



UNIVERSITAT JAUME I
TRABAJO FINAL DE GRADO
GRADO EN MEDICINA

La inserción de secuencias *LoxP* en los genes *Stat5a* y *Stat5b* no altera la conducta maternal en ratones.

Un estudio de control para el análisis de la neuroendocrinología de la conducta maternal

Autora: Victoria Soriano Boluda

Tutores: Manuela Barneo Muñoz y Fernando Martínez García

Centro: Facultad de Ciencias de la Salud

UP de Medicina

Laboratorio de Neuroanatomía funcional (NeuroFun, 278)



TRABAJO DE FIN DE GRADO (TFG) - MEDICINA

LOS PROFESORES TUTORES hacen constar su **AUTORIZACIÓN** para la Defensa Pública del Trabajo de Fin de Grado y **CERTIFICA** que el/la estudiante lo ha desarrollado a lo largo de 6 créditos ECTS (150 horas)

TÍTULO del TFG: *La inserción de secuencias LOX en el gen STAT5a/b no altera la conducta maternal en ratones. Un estudio de control para el análisis de la neuroendocrinología de la conducta maternal*

ALUMNO/A: Victoria Soriano Boluda

DNI:

PROFESORES TUTORES: Manuela Barneo Muñoz y Ferran Martínez García

Fdo : Manuela Barneo

Ferran Martinez

Resumen

La perpetuación de las especies depende de su éxito reproductivo. Vendrá determinado no solo por la cantidad de crías que es capaz de concebir, sino también, por el número de ellas que sobreviven, y que transmitirán sus genes a las generaciones venideras. Por este motivo, una de las condiciones necesarias para la continuación de algunas especies es el adecuado desarrollo de la conducta maternal.

La conducta maternal es el comportamiento que aparece en determinados animales tras el parto, que asegura la supervivencia de la descendencia hasta que ésta puede valerse por sí misma. Esta conducta tiene un impacto profundo en el desarrollo de los recién nacidos. Durante la gestación se produce una activación drástica del cerebro socio-sexual, mediada por señales lactogénicas (presentando un papel clave la prolactina). Entre las áreas cerebrales implicadas se incluyen los núcleos responsables de la motivación maternal y la agresión. Esta activación continúa durante la lactancia, sustentada por los elevados niveles de prolactina propios de este periodo.

Dado que la conducta maternal está modulada por prolactina, durante años se ha intentado usar herramientas biotecnológicas para estudiar el efecto de dicha hormona durante la gestación, parto y lactancia, y ver cómo afectan a la conducta maternal.

El objetivo del presente trabajo es analizar si las inserciones LoxP que flanquean los genes *Stat5a* y *Stat5b* (principales genes involucrados en la cascada de señalización de la prolactina) afectan, per se, a la conducta maternal motivada, y a la agresión maternal, en hembras de ratón. La expresión de la recombinasa CRE presente de manera natural en las células del organismo, provocaría una delección completa de dichos genes, con lo que se produciría una insensibilización a la prolactina y a otros lactógenos.

Estos experimentos permitirán comprobar en qué centros del cerebro sociosexual, la señalización de prolactina induce cambios en aspectos concretos de la conducta maternal, como la motivación o la defensa del nido.

Palabras clave:

comportamiento maternal, motivación maternal, agresión maternal, prolactina, ratón, cerebro socio-sexual.

Abstract

Maternal behavior ensures the survival of the offspring until it can fend for itself, and has a profound impact on the development of newborns. During pregnancy, there is a drastic activation, mediated by lactogenic signals (prolactin playing a key role) of the entire socio-sexual brain, including the nuclei responsible for maternal motivation and aggression. This activation continues during lactation, supported by the high prolactin levels typical of this period.

Given that maternal behavior is modulated by prolactin, an attempt is made to use biotechnological tools to study the effect of prolactin during pregnancy, delivery and lactation, and to see how it affects said behavior. The objective of the present work is to analyze, therefore, whether the LoxP insertions flanking *Stat5a* and *Stat5b* genes affect, per se, maternal motivated behavior and maternal aggression, in mice. The expression of the CRE recombinase would cause a complete deletion of the gene, making the cells insensitive to prolactin. In brief, these experiments would allow verifying where in the sociosexual brain prolactin signaling induces changes in specific aspects of maternal behaviour, such as motivation or nest defense.

Key words:

maternal behaviour, maternal motivation, maternal aggression, prolactin, mice, socio-sexual brain.

Extended Summary

One of the most important periods in terms of the health of an individual is childhood and development during the first stages of his life. For a person to be healthy both physically and mentally during adulthood, it has been proven that correct development and care is necessary during postpartum and early childhood.

It has been proven how those mothers who present certain pathologies such as depression both in the prepartum and postpartum stages present endocrine dysregulations that cause them to find themselves in a situation of anxiety and lack of motivation that is manifested by an inappropriate maternal behaviour during this very important period for her offspring. This deficit care produces that their offspring present in adulthood a marked tendency to present anxious and depressive attitudes and a worse tolerance to stress.

In mouse models, it has been shown that these attitudes and behaviours are transmitted through epigenetic mechanisms between successive generations. In such a way that those mothers who have given poor care to their children during childhood will have grandchildren with these same problems, and so on in successive generations.

It has also been seen that different forms of abuse and neglect by parents during childhood create a greater predisposition for various mental and physical pathologies in adulthood. From all this derives the enormous importance of studying the neurobiology of maternal behaviour to ensure adequate upbringing that ensures optimal development of the individual.

Like many other social behaviours, maternal behaviour is governed by a set of brain areas known as the "socio-sexual brain", where the prolactin signalling sequence plays a key role. This sequence is mediated by two specific genes, the Stat5a and Stat5b gene, which play a fundamental role.

Some researchers have already carried out animal experiments in which the role of prolactin in the development of maternal behaviour has been studied. However, these scientists have made insertions of Lox sequences in the DNA that have not been proven if they represented a modification in the behavior of the mice. Thus, we cannot ensure that said maternal behavior is not modified by the introduction of the Lox sequence in the genome, and not by the deletion of the genes involved in the prolactin signaling cascade.

The objective of this study is to carry out an experiment in which we verify whether the insertion of Lox sequences, for the signaling of these two genes involved in the prolactin signaling sequence, produces maternal behavior modifications in female mice.

To carry out our objective, we have worked with two different groups of animals, one with insertions of the Lox sequence, and the other in which the mice have not been genetically modified. We have subjected these groups of animals to 3 different experiments, in which we evaluate maternal behavior and motivation in the care of the young, by analyzing behaviors such as sniffing the young, collecting the young and grouping them into nests. and the attack on male mice that posed a threat to the offspring.

From all this, we have come to the conclusion that there are no significant differences in maternal behavior between the two groups of rodents, and that therefore, the insertion of Lox sequences in the animals' DNA does not imply a modification in their behavior.

This experiment is a prelude step, which allows us to be certain that we can work with these genetically modified animals with Lox sequences, since it has not led to a change in their behavior. For in successive experiments, to be able to analyze the key role of prolactin in the development of maternal behavior during pregnancy and postpartum.

