

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas
PEDECIBA-Biología
Sub-área Neurociencias.

*“Bases neurales de la variabilidad en la respuesta
comportamental a las crías (parental o infanticida)
en ratones inexperimentados (C57BL/6)”*



Lic. Marcela Alsina-Llanes

Tutor: Dr. Daniel Olazábal

Tribunal:

Dra. Ana Silva

Dra. Daniella Agrati

Dr. Pablo Torterolo

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor y maestro, Daniel, por sus enseñanzas, dedicación, tiempo, por compartir sus conocimientos conmigo y permitirme crecer...

A los miembros del tribunal...Ana, Daniella y Pablo...por sus aportes, sugerencias y dedicación...

Al Departamento de Fisiología... y cada uno de sus integrantes...

A las instituciones financiadoras: CSIC, PEDECIBA...

A las chicas de la office...Nath y Alice... y un gracias especial a Nath por sus comentarios, sugerencias y aportes a este trabajo...

A mis compañeros y amigos...

A mis amigas del alma... porque siempre están ahí... Valen, María y Fede...

A mi gran familia gran... pero especialmente a mis mamás: mamá y abuela...por ser incondicional y respetar mis elecciones...

A Fer... por acompañarme siempre y construir una vida juntos...

INDICE

RESUMEN	5
ABREVIATURAS	7
ANTECEDENTES.....	8
<i>Generalidades del comportamiento parental</i>	8
<i>Inducción hormonal de comportamiento parental</i>	9
<i>Inducción del comportamiento maternal por la cría</i>	10
<i>Comportamiento parental en roedores</i>	11
<i>Comportamiento parental e infanticida inducido por las crías en el ratón</i>	12
<i>Bases neurales del comportamiento parental</i>	14
Facilitación del comportamiento parental.....	14
Inhibición del comportamiento parental	16
<i>Bases neurales del comportamiento parental e infanticida inducido por crías en el ratón</i>	17
JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS.....	18
OBJETIVOS GENERALES.....	19
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	20
MÉTODOS GENERALES.....	21
<i>Animales</i>	21
<i>Test comportamental</i>	21
EXPERIMENTO I: <i>Caracterización de la respuesta parental inmediata de hembras y machos adultos inexperimentados del ratón de laboratorio (C57BL/6) durante 2 exposiciones (15 min).</i> 23	
MÉTODOS ESPECÍFICOS	23
<i>Análisis estadístico</i>	23
RESULTADOS.....	24
Respuesta inmediata de hembras adultas hacia las crías	24
Respuesta inmediata de machos adultos hacia las crías.....	24
DISCUSIÓN	26

Respuesta inmediata de hembras adultas hacia las crías	26
Respuesta inmediata de machos adultos hacia las crías.....	28
EXPERIMENTO II: <i>Inducción de comportamiento parental completo en hembras inexperimentadas adultas del ratón de laboratorio (C57BL/6).</i>	31
MÉTODOS ESPECÍFICOS	31
<i>Análisis estadístico</i>	31
RESULTADOS.....	32
DISCUSIÓN	36
EXPERIMENTO III: <i>Expresión de c-fos (gen de respuesta inmediata) en hembras y machos que muestran respuesta inmediata parental, infanticida o de desinterés.</i>	38
MÉTODOS ESPECÍFICOS	39
<i>Inmunohistoquímica</i>	40
<i>Análisis microscópico y cuantificación</i>	41
<i>Análisis estadístico</i>	41
RESULTADOS.....	44
Expresión de c-fos en hembras que despliegan comportamiento parental o no parental	44
Expresión de c-fos en machos que despliegan infanticidio.....	48
DISCUSIÓN	50
Expresión de c-fos en hembras que despliegan comportamiento parental o no parental	50
Expresión de c-fos en machos que despliegan infanticidio.....	56
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	58
REFERENCIAS	60

RESUMEN

El comportamiento parental es esencial para la supervivencia y el desarrollo saludable de las crías. En la mayoría de los mamíferos los cambios hormonales del final de la preñez facilitan el inicio de la conducta maternal en las hembras. No obstante, es bien conocida la capacidad de las crías de inducir comportamiento parental en individuos inexperimentados en contextos no reproductivos. Hembras y machos inexperimentados del ratón de laboratorio (C57BL/6) han sido generalmente descritos en la literatura como espontáneamente maternales e infanticidas, respectivamente. Sin embargo, la literatura es bastante contradictoria y existiría una importante variabilidad en la respuesta inmediata a las crías de hembras y machos: infanticida, parental o desinterés. En esta tesis se propone caracterizar detalladamente la respuesta inmediata en el ratón (C57BL/6) y las áreas cerebrales que participan en estas formas de comportamientos.

En primer lugar nos propusimos caracterizar la respuesta comportamental hacia 2 crías (1-3 días de edad) durante dos exposiciones de 15 min. De acuerdo a su despliegue conductual, hembras ciclantes inexperimentadas (~60 días) y machos adultos inexperimentados (60 o 100 días de edad) fueron asignados a una de las siguientes categorías comportamentales: parental completo (PC), parental incompleto (PI), no parental (NP) e infanticida (I). Durante una primera exposición a las crías sólo un 20% de las hembras adultas exhibieron comportamiento PC, sugiriendo que las hembras de ratón muestran una baja incidencia de comportamiento PC cuando son expuestas a crías por primera vez. Los machos de 60 días de edad no exhibieron comportamiento parental (55.6% y 44.4%, NP e I, respectivamente). A los 100 días de edad, el 100% de los machos resultó I, sugiriendo un aumento de la respuesta infanticida en machos de ratón como consecuencia de la edad.

En una segunda instancia nos propusimos determinar el número de exposiciones repetidas (60 min) a 2 crías (1-3 días de edad) necesarias para inducir comportamiento PC en hembras adultas ciclantes inexperimentadas. Durante dos exposiciones diarias, se registró detalladamente el comportamiento maternal durante los primeros 15 min y finalizados los 60 min se registró la incidencia de postura de amamantamiento y la posición de las crías (fuera o dentro del nido). Las exposiciones fueron repetidas hasta que todos los animales alcanzaron el criterio de PC al menos en 2 registros consecutivos. Tres exposiciones repetidas de una hora fueron necesarias para inducir comportamiento parental completo en todos los animales, lo que indica que la respuesta parental del ratón no es espontánea sino el resultado de un rápido proceso de sensibilización.

Finalmente, nos propusimos determinar las áreas cerebrales que muestran mayores niveles de Fos en hembras y machos que muestran comportamiento PC, PI, NP o I, cuando son expuestos (15 min) a 2 crías (1-3 días de edad) por primera vez. Se realizó inmunohistoquímica para Fos y se analizó las diferentes subregiones del área preoptica media (MPOA), *core* y *shell* de núcleo accumbens (NAc), región dorsal y ventral del septo lateral (LS), núcleo hipotalámicos anterior (AH) y ventromedial (VMH), amígdala cortical (AmC) y medial (AmM). Las hembras que exhibieron comportamiento PC durante 15 min de exposición a las crías, mostraron niveles más altos de Fos en el *shell* del NAc pero únicamente en comparación a las hembras NP. En las hembras PI se indujo un aumento significativo de las neuronas que expresan *c-fos* en la AmM en comparación a las Ctl, sugiriendo que esta región podría participar en el procesamiento de las crías en forma transitoria hasta que el animal despliega comportamiento PC. Los machos infanticidas expresaron significativamente más *c-fos* en el vLMPOA en comparación a los machos expuestos a un canasto, sugiriendo la participación de esta área en la respuesta infanticida y/o inhibición de la respuesta parental. Los machos expuestos a un canasto tuvieron un número mayor de neuronas *c-Fos-IR* en el VMH en comparación a los infanticidas. Esta área ha sido asociada al procesamiento de las crías en la rata y a la respuesta aversiva/no parental, por lo que esta área también podría participar en el procesamiento de estímulos con un valor cualitativamente diferente al de las crías en el ratón.

