochoa-Amaya JE, Hamasato EK, Tobaruela CN, Queiroz-Hazarbassanov N, Anselmo Franci JA, Palermo-Neto J, et al. Short-term hyperprolactinemia decreases allergic inflammatory response of the lungs. *Life Sci* [Internet]. 2015;142:66–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2015.10.016>
114. Eccard JA, Dammhahn M, Ylönen H. The Bruce effect revisited: is pregnancy termination in female rodents an adaptation to ensure breeding success after male turnover in low densities? *Oecologia.* 2017;185(1):81–94.
115. Binart N, Bachelot A, Bouilly J. Impact of prolactin receptor isoforms on reproduction. *Trends Endocrinol Metab* [Internet]. 2010;21(6):362–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2010.01.008>
116. Terkel J. Neuroendocrine processes in the establishment of pregnancy and pseudopregnancy in rats. *Psychoneuroendocrinology.* 1988;13(1–2):5–28.
117. Beshay VE, Beshay JE, Halvorson LM. Pituitary tumors: Diagnosis, management, and implications for reproduction. *Semin Reprod Med.* 2007;25(5):388–401.
118. Patil MJ, Henry MA, Akopian AN. Prolactin receptor in regulation of neuronal excitability and channels. *Channels.* 2014;8(3):193–202.
119. Drago F, Lissandrello CO. The “low-dose” concept and the paradoxical effects of prolactin on grooming and sexual behavior. *Eur J Pharmacol.* 2000;405(1–3):131–7.
120. Bridges RS, Dibiasi R, Loundes DD, Doherty PC. Prolactin stimulation of maternal behavior in female rats. *Science (80-).* 1985;227(4688):782–4.
121. Brown RSE, Aoki M, Ladyman SR, Phillipps HR, Wyatt A, Boehm U, et al. Prolactin action in the medial preoptic area is necessary for postpartum maternal nursing behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(40):10779–84.
122. Hashemian F, Shafigh F, Roohi E. Regulatory role of prolactin in paternal behavior in male parents: A narrative review. Vol. 62, *Journal of Postgraduate Medicine.* Medknow Publications; 2016. p. 182–7.
123. Shingo T, Gregg C, Enwere E, Fujikawa H, Hassam R, Geary C, et al. Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin. *Science (80-).* 2003;299(5603):117–20.
124. Mak GK, Enwere EK, Gregg C, Pakarainen T, Poutanen M, Huhtaniemi I, et al. Male pheromone-stimulated neurogenesis in the adult female brain: Possible role in mating behavior. *Nat Neurosci.* 2007;10(8):1003–11.
125. Torner L. Actions of Prolactin in the Brain: From Physiological Adaptations to Stress and Neurogenesis to Psychopathology. *Front Endocrinol (Lausanne)* [Internet]. 2016 Mar 30;7(MAR):1–6. Available from: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fendo.2016.00025/abstract>
126. Donner N, Bredewold R, Maloumy R, Neumann ID. Chronic intracerebral prolactin attenuates neuronal stress circuitries in virgin rats. *Eur J Neurosci.* 2007;25(6):1804–14.
127. Torner L, Karg S, Blume A, Kandasamy M, Kuhn HG, Winkler J, et al. Prolactin prevents chronic stress-induced decrease of adult hippocampal neurogenesis and promotes neuronal fate. *J Neurosci.* 2009;29(6):1826–33.
128. Nimchinsky EA, Sabatini BL, Svoboda K. Structure and Function of Dendritic Spines. *Annu Rev Physiol.* 2002;64(1):313–53.
129. Pawluski JL, Galea LAM. Hippocampal morphology is differentially affected by reproductive experience in the mother. *J Neurobiol.* 2006;66(1):71–81.
130. Kinsley CH, Trainer R, Stafisso-Sandoz G, Quadros P, Marcus LK, Hearon C, et al. Motherhood and the hormones of pregnancy modify concentrations of hippocampal neuronal dendritic spines. *Horm Behav.* 2006;49(2):131–42.
131. Hoekzema E, Barba-Müller E, Pozzobon C, Picado M, Lucco F, García-García D, et al. Pregnancy leads to long-lasting changes in human brain structure. *Nat Neurosci.* 2017;20(2):287–96.
132. Hebb DO. *The Organization of Behavior; A Neuropsychological Theory.* *Am J Psychol* [Internet]. 1950 Oct;63(4):633. Available from: <https://www.jstor.org/stable/1418888?origin=crossref>
133. Martin SJ, Grimwood PD, Morris RGM. Synaptic Plasticity and Memory. *AnnRevNeurosci.* 2000;(23):649–711.
134. Buzsáki G, Logothetis N, Singer W. Scaling brain size, keeping timing: Evolutionary preservation of brain rhythms.

- Neuron. 2013 Oct 30;80(3):751–64.