If we are able to analyze which are the main brain centers in which maternal behavior develops, and how prolactin acts in these centers, we will be able to understand how we can eliminate inappropriate maternal behaviors that lead to certain pathologies such as postpartum depression, which discourage the proper development of the individual during the first years of life, and mark their health in adulthood, in addition to that of their children, since it has been seen that these behaviors are repeated from generation to generation.

Introducción

La conducta maternal se define como aquellos comportamientos expresados por una hembra, dirigidos a la atención de las necesidades básicas de las crías, principalmente su protección, alimentación y termorregulación. Este carácter surge evolutivamente para garantizar la supervivencia de la descendencia, especialmente cuando ésta nace muy desprotegida y dependiente, como en el caso del ser humano, y es incapaz de valerse por sí misma en el periodo postnatal (Numan e Insel, 2003). Es, por tanto, un mecanismo imprescindible para la supervivencia de las crías, además de producir un impacto beneficioso en la salud tanto física como mental.

Se ha comprobado en roedores, que las madres que cuidan adecuadamente de su descendencia les transmiten, por mecanismos epigenéticos, una mejor tolerancia al estrés y a los efectos negativos que éste conlleva (Meaney, 2001).

Para evaluar la importancia del cuidado maternal en el periodo posnatal sobre el desarrollo de las crías, se ha utilizado el paradigma experimental de "separación maternal", que consiste en aislar a las crías (en ausencia de su madre) durante largos periodos de tiempo de manera repetitiva a lo largo de sus primeros días de vida. Este aislamiento durante el periodo postnatal causa en la descendencia un déficit en el despliegue de la conducta materna (pasan poco tiempo amamantando y lamiendo el cuerpo de las crías). Además, muestran déficit de atención, son más impulsivas e hiperactivas y son emocionalmente más reactivas, en comparación con las hembras que no ha sufrido separación maternal en el periodo postnatal (Lovic y Fleming, 2004)

Creemos que algo bastante similar ocurre también en el ser humano, donde se ha demostrado cómo diferentes formas de maltrato y desatención por parte de los progenitores durante la niñez crean una mayor predisposición para diversas patologías mentales y físicas en la edad adulta, como son el caso de la depresión o la ansiedad (Bifulco, 1991) (Repetti, 2002). De todo ello se deriva la enorme importancia del estudio de la neurobiología de la conducta maternal, para asegurar una crianza adecuada que asegure un desarrollo óptimo del individuo.

Al efecto directo de la crianza sobre la salud de los hijos, hay que añadir el efecto transgeneracional debido al del estilo de crianza. De nuevo en roedores, se ha comprobado que las hijas de madres atentas (aquellas que les profieren un gran número de lameteos a sus crías) suelen ser atentas, y las de madres desatentas (que lameteen menos a sus crías) son, a su vez, desatentas. Esta transmisión transgeneracional es debida a mecanismos epigenéticos, puesto que, en experimentos de adopción cruzada, las hembras heredan el estilo maternal de las madres adoptivas, no de las madres biológicas. (Lovic y Fleming, 2004).

Por ello, preveer conductas maternas deficientes (inducidas por ejemplo por depresión post-parto) puede evitar muchas generaciones de cuidados maternos deficientes “heredados” del estilo maternal recibido; y asegurar, por el contrario, unas condiciones de desarrollo óptimas para numerosas generaciones de niños. Es por ello, por lo que el *Laboratori de Neuroanatomia Funcional* de la Universitat Jaume I (UJI) se ha centrado en el estudio experimental de las bases neuronales y endocrinas de las conductas maternas motivadas, utilizando roedores como modelo animal.

Los roedores son utilizados ampliamente como modelos animales debido a su corto periodo gestacional y su numerosa progenie. En el caso de la conducta maternal en ratón, se encuentran muy ampliamente referenciados dos tipos de comportamientos; unos dirigidos a las crías (alimentación, agrupación y aseo de las crías) y otros no dirigidos a crías (como son la construcción del nido y su defensa frente a intrusos o agresión maternal) (Gammie, 2005). Estas conductas son claramente identificables por los observadores y susceptibles de ser analizadas, por lo que convierte a estos roedores en una especie óptima para nuestro estudio (Knobloch, 2012).

En este sentido, al comparar el comportamiento maternal entre ratonas lactantes (madres) y “comadres” (hembras vírgenes adultas que han colaborado en el cuidado de las crías, han

tenido acceso directo a todos los estímulos generados por éstas, pero no han sufrido el cambio hormonal de la gestación y lactancia), se observaron pocas diferencias conductuales relativas a la recogida de crías y el acicalado de las mismas (Stolzenberg y Rissman, 2011) lo que sugiere una ausencia de control endocrino del comportamiento maternal dirigido a crías en ratones. Por el contrario, sí que se ha demostrado la implicación hormonal en la expresión de conductas maternales no dirigidas hacia las crías, como es la agresión maternal.

En este caso se ha comprobado que las ratonas que son madres, presentan un comportamiento mucho más agresivo cuando se encuentran ante la presencia de un macho, que supone una amenaza para las crías, que las comadres, que no parecen aumentar el nivel de agresividad como consecuencia de su contacto con crías y su experiencia en el cuidado de las mismas (Martín-Sánchez, 2015).

Durante la agresión maternal, las ratonas lactantes reaccionan realizando brutales agresiones a machos de su misma especie cuando se encuentran cerca de las crías (Lonstein y Gammie, 2002), ya que en la naturaleza los machos suelen ser infanticidas. Esta conducta es transitoria y reversible, puesto que normalmente las hembras de ratón se ven atraídas por los machos y sus feromonas (Martínez-García, 2009). Con el destete de las crías, la agresión desaparece y la hembra vuelve a verse atraída por el macho. Esto sugiere que las hormonas de la maternidad juegan un nivel crucial en la inducción de la agresión maternal.

Al igual que otros muchos comportamientos sociales, la conducta maternal está gobernada por un conjunto de centros nerviosos conocido como el «cerebro sociosexual» (Gammie, 2005) (Newman, 1999). Por tanto, con la finalidad de expresar un adecuado comportamiento maternal en el momento necesario, el cerebro sociosexual sufre ciertos cambios transitorios y reversibles, que se conocen como maternización. En esta maternización del cerebro son claves determinados nonapéptidos, como la vasopresina y la oxitocina (Bosch, 2013).

En concreto se hallan implicadas algunas neuronas nonapeptidérgicas situadas entre la región amigdalina y el hipotálamo preóptico, que proyectan a la amígdala central (responsable de la ansiedad) (Knobloch., 2012) y al núcleo accumbens (responsable de la motivación) (Lin, 2011) (Scotti, 2011). Su modulación por las hormonas de la gestación explicaría la disminución de la ansiedad durante la maternidad, que facilita respuestas como la agresión maternal, así como el incremento de la motivación hacia las crías y su cuidado (Gammie, 2005) (Newman, 1999).