En la presente tesis mostramos que la respuesta inmediata frente a crías en el ratón de laboratorio (C57BL/6) es muy variable, y que no es espontánea sino que el desarrollo de la respuesta parental consiste en un rápido proceso de sensibilización. La respuesta PC durante 15 min, podría depender de la activación del *shell* en el NAc, mientras que no parece ser necesaria la activación de ningunas de las subregiones del MPOA. La amígdala podría jugar un papel en la rápida transición de NP a PC. En cuanto a los machos, si bien la mayoría de éstos resultaron NP e I, algunos machos adultos jóvenes podrían ser inducidos a desplegar comportamiento parental. La activación de vLMPOA podría jugar un papel importante en el ataque a las crías. El análisis de la presente tesis nos permite analizar el patrón temporal de las áreas reclutadas en forma inmediata/transitoria, para a posteriori poder analizar y compararla con la activación de aquellas áreas implicadas en una interacción con las crías de mayor duración.

ABREVIATURAS

AH- Núcleo hipotalámico anterior.

AmC- Amígdala cortical.

AmM- Amígdala medial.

c-Fos-IR- inmunoreactivo para c-fos

cMPOA- MPOA región central.

Ctl- control.

Cto- canasto

DA- dopamina.

dLS- LS región dorsal.

dmMPOA- MPOA región dorsomedial

I- infanticida.

IR- inmunoreactivo.

LS- septo lateral.

MPN- núcleo preóptico medial.

MPOA- área preóptica media

NAc- núcleo Acumbens

NP- no parental.

OXT- oxitocina.

PC- parental completo.

PI- parental incompleto.

vlMPOA- MPOA región ventrolateral.

vLS- LS región ventral.

VTa- área tegmental ventral.

VMH- Núcleo hipotalámico ventromedial.

ANTECEDENTES

Generalidades del comportamiento parental

El comportamiento parental es aquel comportamiento dirigido hacia las crías, generalmente de la misma especie, que resultan en un aumento de la probabilidad de supervivencia y el desarrollo saludable de las mismas (Kuroda et al., 2011; Numan, 2010; Numan & Insel, 2003; Olazábal et al., 2013ab). Esta conducta, en mamíferos, se expresa principalmente al momento del parto, siendo la hembra quién generalmente realiza las actividades de cuidado de las crías.

El comportamiento parental es muy diverso entre los mamíferos. Si bien el cuidado de las crías generalmente está a cargo de la madre, en algunas especies como por ejemplo prairie voles (*Microtus ochrogaster*), ratón de california (*Peromyscus californicus*) o monos marmoset (*Callithrix jacchus*) el padre y otros miembros de la familia pueden contribuir al cuidado de las crías y desplegar comportamiento parental (Numan & Insel, 2003; Olazábal et al., 2013a). La mayoría de roedores y primates construyen un nido o buscan un refugio, transportan o acarrean las crías, limpian y lamen activamente a las crías, y adoptan postura de amamantamiento sobre las mismas (González-Mariscal & Poindron, 2002; Numan & Insel, 2003; Olazábal et al., 2013a). En otras especies como ungulados y capibaras, las madres no acarrean, ni transportan y tampoco realizan postura de amamantamiento, y el despliegue de cuidados maternos se expresa a través de lamidos, conductas de protección y vocalizaciones.

El grado de desarrollo de las crías de mamíferos al nacer varía mucho, desde un estado muy altricial en los marsupiales, hasta un grado de mayor desarrollo sensorial y motor, como es el caso de ungulados. Las características de las crías al nacer determinan en parte el patrón del comportamiento parental (Numan & Insel, 2003; Olazábal et al., 2013a; Poindron, 2001). En este sentido, se pueden distinguir diferentes tipos de interacción con las crías dependiendo del patrón de desarrollo de las mismas, *altriciales* o *precoces*. En aquellas especies en que las crías son altriciales, como la mayoría de roedores, cánidos y felinos, luego de que la madre selecciona el sitio de nidificación, generalmente dan a luz crías, muy poco desarrolladas e inmaduras, incapaces de termorregular y con un escaso desarrollo sensorio-motriz, lo que las torna totalmente dependientes de los cuidados parentales (González-Mariscal & Poindron, 2002; Lévy & Keller, 2009; Numan, 2010; Numan et al., 2006; Poindron, 2001). Las madres cuidan a sus crías en el nido y las estimulan a orinar y defecar mediante lamidos en la región anogenital. Los marsupiales constituyen un caso extremo, en el que las crías nacen en un

estado de desarrollo muy incompleto, casi fetal, e inicialmente son transportadas todo el tiempo por sus madres dentro del marsupio, hasta que finalmente emergen totalmente desarrolladas y móviles (Kimble, 1997). En contraste, las especies con crías precoces, como ungulados y pinnípedos, dan a luz crías completamente desarrolladas y bastante autónomas. Pocos minutos después de nacer, las crías se paran y comienzan a lactar. En estas especies, las madres pueden conducir a sus crías, o ser seguidas por ellas (Lévy & Keller, 2008). En especies como la cabra o el ciervo, el patrón de comportamiento se adapta a proteger a las crías de los depredadores. En estos casos las crías permanecen ocultas durante varios días antes de empezar a seguir a su madre o rebaño, mientras la madre regresa periódicamente para alimentarlas (Ralls et al., 1986). Finalmente, en especies como cerdos y algunos primates (incluyendo humanos), las crías son semiprecocial o semialtricial. En estos casos, la audición y la visión son funcionales, pero carecen de autonomía locomotora y pueden tener una pobre termorregulación. El número de crías varía mucho, desde pocos en primates, hasta camadas de gran tamaño como el caso de suinos. En primates, los recién nacidos son generalmente transportados por su madre, padre, u otros miembros de la familia (Nakamichi & Yanada, 2009), mientras que en suinos, la madre no transporta a las crías y por tanto permanece en el nido con las mismas durante al menos las dos primeras semanas de vida (Algers & Uvnäs-Moberg, 2007).

En muchas especies con crías altriciales, roedores en particular, las madres pueden reconocer a sus crías, sin embargo también pueden cuidar crías ajenas, por lo que el vínculo no es selectivo (Pereira, 2006). No obstante, en algunas especies como oveja, cabra y pinnípedos, en que las madres paren crías precoces en grandes grupos sociales, se ha favorecido un mecanismo para el establecimiento de un vínculo exclusivo y selectivo que se manifiesta a través de cuidados dirigidos solamente hacia su cría y el rechazo de otras crías (Numan & Insel, 2003; Poindron et al., 2007). En otras especies que viven en grupo, como murciélagos, carpinchos, búfalos, las madres no desarrollan una fuerte selectividad y despliegan comportamiento maternal hacia crías de otras madres (Kerth, 2008; Macdonald et al, 2007).

Inducción hormonal de comportamiento parental

El comportamiento maternal se hace evidente en la etapa cercana al parto y durante el período de lactancia. El establecimiento del comportamiento maternal se facilita por el perfil hormonal característico del final de la preñez, particularmente el aumento de la

relación de los niveles de estradiol y progesterona (sintetizadas en el ovario) facilita el despliegue de comportamiento maternal en muchas especies, incluyendo rata, ratón, conejo, oveja y algunos primates (Bridges, 1984; González-Mariscal et al., 1996; Numan et al., 2006; Poindron, 2001; Olazábal et al., 2013ab). Existen algunas excepciones, como es el caso de hamsters, los cuales muestran un aumento tanto de estrógenos como de progesterona durante la preñez, seguido de una posterior disminución de ambas hormonas poco después del parto (Numan et al., 2006). Asimismo, hormonas peptídicas como la prolactina (sintetizada principalmente por la adenohipófisis y posiblemente también por el hipotálamo lateral) y oxitocina (OXT, sintetizada en el núcleo supraóptico y paraventricular del hipotálamo) también facilitan el desarrollo del comportamiento maternal en muchas especies (Bridges, 1996; Kuroda et al., 2011; Numan & Insel, 2003; Numan et al., 2006; Olazábal et al., 2013a). El estradiol también promueve las conductas parentales actuando sobre la liberación de prolactina y/o la producción de receptores de OXT (Tate-Ostroff & Bridges, 1987). La mayoría de las hembras lactantes realizan comportamientos característicos que incluyen la construcción de un nido o la búsqueda de un refugio, el consumo de las membranas fetales y fluidos, el lamido y limpieza de las crías, así como su protección y amamantamiento (Numan & Insel, 2003; Olazábal et al., 2013ab).