135. Floreano D, Urzelai J. Neural morphogenesis, synaptic plasticity, and evolution. *Theory Biosci.* 2001;120(3–4):225–40.
 136. Fioravante D, Regehr WG. Short-term forms of presynaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol.* 2011 Apr;21(2):269–74.
 137. Malmierca MS, Ryugo DK. Auditory System. In: *The Mouse Nervous System* [Internet]. Elsevier; 2012. p. 607–45. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012369497310024X>
 138. Stiebler I, Neulist R, Fichtel I, Ehret G. The auditory cortex of the house mouse: Left-right differences, tonotopic organization and quantitative analysis of frequency representation. *J Comp Physiol - A Sensory, Neural, Behav Physiol.* 1997;181(6):559–71.
 139. Schofield BR, Beebe NL, Schofield BR, Beebe NL. Descending Auditory Pathways and Plasticity. *Oxford Handb Audit Brainstem.* 2019;(March):610–38.
 140. Garcia-Lazaro JA, Shepard KN, Miranda JA, Liu RC, Lesica NA. An overrepresentation of high frequencies in the mouse inferior colliculus supports the processing of ultrasonic vocalizations. *PLoS One.* 2015 Aug 5;10(8).
 141. Miranda JA, Shepard KN, McClintock SK, Liu RC. Adult Plasticity in the Subcortical Auditory Pathway of the Maternal Mouse. Vicario DS, editor. *PLoS One* [Internet]. 2014 Jul 3;9(7):e101630. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0101630>
 142. Caspary DM, Ling L, Turner JG, Hughes LF. Inhibitory neurotransmission, plasticity and aging in the mammalian central auditory system. *J Exp Biol* [Internet]. 2008 Jun 1;211(11):1781–91. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X15370834>
 143. Buzsáki G, Anastassiou CA, Koch C. The origin of extracellular fields and currents — EEG, ECoG, LFP and spikes. *Nat Rev Neurosci.* 2012 Jun 18;13(6):407–20.
 144. Herreras O, Makarova J, Makarov VA. New uses of LFPs: Pathway-specific threads obtained through spatial discrimination. *Neuroscience* [Internet]. 2015;310:486–503. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.09.054>
 145. Rosselet C, Zennou-Azogui Y, Xerri C. Nursing-induced somatosensory cortex plasticity: Temporally decoupled changes in neuronal receptive field properties are accompanied by modifications in activity-dependent protein expression. *J Neurosci.* 2006;26(42):10667–76.
 146. Liu RC, Linden JF, Schreiner CE. Improved cortical entrainment to infant communication calls in mothers compared with virgin mice. *Eur J Neurosci.* 2006;23(11):3087–97.
 147. Cohen L, Mizrahi A. Plasticity during motherhood: Changes in excitatory and inhibitory layer 2/3 neurons in auditory cortex. *J Neurosci.* 2015;35(4):1806–15.
 148. Cohen L, Rothschild G, Mizrahi A. Multisensory integration of natural odors and sounds in the auditory cortex. *Neuron* [Internet]. 2011;72(2):357–69. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuron.2011.08.019>
 149. Tasaka GI, Guenther CJ, Shalev A, Gilday O, Luo L, Mizrahi A. Genetic tagging of active neurons in auditory cortex reveals maternal plasticity of coding ultrasonic vocalizations. *Nat Commun* [Internet]. 2018;9(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-03183-2>
 150. Shepard KN, Chong KK, Liu RC. Contrast enhancement without transient map expansion for species-specific vocalizations in core auditory cortex during learning. *eNeuro.* 2016;3(6).
 151. Watson C. The Somatosensory System. In: *The Mouse Nervous System*. Elsevier Inc.; 2012. p. 563–70.
 152. Fichtel I, Ehret G. Perception and recognition discriminated in the mouse auditory cortex by c-Fos labeling. *Neuroreport.* 1999;10(11):2341–5.
 153. Shepard KN, Lin FG, Zhao CL, Chong KK, Liu RC. Behavioral relevance helps untangle natural vocal categories in a specific subset of core auditory cortical pyramidal neurons. *J Neurosci.* 2015;35(6):2636–45.
 154. Xerri C, Stern JM, Merzenich MM. Alterations of the cortical representation of the rat ventrum induced by nursing behavior. *J Neurosci.* 1994;14(3 II):1710–21.
 155. Issa JB, Haeffele BD, Agarwal A, Bergles DE, Young ED, Yue DT. Multiscale Optical Ca²⁺ Imaging of Tonal Organization in Mouse Auditory Cortex. *Neuron.* 2014 Aug 20;83(4):944–59.
