



Facultad de Ciencias  
Universidad de la República



UNIVERSIDAD  
DE LA REPUBLICA  
URUGUAY

# 2011

## Desarrollo y expresión del comportamiento parental espontáneo en ratones de laboratorio (*Mus musculus*) C57BL6



**Victoria de Brun**

Facultad de Ciencias

Tutor:

**Daniel Olazábal**

## Agradecimientos...

A Daniel, por abrirme las puertas de su laboratorio, por su dedicación

A Marcela, por acompañarme durante los experimentos

A Daniella y Natalia, el tribunal de mi tesis por sus comentarios y sugerencias enriquecedoras

A mi familia, por el apoyo constante que recibí frente a mis decisiones

A Álvaro, por estar siempre...

A mis amigos, que hicieron de la Facultad de Ciencias mi casa, por todos los momentos de alegría y estudio que compartimos...

# CONTENIDO

<b>1. RESUMEN</b> .....	<b>4</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>5</b>
2.1 Comportamiento parental.....	5
2.2 Comportamiento maternal.....	5
2.3 Bases hormonales y circuitos neuronales en la regulación del comportamiento maternal.....	8
2.4 Comportamiento maternal inducido por crías.....	11
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	<b>16</b>
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	<b>16</b>
4.1. General.....	16
4.2. Específicos.....	16
<b>5. METODOLOGÍA</b> .....	<b>17</b>
5.1 Animales .....	17
5.2 Grupos .....	17
5.3 Pruebas comportamentales .....	18
5.5 Análisis estadístico .....	20
<b>6. RESULTADOS</b> .....	<b>22</b>
6.1 Incidencia del comportamiento parental en hembras y machos: comparación por edad .....	22
6.1.1 Incidencia de animales maternas o infanticidas.....	22
6.3.2 Análisis de los distintos componentes del comportamiento parental .....	24
6.3.4 Análisis de las conductas locomotoras y exploratorias .....	28

<b>7. DISCUSIÓN .....</b>	<b>33</b>
ANEXO.....	39
<b>8. REFERENCIAS.....</b>	<b>40</b>

## 1. RESUMEN

Al momento del parto las hembras de los roedores despliegan una serie de comportamientos que aumentan la probabilidad de supervivencia de sus crías. Comportamientos similares a los mostrados por hembras en períodos de lactancia, pueden ser observados, bajo determinadas condiciones, en hembras y machos vírgenes. En el ratón doméstico la exposición a las crías genera respuestas comportamentales muy variables tales como cuidar la cría, ignorarlas, o atacarlas. Existe una enorme variabilidad en lo reportado en la literatura sobre la incidencia de estos comportamientos en el ratón de laboratorio y se carece, en la mayoría de los casos, de descripciones detalladas sobre el comportamiento llamado “parental espontáneo”. El objetivo de este trabajo fue caracterizar el desarrollo del comportamiento parental e infanticida en el ratón de laboratorio, en machos y hembras vírgenes de 20, 30, 60-70 y 100-115 días de edad. A diferencia de lo reportado para ratas y ratones de la pradera, los resultados muestran que el comportamiento maternal de las hembras vírgenes, no se encuentra completamente desarrollado a los 20 días, se comienza a desarrollar a los 30 días y se expresa con mayor frecuencia en adultos. Un patrón similar de desarrollo puede observarse en machos con la respuesta infanticida. Nuestros resultados mostraron una baja incidencia de comportamiento parental espontáneo en el ratón de laboratorio, a diferencia de lo que ocurre en especies como ratones de la pradera. Las inconsistencias en lo reportado en la literatura en los diferentes estudios en ratones de laboratorio, se puede atribuir a diferencias entre las cepas, diferentes protocolos experimentales, y principalmente a la falta existente de definiciones y una descripción detallada del comportamiento comúnmente llamado parental espontáneo.

## 2. INTRODUCCIÓN

### **2.1 Comportamiento parental**

El comportamiento parental se define como un patrón complejo de comportamientos, dirigidos a aumentar la supervivencia de las crías, cuya expresión depende de factores internos hormonales y del procesamiento de una variedad de señales externas asociadas a las crías (Numan, 2010).

El comportamiento parental se puede presentar en distintos contextos; a través de comportamientos maternos, paternos y aloparentales (Numan et al., 2006; Olazábal & Young, 2006a). La mayoría de las especies de mamíferos muestran sistemas de reproducción polígamos o promiscuos, donde generalmente el cuidado de crías es uniparental, siendo la hembra quien frecuentemente cuida de las mismas (Numan, 2010). Sin embargo, algunos mamíferos presentan apareamientos más bien estables, tal es el ejemplo de ratones de pradera (*Microtus ochrogaster*), ratón de California (*Peromyscus californicus*), marmoset común (*Callithrix jacchus*) y monos tamarin (*Saguinus labiatus*). En estas especies los grupos familiares se componen generalmente de madre, padre, recién nacidos, jóvenes y adultos (Numan, 2010).

### **2.2 Comportamiento maternal**

El comportamiento maternal se hace evidente en la etapa cercana al parto y durante el período de lactancia. Durante estas etapas, ocurren una serie de cambios hormonales en la hembra que cumplen las siguientes funciones (entre otras): preparación del útero para nutrir al feto, facilitación del parto, y de la producción de nutrientes (leche) para alimentar a la cría luego del nacimiento y estimulación del comportamiento maternal (Numan et al., 2006). La lactancia abarca el período entre el nacimiento y el destete, y es donde se manifiesta en forma más explícita el comportamiento maternal (Leblond, 1940, Numan et al., 2006)(Figura 1). Se pueden distinguir dos tipos de crías, dependiendo de las características del desarrollo de las mismas: “precoces” y “altriciales”. Las especies con crías “precoces”, característico de ungulados y pinnípedos, dan a luz a pequeñas camadas de crías completamente desarrolladas.

Estas crías al nacimiento presentan una gran capacidad de locomoción y son capaces de seguir a sus madres poco después de su nacimiento (Numan et al., 2006).

Sin embargo, las especies que tienen crías “altriciales” (Figura 1), como la mayoría de roedores, cánidos y felinos, generalmente dan a luz a una gran camada de crías. Se denominan de este modo debido a que las crías nacen escasamente desarrolladas (sin pelo e incapaces de termorregular) y con limitadas habilidades sensitivas (ojos y oídos tapados) y de locomoción, dependiendo totalmente de la atención de la madre para su supervivencia (Lévy & Keller, 2008; Numan, 2010). Por tanto en estas especies, la supervivencia del recién nacido recae en la habilidad de la madre de proveer alimentos, calor y protección (Numan et al., 2006). Estas hembras muestran comportamiento maternal inmediatamente antes y luego del parto, mediante el despliegue de actividades preparatorias para el arribo del neonato (construcción de nido) y actividades de limpieza, estimulación, alimentación y protección de las crías (lamidos, acarreo, amamantamiento) (Kuroda et al., 2011; Lévy & Keller, 2008; Numan et al., 2006; Stolzenberg & Rissman, 2011).

Las hembras adultas construyen uno de dos tipos de nido dependiendo de su estado reproductivo (Kuroda et al., 2011, Gandelman, 1973). El nido de sueño, construido por hembras vírgenes, es relativamente pequeño y poco “profundo”, mientras que el nido reproductor, es construido por hembras preparturientas o lactantes. El tamaño de este nido es dos o tres veces mayor que el nido de sueño y es más profundo de manera que envuelve a las crías, favoreciendo de esta manera, que se mantenga elevada la temperatura corporal (Gandelman, 1973, Kuroda et al., 2011).

Cuando las crías se alejan del nido, o cuando la hembra mueve el nido de lugar, las madres acarrear a las crías, tomando a las mismas con la boca, de manera que son trasladadas nuevamente hacia el nido (Noirot, 1972). Durante las primeras semanas de vida de las crías, las hembras se encargan de la alimentación de las mismas, mediante la producción de leche. Durante el amamantamiento, la hembra adopta una postura característica, de manera que expone los pezones para que las crías puedan alimentarse (Stern & Lonstein, 2001)

Otro componente relevante en el desarrollo del comportamiento parental es el lamido a las crías. Los lamidos anogenitales dirigidos a crías de ratones y ratas son importantes, principalmente durante las dos primeras semanas de vida, para inducir la micción y defecación. La orina de las crías, contribuye a que la hembra lactante aumente la ingesta de agua, requerida por las demandas energéticas de la lactancia (Kuroda et al., 2011). Los

lamidos corporales incluyen contacto nasal con la superficie corporal en general (Kuroda et al., 2011).

En diferentes especies de mamíferos la experiencia postparto con las crías tiene repercusiones duraderas en el cuidado maternal (Bridges, 1976). Aunque la experiencia maternal es fortalecida por las hormonas presentes durante la gestación y la estimulación cervical durante el parto, la interacción con las crías luego del parto, es necesaria para la expresión y retención de este comportamiento (Bridges, 1976; Calamandrei & Keverne, 1994; Fleming et al., 1992; Malefant et al., 1990). Se ha demostrado, en ratas, que hembras que han sido separadas de sus crías al momento del nacimiento, muestran bajos niveles de comportamiento maternal cuando se las presentan nuevamente varios días luego del parto; sin embargo, si se les permite interactuar con las crías aproximadamente durante una hora y media luego del parto, las hembras continuarán respondiendo maternalmente hacia las mismas, aún luego de un período de 25 días en ausencia de contacto. Estos datos confirman que la interacción con las crías al momento del parto, es indispensable para un buen desarrollo de conductas maternales (Orpen & Fleming, 1986; Numan, 2010). Por tanto, la estimulación sensorial recibida a través de las crías es muy importante para que la madre inexperimentada responda de manera maternal hacia sus crías (Malefant et al., 1990).

La maternidad implica cambios en la percepción de la madre hacia los neonatos, lo cual no solo asegura una fuerte interacción con los mismos, sino que produce cambios dramáticos en respuesta a otros estímulos ambientales (Agrati et al., 2008). Durante el período posparto, se observa una reducción del temor, que se relaciona con el cuidado de las crías. Este patrón comportamental se basa, al menos en parte, en los cambios hormonales característicos de la gestación tardía, parto y lactancia (Ferreira et al., 2002).



**Figura 1.** Comportamiento maternal. Hembra en postura de amamantamiento (izquierda). Crías altriciales (derecha)

El comportamiento maternal se encuentra fuertemente motivado. Esto implica que durante el parto las crías se vuelven estímulos atractivos y reforzadores positivos, promoviendo su búsqueda por parte de las madres (Rosenblatt, 1967), así el desarrollo de conductas maternas coincide con un fuerte impulso de búsqueda e interacción con las crías, en el cual la hembra voluntariamente pasa la mayor parte del tiempo en contacto con ellas (Seip & Morrell, 2009). El complejo estado de motivación de la hembra luego del parto, no sólo promueve la expresión del comportamiento maternal, crítico para el desarrollo y supervivencia de sus crías, sino que también promueve un comportamiento de búsqueda intensivo cuando sus crías están ausentes o inaccesibles (Seip & Morrell, 2009).

### ***2.3 Bases hormonales y circuitos neuronales en la regulación del comportamiento maternal***

El cerebro maternal sufre múltiples adaptaciones dirigidas a la preparación de la hembra para cubrir las demandas de la gestación y la lactancia (Larsen et al., 2008). Para la mayoría de los mamíferos los eventos hormonales asociados con el final de la gestación y el inicio de la lactancia, estimulan la respuesta materna, donde las hormonas que participan durante la gestación y el parto, actúan sobre las áreas neuronales implicadas en el control del comportamiento maternal, generando así la rápida activación de la respuesta maternal observada durante el parto (Numan, 2010; Numan & Stolzenberg, 2009). En esta etapa se produce un período de aprendizaje en las hembras, principalmente olfativo, que le permite reconocer a sus crías y por tanto formar vínculos afectivos con ella (Numan, 2010)

Se postula que durante el parto la acción de hormonas a nivel del sistema nervioso central, inhibe las respuestas de evasión y rechazo hacia las crías, mientras que estimula circuitos neuronales que regulan respuestas de aproximación y aceptación de las mismas (Numan, 2010; Numan & Stolzenberg, 2009; Figura 2).