En cuanto a la motivación maternal, los estudios experimentales han demostrado mediante el test de recogida de crías motivado, que solo las madres muestran una motivación maternal. Al poner un obstáculo a las ratonas para la recogida de las crías, solo aquellas que eran madres, realizaban el proceso con la misma velocidad y efectividad, mientras que las ratonas comadres presentaban desinterés en la realización de la recogida de las crías al haber aumentado la dificultad del proceso. Las crías son recuperadas con latencias significativamente más altas en hembras vírgenes, lo que indica que la motivación materna completa aparece solo después del embarazo (Salais-Lopez, 2020). Todo ello sugiere de nuevo, un control endocrino del comportamiento maternal, en este caso motivado, dirigido a crías en ratones.

Por tanto, aunque actualmente el proceso de maternización del cerebro no se conoce en detalle, se sospecha que debe estar ligado a algunas señales hormonales (como los esteroides sexuales, los lactógenos placentarios y la prolactina hipofisiaria, producidas durante el embarazo, parto y lactancia), así como a estímulos causados por la presencia de las propias crías (Salais-López, 2017).

La prolactina es una hormona polipeptídica de la familia de las hormonas de crecimiento y de los lactógenos placentarios (Horseman y Yu-Lee, 1994) que se expresa en la glándula pituitaria así como en el cerebro, la placenta, el útero, los órganos reproductivos masculinos, las glándulas mamarias, los linfocitos y otras células del sistema inmune. La acción de la prolactina tiene lugar por la unión de ésta a su receptor, que también se expresa en un amplio abanico de tejidos como son la glándula pituitaria, corazón, pulmones, timo, bazo, hígado, páncreas, riñones, glándula adrenal, útero y músculo esquelético (Freeman, 2000).

La unión de la prolactina u otros lactógenos (lactógenos placentarios I y II) al receptor provoca la activación de la quinasa Janus (JAK2) que forma parte de la porción intracelular del receptor (figura 1). Como consecuencia de su activación, este enzima fosforila proteínas asociadas al receptor pertenecientes a la familia de las Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT), en concreto STAT1-STAT7. Una vez fosforiladas, estas proteínas STAT se liberan del receptor y dimerizan en el citoplasma dando lugar a la STATp, que se transloca al núcleo donde se une a zonas específicas del ADN, los llamados motivos de ADN (DNA motifs).

Las proteínas STATp reconocen específicamente el llamado motivo GAS (gamma-interferon activated sequence), que incluye una secuencia palindrómica TTCxxxGAA (Horseman y Yu-Lee, 1994). Muchos promotores contienen motivos GAS y, además de la prolactina y otras hormonas (como la hormona del crecimiento), varias citoquinas, que regulan procesos in-

flamatorios en el sistema inmune, también usan la cascada de señalización JAK-STAT-GAS para ejercer su acción.

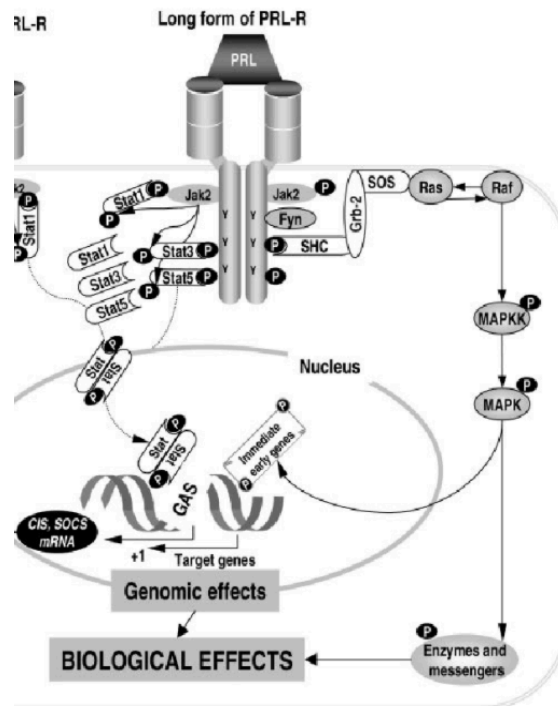


Figura 1: Mecanismo molecular de la señalización de la prolactina y otros lactógenos a través de su principal receptor, la forma larga dimérica del mismo (Long form of PRL-R). De Freeman et al. (2000)

De las proteínas STAT1, STAT3 y STAT5, que pueden ser fosforiladas por el receptor de prolactina, STAT5 (antes conocida como mammary gland factor, MGF) es el elemento más importante para la transducción de la forma larga del receptor de la prolactina (Liu, 1997), hasta el punto de que en animales que carecen de este factor las glándulas mamarias no se desarrollan y no se produce lactogénesis.

Dado el papel de la prolactina, no sólo en la lactogénesis sino también en la inducción de conducta maternal, como se demostró en ratas (Bridges and Ronsheim, 1990) (Bridges, 1990) y en ratones (Brown, 2017), el grupo de Neuroanatomía Funcional de la UP de Medicina de la UJI decidió estudiar la distribución de STAT5 fosforilada (pSTAT5); en respuesta a la acción de lactógenos (incluida la prolactina) en el sistema nervioso central, durante las distintas etapas de la vida de hembras de ratón: vírgenes, gestantes y lactantes. Los resultados indicaban una acción masiva de los lactógenos placentarios durante la gestación, y de la prolactina en el postparto (Salais-Lopez, 2017), en centros del cerebro social, que in-

cluían el área preóptica, la amígdala medial y central extendidas, el septum lateral, y diversos otros núcleos del hipotálamo, tálamo y mesencéfalo.

Para establecer sin ningún género de dudas estas relaciones causales, tendríamos que alterar la señalización de la prolactina y los lactógenos en estos núcleos del cerebro, y comprobar que, como consecuencia, se produce un deterioro de las conductas maternas. Estudios de este tipo son posibles gracias a las modificaciones genéticas inducidas en ratones para esta finalidad.

En este sentido, el grupo del Dr Hennighausen generó un ratón modificado genéticamente preparado para la ablación de STAT5 (Cui, 2004). Estos animales presentaban secuencias LoxP flanqueando los genes de *Stat5a* y *Stat5b* (Figura 2)

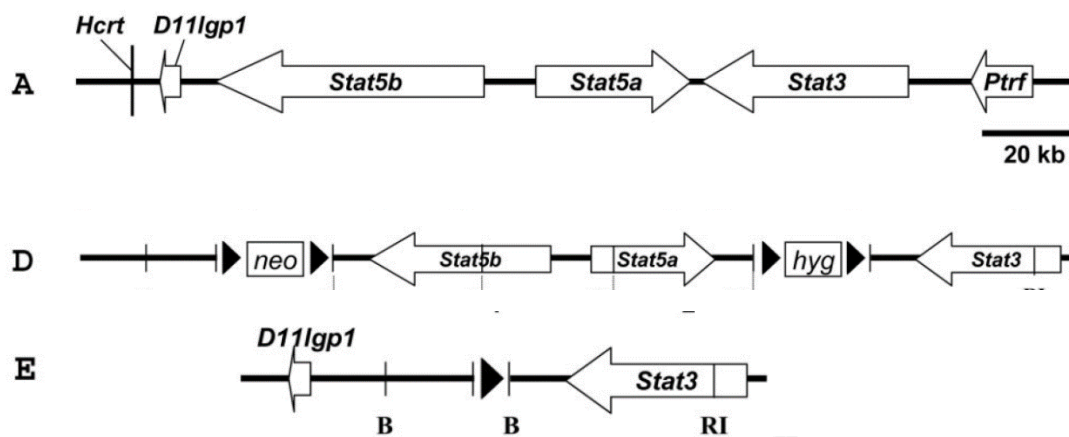


Figura 2. Proceso de modificación genética llevado a cabo en el animal Stat5ab-LoxP (Cui et al. (2004). (A) Localización y estructura de los genes *Stat5b* y *Stat5a* en el genoma murino (Wild type). (D) Localización y estructura de los genes *Stat5b* y *Stat5a* en el genoma murino una vez insertados los sitios LoxP (triángulos negros) y las resistencias. (E) Estructura genómica resultante después de la excisión de los sitios LoxP mediante expresión de una Cre-recombinasa.