 156. Bargmann CI. Beyond the connectome: How neuromodulators shape neural circuits. *BioEssays.* 2012 Jun;34(6):458–65.
 157. Wu Z, Autry AE, Bergan JF, Watabe-Uchida M, Dulac CG. Galanin neurons in the medial preoptic area govern parental

- behaviour. *Nature*. 2014;509(7500):325–30.
158. Lenschow C, Sigl-Glöckner J, Brecht M. Development of rat female genital cortex and control of female puberty by sexual touch. *PLoS Biol*. 2017;15(9):1–22.
 159. Lenschow C, Copley S, Gardiner JM, Talbot ZN, Vitenzon A, Brecht M. Sexually Monomorphic Maps and Dimorphic Responses in Rat Genital Cortex. *Curr Biol [Internet]*. 2016;26(1):106–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2015.11.041>
 160. Lin Z, Liu F, Shi P, Song A, Huang Z, Zou D, et al. Fatty acid oxidation promotes reprogramming by enhancing oxidative phosphorylation and inhibiting protein kinase C. 2018;1–14.
 161. Angeloni C, Geffen MN. Contextual modulation of sound processing in the auditory cortex. *Curr Opin Neurobiol [Internet]*. 2018;49:8–15. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.10.012>
 162. Galindo-Leon EE, Lin FG, Liu RC. Inhibitory Plasticity in a Lateral Band Improves Cortical Detection of Natural Vocalizations. *Neuron [Internet]*. 2009 Jun;62(5):705–16. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627309003523>
 163. Lin FG, Galindo-Leon EE, Ivanova TN, Mappus RC, Liu RC. A role for maternal physiological state in preserving auditory cortical plasticity for salient infant calls. *Neuroscience*. 2013;247:102–16.
 164. Schnupp JWH, Hall TM, Kokelaar RF, Ahmed B. Plasticity of temporal pattern codes for vocalization stimuli in primary auditory cortex. *J Neurosci*. 2006;26(18):4785–95.
 165. Liu RC, Schreiner CE. Auditory cortical detection and discrimination correlates with communicative significance. *PLoS Biol*. 2007;5(7):1426–39.
 166. Rothschild G, Cohen L, Mizrahi A, Nelken I. Elevated correlations in neuronal ensembles of mouse auditory cortex following parturition. *J Neurosci*. 2013;33(31):12851–61.
 167. Kippin TE, Kapur S, Van Der Kooy D. Dopamine specifically inhibits forebrain neural stem cell proliferation, suggesting a novel effect of antipsychotic drugs. *J Neurosci*. 2005;25(24):5815–23.
 168. Craven AJ, Nixon AJ, Ashby MG, Ormandy CJ, Blazek K, Wilkins RJ, et al. Prolactin delays hair regrowth in mice. *J Endocrinol*. 2006;191(2):415–25.
 169. Paxinos G, Franklin KBJ. Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates. Vol. 2nd Editio, Academic Press. 2001. 360 p.
 170. Mukaka MM. Statistics corner: A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. *Malawi Med J*. 2012;24(3):69–71.
 171. Cohen MX. *Analyzing Neural Time Series Data: Theory and Practice*. MIT Press. 2014. p. 600.
 172. Kumar P, Fofoula-Georgiou E. Wavelet analysis for geophysical applications. *Rev Geophys*. 1997 Nov;35(4):385–412.
 173. Leuner B, Gaspert ER, Gould E. Parenting and plasticity. *Trends Neurosci*. 2010;33(10):465–73.
 174. Barnes TD, Rieger MA, Dougherty JD, Holy TE. Group and individual variability in mouse pup isolation calls recorded on the same day show stability. *Front Behav Neurosci*. 2017;11(December):1–10.
 175. Liu RC, Miller KD, Merzenich MM, Schreiner CE. Acoustic variability and distinguishability among mouse ultrasound vocalizations. *J Acoust Soc Am*. 2003;114(6):3412–22.
 176. Okabe S, Nagasawa M, Koto M, Koshida N, Kihara T, Harada T, et al. Pup odor and ultrasonic vocalizations synergistically stimulate maternal attention in mice. *Behav Neurosci*. 2013;127(3):432–8.
 177. Okon EE. The effect of environmental temperature on the production of ultrasounds by isolated non-handled albino mouse pups. *J Zool*. 2009 Aug 20;162(1):71–83.
 178. Herreras O. Local field potentials: Myths and misunderstandings. *Front Neural Circuits*. 2016;10(DEC):1–16.
 179. Paulraj MP, Subramaniam K, Yaccob S Bin, Adom AH Bin, Hema CR. Auditory Evoked Potential Response and Hearing Loss: A Review. *Open Biomed Eng J*. 2015;9(1):17–24.