Las principales hormonas que participan en estos procesos son hormonas esteroideas como estradiol y progesterona (sintetizadas en el ovario) y hormonas proteicas como prolactina (sintetizadas principalmente por la adenohipófisis y posiblemente también por el hipotálamo lateral) y oxitocina (sintetizadas por células o terminales nerviosas en el núcleo supraóptico y paraventricular del hipotálamo) (Numan et al., 2006; Siegel & Rosenblatt, 1975; Rosenblatt et al., 1988) En este sentido, los eventos hormonales críticos que ocurren en la

mayoría de las especies de mamíferos, incluyen, disminución en los niveles de progesterona y aumento en los niveles de estradiol y lactógenos (Numan, 2010; Fleming & Sarker, 1990). El estradiol también facilita la expresión de estas conductas actuando sobre la liberación de prolactina y/o la producción de receptores de oxitocina (Tate-Ostroff & Bridges, 1987). La oxitocina como neurotransmisor es liberada en el cerebro de la hembra parturienta, ejerciendo acciones que favorecen la conducta maternal (Numan, 2010; Olazábal, 2010; Olazábal & Young, 2006a). Los receptores de oxitocina están presentes en varias regiones cerebrales vinculadas a comportamientos afiliativos como: el núcleo accumbens (NA), septo lateral (SL) y área preóptica media (APOM) del hipotálamo, presentando expresión diferencial en especies con diferencias en el comportamiento maternal (Olazábal & Young, 2006a; Numan et al., 2006)

Un área fuertemente implicada en el comportamiento maternal es el APOM, ya que juega un papel preponderante en el control de aspectos apetitivos de la conducta maternal en ratas y otras especies (Numan, 2010).

Así las distintas hormonas reproductivas como oxitocina, prolactina y estrógenos, actúan en el APOM, para estimular el despliegue de conductas maternales en las distintas especies de mamíferos. (Numan et al., 2006; Numan & Stolzenberg, 2009; Pereira & Morrell, 2010; Figura 2 y Tabla 1).

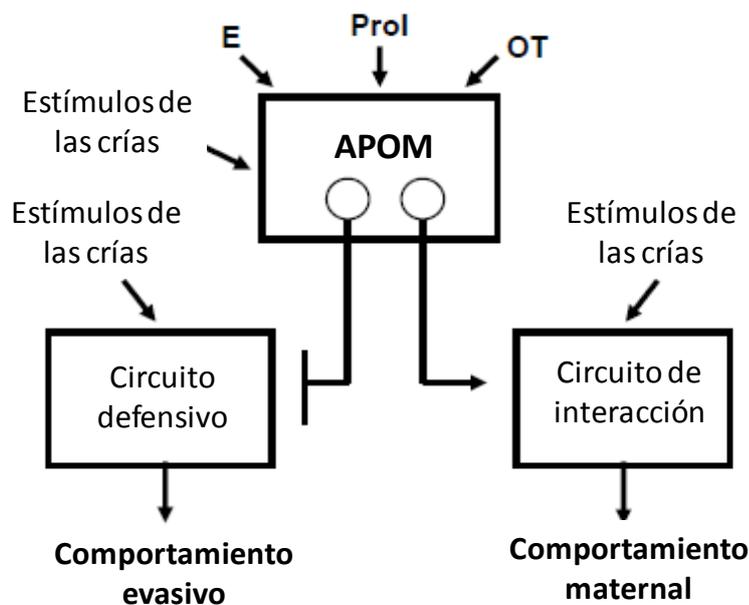
**Tabla 1.** Efecto de las distintas hormonas y de la estimulación vagino-cervical sobre el comportamiento maternal (CM) en mamíferos.

	<b>Progesterona y estradiol</b>	<b>Prolactina</b>	<b>Oxitocina</b>
Rata	CM completo, agresión maternal	CM completo	CM completo
Ratón	Construcción de Nido, agresión maternal	Acarreos, crouching	Inhibición de infanticidio
Conejo	Paja de transporte, excavación, arrancado de cabello	Paja de transporte, arrancado de cabello	No determinado
Oveja	Parcialmente maternal	Sin efectos sobre el CM	CM completo
Primates	Pulsación de barra para obtención de crías	No determinado	No determinado
Humanos	Correlación positiva con sentimientos de apego	No determinado	No determinado

CM: Comportamiento Maternal. Modificado de Numan et al., 2006

La interacción entre el APOM y el sistema neural dopaminérgico regula la expresión del comportamiento maternal. Las hormonas que actúan en APOM regulan aspectos de la conducta maternal estimulando la liberación de dopamina en el NA (Numan & Stolzenberg, 2009; Pereira & Ferreira, 2006). Las neuronas del APOM proyectan hacia el área tegmental ventral (VTA) en el mesencéfalo, la cual contiene neuronas dopaminérgicas que originan el sistema mesolímbico dopaminérgico. Estas neuronas dopaminérgicas, envían proyecciones al NA en el telencéfalo (Numan & Stolzenberg, 2009; Numan 2010). La dopamina (DA) actúa en el NA durante el comportamiento maternal, y se ha demostrado que interrupciones en la acción de DA en el NA interfieren con los comportamientos activos (como acarreos), pero no parece alterar comportamientos inmóviles o pasivos como el amamantamiento (Numan, 2010; Stolzenberg et al., 2010) En este sentido agonistas de los receptores DA en el NA aceleran la respuesta maternal en ratas (Stolzenberg & Rissman, 2011).

Si bien el comienzo inmediato de las conductas maternales en hembras primíparas parturientas se encuentra bajo control hormonal, su mantenimiento no (Numan & Stolzenberg, 2009; Fleming & Sarker, 1990; Orpen & Fleming, 1987). Ratas que han sido hipofisectomizadas luego de haber mostrado conductas maternales, continúan mostrando estas conductas durante el período postparto aunque ya no puedan seguir amamantando (Numan & Stolzenberg, 2009; Rosenblatt, 1967; Siegel & Rosenblatt, 1975).



**Figura 2.** Modelo hipotético de las funciones del APOM respecto a la motivación maternal. Estradiol (E), prolactina (Prol) y oxitocina (OT) se muestran actuando a nivel del APOM para incrementar la respuesta al estímulo de las crías. El APOM activada actúa por una de dos vías: una en la cual inhibe circuitos neuronales de evitación y otro en el cual excita el sistema neural mediante interacciones positivas con las crías. Líneas terminadas en barra indican inhibición, y las terminadas en flecha, indican excitación. 10 Modificado de Numan & Stolzenberg, 2009.

## ***2.4 Comportamiento maternal inducido por crías***

A pesar de la fuerte influencia de las hormonas reproductivas en el desarrollo del comportamiento maternal, es posible provocar este comportamiento en hembras vírgenes e incluso en machos, únicamente mediante cohabitación con las crías (Rosenblatt, 1967). El proceso por el cual la continua exposición a las crías promueve el desarrollo de comportamientos parentales se denomina sensibilización y varía entre las distintas especies (Leblond, 1940, Noirot, 1972). Durante este proceso se produce un profundo cambio en el comportamiento del animal que culmina con el desarrollo del interés y cuidado de las crías. Durante el período de sensibilización, hembras de algunas especies como la rata, perciben a las crías como estímulos aversivos, y en su presencia, realizan una variedad de comportamientos con el fin de incrementar la distancia entre ella y las crías. Esto podría deberse, en parte, a que la hembra nulípara, en contraste con la posparturienta, no muestra reducción del temor, y por tanto se presenta más temerosa en presencia de crías ajenas (Fleming & Luebke, 1981).

Tanto hembras y machos vírgenes pueden desplegar conductas maternas, la única diferencia es que no amamantan, pero se observan posturas similares al amamantamiento a pesar de no presentar pezones desarrollados y no producir leche (Kuroda et al., 2011). El despliegue de estas posturas durante el cuidado parental en individuos vírgenes, sugiere que es provocada como un subproducto de la activación de circuitos neuronales “maternos” en machos y hembras no-lactantes (Kuroda et al., 2011). El comportamiento parental desplegado por hembras y machos vírgenes, no se ve inhibido por hipofisectomía o gonadectomía, si bien en hembras ovariectomizadas se observa una reducción en la frecuencia de construcción de nido y acarreo (Rosenblatt, 1967). Esto sugiere que niveles basales de cuidado parental puede ser inducido por exposición a crías, independientemente de la estimulación hormonal.

Las ratas vírgenes, cuando inicialmente son expuestas a crías no familiares, las evaden, pero luego de un período de exposición de 6 a 8 días, comienzan a tolerar el contacto con las mismas. Una vez que las conductas de acercamiento se mantienen, la estimulación proveniente de los neonatos incrementan aún más, las conductas de búsqueda, que se desarrollan de manera gradual, hasta que se manifiesta el despliegue total del comportamiento maternal, el cual incluye en estos animales conductas características y desarrolladas de un modo ordenado: lamidos, acarreo hacia el sitio de nidificación, construcción de nido alrededor de las crías con función de protegerlas, y asentamiento sobre

las crías en postura de protección (Kuroda et al., 2011, Numan et al., 2006). Una pequeña proporción de ratas hembras vírgenes y una gran proporción de machos, realizan infanticidio cuando son expuestos por primera vez a neonatos, disminuyendo la frecuencia de este comportamiento, cuando son sometidos a sucesivas presentaciones con las crías. Mayer y Rosenblatt (1979) observaron que tanto ratas hembras como machos de temprana edad (18 días), buscan acercamiento y contacto con las crías (45% del tiempo de observación), siendo aún más pronunciado este comportamiento en animales de 20 a 22 días (75% del tiempo de observación). Sin embargo, observaron que en animales de 24 días de edad, el contacto con las crías declina bruscamente (20% del tiempo de observación) y continúa en baja incidencia, en grupos de animales de 30-36, 60 y 90 días de edad.

Por otra parte, Mayer, Freeman y Rosenblatt (1979), analizaron las latencias que presentan las ratas en desarrollar conductas maternas. Observaron que a los 30 días de edad, no se encuentran diferencias comportamentales entre machos y hembras, mientras que a los 45 días de edad, las latencias al despliegue de conductas maternas difieren entre los sexos. En estos animales, las hembras de 45 a 90 días de edad, muestran menores latencias que los machos. Sin embargo en los machos, a partir de los 45 días de edad, aumentan gradualmente las latencias al desarrollo de conductas maternas hasta los 90 días de edad, donde se observa una reducción significativa de este comportamiento.

En los ratones de la pradera, la mayoría de los individuos muestran comportamiento parental “espontáneo” en respuesta a los neonatos en un período que abarca pocos segundos o minutos (Olazábal & Young, 2006b). Se define comportamiento parental espontáneo como la inmediata expresión del patrón de conducta típico de un animal posparturiento (a excepción de la lactancia) por hembras y machos en otros contextos no reproductivos. En este sentido, los ratones de la pradera se diferencian de ratas y ratones de laboratorio, ya que los mismos presentan latencias al desarrollo de conductas maternas que pueden abarcar desde horas a días. La respuesta parental espontánea que presentan los ratones de la pradera, incluye al momento de la exposición de las crías, lamidos y posturas de protección, y subsecuentemente, construcción de nido y acarreo, es decir todos los componentes del comportamiento materno (Olazábal & Young, 2008). La mayoría de los machos vírgenes, de aproximadamente 20 días de edad, despliegan conductas parentales hacia los neonatos, y sólo un pequeño porcentaje (15%) las ignora. El infanticidio en machos de ratones de la pradera es bastante raro, ocurriendo a muy bajas frecuencias (menos del 10%). Las hembras juveniles de ratones de la pradera, interactúan positivamente con las crías, pero sin embargo, una vez que alcanzan la

madurez, un conjunto de hembras (~ 50%) desarrollan conductas no maternas e incluso infanticidas.

En ratones, la latencia para el despliegue de conductas maternas, es más corto que el descrito para ratas. Hembras vírgenes de una amplia variedad de cepas de ratones, iniciarían el comportamiento maternal sólo luego de 30 minutos de exposición, aunque este aspecto se encuentra muy discutido para ratones. Se ha notado que éstos atraviesan una serie de cambios, análogo a la sensibilización en ratas durante su exposición inicial a las crías (Noirot, 1972; Lonstein & De Vries, 2000b). Se sugiere que el comportamiento de ratones hembras vírgenes, cuando inicialmente son expuestas a crías, tiende a progresar de manera ordenada a través de una serie de pasos. En primer lugar se observa un período de exploración intenso y gran frecuencia de olfateos a las crías, un período de ambivalencia, donde son frecuentes los acercamientos alternados con rápidos retiros al lado opuesto de la caja y finalmente el despliegue o no de conductas maternas, que abarcan lamidos, acareo y finalmente construcción de nido (Fleming & Luebke, 1981; Mayer, 1983; Noirot, 1972). Las hembras de ratones, raramente comenten infanticidio cuando son expuestas a crías, pero los machos vírgenes generalmente realizan infanticidio, aún luego de repetidas exposiciones (Kuroda et al., 2011). Aproximadamente el 40% de machos adultos de la cepa Rockland-Swiss albino (R-S) realizan infanticidio, en contraste con menos del 10% en las hembras (Gandelman & Vom Saal, 1975). Estudios realizados por Gandelman (1973) en la cepa de ratón R-S albino, muestran que hembras de 22 días de edad tienden a ignorar a las crías, mostrando comportamiento maternal a partir de los 40 días y manteniéndose en continuo aumento hasta los 70 días de edad.