Este animal se encuentra en el abanico de ratones modelo ofertado por *Jaxmice* (B6.129-S6-Stat5b^{<tm1Mam>} Stat5a^{<tm2Mam>}/Mmjax) y será nuestra herramienta para estudiar el efecto de la prolactina durante la gestación, parto y lactancia, y ver cómo afecta a la conducta maternal.

Con nuestro estudio nos proponemos caracterizar el comportamiento maternal de estos animales, ya que desconocemos si las inserciones LoxP (necesarias para generar la delección de los genes *Stat5a* y *Stat5b* al actuar con la recombinasa CRE) pueden tener algún efecto en la regulación de dichos genes y por tanto, modificaciones de la conducta maternal. Se trata de un paso previo necesario para comenzar los experimentos de delección inducida de los genes *Stat5a* y *Stat5b* con el fin de provocar una insensibilización a la prolactina.

Material y métodos

Animales

Para llevar a cabo este estudio se utilizaron ratones de la cepa B6.129S6-Stat5btm1MamStat5atm1Mam/Mmjax (MMRRC Stock No: 32053-JAX | Stat5fl, www.jax.org). Las hembras utilizadas fueron todas primíparas, de entre 12 y 16 semanas de edad. Del total, aproximadamente la mitad -7 ratonas-, eran animales genéticamente modificados que contenían las inserciones LoxP necesarias para la escisión de los genes *Stat5b* y *Stat5a* (Lox). La otra mitad -6-, fueron animales de la misma cepa pero sin modificación genética alguna (*Wilde Type*, WT).

Los experimentos de comportamiento maternal se llevaron a cabo en los primeros días postparto. Todas las camadas fueron normalizadas a 8 crías el día siguiente al parto. Tanto la estabulación y ampliación de la colonia, como la experimentación comportacional se realizó en el Servicio de Experimentación Animal de la UJI. El Comité de Ética en Animales de Experimentación de la misma universidad aprobó el procedimiento experimental que se llevó a cabo de acuerdo con la Directiva del Consejo de la Unión Europea del 3 de junio 2010 (6106/1/10 REV1). Todo el trabajo con animales se realizó con anterioridad a este trabajo final de grado.

Experimento 1: Recuperación de las crías.

En este primer experimento de comportamiento maternal se analizó la eficacia en la recogida de las crías por parte de la madre, cuando 4 de éstas eran separadas del nido por el experimentador. La prueba se realizó 3 días consecutivos, desde el segundo hasta el cuarto día postparto, en horario de 10 a 12 horas.

Para la cuantificación de este comportamiento se visualizaron 39 videos y se registró la latencia en olfatear a la primera cría y el tiempo que cada ratona tardaba en reintroducir a cada una de las cuatro crías en el nido.

Experimento 2: Recuperación de las crías separadas por una barrera.

En este segundo experimento de comportamiento maternal se analizó la eficacia en la recogida de las crías por parte de la madre cuando ello supone un mayor esfuerzo. La colocación de dos de las crías detrás de sendas barreras de alambre de 10cm de alto ya fue descrita con anterioridad por Salais-López en 2020 como un test de motivación maternal. La prueba se realizó 3 días consecutivos, desde el segundo hasta el cuarto día postparto, en horario de 15 a 17 horas.

Para la cuantificación de este comportamiento se visualizaron 39 videos y se registró de nuevo la latencia al olfateo de la primera cría y tiempo que tardaba en reintroducir a cada una de las dos crías en el nido. En este caso se anotó también el número de saltos de barrera realizados.

Experimento 3: Agresión Maternal

En este tercer experimento de comportamiento maternal se analizó el comportamiento agresivo por parte de la madre frente a la intrusión de un macho desconocido (amenaza) en su caja. Para ello se utilizaron machos de la cepa C57BL/6JRj (www.janvier-labs.com) que no compartieron sala de estabulación con las hembras experimentales y que, por tanto, no eran familiares para éstas. Las crías se retiraron del nido y se depositaron en una cesta al lado de la caja de estabulación de la madre antes de añadir al macho. La prueba se realizó 2 días consecutivos, sexto y séptimo día postparto, en horario de 10 a 13 horas.

Para la cuantificación de este comportamiento visualizaron 26 videos y se registró la latencia tanto al primer olfateo como al primer ataque al macho por parte de la ratona adulta, así como el número de ataques realizados durante cinco minutos desde la introducción del macho.

Análisis del comportamiento

La visualización y registro de los videos se hizo a doble ciego, sin saber genotipo ni identidad de los animales, desconociendo así si el animal era la primera vez que hacía la prueba o ya la había hecho con anterioridad. La visualización se hizo en bloque para cada uno de

los tres experimentos, para de esta manera evitar cualquier tipo de sesgo. Para ello se utilizó el programa informático Boris (Behavioral Observation Research Interactive Software; Universidad de Torino (Italia), www.boris.unito.it), con la finalidad de optimizar la observación de los videos.

Este programa permitió la codificación de los eventos a cuantificar, así como su registro mediante teclas para la obtención de tablas temporales de eventos mediante las que calculamos los tiempos de latencia de cada estudio. Las funciones de exportación permitieron obtener los datos como archivo de texto para ser posteriormente recopilados en una tabla de Excel. En esta base de datos, asignamos a cada una de las ratonas su genotipo correspondiente y el orden en la repetición de cada prueba.

Análisis de los datos

La base de datos obtenida fue analizada utilizando el programa Statistical Package for the Social Sciences (IBM SPSS Statistics, versión 27) .En primer lugar se comprobó la normalidad para todas las variables y se transformaron aquellas que no cumplieron la prueba Kolmogorov-Smirnov. Una vez obtenida normalidad, se realizaron las pruebas pertinentes que se detallan para cada resultado.

Resultados

Experimento 1: Recuperación de las crías.

En un primer experimento queremos comprobar si la inserción de las secuencias LoxP afecta a la conducta maternal con una prueba de recuperación de las crías después de que el experimentador las separe del nido.