Inducción del comportamiento maternal por la cría

A pesar de la fuerte influencia de las hormonas reproductivas en el desarrollo del comportamiento maternal, es posible inducir dicho comportamiento en hembras vírgenes no lactantes inexperimentadas e incluso en machos, únicamente mediante cohabitación con las crías (Rosenblatt, 1967). El proceso por el cual la exposición continua a las crías conduce al desarrollo de comportamiento parental se denomina *sensibilización* y varía entre las distintas especies, como por ejemplo rata y ratón (Leblond, 1938; Noirot, 1972). Durante este proceso se produce un cambio profundo en el comportamiento de la hembra que culmina con el desarrollo de interés y cuidado de las crías. En la rata, hembras y machos juveniles (20-22 días de edad) son inducidos a desplegar comportamiento parental luego de una exposición a las crías de 1-2 días o incluso en algunos casos luego de unas pocas horas de exposición (Bridges et al., 1974; Mayer, 1983; Olazábal & Morrell, 2005). Sin embargo, cuando ratas adultas vírgenes son expuestas a crías por primera vez, tanto machos como hembras, las evaden, probablemente por neofobia. Luego de un período de exposición de 6 a 8 días, comienzan a tolerar el contacto con las mismas y una vez que las

conductas de acercamiento se mantienen, la estimulación proveniente de los neonatos, incrementan aún más las conductas de búsqueda, hasta que se induce el despliegue de todo el comportamiento maternal. Este comportamiento incluye conductas características como: lamidos, acarreo hacia el sitio de nidificación, construcción de un nido y asentamiento sobre las crías en postura de amamantamiento y termorregulación (Numan et al., 2006, Kuroda et al., 2011). Se ha propuesto que el ratón de laboratorio despliega comportamiento parental rápidamente (30 min-2 días), aunque no todos los componentes de la conducta parental son observados inmediatamente (Kuroda et al., 2011; Lucas et al., 1998). Sin embargo, en prairie voles, una especie “monógama” y con cuidado biparental, tanto hembras como machos juveniles y adultos despliegan, en su mayoría, respuesta parental “espontánea” (luego de unos pocos minutos o incluso en unos pocos segundos) hacia las crías a pesar de no tener experiencia previa (Olazábal & Young, 2006ab; Roberts et al., 1998). Asimismo, en roedores eusociales como la rata topo desnuda, hembras y machos subordinados y sin actividad reproductiva, contribuyen con el cuidado de las crías (Kalamatianos et al., 2010). En estos sistemas de cría cooperativa, los “helpers” no necesitan un período de sensibilización prolongado, ya que rápidamente comienzan a cuidar a las crías. Cuando hembras y machos inexperimentados de estas especies de roedores son inducidos a mostrar comportamiento parental su respuesta es muy similar a la de una hembra lactante, con la salvedad de que no pueden amamantar, sin embargo son capaces de exhibir una postura similar a la de amamantamiento. Asimismo, el comportamiento parental desplegado por animales sensibilizados, no se ve completamente inhibido por hipofisectomía o gonadectomía (Rosenblatt, 1967), lo que apoya el supuesto de que niveles basales de cuidado parental puede ser inducidos por exposición a crías, independientemente de la estimulación hormonal.

Comportamiento parental en roedores

El comportamiento parental en roedores incluye el acarreo y lamido de las crías, construcción de un nido y postura de amamantamiento. Las hembras de roedores construyen uno de dos tipos de nido dependiendo de su estado reproductivo: nido de sueño construido por hembras vírgenes, el cual es relativamente pequeño y poco “profundo”, y nido reproductor construido por hembras pre-parturientas o lactantes. El tamaño de este último es dos o tres veces mayor que el nido de sueño y es más profundo, de esta manera envuelve a las crías y favorece que se mantenga elevada su temperatura corporal que,

como ya se mencionó, por su condición de altricial tienen la incapacidad de termorregular (Kuroda et al., 2011, Gandelman, 1973a).

Los animales parentales también lamen a las crías activamente (Gubernick & Albert, 1985; Kuroda et al., 2011; Numan, 2010; Numan & Insel, 2003; Olazábal & Young, 2006a; Rosenblatt, 1967). El lamido anogenital de las crías estimula la micción y defecación de las mismas. Asimismo, la ingesta de la orina por la hembra contribuye a mantener el agua necesaria para la lactancia (Gubernick & Albert, 1985; Kuroda et al., 2011). Por otra parte, el lamido corporal provee a las crías de estimulación táctil necesaria para su desarrollo y crecimiento (Kuroda et al., 2011).

Los roedores también adoptan una postura llamada de *amamantamiento* pero que no está necesariamente ligada a la lactancia, que consiste en cubrir a las crías con la región ventral del cuerpo. Esta postura no sólo cumple una función nutritiva durante la lactancia sino que también es desplegada por los machos, animales no experimentados y prepúberes (Elwood, 1985; Kuroda et al., 2011; Lonstein et al., 1999; Olazábal et al., 2013a). La función de esta postura estaría entonces ligada a la protección y termorregulación de las crías. Finalmente, los animales parentales acarrear o agrupan a las crías (Numan & Insel, 2003; Olazábal et al., 2013a; Rosenblatt, 1967). Cuando un animal despliega todos estos comportamientos o la mayoría de ellos es considerado parental (Alsina-Llanes et al., 2015; Kuroda et al., 2011).

Existen otros comportamientos, dependiendo de la condición fisiológica, que también acompañan a la respuesta parental, como son las respuestas agresivas ante intrusos, o también llamada agresión maternal (Agrati et al., 2008; Elwood et al., 1990; Ferreira et al., 2002; Gammie & Nelson, 2001).

Comportamiento parental e infanticida inducido por las crías en el ratón

Estudios clásicos de Gandelman (1973b) utilizando la cepa del ratón R-S albino y estudios recientes en nuestro laboratorio en la cepa C57BL/6 (Alsina-Llanes et al., 2015), han mostrado que la respuesta parental en las hembras de ratón se desarrolla a partir de la edad adulta (~60 días de edad). Se ha propuesto que en las hembras adultas de ratón, el conjunto de señales sensoriales proporcionadas por las crías, es suficiente para inducir una conducta parental “espontánea” en términos de minutos, independiente del estado fisiológico, o la experiencia maternal previa (Calamandrei & Keverne, 1994; Gandelman, 1973bc; Leussis et al., 2008; Lonstein & De Vries, 2000; Noirot, 1969; 1972; Stolzenberg & Rissman, 2011). Sin embargo, la respuesta parental inmediata del ratón es

extremadamente variable (parental, desinterés o infanticida) y en algunos trabajos se muestra que sólo luego de 2 días de exposición a las crías se desarrollan todos los componentes del comportamiento parental (Brown et al., 1996; Hamaguchi-Hamada et al., 2004; Lucas et al., 1998; Matsumoto et al., 2003; Pedersen et al., 2006). Brown et al. (1996) encontró que luego de dos exposiciones de 30 min, sólo la mitad de los animales desarrollaron comportamiento parental en la segunda exposición, por lo que podrían ser necesarios varios días de exposición continua a las crías para la inducción de comportamiento parental completo (PC). Diferencias en edad, cepa, sexo, experiencia previa, condición del test, alojamiento o estado fisiológico, podrían explicar dicha variabilidad en la literatura (Brown et al., 1999; Kuroda et al., 2011; McCarthy & vom Saal, 1985; Numan & Insel, 2003; Svare & Broida, 1982; vom Saal, 1984).