En ratas y ratones de laboratorio se ha encontrado una marcada diferencia entre hembras y machos en el comportamiento hacia las crías, donde el macho en general, es visiblemente más agresivo (Gandelman, 1972). Esta diferencia se ha atribuido al hecho de que el cerebro de la hembra no está sometido al influjo hormonal proveniente de los testículos (andrógenos) ya que se ha visto que si se le administra a la hembra andrógenos, ésta desarrolla comportamientos agresivos similares al macho y a la inversa, si el macho es castrado no se desarrolla el comportamiento agresivo característico del sexo (Gandelman, 1972). Sin embargo, otros estudios han mostrado que administraciones agudas de testosterona en hembras gonadectomizadas no induce comportamientos agresivos (Johnson & Whalen, 1987). Alternativamente a esta hipótesis, se ha planteado la idea de que el comportamiento aversivo está influenciado por el sistema olfativo. Las señales químicas, como la orina en machos, modulan el comportamiento agresivo en ratones, principalmente mediante las Principales

Proteínas de la Orina (MUPs) y sus ligandos (Mucignat-Cartetta et al., 2004), las cuales parecen estar involucradas en el reconocimiento individual.

En el ratón de laboratorio, existe una variabilidad importante entre los distintos estudios en cuanto a la incidencia de comportamiento parental espontáneo (Tabla 2). En numerosos estudios se reporta una alta incidencia de este comportamiento, mientras que otros estudios muestran lo contrario (Stolzenberg & Rissman, 2011; Gandelman & Vom Saal, 1975; Calamandrei & Keverne, 1994). Esta variabilidad, puede deberse a numerosos aspectos, entre los que se destacan, la cepa estudiada, pre-exposición a las crías (la cual puede inducir un aumento en el comportamiento parental espontáneo), habituación a la caja, la edad de las crías, duración total del test, y principalmente a la definición de comportamiento parental. En muchos trabajos no se definen los componentes comportamentales que se evaluaron para categorizar a los animales como parentales espontáneos, y en otros casos solamente definen comportamiento parental cuando observan únicamente la presencia de acarro, y no toman en cuenta algunas variables características y sumamente importantes como es el *crouching*, el cual debe estar siempre presente en los individuos categorizados como parentales (Gandelman, 1972; Gandelman & Vom Saal, 1975; Gandelman, 1973). Algunos autores, reportan que las posturas de amamantamiento o *crouching* en ratones no son muy frecuentes antes de la madurez (Noirot, 1972), sin embargo, en otros trabajos, se reporta que la mayoría de los individuos categorizados como maternas realizan este comportamiento (Gandelman, 1973; Stolzenberg & Rissman, 2011).

Se evidencia así, que existe una gran variabilidad en la incidencia del comportamiento parental tanto inter como intra-específico. Además, hasta el momento no se conoce a qué edad aparece la respuesta maternal espontánea e infanticida en el ratón de laboratorio. Por tanto consideramos apropiado e interesante realizar una caracterización del comportamiento parental espontáneo e infanticida en esta especie.

Existe un aumento en los últimos años en el número de estudios que utilizan cepas de ratones de laboratorio como modelos experimentales, principalmente debido al uso del ratón para la creación de transgénicos y estudios de genética funcional. También por esta razón considero que es fundamental entender y describir cuidadosamente el desarrollo del comportamiento parental e infanticida en ratones de laboratorio.

Tabla 2. Datos extraídos de los trabajos de distintos autores sobre comportamiento maternal espontáneo en las distintas cepas de ratones.

Autor	Cepa	Ciclo luz/oscuridad	Nº de crías (edad)	Exposición previa	Duración test	N	Mat/NoMat/Inf (%)	Descripción del Comportamiento Maternal
<b>Gandelman, 1972</b>	R-S albino	Fase luz	2(1)	15 min	5 min	50♀ y 50♂	?/?/10♀ y ?/?/40♂	No aclara
<b>Gandelman, 1973</b>	R-S albino	Fase luz	2(1)	15 min	15 min	15 ♀	?/?/?	Acarreo y postura de amamantamiento
<b>Gandelman &amp; Vom Saal, 1995</b>	R-S albino	Fase luz	3 (1)	15 min	no aclara	50♀ y 60♂	90/0/10♀ y 67/0/33♂	Acarreo
<b>Calamndrei &amp; Keverne, 1994</b>	Balb-C	Fase oscura	3(1-3)	0 min	30 min	6 ♀	>80/0/<20	Lamido, nido y postura de amamantamiento
<b>Leussis et al., 2008</b>	CD-1	Fase oscura	3 (3-11)	24 horas	10 min	24 ♀	67/0/33	Lat. acarreo, lamidos, nido y postura de amamantamiento
<b>Stolzenberg &amp; Rissman, 2011</b>	C57BL6	Fase oscura	4 (2-7)	45 min	15 min	10 ♀	100/0/0	Lat. acarreo, lamidos, postura de amamantamiento

### **3. HIPÓTESIS**

La exposición, en el ratón de laboratorio, a crías recién nacidas no dispara todos los componentes característicos del comportamiento parental en forma inmediata.

La incidencia del comportamiento parental e infanticida en individuos jóvenes de ratón de laboratorio es menor que en adultos

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1. General**

Describir la respuesta comportamental en hembras y machos vírgenes del ratón de laboratorio, cuando son expuestos por primera vez a crías recién nacidas, y determinar cómo este comportamiento cambia desde el destete a la edad adulta.

#### **4.2. Específicos**

Describir en forma detallada el comportamiento que despliegan hembras y machos inexperimentados a los 20, 30, 60-70, 100-115 días de edad, de ratón de la cepa C57BL6 durante los primeros 15 min de exposición a crías recién nacidas.

Determinar la incidencia del comportamiento parental espontáneo e infanticida en hembras y machos de ratón de la cepa C57BL6 a los 20, 30, 60-70, 100-115 días de edad.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 *Animales*

Se utilizaron ratones de laboratorio (*Mus musculus*) de la cepa C57BL/6J traídos originalmente del Instituto Pasteur de Montevideo (IPM) y criados en la Unidad de Reactivos para Biomodelos de Experimentación (URBE) de la Facultad de Medicina.

Los individuos fueron alojados en grupos separados por sexo, en cajas de plástico transparente (267X207X140 cm) sometidos a un ciclo luz/oscuridad 12:12 (luces encendidas a las 6:00 am). Todos los individuos fueron mantenidos en un ambiente estable, con temperatura controlada ( $20\pm 2$  °C) con acceso a comida y agua *ad libitum*. La limpieza y cambios de cajas se realizó una vez a la semana.

Inicialmente se aparearon 6 hembras con 3 machos (3 animales por caja). Luego de una semana, los machos fueron retirados de las cajas de las hembras. El día 19 luego del cruce, estas 6 hembras posibles preñadas fueron alojadas individualmente, verificando la presencia de crías hasta el día del parto. El primer día que se encontraron crías en la caja, se consideró el día 0 posparto. Las crías nacidas de estas 6 madres se utilizaron como una primera camada para la realización de los test comportamentales. Un grupo “donador” de hembras lactantes fueron mantenidos para proveer crías a hembras y machos de experimentación.

Todos los animales fueron destetados a los 20 días de edad y se alojaron en grupos de un máximo de 10 individuos del mismo sexo y edad, mantenidos allí hasta la realización de los correspondientes registros comportamentales.

### 5.2 *Grupos*

Las pruebas comportamentales se realizaron para un total de 29 hembras y 38 machos. Las hembras se dividieron en 3 grupos en relación a su edad: 9 hembras de 20-22 días, 10 hembras de 30-33 días y 10 hembras de 60-65 días de edad. Los machos, se dividieron en 4 grupos: 10 machos de 20-22 días, 10 machos de 30-33 días, 9 machos de 60-65 días y 9 machos de 102-104 días de edad.

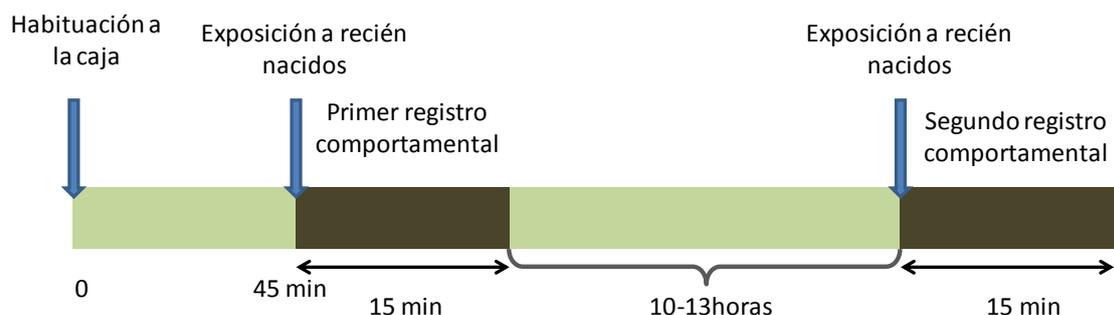
Las hembras de 102-104 días de edad no pudieron ser testeadas ya que a que al momento del registro comportamental, observamos que estas hembras se encontraban lastimadas debido a enfrentamientos producidos entre las mismas. Consideramos inapropiado registrar las conductas parentales de estas hembras, ya que se encontraban en una situación alterada y no pudieron ser evaluados en condiciones normales.

### 5.3 Pruebas comportamentales

Los días de registros, los animales sujetos a los test comportamentales, fueron trasladados a un cuarto de experimentación contiguo al área de cría, donde se alojaron individualmente en nuevas cajas de plástico transparente (267 x 207 x 140 mm), dejándolos habituar a la misma por 45 minutos.

Luego del período de habituación, dos crías (1-4 días de edad) fueron colocadas en la caja, en el sitio opuesto al cual se encontraba el individuo en el momento en que la caja fue abierta. A partir de ese momento se realizó un registro comportamental durante un período de 15 minutos (Olazábal and Young, 2006a). Aproximadamente 10-13 horas luego de la primera exposición, se realizó una segunda exposición a los neonatos por otros 15 minutos (Figura 3). Los animales por tanto fueron testeados en el día y la noche, alternando el orden de comienzo del test de manera de balancear los grupos. En el anexo se muestran los resultados obtenidos del análisis del efecto que presenta el ciclo luz oscuridad sobre el comportamiento maternal, y el efecto de la exposición repetida a las crías.

Los test que comenzaron por la mañana se iniciaron aproximadamente a las 8:00 am y en la tarde se volvieron a repetir aproximadamente a las 18:00. Los test que se comenzaron por la noche se iniciaron a las 18:00 y se volvieron a repetir a las 7:00 am.



**Figura 3.** Protocolo experimental. Las flechas verticales indican el momento que se realizarán las distintas actividades. Las flechas horizontales indican la duración de cada registro comportamental (15 minutos).

Durante las pruebas comportamentales se registraron distintas variables. Entre éstas se encuentran variables relacionadas con el comportamiento maternal (Olazábal & Young, 2006b) y variables relacionadas principalmente con la exploración (Casarrubea, et al, 2009). Las variables relacionadas a las conductas maternas que se registraron fueron:

Acarreos: transporte de las crías con la boca, hacia el nido.

Lamidos: movimiento rápido de la lengua sobre el cuerpo de la cría.

Postura de protección o *crouching*: posicionamiento sobre las crías con función de protección y suministro de calor. Se considero *crouching* a los individuos que permanecieron realizando este comportamiento durante un período de al menos 3 segundos.

Construcción de nido: armado de un “refugio” para las crías

Las otras variables registradas fueron:

Rearings: elevamiento del cuerpo mediante el apoyo sobre las patas traseras.

Trepadas: los individuos se agarran de las rejillas de la caja y trepan sobre la tapa y bebederos.

Distancia: alejamiento de las crías mayor a 10 cm

Olfateos: los individuos huelen a las crías, generalmente con contacto nasal

Inmovilidad: los individuos permanecen quietos

Infanticidio: ataque a las crías

Se determinó la frecuencia, duración y latencia de cada uno de estos componentes.

Frecuencia: cantidad de veces que el individuo realiza un comportamiento.

Duración: tiempo total en que el individuo permaneció realizando esa conducta.

Latencia: tiempo que transcurre desde que comienza el test, hasta que se manifiesta el comportamiento.

El registro de todos los parámetros comportamentales se realizó utilizando el programa Stopwatch (<http://www.cbn-atl.org/research/stopwatch.shtml>).

## 5.4 Categorías

Se categorizaron a los animales como completamente parentales (CP), parentales incompletos (PI), no parentales (NP) o infanticidas (I) de acuerdo al siguiente criterio:

CP: animal que desplegó todos los componentes típicamente asociados al comportamiento maternal: acarreo de las crías, lamido a las crías por un tiempo igual o mayor a 60 segundos, y postura de protección por un tiempo igual o mayor a 30 segundos.