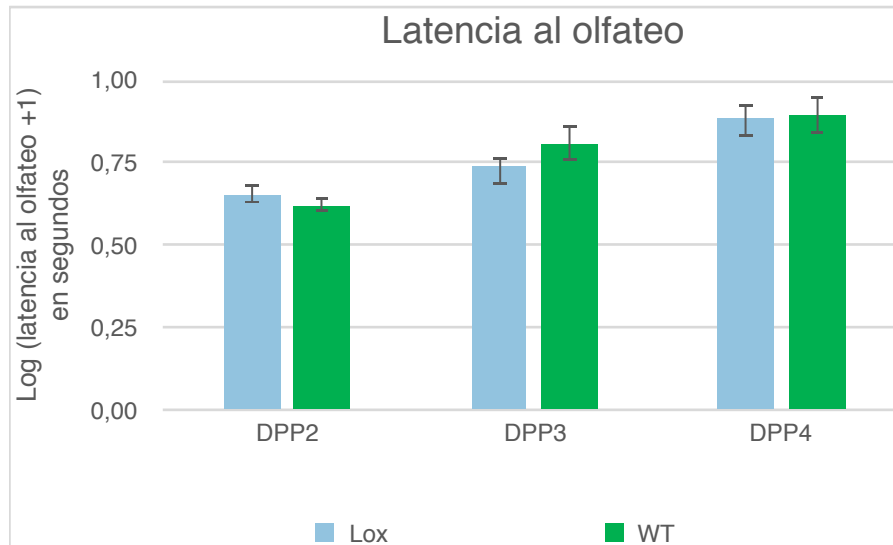


Figura 3: Diagrama de barras de los tiempos de latencia al primer olfateo en el experimento de recogida de crías. Se representan las medias \pm SEM de la latencia en segundos (variable transformada Log+1) para los ratones modificados genéticamente (Lox, en azul) y los *Wilde Type* (WT, en verde) a lo largo de 3 repeticiones en los días postparto (DPP) 2, 3 y 4.

En los resultados obtenidos con este experimento (figura 3), comprobamos cómo la latencia al primer olfateo de las crías por parte de las madres aumenta progresivamente a lo largo de los días post-parto. Al analizar esta variable, transformada (log+1) para que cumpla la normalidad, en los días 2, 3 y 4 mediante un test ANOVA de medidas repetidas se observa un aumento estadísticamente significativo ($p_{\text{valor}} 0.037$).

Sin embargo, al comparar el efecto de la modificación genética, observamos que no existen diferencias estadísticamente significativas entre grupos experimentales ($p_{\text{valor}} 0.852$). Por tanto, la inserción de los sitios LoxP no provoca un comportamiento diferencial en la recogida de crías cuando éstas son separadas del nido.

El resto de parámetros analizados, el tiempo de recogida de cada una de las 4 crías, no cumplen la normalidad, aun transformando la variable. Por ello, al no poder analizar la variable repetición, analizamos mediante un test no paramétrico el tiempo que tardan en recoger a la primera cría en el primer día del test (día postparto 2, DPP2) (Figura 4). Como resultado, no se encuentran diferencias significativas entre los ratones modificados genéticamente y los controles ($p_{\text{valor}} 0.612$, Prueba U de Mann Whitney).

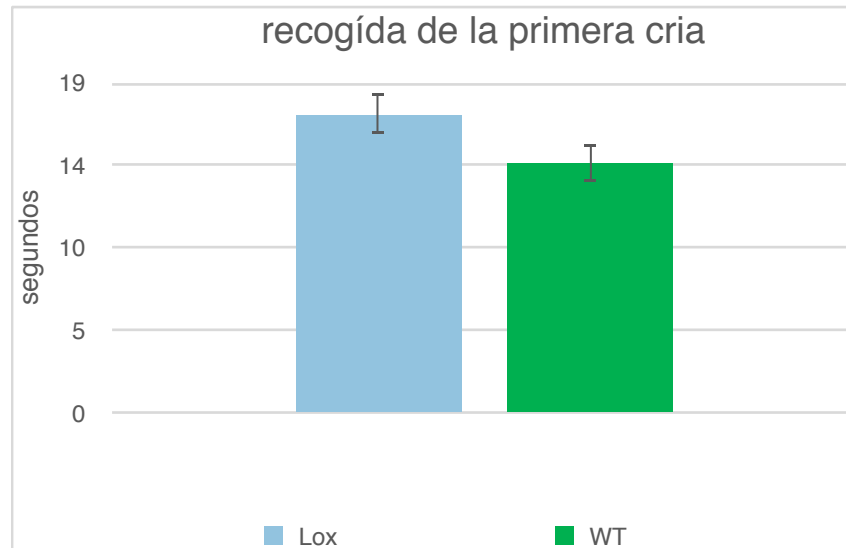


Figura 4: Diagrama de barras de los tiempos de latencia a la recogida de la primera cría. Se representan las medias \pm SEM de la latencia en segundos de la recogida de la primera cría separada del nido en el DPP2 para los ratones modificados genéticamente (Lox, en azul) y los *Wilde Type* (WT, en verde).

Experimento 2: Recuperación de las crías separadas por una barrera.

En el test de recogida motivada, las hembras se someten a pruebas de recuperación de crías, con las crías desplazadas detrás de una barrera de malla de alambre de 10 cm de altura (Salais-Lopez, 2020). En este paradigma que necesita de la motivación de la madre para llevar a cabo la tarea de recogida de las crías, necesitan saltar para recoger las crías y volverla a saltar para dejarlas en el nido.

Observamos cómo la latencia al primer olfateo a las crías va disminuyendo progresivamente con la repetición del test (figura 5). Se observa una diferencia estadísticamente significativa al comparar esta variable en los días postparto 2, 3 y 4 ($p_{\text{valor}} 0,016$). No obstante, al igual que en el caso anterior, no encontramos una diferencia significativa entre grupos experimentales ($p_{\text{valor}} 0.558$). Por ello, de nuevo podemos decir que la modificación genética de estos animales no provoca un cambio comportamental en el test de la recogida de crías motivada.

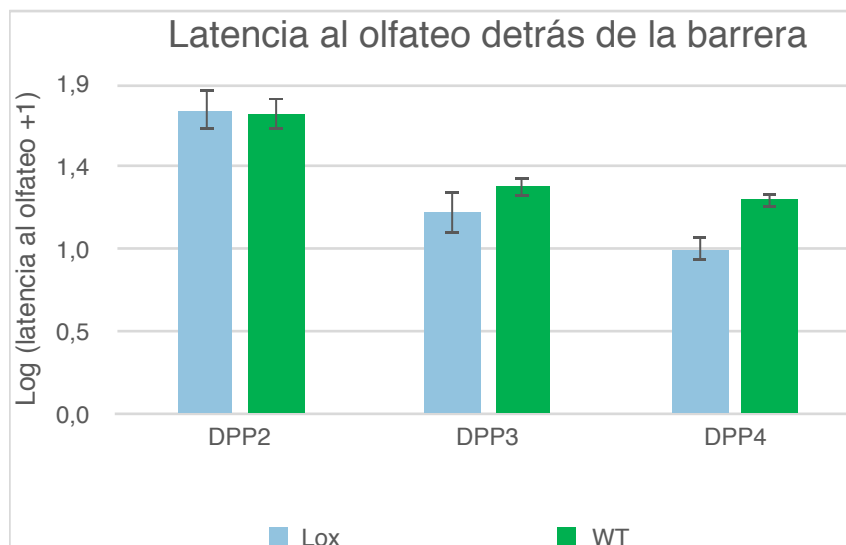


Figura 5: Diagrama de barras de los tiempos de latencia al primer olfateo en el experimento de recogida de crías motivado. Se representan las medias \pm SEM de la latencia en segundos (variable transformada Log+1) para los ratones modificados genéticamente (Lox, en azul) y los *Wild Type* (WT, en verde) a los largo de 3 repeticiones en los días postparto (DPP) 2, 3 y 4.