No obstante, el análisis detallado de la literatura muestra algunas inconsistencias en la definición o criterio utilizado por algunos autores para considerar un animal completamente parental. En este sentido, en algunos trabajos no se aclara cuáles componentes de la respuesta parental fueron cuantificados, o utilizados para considerar un animal parental (usualmente acarreo o lamido y grooming, Calamandrei & Keverne, 1994; Gandelman, 1973b; Gandelman et al., 1970; Jin et al., 2005; Kuroda et al., 2008; Li et al., 1999; Pedersen et al., 2006; Ragnauth et al., 2005). Asimismo, en algunos trabajos los animales considerados como parentales fueron pre-expuestos a las crías durante 15-45 min o incluso 24 hr previas al test (Gandelman & vom Saal, 1975; Leussis et al., 2008; Stolzenberg & Rissman, 2011). Por lo que las discrepancias en la literatura podrían surgir de inconsistencias metodológicas. En este sentido, nos propusimos realizar un análisis detallado de la respuesta inmediata de hembras inexperimentadas de ratón de laboratorio (C57BL/6) cuando son expuestas a las crías por primera vez, ya que el análisis de la literatura sugiere que la respuesta parental en el ratón parece ser un rápido proceso de sensibilización más que una respuesta espontánea.

Los machos adultos del ratón de laboratorio (129S, Balb/c, C57BL/6, CBA, DBA) son generalmente descriptos como infanticidas, siendo necesaria la cópula y/o exposición a una hembra preñada para inhibir este comportamiento y facilitar el comportamiento parental (Brooks, & Schwarzkopf, 1983; Elwood, 1985; Gubernick et al., 1994; Huck et al., 1982; Kennedy & Elwood, 1988; Soroaker, & Terkel, 1988; Tachikawa et al., 2013). No obstante, varios estudios en machos, encuentran una gran variabilidad en la respuesta inmediata a las crías (Matsumoto et al., 2003; Noirot, 1969). En algunos estudios se muestra un porcentaje de machos inexperimentados que despliega comportamiento parental

durante la primera exposición a las crías (Kennedy & Elwood, 1988; McCarthy & vom Saal, 1986; Kuroda et al., 2007). Del mismo modo que lo expuesto respecto a las hembras, el análisis detallado de la literatura muestra algunas inconsistencias. Las discrepancias en machos pueden ser explicadas en término de diferencias en los criterios que definen un animal parental (Kennedy & Elwood, 1988; Kuroda et al., 2007; McCarthy & vom Saal, 1986; vom Saal & Howard, 1982; Wright & Brown, 2000), por ejemplo, acarreo, lamido/grooming, postura de amamantamiento, o construcción de nido (Brown, 1993; Noirot, 1969; Priestnall & Young, 1978). Resulta interesante destacar que los machos pueden acarrear y lamer o lamer y realizar una postura similar a la de amamantamiento antes de desplegar infanticidio (Gandelaman, 1973c; Huck et al., 1982). Por lo tanto, la variabilidad en la literatura podría deberse a inconsistencias metodológicas, por ejemplo exposición previa a crías y/o hembra lactantes, criterio al considerar un animal parental. En esta tesis, estamos interesados en caracterizar la respuesta inmediata de machos adultos inexperimentados del ratón de laboratorio (C57BL/6) cuando son expuestos a las crías por primera vez.

Bases neurales del comportamiento parental

Facilitación del comportamiento parental

Diferentes abordajes han contribuido al entendimiento de las bases neurales del comportamiento parental durante el posparto, en animales sensibilizados o espontáneamente parentales (Numan & Insel, 2003; Olazábal et al., 2013ab). En las hembras, 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 cuidado de las mismas (Numan, 2010; Numan & Stolzenberg, 2009). El área preóptica media (MPOA) es una de las áreas críticas para la expresión del comportamiento parental en hembras parturientas y también en animales adultos sensibilizadas. Existe una vasta evidencia que proponen que la acción de estrógenos, prolactina y OXT en el MPOA y la porción ventral del núcleo de la estría terminalis facilitan el comportamiento parental (Bridges et al., 1990; Numan, 1994; Numan et al., 1977). En este sentido, tanto la prolactina como la OXT inyectada en el MPOA facilitan el comportamiento parental (Bridges, 1996; Bridges et al., 1990; Numan et al., 1977; Pederson et al., 1994). Por otra parte, lesiones del MPOA previenen la respuesta maternal en ratas adultas lactantes y vírgenes sensibilizadas (Numan & Insel, 2003; Numan et al., 1977). Asimismo, lesiones de ésta misma área deterioran el

comportamiento maternal en hembras vírgenes de ratón que previamente habían desplegado comportamiento PC y en hembras lactantes (Tsuneoka et al., 2013), así como en una especie de ratón biparetal (ratones de California) en contexto reproductivo (Lee & Brown, 2002; 2007). El despliegue de comportamiento maternal induce la expresión de *c-fos*¹ y *fosB* en el MPOA y otras áreas asociadas a la respuesta parental en la rata, ratón de laboratorio, prairie voles y ratón de California (de Jong et al., 2009; Calamandrei & Keverne, 1994; Kirkpatrick et al., 1994; Kuroda et al., 2007; Numan & Numan, 1994; Tsuneoka et al., 2013).

El MPOA y el sistema neural dopaminérgico interactuarían, en la regulación del comportamiento maternal. Principalmente, dos sistemas dopaminérgicos se encuentran involucrados: el *sistema mesolímbico dopaminérgico* y el *sistema dopaminérgico incerto-hipotalámico*. Las hormonas que actúan en MPOA regulan aspectos de la conducta maternal facilitando la liberación de dopamina en el núcleo accumbens (NAc) (Numan & Stolzenberg, 2009; Pereira & Ferreira, 2006). Las neuronas del MPOA proyectan hacia el área tegmental ventral (VTA) en el mesencéfalo, la cual contiene neuronas dopaminérgicas que originan el sistema mesolímbico dopaminérgico, enviando proyecciones al NAc (Numan & Stolzenberg, 2009; Numan 2010). La dopamina (DA) actúa en el NAc durante el comportamiento maternal, y se ha demostrado que interrupciones en la acción de DA en el NAc interfiere con comportamientos activos (como acarreo), pero no parece alterar comportamientos pasivos o inmóviles como el amamantamiento (Numan, 2010). Asimismo, lesiones que afectan al NAc pueden provocar enlentecimiento en la respuesta maternal, déficit en la memoria maternal o efectos menores (Li & Fleming, 2003ab; Hansen, 1994; Olazábal et al., 2013a). Asimismo, agonistas de los receptores DA en el NAc aceleran el despliegue de la

¹ Los genes *fos*, también denominados genes de expresión inmediata han constituido una herramienta correlacional ampliamente utilizada para el estudio de las bases neurales del comportamiento parental. Fos es una proteína codificada por una familia de protooncogenes, entre ellos *c-fos*, los cuales se expresan en respuesta a una variedad de estímulos extracelulares (hormonas, neurotransmisores, luz pulsátil, psicoestimulantes, despliegue de comportamiento sexual, entre otros). Estos genes son ampliamente utilizados como marcadores de cambios en la transcripción genética y como indicador de acción neuronal frente a diferentes condiciones/estímulos (Hunt et al., 1987; Morgan & Curran, 1989; Morgan et al., 1987; Numan & Numan, 1994; Sheng & Greenberg, 1990). La expresión de estos genes no sólo ha sido asociada al despliegue de conductas, sino que también su expresión se induce, por ejemplo, asociada en el hipocampo por LTP (Demmer et al., 1993), en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo en el cambio del ciclo circadiano (Kornhauser et al., 1992) y como marcador de la estimulación nociceptiva (Hunt et al., 1987; Bullitt, 1990).

respuesta maternal en ratas vírgenes (Stolzenberg & Rissman, 2011). Por otra parte, la OXT en el cerebro de la hembra parturienta, interactúa con éstos sistema (NAC, VTA, MPOA) ejerciendo acciones que favorecerían la conducta maternal, así como en el Núcleo paraventricular del hipotálamo, el septo lateral (LS), y bulbo olfatorio (Numan, 2010; Numan et al., 2006; Olazábal & Young, 2006b). Estudios recientes, también han propuesto que el cuidado de las crías activa muchas áreas corticales, en particular la corteza prefrontal y orbitofrontal, las que podrían estar involucradas en la organización temporal de los componentes del comportamiento parental (Febo et al., 2008; Olazábal et al., 2013a; Pereira & Morrell, 2011).