PI: animal que desplegó sólo 2 de los componentes comportamentales descritos arriba.

NP: animal que desplegó sólo uno o ninguno de los componentes comportamentales descritos más arriba y no ataca.

I: animal que atacó a las crías.

Luego de finalización del test o al momento de ser atacadas, las crías fueron retiradas de la caja. Aquellas que recibieron lesiones fueron sacrificadas inmediatamente, y aquellas que no fueron atacadas se devolvieron a su madre. Todas las crías fueron aceptadas por su madre, luego de devolverlas al nido. Los animales que atacaron a las crías fueron excluidos de las comparaciones de tiempos y latencias, debido a que los registros se interrumpieron.

## 5.5 Análisis estadístico

En primera instancia se realizaron test de homogeneidad de varianza y de distribución normal, y en los casos de que ambos cumplieron, se realizó test paramétricos, en caso contrario, se realizaron test no paramétricos para el análisis de los datos.

Para hembras, la frecuencia y duración de *rearings*, y la frecuencia de alejamiento de las crías, cumplieron con el test de homogeneidad de varianza y distribución normal; para machos, la frecuencia y duración de olfateos, duración de distancia a las crías y frecuencia de *rearings*,

también cumplieron con el test de homogeneidad de varianza y distribución normal por lo que fueron analizados por test paramétricos (ANOVA) y test posthoc (Fisher PLSD).

Las diferencias entre grupos en las latencias y frecuencia de los distintos comportamientos que no cumplieron con los requerimientos de normalidad y homogeneidad de varianza (lamidos, posturas de protección, acarreos, etc.) fueron analizadas mediante Kruskal Wallis, y Mann Withney.

Se comparó la incidencia de comportamiento parental completo, incompleto, no parental e infanticida en machos y hembras usando Chi cuadrado (X<sup>2</sup>).

Los datos fueron expresados como medianas (rango semi-intercuartiles, RSIQ). El valor de significancia escogido para las comparaciones estadísticas fue  $p < 0.05$ .

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Incidencia del comportamiento parental en hembras y machos: comparación por edad

Los resultados que se muestran a continuación refieren exclusivamente al comportamiento desplegado en la primera exposición a las crías.

#### 6.1.1 Incidencia de animales maternas o infanticidas

##### *Hembras*

La comparación por edades en hembras no mostró ninguna diferencia significativa en el número de animales que alcanzaron el criterio de Maternal completo, Maternal incompleto, No maternal o Infanticida ( $X^2 = 5.70$ ;  $p = 0.22$ ; Tabla 3).

Tabla 3. Número de animales que expresaron comportamiento parental

	♀ 20-22 días	♀ 30-33 días	♀ 60-65 días	Total
<b>MC</b>	0	0	2	2
<b>MI</b>	1	2	3	6
<b>N</b>	8	8	5	21
<b>I</b>	0	0	0	0

MC: Maternal Completo, MI: Maternal Incompleto, N: No maternal, I: Infanticida  
Hembra (♀).

Se observó que sólo 2 hembras de 60-65 días alcanzaron el criterio de MC y que no hubo infanticidio en ninguna de las edades estudiadas. Cuando se comparó la incidencia de comportamientos maternas (maternal completo sumado a maternal incompleto) y no maternas, tampoco se encontraron diferencias significativas, presentando un valor  $p$  de 0.13 ( $X^2 = 4.01$ ).

## Machos

La comparación de la respuesta a las crías entre las diferentes edades en machos, mostró diferencias significativas entre los grupos ( $X^2= 20.3$ ;  $p = 0.0001$ ; Tabla 4). Los machos no mostraron conductas parentales, si no que únicamente se observaron animales no maternales e infanticidas. El aumento de infanticidio con la edad se hace evidente en el grupo de los machos.

Tabla 4. Número de animales que expresaron comportamiento parental

	♂ 20-22* días	♂ 30-33 días	♂ 60-65 días	♂ 102-104† días	Total
<b>MC</b>	0	0	0	0	0
<b>MI</b>	0	0	0	0	0
<b>N</b>	10	7	5	0	22
<b>A</b>	0	3	4	9	16

MC: Maternal Completo, MI: Maternal Incompleto, N: No maternal, I: Infanticida. Macho (♂).

\* $p < 0.05$  vs 60-65 y 102-104. † $p < 0.05$  vs 30-33, 60-65. Prueba de  $X^2$ .

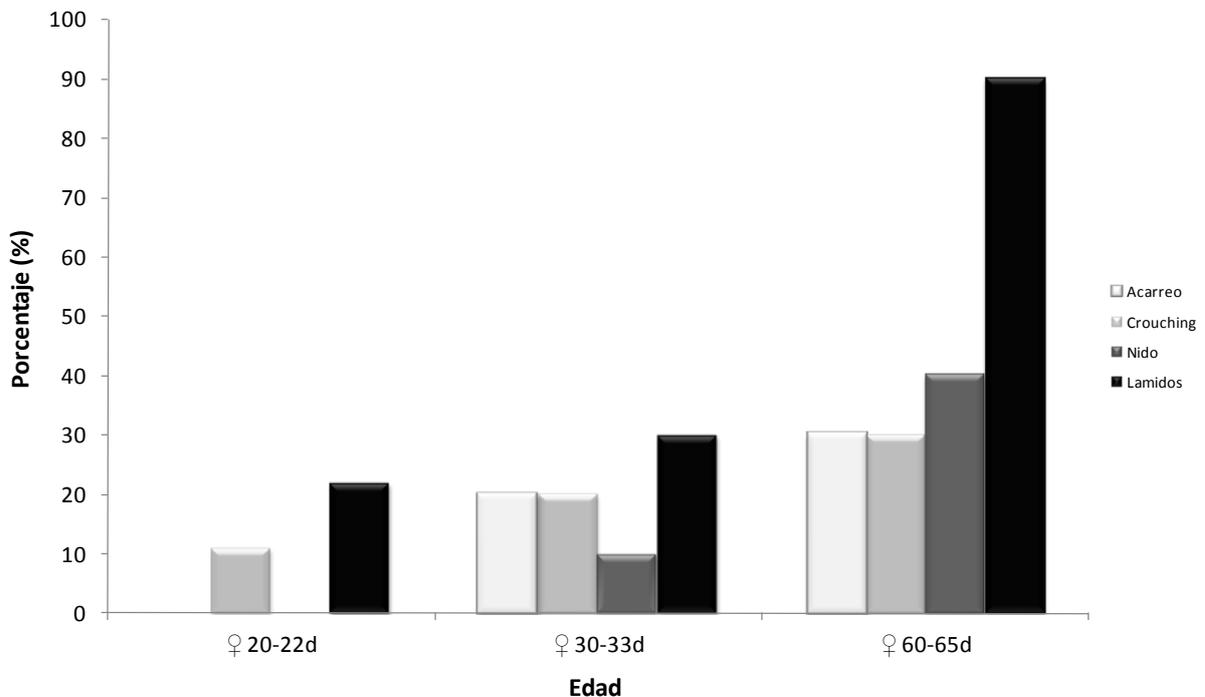
La comparación de la respuesta a las crías entre machos y hembras de 20 días no mostró diferencias significativas ( $X^2= 1.20$ ;  $p = 0.28$ ). Hacia los 30 días de edad, si bien las diferencias no fueron significativas ( $X^2= 5.10$ ;  $p = 0.08$ ), la disparidad entre los sexos se vuelven gradualmente más notorias. Las hembras comenzarían a responder de manera más maternal (2 hembras alcanzaron el criterio de PI), y los machos comenzarían a mostrar conductas aversivas hacia las crías, ausentes en los individuos de 20 días de edad.

Cuando se comparó la respuesta hacia las crías en machos y hembras de 60 días de edad, se observó una marcada diferencia entre estos animales en relación a la encontrada en animales de 30 días, obteniendo en este caso valores significativos ( $X^2= 9.01$ ;  $p = 0.03$ ). El número de hembras que mostraron conductas maternales aumentó notoriamente en relación con las de 30 días, ya que en este caso 5 hembras (2 PC y 3 PI) mostraron conductas maternales. Al igual que en los individuos de 30 días de edad, ningún macho alcanzó el criterio de parentalidad, sin embargo se incrementó el número de individuos que atacaron a las crías.

### **6.3.2 Análisis de los distintos componentes del comportamiento parental**

#### ***Incidencia de los distintos componentes asociados al comportamiento parental en hembras y machos***

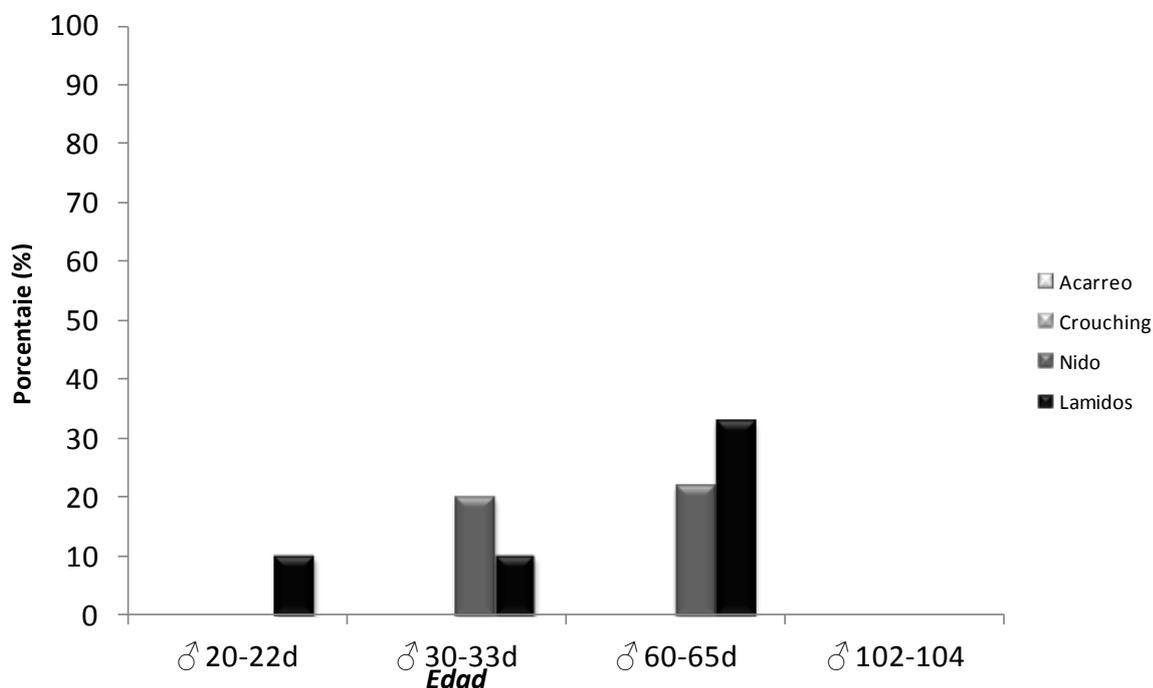
Se observó en las hembras, que a la edad de 20 días sólo despliegan, en muy baja incidencia, las conductas de lamidos y *crouching*. Sin embargo, a los 30 días de edad, se observa que las hembras muestran los cuatro componentes principales del comportamiento parental. En las hembras adultas, el porcentaje de expresión de los diferentes componentes del comportamiento parental es mayor que en hembras de 20 y 30 días, destacándose principalmente los lamidos (Figura 4).