Experimento 3: Agresión

La agresión es un comportamiento maternal que pretende la defensa del nido frente a posibles intrusos. Este comportamiento se evalúa utilizando un test de defensa maternal, introduciendo a un macho intruso en la caja hogar de la madre. (Neumann et al, 2001). Se considera un ataque cuando la hembra, de manera espontánea y activa, muerde o golpea al macho. (Martín-Sánchez, 2015).

Analizamos el comportamiento de las madres en el sexto día post-parto mediante una gráfica de supervivencia de Kaplan-Meier agrupando los animales modificados genéticamente frente a los que no lo están.

En la gráfica (figura 6) observamos como un 17% de las ratonas pertenecientes al genotipo Wt (en verde), y un 42% de las pertenecientes al genotipo Lox (en azul), no iniciaron el ataque al macho durante los primeros 5 minutos.

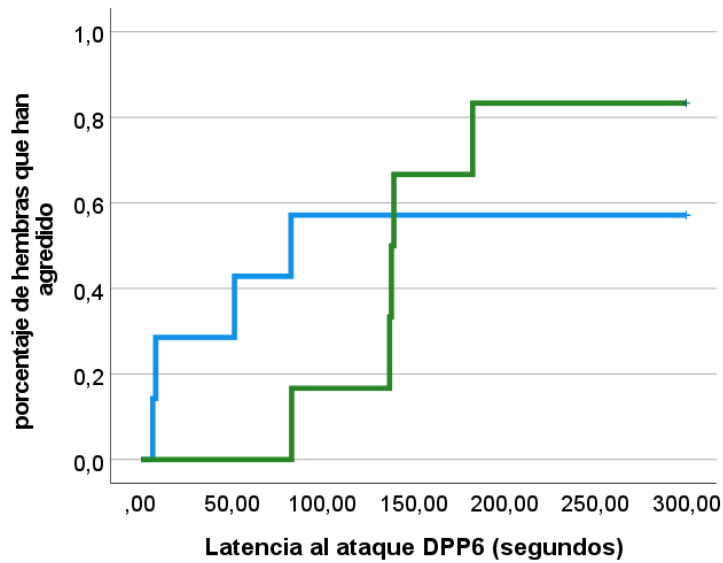


Figura 6: Diagrama de supervivencia en el que se representan los tiempos de latencia al primer ataque en el experimento de agresión durante 5 minutos. Se representa el porcentaje de animales (eje Y) que en un tiempo determinado (eje X) han agredido. En azul se representan los animales modificados genéticamente (Lox) y en verde los controles (WT).

Sin embargo, el análisis estadístico de las distribuciones de ambos grupos, determina que no existen diferencias estadísticamente significativas ($p_{\text{valor}} 0.930$) la al ataque al macho intruso entre los grupos Lox y Wt.

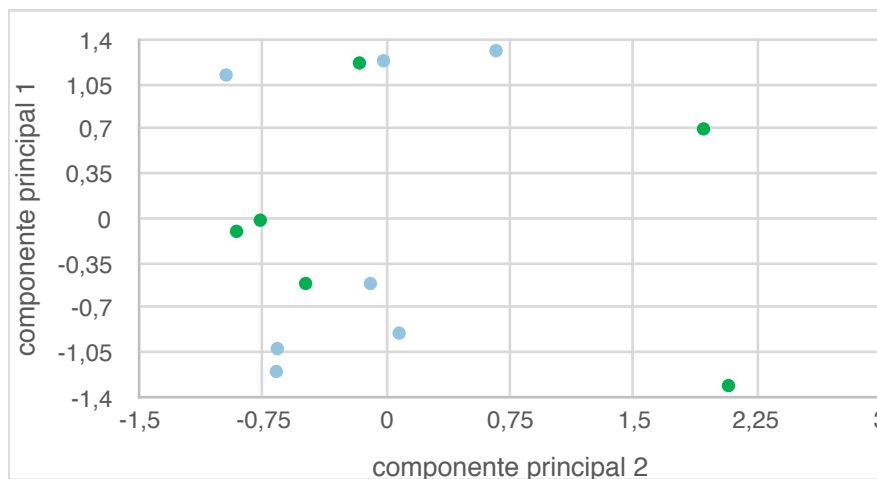


Figura 7: Diagrama de dispersión compilando 3 variable (latencia al olfateo, latencia al ataque y agresión) en sus dos componentes principales. Se representa cada animal respecto de estas dos componentes principales. En azul los modificadas genéticamente (Lox) y en verde los no modificadas genéticamente (WT).

Además, realizamos un análisis de componentes compilando 3 variables (latencia al olisqueo, latencia al ataque y número de ataques) en dos componentes principales. La distribución del comportamiento de las 13 hembras estudiadas en estos dos ejes (figura 7) no reveló agrupación alguna en animales con la inserción (Lox, en azul) y animales sin ella (WT, en verde).

Discusión

Como un primer paso para el estudio del efecto del bloqueo de la señalización producida por prolactina en áreas del cerebro concretas, nos planteamos la necesidad de evaluar el comportamiento de los ratones modelo utilizados como herramienta (*Jaxmice* B6.129S6-Stat5b^{<tm1Mam>} Stat5a^{<tm2Mam>}/Mmjax; (Cui, 2004) en estos experimentos preliminares. La necesidad de estos experimentos deriva de la estructura de los insertos que poseen los animales genéticamente modificados (ver Figura 2). Además de las secuencias LoxP que permiten la delección por parte de la recombinasa CRE de aquello que flanquean, estos ratones poseen genes de resistencia a antibióticos, sumando un total de 1kilobase de material genético exógeno aguas abajo de los genes *Stat5a* y *Stat5b*.

La conducta maternal es la interacción de la expresión de genes en una red muy compleja que aún no hemos podido descifrar en su conjunto. Debido a ello es importante comprobar que estas inserciones no comprometen la expresión de dichos genes, así como su modulación.

En nuestros estudios futuros, como control utilizaremos el animal LoxP-Stat5ab, en comparación con aquel al que se le ha escindido dicho par de genes (ver Figura 2). Por ello, ha sido necesario este primer estudio comparativo entre el animal LoxP-Stat5ab y el no modificado genéticamente (Wilde type).

En el presente trabajo hemos revisado distintos aspectos de la conducta maternal de hembras de ratón lactantes -madres- y hemos comprobado que la inserción de secuencias LoxP flanqueado los genes necesarios para la ruta de señalización de la prolactina (ver figura 1), *Stat5a* y *Stat5b*, carece de un efecto cuantificable mediante diversos paradigmas de conducta maternal.