 180. Cone-Wesson B, Wunderlich J. Auditory evoked potentials from the cortex: audiology applications. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2003 Oct;11(5):372–7.
 181. De Cosmo G, Aceto P, Clemente A, Congedo E. Auditory evoked potentials. *Minerva Anestesiol [Internet]*. 2004 May;70(5):293–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15181406>

182. Delano PH, Pavez E, Robles L, Maldonado PE. Stimulus-dependent oscillations and evoked potentials in chinchilla auditory cortex. 2008;693–700.
183. Cediel R, Riquelme R, Contreras J, Díaz A, Varela-Nieto I. Sensorineural hearing loss in insulin-like growth factor I-null mice: A new model of human deafness. *Eur J Neurosci*. 2006;23(2):587–90.
184. Fries P, Reynolds JH, Rorie AE, Desimone R. Linked references are available on JSTOR for this article : Modulation of Oscillatory Neuronal Synchronization by Selective Visual Attention. *Science* (80-). 2001;291(5508):1560–3.
185. Purhonen M, Kilpeläinen-Lees R, Pääkkönen A, Yppärilä H, Lehtonen J, Karhu J. Effects of maternity on auditory event-related potentials to human sound. *Neuroreport*. 2001;12(13):2975–9.
186. Corballis MC. The Evolution of Lateralized Brain Circuits. *Front Psychol* [Internet]. 2017 Jun 16;8(JUN):1–6. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpsyg.2017.01021/full>
187. Paoli M, Andrione M, Haase A. Lateralized Brain Functions. 1st ed. Rogers LJ, Vallortigara G, editors. *Lateralized brain functions*. New York, NY: Springer New York; 2017. (Neuromethods; vol. 122).
188. Sander K, Scheich H. Left auditory cortex and amygdala, but right insula dominance for human laughing and crying. *J Cogn Neurosci*. 2005;17(10):1519–31.
189. Mitre M, Marlin BJ, Schiavo JK, Morina E, Norden SE, Hackett TA, et al. A distributed network for social cognition enriched for oxytocin receptors. *J Neurosci*. 2016;36(8):2517–35.
190. Nasello AG, Vanzeler MLA, Madureira EH, Felicio LF. Effects of acute and long-term domperidone treatment on prolactin and gonadal hormone levels and sexual behavior of male and female rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 1997;58(4):1089–94.
191. Kelly MA, Rubinstein M, Asa SL, Zhang G, Saez C, Bunzow JR, et al. Pituitary lactotroph hyperplasia and chronic hyperprolactinemia in dopamine D2 receptor-deficient mice. *Neuron*. 1997;19(1):103–13.
192. Sandhu MA, Rahman ZU, Riaz A, RAhaman SA, Javed I, Ullah N. Somatotrophs and lactotrophs: An immunohistochemical study of *Gallus domesticus* pituitary gland at different stages of induced moult. *Eur J Histochem*. 2010;54(2):123–7.
193. Garcia-Lazaro JA, Shepard KN, Miranda JA, Liu RC, Lesica NA. An overrepresentation of high frequencies in the mouse inferior colliculus supports the processing of ultrasonic vocalizations. *PLoS One*. 2015;10(8):1–13.
194. Casey TM, Crodian J, Erickson E, Kuropatwinski KK, Gleiberman AS, Antoch MP. Tissue-Specific Changes in Molecular Clocks During the Transition from Pregnancy to Lactation in Mice1. *Biol Reprod*. 2014;90(6):1–15.
195. Levine S, Muneyyirci-Delale O. Stress-induced hyperprolactinemia: Pathophysiology and clinical approach. *Obstet Gynecol Int*. 2018;2018.
196. Liu HX, Lopatina O, Higashida C, Fujimoto H, Akther S, Inzhutova A, et al. Displays of paternal mouse pup retrieval following communicative interaction with maternal mates. *Nat Commun* [Internet]. 2013;4(May 2012):1346–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms2336>
197. Zhong J, Liang M, Akther S, Higashida C, Tsuji T, Higashida H. C-Fos expression in the paternal mouse brain induced by communicative interaction with maternal mates. *Mol Brain*. 2014;7(1):1–11.
198. Storey AE, Walsh CJ, Quinton RL, Wynne-Edwards KE. Hormonal correlates of paternal responsiveness in men. *Evol Hum Behav* [Internet]. 2000;21(2):79–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10785345>
199. Fleming AS, Corter C, Stallings J, Steiner M. Testosterone and prolactin are associated with emotional responses to infant cries in new fathers. *Horm Behav*. 2002;42(4):399–413.
200. Gettler LT, McDade TW, Feranil AB, Kuzawa CW. Prolactin, fatherhood, and reproductive behavior in human males. *Am J Phys Anthropol*. 2012;148(3):362–70.