**Figura 4.** Porcentaje de hembras (♀) que expresaron las variables acarreo (barra blanca), crouching( barra clara), nido (barra oscura) y lamidos (barra negra)

En machos, en cambio, las únicas conductas que se observaron fueron construcción de nido y lamidos (Figura 5). A los 20 días de edad, solamente se evidenció la presencia de lamidos, sin embargo, a los 30 y 60 días también se evidenció construcción de nido. Al igual que en hembras se observa en los machos, aun aumento en la incidencia de lamidos a la edad

de 60 días. No se evidenciaron componentes del comportamiento parental en machos de 102-104 días ya que todos atacaron a las crías

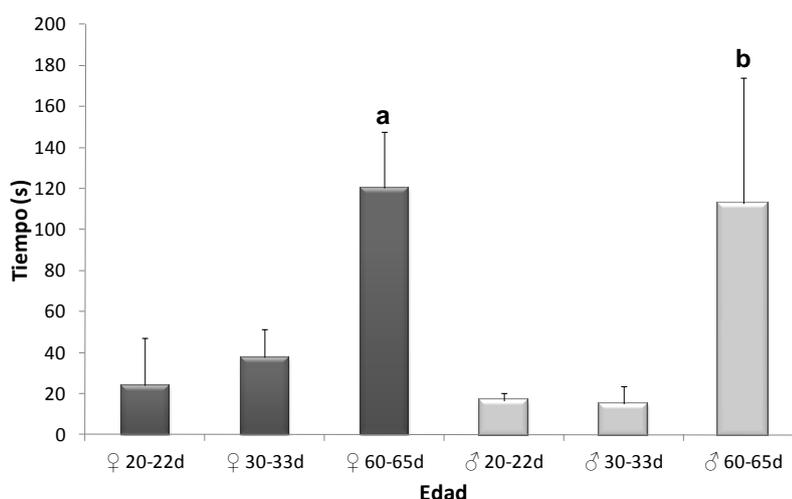


**Figura 5.** Porcentaje de machos (♂) que expresaron las variables acarreo (barra blanca), crouching( barra clara), nido (barra oscura) y lamidos (barra negra)

### **Lamidos**

En hembras, se evidenciaron diferencias significativas en la frecuencia de lamidos ( $H= 16.80$ ;  $p = 0.00$ ), entre los individuos de 20 y 60 días ( $U_{(9,10)}= 6.50$ ;  $p=0.00$ ), y los de 30 y 60 ( $U_{(10,10)}= 1.50$ ;  $p= 0.00$ ) días de edad. También se encontraron diferencias en cuanto a la duración total ( $H= 10.01$ ;  $p = 0.00$ ) de lamidos entre individuos de 20 y 60 ( $U_{(9,10)}= 14.04$ ;  $p=0.00$ ) y los de 30 y 60 días ( $U_{(10,10)}= 12.42$ ;  $p=0.00$ ). Las hembras de 20 y 30 días presentaron una menor frecuencia de lamidos [5.03 (6.08) y 14.06 (4.02) respectivamente], en relación a las hembras de 60 días, quienes mostraron una frecuencia de lamidos bastante más elevada [60.01 (44.09)]. A su vez, como se observa en la Figura 6, las hembras de 60 días también permanecieron durante más tiempo lamiendo en relación a las hembras de 20 y 30 días edad. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la latencia al primer lamido para ninguna edad ( $p = 0.10$ ).

En los machos, en cambio, se evidenciaron diferencias significativas en la latencia a lamidos ( $H= 7.50$ ;  $p = 0.00$ ) entre los animales de 20 [8.01 (41.05)] y 60 [49.08 (20.06)] días de edad ( $U_{(10,5)}= 5.00$ ;  $p= 0.00$ ), siendo los juveniles quienes mostraron mayores latencias al primer lamido. En cuanto al tiempo total de lamidos, no se observaron diferencias significativas ( $H= 5.08$ ;  $p = 0.08$ ) entre los grupos, pero se observa una tendencia en los machos de 60 días a lamer más a las crías que los individuos de 20 y 30 días de edad (ver figura 6). No hubo diferencias significativas en la frecuencia de lamidos de los machos en las diferentes edades ( $p = 0.18$ ).



**Figura 6.** Duración de lamidos realizados por hembras (barras oscuras) y machos (barras claras) de las distintas edades. Datos expresados como medianas (RSIQ). <sup>a</sup> $p < 0.05$  vs ♀ de 30-33 días y ♀ de 20-22 días de edad, Prueba de U Mann Withney. <sup>b</sup> $p = 0.08$  vs ♂ de 30-33 días y ♂ de 20-22 días de edad.

### ***Crouching***

En las hembras, se evidenciaron diferencias significativas en frecuencia ( $H= 8.60$ ;  $p = 0.01$ ) y duración ( $H= 5.90$ ;  $p = 0.05$ ) de *crouching*, sólo entre los individuos de 20 y 60 días de edad ( $U_{(9,10)}= 14.50$ ;  $p = 0.01$ ). Los individuos de 60 días permanecieron durante más tiempo realizando *crouching* [9.07 (1.50) segundos], en relación a los individuos de 20 días de edad [0.04 (0.12) segundos]. Las hembras de 30 días realizaron esta conducta durante un tiempo de 3.08 (29.01) segundos. Asimismo, las hembras de 60 días realizaron *crouching* con una mayor frecuencia [9.04 (2.01)] en relación a individuos de 20 días [0.04 (0.12)]. Las hembras de 30 días realizaron esta conducta con una frecuencia de 2.0 (5.0).

En machos, la comparación entre los grupos, no evidenció diferencias significativas ni en frecuencia ( $H= 3.70$ ;  $p = 0.16$ ) y duración de *crouching* ( $H= 3.70$ ;  $p = 0.15$ ). En los machos de 30 y

60 días de edad, se encontró baja incidencia de *crouching*, tanto de la cantidad de veces que realizaron esta conducta [0.07 (0.40), 1.08 (2.12) respectivamente] como del tiempo total en que estuvieron realizándolo [0.02 (0.10), 1.44 (5.22), respectivamente]. Los machos de 20 días no realizaron *crouching* [0.02 (0.00)].

Los resultados obtenidos de la comparación entre machos y hembras de igual edad, evidenció diferencias significativas solamente en cuanto a la Frecuencia de *crouching*, entre machos y hembras de 60 días de edad ( $p = 0.01$ ).

### **Construcción de Nido**

La comparación por edades, tanto en hembras como en machos, no reveló diferencias significativas en frecuencia (H=2.70  $p=0.26$ ; H= 1.90  $p=0.38$ ), duración (H=2.50  $p=0.28$ ; H=3.70  $p=0.16$ ) o latencia (H=4.00  $p=0.14$ ; H=1.10  $p=0.58$ ) respectivamente. En la figura 4 y 5, se observa el porcentaje de hembras y machos que construyeron nido. Se observa que a los 20 días, los individuos no construyeron nido, mostrando a los 30 y 60 días de edad, baja incidencia de esta conducta.

### **Acarreo**

En cuanto al acarreo, sólo se observó esta conducta en hembras. No se encontraron diferencias significativas ni entre los grupos ni en frecuencia (H=1.30;  $p=0.52$ ) y latencia al acarreo (H=1.40;  $p=0.51$ ). En las figura 4, donde se muestra el porcentaje de hembras que acarrearón, se observa que los animales de 20 días no acarrearón y las hembras de 30 y 60 días de edad lo hicieron en un muy bajo porcentaje.

### ***Descripción de lamido, crouching, acarreo y la construcción de nido en animales parentales (PC + PI)***

Tabla 8. Descripción de la duración de los diferentes componentes del comportamiento parental en los individuos categorizados como maternas, incluyendo a los individuos maternas completos como incompletos.

	<b>Mediana (RSIQ)</b>
<b>Lamidos</b>	140±21
<b>Crouching</b>	47±35
<b>Construcción de Nido</b>	0±41

Individuos parentales (PC+PI)

La tabla 8 muestra la duración de lamidos, crouching y nido para los animales maternas. Se categorizaron 8 animales maternas, de los cuales 2 alcanzaron el criterio de MC y 6 el de MI. Se observa que los animales maternas permanecen más tiempo lamiendo que realizando crouching o construyendo nido. Se encontró a su vez, que los individuos se acercan más veces a lamer [35.0 (8.0)], en relación a la cantidad de veces que realizan crouching [12.14 (2.06)], o construyen nido [0.04 (2.01)]. Asimismo, se evidencia que la latencia al primer lamido [24.03 (18.07)] es menor que las latencia a realizar crouching [98.04 (36.02)], construcción de nido [900.00 (157.04)], o acarreo [900.00 (340.02)]. Se encontró que sólo el 38% de los animales categorizados como maternas, acarrearon a las crías.

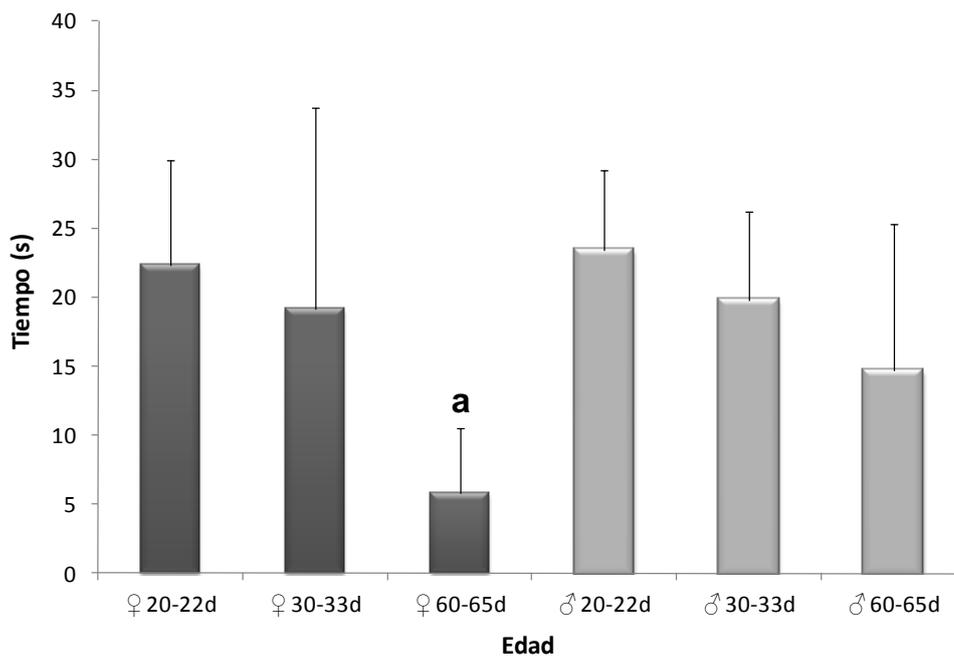
#### **6.3.4 Análisis de las conductas locomotoras y exploratorias**

El análisis de los diferentes componentes asociados a la actividad exploratoria y locomotora (trepadas, *rearing*, distancia a las crías, inmóvil) mostraron diferencias significativas por edad:

## Olfateos

En cuanto a olfateos a las crías, en hembras, se observaron diferencias significativas entre los grupos en duración ( $H=18.20$ ;  $p=0.02$ ) y frecuencia ( $H= 13.60$ ;  $p=0.01$ ) de olfateos. Estas diferencias se evidenciaron entre los individuos de 20 y 60 días ( $U_{(9,10)}= 11.00$   $p=0.01$ ;  $U_{(9,10)}= 2.00$   $p=0.00$  respectivamente) y los de 30 y 60 días de edad ( $U_{(10,10)}= 22.00$   $p=0.03$ ;  $U_{(10,10)}= 13.00$   $p= 0.01$  respectivamente). Se observó que las hembras de 20 y 30 días olfatearon con más frecuencia a las crías [10.32 (4.12) y 8.16 (14.50) respectivamente], siendo las hembras de 60 días quienes realizaron esta conducta en menor frecuencia [1.10 (1.50)]. En la figura 7 se observa la duración de olfateos. Las hembras de 60 días permanecieron durante menos tiempo olfateando a las crías, en relación a las hembras de 20 y 30 días de edad. No se observaron diferencias significativas en la latencia a olfateos entre las distintas edades ( $H=0.80$ ;  $p = 0.67$ ).

En machos, el análisis de esta conducta mediante test de ANOVA, no evidenció diferencias significativas entre los grupos ni en frecuencia ( $F_{(2,19)}= 1.90$ ;  $p = 0.18$ ), duración ( $F_{(2,19)}= 1.40$   $p = 0.28$ ) o latencia ( $F_{(2,19)}= 0.30$ ;  $p = 0.89$ ) de olfateo a crías.

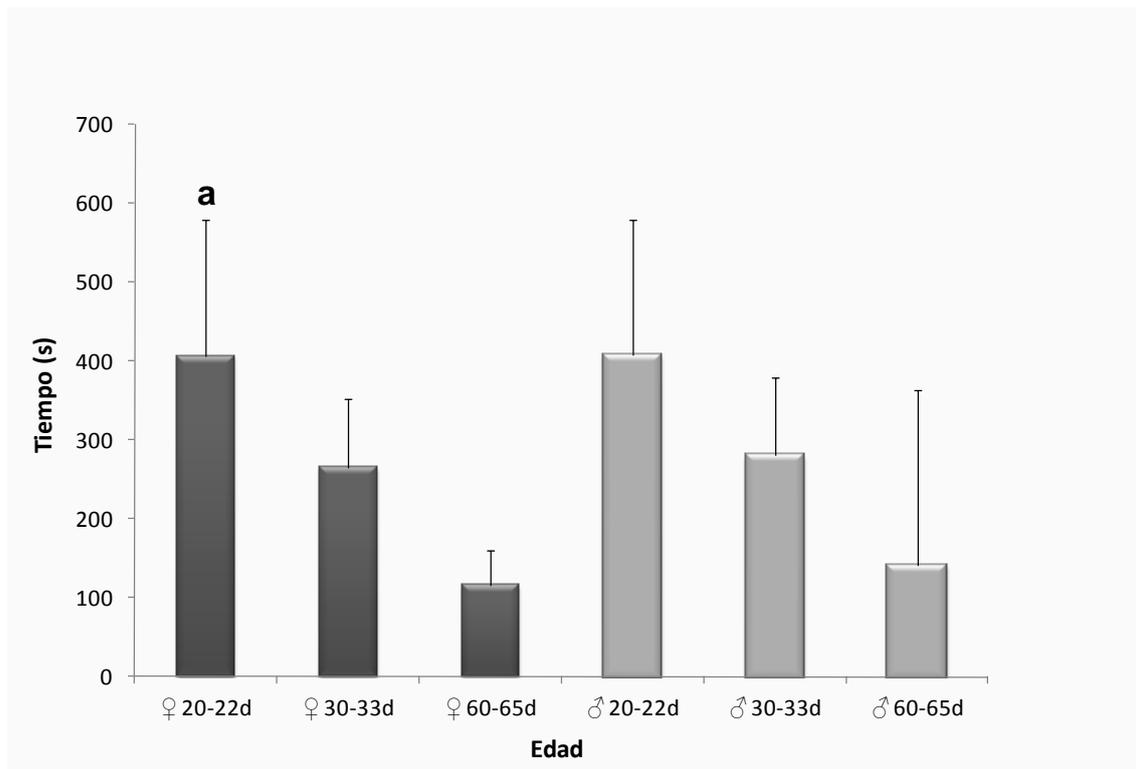


**Figura 7.** Tiempo total en que las hembras (barras oscuras) y machos (barras claras) permanecieron olfateando a las crías. Datos expresados como medianas (RSIQ). <sup>a</sup> $p < 0.05$  vs ♀ de 20-22d y ♀ de 30-33 d, Prueba U Mann Whitney.