Inhibición del comportamiento parental

En la rata, el circuito neural que media la inhibición del comportamiento parental y/o la respuesta neofóbica o aversiva hacia las crías no está completamente dilucidado. No obstante se han propuesto algunas estructuras asociadas a algunos aspectos de éstas conductas. Lesiones del sistema olfativo en ratas vírgenes induce la expresión de comportamiento maternal por lo que los estímulos olfativos han sido implicados en la inhibición del mismo durante ésta etapa (Fleming & Rosenblatt, 1974). Las áreas asociadas a la inhibición del comportamiento parental y a la respuesta aversiva a las crías incluyen a la amígdala medial (AmM) y cortical (AmC), que reciben aferencias del sistema olfativo. Lesiones de éstas áreas y del hipotálamo dorsal, anterior (AH) y el núcleo ventromedial del hipotálamo (VMH) (Bridges et al., 1999; Fleming et al., 1980; Morgan et al., 1997) facilitan el comportamiento parental. Además, Sheehan y col. (2000) encontraron otras áreas cerebrales que podrían estar relacionadas a la inhibición de la conducta parental en ratas vírgenes: núcleo de la estria terminal principal, subdivisión capsular del núcleo central de la amígdala, septo lateral ventral (vLS), núcleo dorsal premamilar, núcleo paraventricular del hipotálamo, núcleo paraventricular del tálamo y la región ventrolateral del MPOA (vlMPOA).

Diferentes subregiones del LS han sido identificadas en la facilitación o inhibición del comportamiento maternal. Por ejemplo, se ha evidenciado una fuerte expresión de *c-fos* en la región ventral del LS (vLS) en ratas vírgenes no maternas expuestas a las crías por primera vez. Asimismo, se ha evidenciado una mayor expresión en las regiones dorsal (dLS) y la región intermedia del LS en hembras expuestas a crías por primera vez, a las cuales se les interrumpió la preñez mediante histerectomía/ovariectomía y fueron tratadas con estrógenos (Sheehan et al., 2000). Sin embargo, en hembras de conejo y rata, el

contacto con las crías durante el posparto, induce *c-fos* tanto en vLS (González-Mariscal et al., 2009; Stack & Numan, 2000) como en la región intermedia del LS (Stack & Numan, 2000). Del mismo modo, hembras y machos inexperimentados de prairie voles muestran una mayor expresión de *c-fos* en el vLS cuando son expuestos a crías por primera vez (Kirkpatrick et al., 1994). Por lo tanto, diferentes subregiones del LS podrían estar involucradas en el procesamiento de las crías asociado a diferentes estados motivacionales y/o fisiológicos en diferentes especies o pueden jugar un papel diferencial al inicio de la exposición a las crías.

Por lo tanto, distintas áreas cerebrales afectarían la respuesta parental de una manera particular en cada especie. En el caso del ratón, hay evidencia de que el MPOA mediaría también la respuesta paterna durante una interacción de larga duración (de Jong et al., 2009; Calamandrei & Keverne, 1994; Kirkpatrick et al., 1994; Kuroda et al., 2007; Lee & Brown, 2002; 2007; Tsuneoka et al., 2013). Sin embargo, se desconoce qué áreas cerebrales se reclutan inmediatamente después de que los ratones son expuestos a las crías por primera vez y durante una exposición de corta duración, en la cual éstas son procesadas como atractivas, neutrales, o aversivas desencadenando las diferentes respuestas comportamentales. En este sentido, Olazábal y Morrell (2005) evaluaron las áreas que muestran una mayor activación de *c-fos* en ratas hembras adultas y juveniles expuestas a las crías por primera vez (NP) vs. aquellas sensibilizadas (exposición de larga duración, 4 días). Una primera exposición a las crías mostró una mayor activación de la AmM, AmC y AH en hembras adultas y sólo AmM en juveniles NP (Olazábal & Morrell, 2005). Sin embargo, la respuesta de la rata adulta cuando es expuesta a crías por primera vez, es mayormente NP y muestran respuesta de evasión o neofobia, mientras que la respuesta conductual del ratón o de la rata juvenil puede ser no parental o de desinterés, parental o infanticida.

Bases neurales del comportamiento parental e infanticida inducido por crías en el ratón

Las bases neurales de la respuesta inmediata en el ratón han sido poco exploradas. Debido al rol sustancial del MPOA en el comportamiento parental durante el posparto, esta región ha sido una de las áreas más estudiadas. En este sentido, un aumento de la expresión de *c-fos* en el MPOA ha sido asociado al despliegue de comportamiento parental en ratones inexperimentados (Calamandrei & Keverne, 1994; Tsuneoka et al., 2013) y en hembras parturientas (Kuroda et al., 2007). Asimismo, Brown y col. (1996) propusieron que la activación de *fosB* en dicha área es crítica para el correcto despliegue de comportamiento

parental en el ratón. Por otra parte, lesiones excitotóxicas de todo el MPOA o específicamente en la subdivisión central en el ratón C57BL/6 induciría el despliegue de infanticidios en hembras vírgenes y lactantes (Tsuneoka et al., 2013).

Se ha reportado que la presencia de las crías *per se* (con o sin interacción), en el ratón de laboratorio Balb/c, reclutaría la expresión de *c-fos* en áreas tales como en el núcleo olfatorio anterior, la amígdala corticomedial, corteza entorrinal y piriforme (Calamandrei & Keverne, 1994). Por otra parte, lesiones electrolíticas del LS en ratones de las cepas CF-1 y B6D2F1, un área como ya se mencionó ha sido asociada tanto a la facilitación como a la inhibición del comportamiento parental, generan un déficit en el comportamiento maternal durante el posparto, producen un aumento en la incidencia de infanticidio y afectan la organización de los comportamientos (Carlson & Thomas, 1968; Slotnick & Nigrosh, 1975).

Finalmente, se ha reportado que la presencia de las crías (2 hr, dentro de un canasto) induce un aumento significativo de la expresión de *c-fos* en el bulbo olfatorio, AmM, división medio-posterior del núcleo de la estría terminalis, AH y VMH (Tachikawa et al., 2013) en machos que previamente habían desplegado infanticidio en comparación a los sin ninguna exposición. Asimismo, machos infanticidas mostraron un aumento moderado en la región dorsal del MPOA cuando fueron expuestos a las crías por primera vez (dMPOA) en relación a los no expuestos a crías (Kuroda et al., 2007). Estudios recientes combinando inmunohistoquímica para genes de expresión inmediata (*c-fos*) y activación optogenética, han identificado que la subdivisión ventrolateral del VMH promueve agresión en el ratón (Falkner et al., 2014; Lin et al., 2011). Por tanto, a partir de la variabilidad de la respuesta inmediata en el ratón de laboratorio (parental, no parental e infanticida) y de los diferentes estudios que han propuestos diferentes áreas cerebrales implicadas en la respuesta parental-no parental, en esta tesis estamos interesados en determinar las áreas cerebrales que muestran expresión de *c-fos* cuando los animales son expuestos a las crías por primera vez durante 15 min y despliegan uno u otro comportamiento.

JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

En una primera instancia y debido a la falta de una descripción detallada de la respuesta comportamental inmediata hacia las crías de ratones de laboratorio, nos propusimos caracterizar la respuesta espontánea hacia las crías de hembras ciclantes adultas inexperimentadas y machos adultos inexperimentados del ratón de laboratorio C57BL/6.

Las inconsistencias en la literatura, nos llevó a hipotetizar que la respuesta inmediata de hembras y machos del ratón de laboratorio no sería espontáneamente parental e infanticida respectivamente.

El hecho de que las hembras de ratón no fueran espontáneamente parentales en dos exposiciones repetidas de 15 min (Alsina-Llanes et al., 2015), nos llevó a hipotetizar que la respuesta parental inmediata en el ratón consistiría en un rápido proceso de sensibilización.