Las hembras mutantes (con inserciones LoxP) parecen mostrar la misma motivación por recoger y atender crías que las wild-type, dado que muestran la misma latencia en acercarse a ellas, tanto en el test estándar de recogida de crías (poco sensible a la motivación de la

hembra, figura 3) como en el test de recogida de crías motivado (Figura 5). El mismo efecto se observa en la recogida de dichas crías (figura 4) o en la recogida de crías motivada (datos no mostrados) en el que la necesidad trasladar a las crías en la boca cruzando una barrera alta, convierte este test en un auténtico test de motivación maternal (Salais-Lopez, 2020).

Además, las hembras *Wild Type* y las mutantes muestran la misma latencia y frecuencia en atacar a un macho intruso que es introducido en su caja (figuras 6 y 7). Esto indica que las conductas maternas no dirigidas a las crías, en concreto la agresión maternal, tampoco es afectada por la inserción de secuencias LoxP flanqueando los genes *Stat5a* y *Stat5b*.

En este sentido, el grupo del Dr Donato Jr. de la Universidade de Sao Paulo, ha utilizado este mismo ratón eliminando la señalización por prolactina en todo el cerebro (Buonfiglio, 2015). Para ello usaron como base el animal que hemos analizado nosotros (*Jaxmice* B6.129S6-Stat5b^{<tm1Mam>} Stat5a^{<tm2Mam>}/Mmjax; Cui et al., 2004), que cruzaron debidamente con otros animales que expresaban la recombinasa CRE bajo el promotor de Nestina (B6.Cg-Tg(Nes-cre)1Kln/J, Jackson Laboratories).

En la descendencia, aquellas células que expresen nestina, expresaran la recombinasa CRE y con ello, se producirá un corte del ADN entre los dos insertos LoxP, delecionandose de forma irreversible los genes *Stat5a* y *Stat5b* en toda la progenie de estas células (Figura 2). De esta forma, las células resultantes serán en gran medida insensibles a la acción de la prolactina y lactógenos durante la gestación y postparto. La nestina es una proteína que, en el adulto, se expresa de forma casi específica en neuronas como parte de su citoesqueleto, por lo que, en principio, en los animales resultantes del cruce diseñado por (Buonfiglio, 2015) el cerebro sería insensible en gran medida a la prolactina y lactógenos.

Estos autores analizaron diversas variables fisiológicas y comportamentales en sus sujetos experimentales. En primer lugar, comprobaron mediante PCR que la expresión de los genes *stat5a* y *stat5b* se encontraba reducida en el hipotálamo un 50%. Aunque no evaluaron la expresión en otros tejidos (mamas, por ejemplo) los autores indican que las hembras que portaban la delección eran capaces de amamantar a sus crías pero su producción de leche se veía reducida a partir del quinto día de postparto. Aunque esto sugiere que la delección afectaba al tejido mamario, comprobaron que no era así, la expresión de *stat5a/b* no estaba afectada a este nivel.

Los animales mutantes, sin embargo, eran hiperprolactinémicos, lo que podría deberse a que el feed-back negativo hipotalámico se encontraba afectado, probablemente por la in-

sensibilidad a prolactina de las neuronas TIDA (Tuberoinfundibular Dopaminérgica) del núcleo arqueado que mediante la secreción de dopamina en el sistema portal hipotálamo-hipofisario, inhiben la secreción de prolactina por parte de las células lactotrofas de la adenohipófisis. También mostraban alteraciones en la expresión cerebral de genes relacionados con el hambre y la demanda energética (NPY, agRP) y, consecuentemente, las hembras mutantes no mostraban la hiperfagia típica de la gestación y postparto. Aun con todo esto, los animales mutantes parecían mostrar una conducta maternal (latencia a la recogida de crías; a abrirlas en el nido con el propio cuerpo – crouching over pups) igual o mejor que los animales control.

Los autores atribuyen este hecho a la participación en estas conductas de mecanismos de señalización de prolactina independientes de la cascada de señalización Jak/STAT5, relacionados con respuestas eléctricas inmediatas, que ellos comprobaron mediante técnicas electrofisiológicas.

Este trabajo muestra, sin embargo, defectos de diseño que pueden explicar algunos de los resultados sorprendentes e inesperados. Fundamentalmente, el problema consiste en que los animales obtenidos mediante cruces entre los *LoxP-stat5a/b* y los *CRE-nestin*, mostraron deleciones no sólo en las células que expresan *nestina* (*CRE*) en el adulto, sino en todas aquellas que lo expresan durante el desarrollo y en toda su progenie, dado que se trata de deleciones irreversibles. Estas incluyen el riñón, los islotes Langerhans del páncreas y el páncreas exocrino, corazón y pericardio, epitelio olfativo, tejido adiposo, pulmones, aparato musculoesquelético, etc... (ver <http://www.informatics.jax.org/marker/MGI:101784>).

Todo ello hace difícil de evaluar la validez de los resultados obtenidos, y recomienda usar una estrategia alternativa que hemos adoptado para estudiar este asunto, y de la que este TFG es el primer trabajo.

En el laboratorio de *Neuroanatomía Funcional* de la UJI, se pretende usar el animal mutante con secuencias *LoxP* flanqueando a los genes *stat5a* y *stat5b* (*B6.129S6-Stat5b^{tm1Mam}-Stat5a^{tm2Mam}/Mmjax*) y en ellos provocar la deleción de estos genes en zonas concretas del cerebro ya en la edad adulta. Para ello se usará un vector vírico adenoasociado que codificará *CRE* y una proteína fluorescente reportera (*venus*, *GFP*, *eGFP*, *tomato*) bajo un promotor genérico de neuronas, que se inyectará bilateralmente mediante estereotaxia en las zonas del cerebro en las que la señalización de prolactina durante el postparto está correlacionada con la conducta maternal motivada (Salais-Lopez, 2020): área preóptica medial, amígdala medial posterodorsal, amígdala central división medial, núcleo paraventricular hipotalámico y tálamo intralaminar posterior. Se ha escogido el vector vírico *pAAV-hSyn-*

Cre-P2A-dTomato (#107738 de Addgene; <https://www.addgene.org/107738/#107738-AAV2>), que es adecuado para este fin.

El proyecto consiste en inyectar el vector vírico en hembras vírgenes adultas, para provocar la delección en el centro escogido, y administrar un vector vírico con proteína reportera sin CRE en las hembras control. Tras esto, se cruzarían ambos grupos de hembras con machos sementales y, tras el parto se evaluaría su conducta maternal tal como hemos hecho en este TFG. Si la conducta maternal resultara alterada, habríamos demostrado que la señalización de prolactina en el centro nervioso escogido es parte de la maternización cerebral que ocurre durante la gestación y postparto.

Conclusión

La ruta de señalización de prolactina es una buena candidata de estudio del comportamiento maternal y sus posibles alteraciones. Para poder estudiar su implicación en el desarrollo de la conducta maternal, necesitamos poder bloquear esta ruta en diferentes tiempos y/o en diversas áreas del cerebro implicadas en el comportamiento sociosexual.