### ***Distancia a las crías***

En las hembras, el análisis por test de ANOVA, evidenció diferencias significativas entre los grupos únicamente en cuanto a la cantidad de veces ( $F_{(2,26)} = 3.40$ ;  $p = 0.04$ ) en que las hembras permanecieron distantes más 10 cm de las crías. Estas diferencias se percibieron sólo entre animales de 20 y 60 días de edad, siendo las hembras de 60 las que se alejaron más veces de las crías [18.19 (3.20)] en relación a las hembras de 20 días [8.10 (6.02)]. Las hembras de 30 días permanecieron alejadas de las crías con una frecuencia de 13.12 (4.04). Si bien no se encontraron diferencias significativas entre los distintos grupos en cuanto al tiempo total en que permanecieron distantes de las crías ( $H=5.28$ ;  $p=0.07$ ), se observa que existe una tendencia en las hembras de 20 días de edad a permanecer más tiempo alejadas de las crías en relación a los individuos de 30 y 60 días de edad (figura 8).

En machos, el análisis por test ANOVA para el tiempo total en que permanecieron alejados de las crías, no evidenció diferencias significativas ( $F_{(2,19)} = 0.90$ ;  $p=0.41$ ) entre las edades (figura 8), así como tampoco se encontraron diferencias significativas en el número de veces que se alejaron de las crías ( $F_{(2,19)} = 2.20$ ;  $p=0.10$ ).



**Figura 8.** Tiempo total en que las hembras (barras oscuras) y machos (barras claras) permanecieron distantes a las crías. Datos expresados como medianas (RSIQ). <sup>a</sup> $p = 0.03$  vs ♀ de 60-65 días de edad

### Conducta Inmóvil

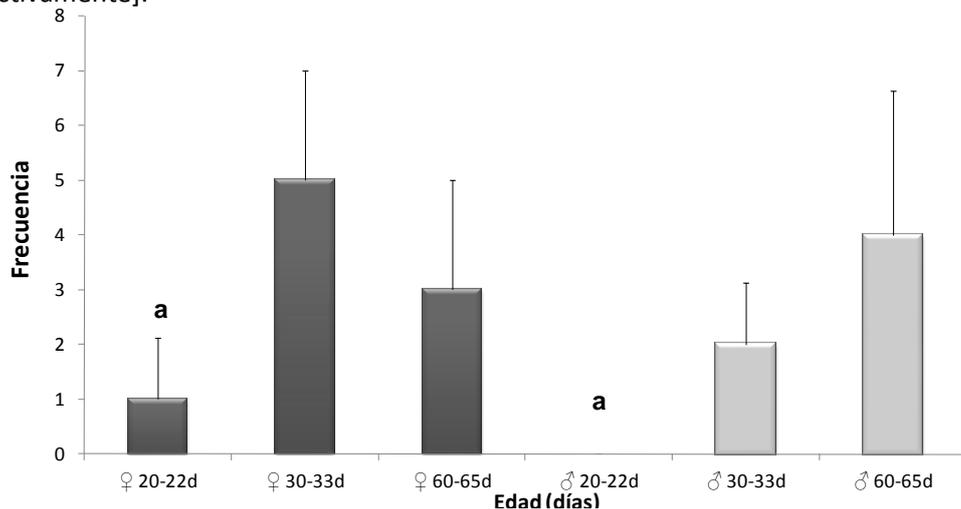
En hembras, se encontraron diferencias significativas en cuanto a la frecuencia ( $H=8.01$ ;  $p = 0.02$ ) y duración ( $H= 8.03$ ;  $p = 0.02$ ) de la conducta inmóvil, entre individuos de 20 y 30 días, e individuos de 20 y 60 días de edad ( $U_{(9,10)} = 15.07$ ;  $p=0.01$ ). Las hembras de 20 días [3.23 (2.50)] fueron las únicas que mostraron conducta inmóvil.

En los machos, también se encontraron diferencias significativas en duración ( $H=6.00$ ;  $p=0.05$ ) y frecuencia ( $H=8.60$ ;  $p=0.01$ ) de la conducta inmóvil. Estas diferencias fueron entre individuos de 20 y 30 días ( $U_{(10,7)}=15.02$   $p=0.05$ ;  $U_{(10,7)}=14.50$   $p=0.04$  respectivamente) y entre 20 y 60 días de edad ( $U_{(10,5)}= 5.04$   $p= 0.01$ ). Los machos de 20 días de edad fueron quienes permanecieron mayor número de veces y más tiempo inmóviles [3.12 (2.50); 93.23 (82.10)] en comparación con machos de 30 [0.02 (0.75); 0.01 (22.03)] y 60 días de edad [0.01 (0.00); 0.03 (0.01)].

### Trepadas

En las hembras, se encontraron diferencias significativas entre los distintos grupos, únicamente en la frecuencia de Trepadas ( $H= 7.60$ ;  $p=0.02$ ) entre animales de 20 y 30 ( $U_{(9,10)}=13.50$ ;  $p=0.01$ ) días de edad. Se observó que individuos de 30 días de edad treparon con mayor frecuencia que individuos de 20 días (Figura 9) Sin embargo no se observaron diferencias significativas entre las distintas edades en cuanto al tiempo total que permanecieron trepadas ( $H= 3.20$ ;  $p = 0.20$ ).

En los machos, en cambio, la comparación por edad, evidenció diferencias significativas tanto en frecuencia ( $H=8.60$ ;  $p = 0.01$ ) como en duración de trepadas ( $H=6.01$ ;  $p = 0.05$ ) entre animales de 20 y 30 días ( $U_{(10,7)}= 12.02$   $p=0.02$ ;  $U_{(10,7)}= 15.01$   $p=0.05$  respectivamente) y animales de 20 y 60 días de edad ( $U_{(10,5)}= 6.00$   $p=0.02$ ;  $U_{(10,5)}= 8.07$   $p= 0.04$ ). En los machos de 20 días, no se observó esta conducta, siendo los individuos de 30 y 60 días de edad quienes treparon con mayor frecuencia (figura 9) y durante más tiempo [50.08 (34.02); 21.23 (32.14) respectivamente].

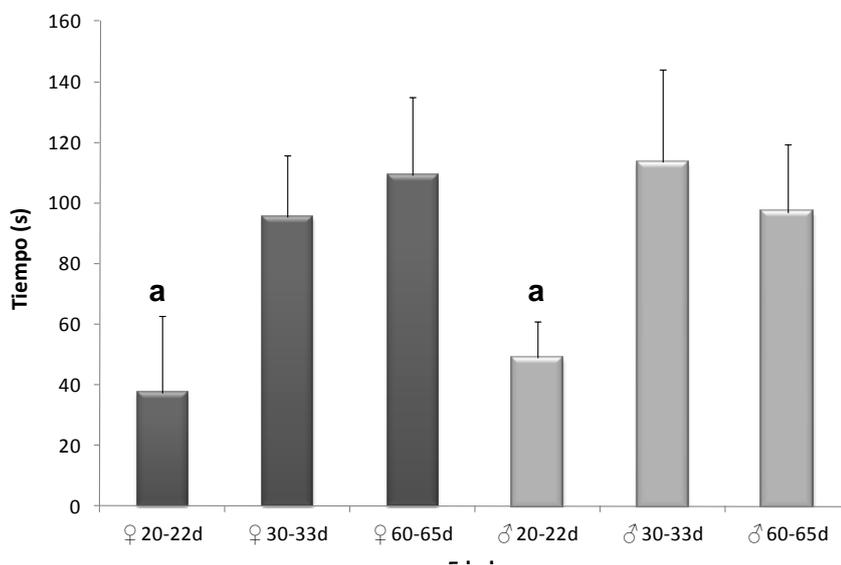


**Figura 9.** Frecuencia de trepadas en hembras (barras oscuras) y machos (barras claras) para las distintas edades. Datos expresados como medianas (RSIQ). <sup>a</sup> $p < 0.05$  vs ♀ de 30-33d y ♀ de 60-65d, Pruebas de U Mann Withney.

## Rearings

En hembras, el análisis por ANOVA evidenció diferencias significativas entre los grupos en la frecuencia ( $F_{(2,26)}= 9.90$ ;  $p=0.00$ ) y duración ( $F_{(2,26)}= 5.10$ ;  $p=0.02$ ) de *rearing*, tanto entre individuos de 20 y 30 días como entre individuos de 20 y 60 días de edad. Las hembras de 30 y 60 días de edad mostraron mayores frecuencias de *rearing* [96.13 (20.01), 109.24 (26.11) respectivamente], mientras que los individuos de 20 días mostraron una baja frecuencia de este comportamiento [37.01 (25.32)]. Asimismo, como se observa en la figura 10, los individuos de 20 días de edad permanecieron menos tiempo realizando *rearing*, en relación a los individuos de 30 y 60 días.

Al igual que en hembras, los machos también mostraron diferencias significativas en frecuencia ( $H=7.10$ ;  $p = 0.02$ ) y duración de *rearings* ( $H=10.10$ ;  $p = 0.01$ ) entre individuos de 20 y 30 días ( $U_{(10,7)}= 11.01$   $p=0.02$ ;  $U_{(10,7)}= 6.00$   $p=0.01$  respectivamente) e individuos de 20 y 60 días de edad ( $U_{(10,5)}=9.00$   $p=0.05$ ;  $U_{(10,5)}= 7.01$   $p=0.03$  respectivamente). Se observó que los individuos de 20 días presentaron menores frecuencias de *rearing* [39.10 (12.22)] en relación a los individuos de 30 y 60 días de edad [63.48 (4.02), 59.20 (10.03) respectivamente). A su vez, como se observa en la figura 10, los individuos de 20 días permanecieron menos tiempo realizando esta conducta, en relación a los individuos de 30 y 60 días.



**Figura 10.** Tiempo total en que las hembras (barras oscuras) y machos (barras claras) realizaron rearings. Datos expresados como medianas (RSIQ). <sup>a</sup> $p < 0.05$  vs ♀ de 30-33d y ♀ de 60-65d. Prueba U Mann Whitney.

## 7. DISCUSIÓN

El principal aporte de este trabajo se basa en el esclarecimiento del desarrollo y la expresión del comportamiento parental espontáneo en el ratón de laboratorio.

En las condiciones en las que se realizó el estudio, la mayoría de los animales de esta cepa de ratón no desplegaron respuesta parental espontánea cuando se les expuso a los recién nacidos. Asimismo, la segunda exposición no mostró un aumento en la respuesta parental, como podría esperarse de la exposición repetida a las crías de acuerdo a otros estudios en ratones (Gandelman, 1972b; Gandelman & Vom Saal, 1975; Leussis et al., 2008; Stolzenberg & Rissman, 2011). A pesar de que en la mitad de las hembras de 60 días, se evidenciaron algunos componentes comportamentales que se asocian a la conducta materna, la respuesta general difiere de lo reportado en la literatura (Gandelman & Vom Sal, 1975; Stolzenberg & Rissman, 2011; Calamandrei & Keverne, 1994) y también de lo reportado para otras especies como ratones de la pradera, estudiados en condiciones similares (Olazábal & Young, 2006b; Olazábal, 2010).