Además, debido a la pobre definición del comportamiento, asumimos que la expresión de *c-fos* podría variar de lo reportado en la literatura. En la rata, el MPOA, el núcleo de la estria terminalis, así como el dLS entre otras, han sido asociadas a la facilitación/expresión del comportamiento parental, mientras que la AmM y AmC, AH, VMH, vLS y vlMPOA han sido asociadas a la inhibición del mismo. Sin embargo el desarrollo de la respuesta parental así como la respuesta inmediata en el ratón difieren de lo reportado en la rata. Por tanto, hipotetizamos que el patrón de activación neural sería específico a la respuesta inmediata desplegada hacia las crías y podría diferir de lo observado en la rata.

OBJETIVOS GENERALES

♣ Caracterizar la respuesta inmediata a crías de hembras ciclantes adultas inexperimentadas y machos adultos inexperimentados en ratones (C57BL/6, parental, infanticida y de desinterés).

♣ Determinar las áreas cerebrales que muestran expresión de *c-fos* durante el despliegue de comportamiento parental, infanticida o de desinterés de hembras y machos adultos inexperimentados del ratón de laboratorio (C57BL/6).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

♣ Caracterizar la respuesta espontánea hacia las crías (maternal, infanticida, o de desinterés) de hembras ciclantes adultas inexperimentadas y machos adultos inexperimentados en ratones (C57BL/6) durante 2 exposiciones de corta duración (15 min).

♣ Determinar el número de exposiciones repetidas (60 min) a las crías necesarias para inducir comportamiento parental completo en hembras inexperimentadas ciclantes C57BL/6.

♣ Determinar las áreas cerebrales que son reclutadas (muestran activación del gen *c-fos*) en hembras ciclantes adultas inexperimentadas y machos adultos inexperimentados que muestran respuesta inmediata parental, no parental o infanticida.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Nuestro primer objetivo específico consistió en caracterizar la respuesta inmediata parental e infanticida de hembras inexperimentadas adultas de 60 días de edad (n=10) y machos inexperimentados adultos de 60 (n=9) o 100 días de edad (n=9) del ratón de laboratorio (C57BL/6). Los animales fueron expuestos a 2 crías recién nacidas (1-3 días de edad) durante 15 min a aproximadamente intervalos de 10-13 hrs y su comportamiento registrado detalladamente. De acuerdo a su despliegue conductual, los animales fueron asignados a una de las siguientes categorías: parental completo (PC), parental incompleto (PI), no parental (NP) e infanticida (I).

Para el segundo objetivo específico, se utilizaron hembras vírgenes ciclantes inexperimentadas adultas de ~60 días (n=8). En este caso, se realizaron 2 exposiciones diarias de 60 min hasta que el animal mostró comportamiento PC por dos días consecutivos. Se registró detalladamente el comportamiento maternal durante los primeros 15 min de cada exposición y finalizados los 60 min se registró la ocurrencia de postura de amamantamiento y la presencia o ausencia de las crías en el nido. En cada exposición los animales fueron asignados a una de las categorías antes mencionadas.

Para el último objetivo específico, se utilizaron 26 hembras inexperimentadas adultas ciclantes y 13 machos adultos inexperimentados. Los animales fueron expuestos a 2 crías recién nacidas (1-3 días de edad) y de acuerdo a su despliegue conductual fueron asignados a cuatro categorías (PC, PI, NP, I). En el caso de aquellos animales que mostraron infanticidio, las crías fueron retiradas y la exposición culminó inmediatamente después del primer ataque. Se utilizaron dos grupos controles que fueron en un caso machos expuestos a un objeto novedoso (canasto, Cto) o hembras sin exposición (control, Ctl). Luego de 1 hora de iniciada la exposición a las crías de 15 min, los animales fueron sacrificados con un exceso de anestesia y perfundidos con paraformaldehído. Posteriormente, se seccionaron los cerebros y se realizó la inmunohistoquímica como se describe en la sección métodos. Se cuantificó la expresión de *c-fos* en las diferentes áreas de interés.

MÉTODOS GENERALES

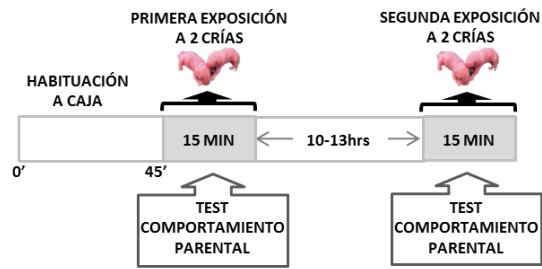
Animales

Se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6 pertenecientes a la colonia del bioterio (Unidad de reactivos biológicos: URBE) de la Facultad de Medicina, Montevideo, Uruguay, obtenidos originalmente de Jackson Laboratory (EE.UU.). Todos los animales fueron mantenidos en cajas metabólicas estándares de polietileno transparente de 45cm de largo x 25cm de ancho x 15cm de alto. Se aparearon grupos de tres hembras con un macho de la misma cepa. Las hembras que quedaron preñadas fueron colocadas en cajas individuales hasta el parto. Los juveniles fueron destetados a los 20-21 días de edad separándoselos en grupos de hasta 6 animales del mismo sexo y edad hasta los sucesivos experimentos. Los animales estuvieron sometidos a un ciclo de 12 horas luz/oscuridad, temperatura ambiente de 22°C con acceso a la comida y agua *ad libitum*. El interior de las cajas fue cubierto con viruta. Estos procedimientos experimentales tuvieron la aprobación de la Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA), (N° 071140, 26 de Diciembre 2011).

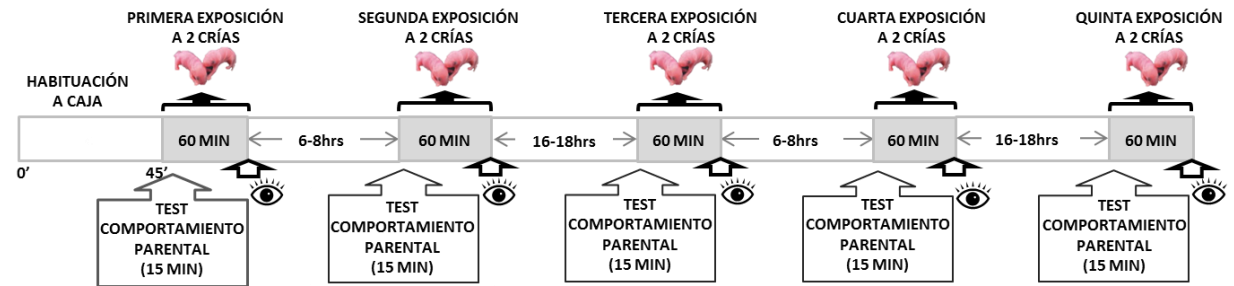
Test comportamental

En todos los casos, los animales adultos fueron individualmente alojados en una caja limpia (27 x 21 x 14 cm, 370 cm² de área) y habituados durante 45-60 min a la misma. Transcurrido ese tiempo dos crías recién nacidas (de 1-3 días de edad) provenientes de madres donadoras fueron colocadas en la caja en el lado opuesto adónde se encontraba el animal. Los parámetros comportamentales registrados durante 15 min incluyeron frecuencias y duración de lamidos, acicalamiento, postura de amamantamiento inmóvil (por lo menos sobre una cría) o postura de amamantamiento activa (realizando otras actividades) y construcción de nido, número de acarreos, transportes y ataque a las crías. Todas las variables conductuales fueron registradas utilizando el programa Stopwatch <http://www.cbn-atl.org/research/stopwatch.shtml>. El criterio de inclusión para considerar un animal completamente parental (PC) consistió en acarrear o agrupar las crías, lamer las crías al menos 60 s, adoptar postura de amamantamiento por más de 30 s y no atacar a las crías. Los animales categorizados como PI fueron aquellos que solo desplegaron 2 de las conductas mencionadas anteriormente, NP aquellos que solo realizaron 1 o ninguna de las conductas, e I aquellos que atacaron a las crías.