El uso de animales genéticamente modificados se ha extendido en el ámbito científico sin pararse a diseñar buenos controles que aseguren unos resultados concluyentes. En determinados estudios no se han analizado algunos pasos que podrían producir variaciones en el comportamiento de los animales, como la inserción de secuencias LoxP, pero que podrían modificar los resultados finales obtenidos. Este TFG ha servido para caracterizar a nivel conductual, en concreto en el ámbito del comportamiento maternal, el efecto de dos inserciones de 1kb aguas debajo de los genes *Stat5a* y *Stat5b*. Genes necesarios para que se dé la señalización mediada por prolactina en el cerebro.

Tras el análisis de los datos que hemos obtenido en este trabajo de visualización de experimentos comportamentales, con hembras de ratón lactantes sometidas a experimentos de: recogida de crías, recogida de crías motivada y agresión, hemos llegado a la conclusión de que no existe modificaciones en cuanto a la conducta maternal entre los animales que han sido modificadas genéticamente (con las inserciones LoxP flanqueando los genes *Stat5a* y *Stat5b*), y las ratonas que no han sido modificadas genéticamente (*Wilde Type*), ya que ambos grupos presentan unos tiempos de latencia en cuanto a los parámetros analizados, prácticamente idénticos en dichos experimentos.

Este análisis en detalle de las no alteraciones comportamentales, a nivel de conductas maternales, de estos ratones mutantes nos permitirá, en un futuro, poder utilizar estos ratones

como controles de aquellos a los que se les ha escindido la región contenida entre las secuencias LoxP.

Estos estudios nos permitirían comprender el papel que presenta la prolactina en determinadas zonas del cerebro socio-sexual, y nos hacen estar un poco más cerca de poder evitar que las madres con determinadas patologías como la depresión, donde se produce una desregulación hormonal, que conlleva una conducta maternal inadecuada para el correcto desarrollo de la descendencia sean evitados.

Por lo tanto, este trabajo ha sido un paso previo para poder llevar a cabo un experimento futuro, en que se estudiará el papel de la prolactina a nivel cerebral en el desarrollo de la conducta maternal.

BIBLIOGRAFÍA:

1. Numan, M., e Insel, T. R. (2003). *The neurobiology of parental behavior*. Nueva York: Springer. Numan, M., y Woodside, B. (2010). Maternity: neural mechanisms, motivational processes, and physiological adaptations. *Behavioral Neuroscience*, 124, 715-41.
2. Meaney, M. J. (2001). Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Annual Review of Neuroscience*, 24, 1161- 92.
3. Lovic, V. y Fleming, A. S. (2004). Artificially-reared female rats show reduced prepulse inhibition and deficits in the attentional set shifting task reversal of effects with maternal like licking stimulation. *Behavioural Brain Research*, 148, 209-219.
4. Bifulco, A., Brown, G. W., y Adler, Z. (1991). Early sexual abuse and clinical depression in adult life. *The British Journal of Psychiatry*, 159, 115-22.
5. Repetti, R. L., Taylor, S. E., y Seeman, T. E. (2002). Risky families: family social environments and the mental and physical health of offspring. *Psychological Bulletin*, 128, 330-66.
6. Gammie, S. C. (2005). Current models and future directions for understanding the neural circuitries of maternal behaviors in rodents. *Behavioral and Cognitive Neuroscience Reviews*, 4, 119-13.
7. Knobloch, H. S., Charlet, A., Hoffmann, L., Eliava, M., Khrulev, S., Cetin, A. H., Grinevich, V. (2012). Evoked axonal oxytocin release in the central amygdala attenuates fear response. *Neuron*, 73, 553-566.
8. Stolzenberg, D.S. y Rissman, E. F. (2011). Oestrogen independent, experience induced maternal behaviour in female mice. *Journal of Neuroendocrinology*, 23, 345-354.
9. Martín-Sánchez, A., Valera-Marín, G., Hernández-Martínez, A., Lanuza, E., Martínez-García, F. y Agustín-Pavón, C. (2015). Conectados por la maternidad: inducción del cuidado materno pero no agresión materna en ratones CD1 hembras vírgenes. 197, 315-155
10. Lonstein, J. S., y Gammie, S. C. (2002). Sensory, hormonal, and neural control of maternal aggression in laboratory rodents. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 26, 869- 888.
11. Martínez-García, F., Martínez-Ricós, J., Agustín-Pavón, C., Martínez-Hernández, J., Novejarque, A., y Lanuza, E. (2009). Refining the dual olfactory hypothesis: pheromone reward and odour experience. *Behavioral Brain Research*, 200, 277-86.
12. Newman, S. W. (1999). The medial extended amygdala in male reproductive behavior. A node in the mammalian social behavior network. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 877, 242-257.

13. Bosch, O. J. (2013). Maternal aggression in rodents: brain oxytocin and vasopressin mediate pup defence. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Bio- logical Sciences*, 368, 201-300.
14. Lin, D., Boyle, M. P., Dollar, P., Lee, H., Lein, E. S., Perona, P., y Anderson, D. J. (2011). Functional identification of an aggression locus in the mouse hypothalamus. *Nature*, 470, 221-226.
15. Scotti, M.-A. L., Lee, G., y Gammie, S. C. (2011). Maternal defense is modulated by beta adre- nergic receptors in lateral septum in mice. *Behavioral Neuroscience*, 125, 434-45.
16. Newman, S. W. (1999). The medial extended amygdala in male reproductive behavior. A node in the mammalian social behavior network. *Annals of the New York Academy of Scien- ces*, 877, 242-257.
17. Salais, H., Martín-Sánchez, A., Otero-García, M. y Martínez-García, F. (2017). Madres, madrinas y vecinas. *Neuroendocrinología del comportamiento maternal en el ratón. Ago- raSalut* 244, 357-357.
18. LeDoux, J. E., Iwata, J., Cicchetti, P., y Reis, D. J. (1988). Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. *The Journal of Neuroscience*, 8, 2517-2529.
19. Lonstein, J. S., y Gammie, S. C. (2002). Sensory, hormonal, and neural control of ma- ternal aggression in laboratory rodents. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 26, 869- 888.
20. Vianna, D. M. L., y Brandão, M. L. (2003). Anatomical connections of the periaqueductal gray: Specific neural substrates for different kinds of fear. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 36, 557-566.
21. Janak, P. H., y Tye, K. M. (2015). From circuits to behaviour in the amygdala. *Nature*, 517, 284-29.
22. Cui, Y., Riedlinger, G., Miyoshi, K., Tang, W., Li, C., Deng, C., Robinson, G. y Hennig- hause, L. (2004). Inactivation of Stat5 in mouse mammary epithelium during pregnancy reveals distinct functions in cell proliferation, survival, and differentiation. *188*, 345-367.
23. Buonfiglio, D.C., Ramos-Lobo, A.M., Silveira, M.A., Furigo, I.C. Hennighausen, H., Fra- zao, R. y Donato, J. (2015). Neuronal STAT5 signaling is required for maintaining lacta- tion but not for postpartum maternal behaviors in mice. *71*, 60-68.