Si bien el análisis del comportamiento parental espontáneo durante la primera exposición a crías, no evidenció diferencias significativas entre los distintos grupos de hembras, se observa una expresión diferencial y patrón de desarrollo que varía con la edad y sexo. Los resultados muestran que el comportamiento infanticida y parental, no se encuentra completamente desarrollado a los 20 días, comenzando a desarrollarse a los 30 días y expresándose con mayor frecuencia en adultos. Esto sugiere que los animales de 20 días aún no han desarrollado una atracción o aversión significativa por las crías. Asimismo, el comienzo de la respuesta aversiva a las crías en los machos coincide temporalmente con el comienzo de la respuesta de atracción a las crías, desplegada por las hembras en animales de 30 días de edad.

La falta de respuesta maternal en individuos de 20-22 días de edad, es interesante y difiere de lo observado en ratas y ratones de la pradera. Esta falta de respuesta a las crías, no se debería a la condición corporal, o a la dificultad que pueda causarles sujetar a las crías debido a su menor tamaño, ya que en estos individuos hemos observado la presencia de transporte, pudiendo también acarrear pellets de comida de peso y tamaño similar. La ausencia de conductas maternas en estos individuos se evidenció mediante los bajos índices de lamidos, *crouching* y ausencia de acarreo en todos los individuos. En relación a este último componente, Noirot (1972) en su estudio en ratones, reporta acarreo por individuos de 20-29 días de edad, aunque en muy bajas frecuencias. Sin embargo, los valores reportados por

Noirot para *crouching*, evidencian resultados similares a los encontrados en el presente trabajo, ya que este autor reporta que este comportamiento se realiza en muy bajas frecuencias (3 de 80 casos). En este último estudio, el rango extenso de edad utilizado (20-29 días), puede que haya resultado en un grupo más parecido al grupo de 30 días utilizado en nuestro estudio, pudiendo explicar tal vez la presencia de acarreo en tales individuos. Gandelman (1973) en un trabajo en el cual utilizó la cepa Rockland-Swiss albino, mostró valores similares a los obtenidos en este estudio para los individuos de 20-22 días de edad, donde encontró que el 80% de los individuos de 22 días de edad ignoran a las crías. Mayer y Rosenblatt (1979) en sus estudios en ratas, encuentran que individuos de 18-22 días de edad, responden de manera más parental que individuos adultos. Estas diferencias encontradas entre las distintas especies, puede deberse principalmente a diferencias ontogenéticas, mientras que las diferencias dentro de una misma especie, como la encontrada en la bibliografía del ratón de laboratorio, puede deberse a variables más sutiles como diferencias en alojamiento y alimentación..

El análisis de las conductas exploratorias en estos individuos juveniles, va de la mano a lo encontrado en cuanto a las conductas maternas. La presencia de mayor cantidad de olfateos en los animales de 20 y 30 días, respecto a los de 60 días de edad, sugiere que los animales más jóvenes estuvieron interesados en las crías pero se vieron mucho menos motivados a interactuar con las mismas, que los individuos adultos. Por otra parte, el gran período de tiempo que estos juveniles permanecieron alejados de las crías, el aumento de inmovilidad y el menor número de veces que estos animales se acercaron y volvieron a alejarse, supone que los individuos de 20 y 30 días de edad, en general se acercaron menos a las crías y prefirieron mantenerse separados de ellas. Estos parámetros conductuales, como la distancia a las crías y la inmovilidad, nos sugieren que los animales juveniles son más temerosos, lo que puede derivar en una inhibición conductual, que explicaría en parte, el bajo índice de comportamiento parental observada en individuos de 20 y 30 días de edad. Por otra parte, si bien los individuos de 30 días de edad no mostraron conductas maternas en su plenitud, si se evidenció una alta actividad exploratoria (*trepada*, *rearings*), característicos de esta edad en otras especies (Numan et al., 2006).

A los 30 días de edad, en los individuos de nuestro estudio, se comenzaron a evidenciar las conductas opuestas entre hembras y machos. Las hembras comienzan a mostrarse más maternas y los machos más agresivos, aunque en términos generales los valores encontrados no presentan grandes diferencias para lo reportado en animales de 20 días de edad. Si bien, en este trabajo, la comparación de la respuesta maternal entre machos y hembras de 30 días,

no alcanzó los niveles de significancia ( $p < 0.08$ ), valoramos que las diferencias no son imperceptibles ya que se evidencia claramente una tendencia de diferenciación. En las hembras de 30 días de edad, a diferencia de los individuos de 20, se constata la presencia de acarreo, aunque se presenta en bajas frecuencias (20%). Estos resultados coinciden con lo reportado por Gandelman (1973) pero difiere en relación al infanticidio, ya que reporta la presencia de esta conducta en hembras. Mayer, Freeman y Rosenblatt (1979), en sus trabajos en ratas, reportan que las diferencias entre sexos en individuos de 30 días de edad aún no son notorias. En ratones de la pradera, se comienza a evidenciar infanticidio en hembras a la edad de 30 días y a diferencia de lo que observamos para C57BL6, las hembras de ratones de la pradera, disminuyen su respuesta parental hacia los neonatos con la edad.

Por otro lado, el análisis de las conductas locomotoras y exploratorias en los individuos de 30 días de edad, mostró valores diferentes a los obtenidos para los individuos de 20 días. Si bien podemos decir que a los 30 días aún se mantienen ciertas características de los individuos de 20 días de edad, ya han alcanzado valores similares a los individuos adultos en cuanto al despliegue de conductas maternas.

En individuos adultos (60-65 días de edad) las diferencias entre machos y hembras están bien marcadas. La mayoría de los machos de esta edad realizan infanticidio, sin embargo las hembras, a los 60 días de edad, mostraron los mayores índices de conductas maternas en relación a los individuos de 20 y 30 días de edad, aunque solamente 2 de 10 hembras fueron categorizadas como maternas completas. Estos hallazgos no se manifiestan de esta manera en variados estudios. Calamandrei y Keverne (1994) encuentran altos valores (> 80%) de individuos maternas; la principal diferencia con nuestro estudio fue la duración total del test, la cual alcanzó los 30 minutos. Stolzenberg y Rissman (2011) en su estudio reciente, manifiestan que el 100% de los individuos adultos desplegaron conductas maternas, definiendo como tales, acarreo, lamidos y *crouching*. La principal diferencia entre ambos estudios se evidencia mediante la sensibilización de 45 minutos con las crías. El período de sensibilización puede hacer que se estén sobreestimando los resultados ya que no se debería hablar en ese caso de comportamiento materno espontáneo, debido a que la expresión del comportamiento parental en esos casos no es inmediata.

Las hembras adultas del presente trabajo mostraron mayor incidencia de lamidos, *crouching* y acarreos en comparación con individuos de 20 y 30 días de edad. Si bien hembras de todas las edades mostraron posturas de *crouching*, esta conducta no se observó con gran frecuencia en ninguna edad, lo cual como ya se mencionó, coincide con lo reportado por Noirot (1972). Sin

embargo, estos datos difieren con lo encontrado en trabajos de Gandelman (1973) quien afirma en su estudio que la mayoría de los individuos realizan este comportamiento. Estas diferencias encontradas con Gandelman, pueden deberse a diferencias en los procedimientos experimentales, debido a que en su estudio se realiza una habituación de los individuos a la caja por 24 horas previos al comienzo del test y a su vez mantiene a los mismos con las crías durante 15 minutos antes del comienzo del registro, categorizando como maternas a los individuos que acarrear y realizan posturas de amamantamiento. Si bien en nuestra cepa no se evidenció diferencias entre los primeros y segundos 15 minutos, tal vez en la cepa R-S albino este período de tiempo es suficiente para provocar el aumento de conductas maternas. Por otro lado, en nuestro estudio, ninguna de las hembras realizó infanticidio, lo cual difiere con lo reportado por otros estudios como Gandelman (1973), quien encontró un 10% de hembras que realizaron infanticidio. A su vez, otros estudios realizados en las cepas Balb-C por Calamandrei y Keverne (1994) y CD-1 por Leussis y colaboradores (2008), también reportaron infanticidio en hembras adultas pero en un porcentaje mayor, 20 y 33 % respectivamente. Estas grandes diferencias encontradas por Leussis y colaboradores (2008) en relación al infanticidio en hembras, puede deberse a la disparidad que se observa en las edades de las crías sujetas a los test maternas, ya que el mismo, utiliza crías de hasta 11 días de edad, lo cual tal vez favorezca el comportamiento infanticida. Por otro lado, las diferencias entre los individuos de las distintas cepas en cuanto al comportamiento infanticida, también puede deberse a características ontogenéticas particulares de cada cepa; tal vez las hembras de la cepa C57BL6 sean genéticamente menos agresivas, que por ejemplo las hembras de las cepas CD-1 y Balb-C. Otro factor que podría explicar la ausencia de hembras infanticidas en nuestro estudio, es el período de habituación a la caja. Leussis y colaboradores (2008) en su trabajo, mantienen a los individuos por 24 horas en la caja antes del comienzo del test, lo cual podría favorecer conductas agresivas ya que la hembra al encontrarse dentro de su propio ambiente, ataca con el objetivo de defender su territorio. A diferencia de Leussis, en nuestro estudio, los individuos fueron habituados a la caja por 45 minutos, tiempo en el cual la hembra aún puede percibir ese ambiente como nuevo, y por tanto podría explicar la falta de desarrollo del comportamiento agresivo.

En cuanto a las conductas exploratorias, la disminución en duración de la conducta de olfateo se correlaciona con el aumento en las conductas maternas, ya que el incremento en los niveles de lamidos en relación al grupo de 60 días, podría estar vinculado con la disminución en olfateos. Así las hembras de 60 días de edad permanecerían menos tiempo olfateando y más tiempo lamiendo a las crías. A su vez, se observó que si bien la frecuencia con la que la

hembra se alejaba de la cría fue mayor en las hembras de 60, el tiempo total que permanecieron alejadas de las mismas fue significativamente menor, así el aumento en conductas maternas derivó en un descenso de las conductas que las alejaban de las crías.

En machos sin embargo, más del 50% de los individuos adultos mostraron conductas infanticidas. Estos datos se asemejan con lo reportado por Gandelman & Vom Saal, 1995, donde reportan infanticidio en machos adultos en aproximadamente un 40%. El mayor índice de infanticidio en machos puede deberse a la presencia de testosterona, la cual induce comportamientos agresivos. Si bien la mayoría de los machos de 60-65 días de edad atacaron a las crías, se observó en estos individuos un alto porcentaje de lamidos hacia las mismas. Esto nos puede estar indicando que el lamido no sería solamente un componente asociado al comportamiento materno, sino que podría también asociarse con el infanticidio. Así los machos podrían haber estado lamiendo a las crías no por sentirse atraídos parentalmente hacia ellas, sino como una instancia previa al ataque.

Se conoce que el tamaño de la caja experimental afecta el despliegue de conductas maternas, así cajas chicas favorecen estos comportamientos pero podrían no favorecer el acarreo (Noirot, 1972). El tamaño de nuestras cajas de experimentación fueron de 267 x 207 x 140 cm, por lo cual esta podría ser una posibilidad de que en nuestro trabajo sólo el 20 % de las hembras de 30 y el 30% de las hembras de 60 mostraran esta conducta. Sin embargo, los bajos niveles de *crouching* nos sugiere, que fue la baja motivación materna la causante de la falta de acarreo.

En general, estudios previos a este trabajo, tanto en CB57BL6 o en distintas cepas, muestran una mayor incidencia de individuos parentales (Calamandrei & Keverne, 1994; Gandelman & Vom Saal, 1995; Leussis et al., 2008; Stolzenberg & Rissman, 2011), lo cual tal vez podría atribuirse a la sensibilización con las crías o a la definición de parentalidad que básicamente incluye sólo acarreo en la mayoría de los estudios (Gandelman, 1973; Gandelman & Vom Saal, 1995). Una continua exposición a las crías da lugar al despliegue de conductas maternas en animales vírgenes. En ratones se desconocen las condiciones y el tiempo necesario para estimular el comportamiento materno a plenitud en al menos 50 o 60% de las hembras. Pero confirmamos que este comportamiento no es espontáneo ya que requiere de sensibilización, al menos de unas horas. Por lo tanto, afirmamos que los ratones de la cepa C57BL6 no son espontáneamente parentales ya que no se observa la inmediata expresión del comportamiento parental cuando son expuestos por primera vez a crías, en contextos no reproductivos.

Muchos trabajos no definen o no dejan en claro, cuales son las variables comportamentales que se consideran para categorizar a los animales como maternas y no maternas y no incluyen información sobre el porcentaje de individuos no maternas en sus estudios, lo cual es particularmente inusual, considerando que es difícil encontrar 100% de ratones parentales, incluso entre los ratones parturientos (Gandelman, 1972; Gandelman, 1973; Gandelman & Vom Saal, 1995; Calamandrei & Keverne, 1994; Leussis et al., 2008; Stolzenberg & Rissman, 2011). Por tanto en general, las inconsistencias en lo reportado en la literatura, se puede atribuir a las diferencias genéticas dadas por las distintas cepas o especies, y principalmente a la disparidad encontrada en relación a los procedimientos experimentales y a la variabilidad que existe en el momento de definir comportamiento parental espontáneo (Tabla 2).