EXPERIMENTO I



EXPERIMENTO II



EXPERIMENTO III

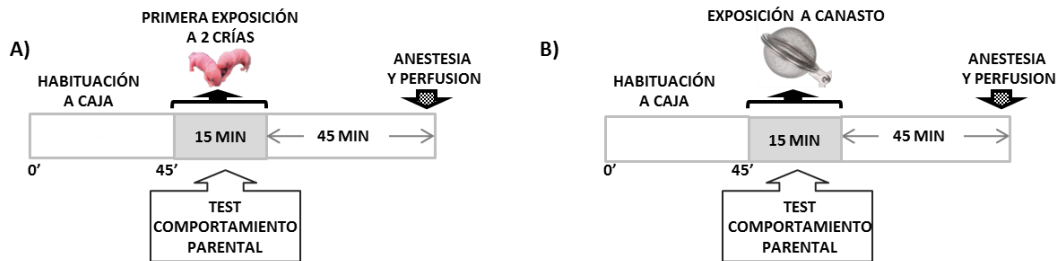


Figura 1. Representación esquemática de los diferentes test comportamentales en los Experimentos I, II y III.

EXPERIMENTO I: *Caracterización de la respuesta parental inmediata de hembras y machos adultos inexperimentados del ratón de laboratorio (C57BL/6) durante 2 exposiciones (15 min).*

Hembras y machos de ratón de laboratorio son descriptos en la literatura como espontáneamente parentales e infanticida respectivamente (Gandelman, 1973b; Noiro, 1969; 1972). Sin embargo, existe una gran variabilidad en la respuesta comportamental cuando hembras y machos son expuestos a las crías por primera vez. En este sentido, algunos estudios encuentran que se requieren al menos 2 días de exposición continua a las crías para el despliegue de comportamiento parental completo (Brown et al., 1996; Hamaguchi-Hamada et al., 2004; Kuroda et al., 2011; Lucas et al., 1998; Matsumoto et al., 2003; Pedersen et al., 2006). Asimismo, estudios preliminares no publicados realizados por Olazábal D.E. en dos instituciones diferentes (Emory y Vanderbilt University), y en dos cepas distintas (C57BL/6; Balb/c) sugerían que sólo un porcentaje muy bajo de animales adultos testeados con crías eran capaces de mostrar todos los componentes del comportamiento parental. Nos propusimos entonces investigar la respuesta espontánea de hembras y machos durante dos exposiciones de 15 min a las crías.

MÉTODOS ESPECÍFICOS

Diez hembras adultas inexperimentadas (~60 días) y 18 machos adultos inexperimentados (9 de ~60 días de edad y 9 de ~100 días de edad) fueron expuestos a 2 crías recién nacidas (1-3 días de edad) durante 15 min. Se realizaron dos exposiciones (una es fase de luz y otra en fase de oscuridad) a intervalos de 10-13 horas, alternando el orden de comienzo del test (día o noche) de manera de contrabalancear los grupos (Figura 1, Panel I). Finalizados los 15 min de cada exposición las crías fueron inmediatamente retornadas a sus madres. En el caso de ataque a las crías, el test fue inmediatamente interrumpido y las mismas fueron sacrificadas de modo evitar su sufrimiento. Se registró detalladamente la respuesta parental, y el comportamiento locomotor y exploratorio: rearing, trepadas, olfateos, distancia de las crías y posición inmóvil. De acuerdo a la respuesta conductual a las crías los animales fueron asignados a una de las categorías comportamentales ya mencionadas.

Análisis estadístico

Los datos comportamentales fueron analizados usando el paquete estadístico StatView (SAS Institute Inc, Cary, NC). Fueron chequeados para el ajuste de Normalidad (Test de Kolmogorov-Smirnov) y Homogeneidad de Varianza (Test de Bartlett). Como en la

mayoría de los casos los datos no cumplieron con dichos supuestos, fueron analizados mediante Test no paramétricos. El análisis se llevó a cabo mediante la prueba pareada de Wilcoxon para datos dependientes. Los datos son expresados como medianas (rango semi-intercuartil, RSIQ). La significancia estadística fue establecida en $p < 0,05$.

RESULTADOS

Respuesta inmediata de hembras adultas hacia las crías

El 50% (5/10) de las hembras adultas inexperimentadas de ratón exhibieron comportamiento parental (PC o PI) mientras el restante 50% no realizó ninguna conducta parental. Sólo el 20% (2/10) de las hembras alcanzó el criterio de comportamiento PC y únicamente durante la primera exposición (15 min) a las crías, indicando que las hembras de ratón muestran una baja incidencia de comportamiento parental completo. Durante la primera y segunda exposición a las crías (15 min), 2, 3, 5 y 0, 5, 5 animales desplegaron comportamiento PC, PI o NP, respectivamente (Figura 2, Panel A).

El análisis de los diferentes componentes del comportamiento parental (acarreo, lamidos, postura de amamantamiento y construcción de nido) desplegado por hembras durante dos exposiciones de 15 min, se muestra en la Tabla 1. Sólo se encontraron diferencias significativas en el tiempo en que las hembras permanecieron realizando postura de amamantamiento, siendo significativamente mayor en la segunda exposición ($T(10)=1,9$; $p < 0,05$). El porcentaje de hembras que acarreoó (30%; 0%; Tabla 1), lamió (90%; 100%), adoptó postura de amamantamiento (40%; 50%) o realizó construcción de nido (30%; 50%) no fue diferente entre la primer y segunda exposición a crías ($p > 0,05$). Estos resultados sugieren que la respuesta inmediata en las hembras de ratón no es espontáneamente parental.

Respuesta inmediata de machos adultos hacia las crías

Durante la primera exposición (15 min) a las crías, el 44,3% (4/9) de los machos adultos de 60 días de edad desplegó infanticidio, mientras el resto mostró comportamiento NP (55,6%). Tres de éstos (NP) lamieron y 2 construyeron nido por un tiempo mayor a 60 segundos. A pesar de esto, ninguno alcanzó el criterio de comportamiento PI durante la primera exposición. Cuando fueron expuestos a las crías por segunda vez, un animal mostró comportamiento PC y dos fueron PI (Figura 2, Panel B).

En cuanto a los machos de 100 días de edad ($n=9$), el 100% de ellos desplegó infanticidio durante la primera exposición a las crías, mientras el 89% (8/9) y 11% (1/9)

mostró comportamiento I o NP, respectivamente, cuando fueron expuestos a las crías por segunda vez.

Para el análisis detallado de la respuesta de los machos de 60 días de edad a las crías, se excluyeron aquellos que habían desplegado infanticidio (4). En este sentido, el tiempo que los machos permanecieron lamiendo a las crías, fue significativamente mayor durante la segunda exposición ($T(9)=2,0$; $p<0,05$). El porcentaje de machos que acarreo (0%; 14,3%), lamió (22,2%; 55,5%), adoptó postura de amamantamiento (0%; 33,3%) o realizó construcción de nido (22,2%; 55,5%) no fue diferente entre las dos exposiciones a las crías ($p>0,05$). Todos los machos de 100 días de edad desplegaron infanticidio por lo que fueron excluidos del análisis de los diferentes componentes de la respuesta a las crías. Los resultados siguieron que la respuesta inmediata de los machos de ratón es principalmente NP e I, mostrando un desarrollo gradual con la edad de la respuesta infanticida. Sin embargo, un porcentaje de machos jóvenes podrían ser sensibilizados a desplegar comportamiento parental.