De este trabajo por tanto se desprende que el desarrollo del comportamiento parental en ratones difiere a lo reportado para ratas en otros estudios, en los cuales que se ha observado que las ratas jóvenes de 20-22 días de edad muestran respuesta parental más rápido que sus coespecíficos adultos (Mayer & Rosenblatt, 1979; Mayer et al., 1979). A su vez los resultados de nuestro trabajo también difieren del comportamiento reportado en ratones de la pradera, ya que estos muestran comportamiento materno completo cuando recién son expuestos a neonatos (Olazábal & Young, 2006b). También difieren en que los machos adultos responden parentalmente con mayor frecuencia que las hembras (Olazábal & Young, 2006b). Esto se evidencia claramente cuando se comparan resultados obtenidos en trabajos con ratones de la pradera y nuestra cepa de estudio, donde se observa una diferencia muy importante en la intensidad y frecuencia del comportamiento parental respecto a los ratones de la cepa C57BL6.

En resumen, este trabajo evidencia que la expresión del comportamiento parental espontáneo en el ratón de laboratorio, difiere a la descrita en ratones de la pradera, debido a la baja respuesta parental que mostró la cepa C57BL6. A su vez vemos que el desarrollo del comportamiento parental difiere a lo encontrado tanto para ratas como para ratones de la pradera (Olazábal & Young, 2006; Mayer et al., 1979; Mayer & Rosenblatt, 1979) ya que individuos de 20 días de edad tienden a ignorar a las crías, comenzando a desarrollarse atracción en hembras y aversión en machos a partir de los 30 días de edad, mostrando mayor magnitud hacia los 60 días.

## ANEXO

### Efecto del ciclo luz/oscuridad sobre el comportamiento maternal

El despliegue de conductas maternas, tanto en machos como en hembras, no se vio alterado por las condiciones de ausencia o presencia de luz ( $p = 0.90$ ) (Tabla 7). Tampoco se encontraron diferencias en estos patrones cuando se analizaron hembras ( $p = 0.32$ ) y machos ( $p = 0.37$ ) por separado.

Tabla 7. Efecto del día y la noche sobre el comportamiento maternal.

	<b>MC</b>	<b>MI</b>	<b>N</b>	<b>A</b>	<b>Total</b>
<b>Luz</b>	1	9	44	13	67
<b>Oscuridad</b>	2	8	42	15	67

MC: Maternal Completo, MI: Maternal Incompleto, N: No maternal, A: Ataque a las crías. Prueba de  $X^2$

### Efectos de la exposición repetida a las crías

No se encontraron diferencias significativas en el comportamiento desplegado por machos o hembras durante la primera y la segunda exposición a las crías, encontrando proporciones similares de individuos maternas, no maternas e infanticidas tanto en la primera como en la segunda exposición ( $p = 0.49$ ) (Tabla ).

Tabla 8. Efecto de la repetición de la exposición a las crías sobre el comportamiento maternal.

	<b>MC</b>	<b>MI</b>	<b>N</b>	<b>A</b>	<b>Total</b>
<b>Primera</b>	2	6	43	16	67
<b>Segunda</b>	1	11	43	12	67

MC: Maternal completo, MI: Maternal Incompleto, N: No maternal, A: Ataque a las crías. Primera: Primera exposición a las crías. Segunda: Segunda exposición a crías. Prueba de  $X^2$

## 8. REFERENCIAS

- AGRATI, D., ZULUAGA, M.J., FERNANDEZ-GUASTI, A., MEIKLE, A., FERREIRA, A. 2008. Maternal condition reduces fear behaviors but not the endocrine response to an emotional threat in virgin female rats. *Hormones and Behavior* 53: 232-240.
- BRIDGES, R.S. 1976. Parturition: Its Role in the Long Term Retention of Maternal Behavior in the Rat. *Physiology and Behavior* 18: 487-490.
- CALAMANDREI, G & KEVERNE, E.B. 1994. Differential Expression of Fos Protein in the Brain of Female Mice Dependent on Pup Sensory Cues and Maternal Experience. *Behavioral Neuroscience* 108: 113-120.
- CASARRUBEA M., SORBERA F., CRESCIMANNO G. 2009. Structure of rat behavior in hole-board: II) multivariate analysis of modifications induced by diazepam. *Physiology and Behavior* 96(4-5):683-92.
- FERREIRA, A., PEREIRA, M., AGRATI, D., URIARTE, N., FERNANDEZ-GUASTI, A. 2002. Role of maternal behavior on aggression, fear and anxiety. *Physiology and Behavior* 77: 197-204.
- FLEMING, A.S & LUEBKE, C. 1981. Timidity prevents the virgin female rat from being a good mother: emotionality differences between nulliparous and parturient females. *Physiology and Behavior* 27: 863-868.
- FLEMING, A.S & SARKER, J. 1990. Experience-hormone interactions and maternal behavior in rats. *Physiology and Behavior* 47: 1165-1173.
- FLEMING, A.S., GAVARTH, K., SARKER, J. 1992. Effects of Transections to the Vomeronasal Nerves or to the Main Olfactory Bulbs on the Initiation and Long-Term Retention of Maternal Behavior in Primiparous Rats. *Behavioral and Neural Biology* 57: 177-188.
- GANDELMAN, R. 1972a. Induction of pup killing in female mice by androgenization. *Physiology and Behavior* 9: 101-102.
- GANDELMAN, R. 1972b. Maternal Behavior in the Mouse: Effect of Estrogen and Progesterone. *Physiology and Behavior* 10: 153-155.
- GANDELMAN, R. 1973. Induction of Maternal Nest Building in Virgin Female Mice by Presentation of Young *Hormones and Behavior* 4: 191-197.
- GANDELMAN, R. 1973. The Ontogeny of Maternal Responsiveness in Female Rockland –Swiss Albino Mice. *Hormones and Behavior* 4:257-268.
- GANDELMAN, R & VOM SAAL, F.S. 1975. Pup-killing in mice: the effects of gonadectomy and testosterone administration. *Physiology and Behavior* 15: 647-651.
- JOHNSON, F & WHALEN, R.E. 1987. Testicular Hormones Reduce Individual Differences in the Aggressive Behavior of Male Mice: A Theory of Hormone Action *Neuroscience & Behavioral Reviews* 12: 93-99.
- KURODA, K.O., TACHIKAWA, K., YOSHIDA, S., TSUNEOKA, Y., NUMAN, M. 2011. Neuromolecular basis of parental behavior in laboratory mice and rats: With special emphasis on technical issues of using mouse genetics. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 35: 1205-1231.
- LARSEN, C.M., KOKAY, I.C., GRATTAN, D.R. 2008. Male Pheromones Initiate Prolactin induced Neurogenesis and Advance Maternal Behavior in Female Mice. *Hormones and Behavior* 53: 509-517.
- LEBLOND, C.P. 1940. Nervous and Hormonal Factors in the Maternal Behavior of the Mouse. *The Journal of Genetic Psychology* 57: 327-344.
- LEUSSIS, M.P., BOND, T.L., HAWKEN, C.M., BROWN, R.E. 2008. Attenuation of maternal

- behavior in virgin CD-1 mice by methylphenidate hydrochloride. *Physiology and behavior* 95: 395-399.
- LÉVY, F & KELLER, M. 2008. Neurobiology of Maternal Behavior in Sheep. *Advances in the Study of Behavior* 38: 399-438.
- LONSTEIN, J.S & DE VRIES, G.J. 2000b. Sex differences in the parental behavior of rodents. *Neurosci Biobehav Rev* 24:669-686
- MALEFANT, S.A., BARRY, M., FLEMING, A.S. 1990. Effects of Cycloheximide on the retention of Olfactory Learning and Maternal Experience Effects in Postpartum Rats. *Physiology and Behavior* 49: 289-294.
- MAYER, A.D. 1983. The ontogeny of maternal behaviour in rodents. Parental Behaviour of Rodents.
- MAYER, A.D., ROSENBLATT, J.S. 1979. Ontogeny of Maternal Behavior in the Laboratory Rat: Early Origins in 18-to 27-Day-Old Young. *Developmental Psychobiology* 12: 407-424.
- MAYER, A.D., FREEMAN, N.C., ROSENBLATT, J.S. 1979. Ontogeny of maternal behavior in the laboratory rat: factors underlying changes in responsiveness from 30 to 90 days. *Developmental Psychobiology* 12: 425-439.
- MUCIGNAT-CARTETTA, C., CAVAGGIONI, A., CARETTA, A. 2004. Male Urinary Chemosignals Differentially Affect Aggressive Behavior in Male Mice. *Journal of Chemical Ecology* 30: 777-791.
- NOIROT, E. 1969. Changes in responsiveness to young in the adult mouse. V. Priming. *Animal Behavior* 17: 542-546.
- NOIROT, E. 1972. The Onset of Maternal Behavior in Rats, Hamsters and Mice: A Selective Review. In Lehman D, Hinde R, Shaw, E (Eds), *Advances in the Study of Behavior*. New York and London 4: 107-141.
- NUMAN, M. 2010. Parental Behavior. *Encyclopedia of Behavioral Neuroscience* 3: 14-23.
- NUMAN, M & STOLZENBERG, D.S. 2009. Medial preoptic area interactions with dopamine neural systems in the control of the onset and maintenance of maternal behavior in rats. *Frontiers in Neuroendocrinology* 30: 46-64.
- NUMAN, M., FLEMING, A.S., LEVY, F. 2006. Maternal Behavior. Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction*, Third Edition. Chapter 35. Edited by Jimmy D. Neill, Elsevier.
- OLAZÁBAL, D. 2010. Stability and Potential Inheritance of infanticidal Behavior in Prairie Voles. Wiley InterScience.
- OLAZÁBAL, D & YOUNG, L. 2006a. Species and individual differences in juvenile female alloparental care are associated with oxytocin receptor density in the striatum and the lateral septum. *Hormones and Behavior* 49: 681-687.
- OLAZÁBAL, D & YOUNG, L. 2006b. Variability in "Spontaneous" Maternal Behavior is Associated with Anxiety-like behavior and Affiliation in Naive Juvenile and Adult Female Prairie Voles (*Microtus ochrogaster*). Wiley InterScience.
- OLÁZABAL, D & YOUNG, L. 2008. Chapter 21 - Oxytocin And Individual Variation in Care in Prairie Voles. *Neurobiology of the Parental Brain*: 333-345.
- ORPEN, B.G & FLEMING, A.S. 1986. Experience With Pups Sustains Maternal Responding in Postpartum Rats. *Physiology and Behavior* 40: 47-54.
- PEREIRA, M & FERREIRA, A. 2006. Demanding pups improve maternal behavioral impairments in sensitized and haloperidol-treated lactating female rats. *Behav Brain Res* 175: 139-148.
- PEREIRA, M & MORRELL, J.I. 2010. The medial preoptic area is necessary for motivated choice of pup- over cocaine-associated environments by early postpartum rats. *Neuroscience* 167: 216-231.
- ROSENBLATT J.S., MAYER, A.D., GIORDANO, A.L. 1988. Hormonal Basis during Pregnancy for

- the Onset of Maternal Behavior in the Rat. *Psychoneuroendocrinology* 13: 29-46.
- ROSENBLATT, J.S. 1967. Nonhormonal basis of maternal behavior in the rat. *Science* 156: 1512-1514.
- SEIP, K.M & MORRELL, J.I. 2008. Exposure to pups influences the strength of maternal motivation in virgin female rats. *Physiology and Behavior* 95: 599-608.
- SIEGEL, H & ROSENBLATT, J.S. 1975. Hormonal Basis of Hysterectomy-Induce Maternal Behavior during Pregnancy in the Rat. *Hormones and Behavior*. 6:211-212
- STERN, J.M & LONSTEIN, J.S. 2001. Neural mediation of nursing and related maternal behaviors. *Progress in Brain Reserch* 133:263-278.
- STOLZENBERG, D.S & RISSMAN, E.F. 2011. Oestrogen-independent, experience-induced maternal behavior in female mice. *Journal of Neuroendocrinology*.
- STOLZENBERG, D.S., ZHANG, K.Y., LUSKIN, K., RANKER, L., BRESS, J., NUMAN, M. 2010. Dopamine D1 receptor activation of adenyl cyclase, not phospholipase C, in the Nucleus accumbens promotes maternal behavior onset in rats. *Hormones and Behavior*. 57:96-104.
- TATE-OSTROFF, B.A & BRIDGES, R.S. 1987. Regulation of prolactin secretion in parental rats: Roles os steroids priming and responsiveness. *Psychoneuroendocrinology* 12: 385-391.