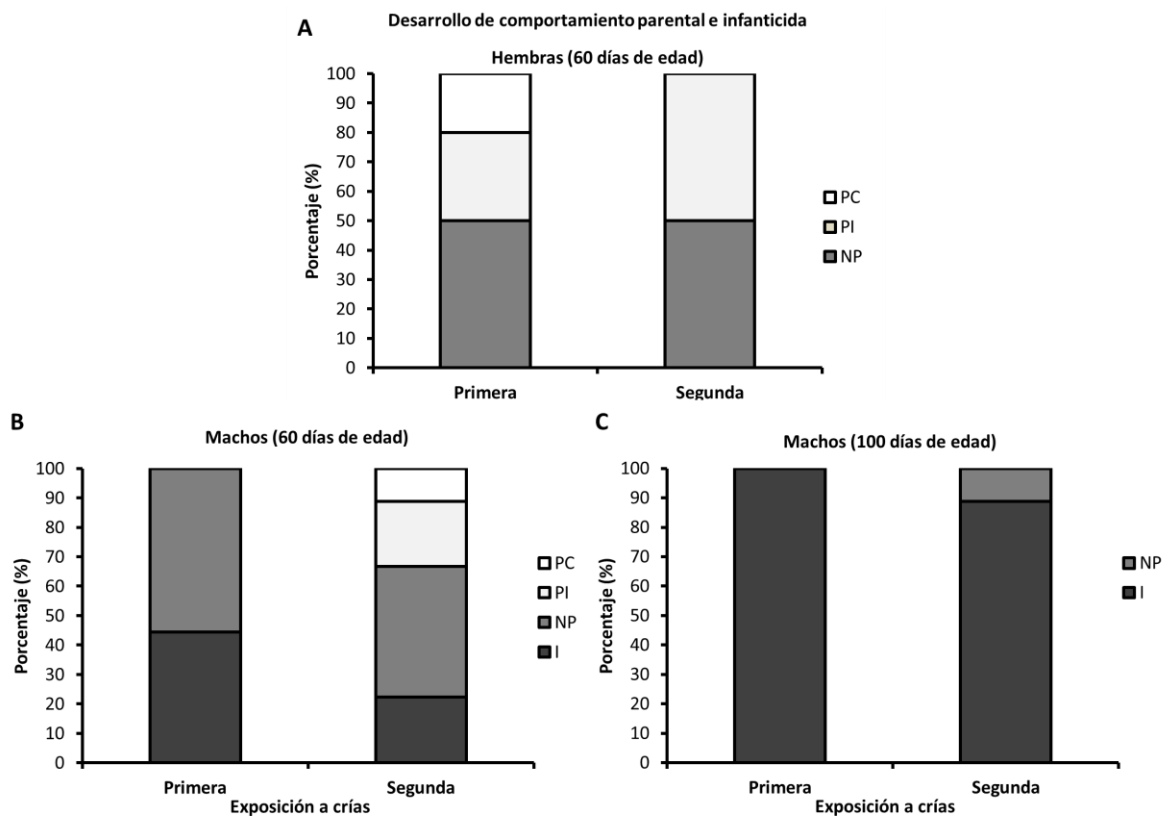


Figura 2. *Panel A.* Porcentaje de hembras adultas (60 días de edad, $n=10$) maternas y no maternas durante dos exposiciones (15 min) a las crías. *Panel B.* Porcentaje de machos adultos (60 días de edad, $n=9$) parentales y no parentales durante dos exposiciones (15 min) a las crías. *Panel C.* Porcentaje de machos adultos (100 días de edad, $n=9$) no parentales o infanticidas

durante dos exposiciones (15 min) a las crías. PC: parental completo, PI: parental incompleto, NP: no parental, I: infanticida.

Tabla 1. Respuesta a las crías desplegada por hembras (~60 días de edad) durante dos exposiciones de 15 min.

Exposición	Hembras (n=10)	
	Primera	Segunda
Porcentaje		
Acarreo	30,0%	0,0%
Frecuencia (15 min)		
Lamido	44,0 (8,0)	40,5 (6,5)
P. amamantamiento	9,0 (1,5)	8,0 (3,5)
Construcción de nido	0,0 (3,0)	4,0 (4,0)
Duración (s)		
Lamido	120,1 (27,3)	144,6 (49,6)
P. amamantamiento	22,4 (14,8) ^a	33,0 (21,0) ^b
Construcción de nido	0,0 (43,5)	65,9 (48,1)

Los datos son expresados como medianas (RSIQ).

Prueba pareada de Wilcoxon.

Las diferentes letras (a,b) indican las diferencias estadísticas entre exposición 1 y 2 entre los grupos ($p < 0,05$).

DISCUSIÓN

Respuesta inmediata de hembras adultas hacia las crías

Estudios clásicos muestran una alta incidencia de comportamiento parental en el ratón de laboratorio (Gandelman, 1973abd; Leblond, 1938; Noirot, 1964ab; 1969; 1972). Sin embargo, en contraste a algunos estudios en los que se propone que la mayoría de las hembras inexperimentadas despliegan comportamiento espontáneo o PC (70-100%, Calamandrei & Keverne, 1994; Gandelman, 1973abd; Leussis et al., 2008; Lonstein & De Vries, 2000; Noirot, 1964ab; 1969; 1972; Stolzenberg & Rissman, 2011), en la presente tesis se muestra una incidencia significativamente menor de hembras que exhibieron comportamiento PC (~20%). De hecho, una segunda exposición a las crías durante 15 min no facilitó la respuesta parental. Aunque el 50% de los animales desplegó algunos componentes del comportamiento parental, exposiciones repetidas a las crías durante un periodo de tiempo mayor (60 min) fueron necesarias para facilitar la respuesta parental completa de los animales (Experimento II).

Algunas de las discrepancias en la incidencia de comportamiento parental de las hembras adultas inexperimentadas de ratón, pueden ser consecuencia de diferentes criterios usados para considerar un animal como parental. En este sentido, algunos autores consideran a un animal parental cuando al menos uno de los parámetros comportamentales eran observados (usualmente acarreo, o lamido y grooming, Calamandrei & Keverne, 1994; Gandelman et al., 1970; Gandelman, 1973bd; Jin et al., 2005; Kuroda et al., 2008; Li et al., 1999; Pedersen et al. 2006; Ragnauth et al., 2005). Sin embargo, las limitaciones del registro de un sólo parámetro comportamental y la necesidad de realizar un análisis minucioso de la respuesta parental fue discutida en Priestnall & Young (1978). En este sentido, aquí se muestra un análisis detallado de todos los componentes de la conducta parental. En el siguiente experimento (Experimento II), se muestra como efectivamente la secuencia de la respuesta parental y no parental difieren cualitativamente. En este sentido, cuando un animal es completamente parental, la secuencia conductual es muy similar a la desplegada por una hembra lactante, siendo cualitativamente diferente de aquellos que solo desplegaron uno (NP) o algunos (PI) parámetros conductuales.

Asimismo, las discrepancias señalan otras inconsistencias. Por ejemplo, en algunos trabajos las hembras descritas como espontáneamente parentales fueron expuestas previamente a las crías durante 15-60 min o incluso 24 hr (Gandelman, 1973cd; Leussis et al., 2008; Stolzenberg & Rissman, 2011). En este trabajo todos los animales fueron completamente inexperimentados al momento del test.

La variabilidad de la respuesta parental a las crías en las hembras de ratón ha sido explicada previamente en términos de diferencias en el procedimiento experimental (por ejemplo, test en caja propia vs. caja nueva), tiempo de habituación a la caja, tipo de alojamiento, alimentación, entre otros (Kuroda et al., 2011). No obstante, muchos estudios han encontrado que las condiciones del test, el tiempo de habituación, las condiciones de crianza, o incluso el origen de los animales, no necesariamente inducen diferencias en el comportamiento parental u otros comportamientos (Crawley et al., 2007; Svare & Broida, 1982). La ausencia de comportamiento parental espontáneo en las hembras de ratón y la necesidad de un periodo de sensibilización ya habían sido previamente sugeridos por los resultados de otros autores (Brown et al., 1996; Gandelman, 1973b; Kuroda et al., 2011; Lucas et al., 1998, entre otros). En el experimento II de la presente tesis confirmamos que la mayoría de los animales requieren al menos tres exposiciones repetidas a las crías durante 60 min para mostrar comportamiento PC. En este sentido, la respuesta parental inmediata en el ratón de laboratorio difiere de la que exhibe prairie voles, los cuales son

capaces de desplegar todas las conductas parentales dentro de unos pocos minutos e incluso segundos; asimismo, también difieren de la respuesta mostrada por ratas adultas, quienes necesitan una exposición continua a las crías durante 6-8 días para desarrollar comportamiento PC (Olazábal & Young 2006ab; Rosenblatt, 1967).

Respuesta inmediata de machos adultos hacia las crías

En cuanto a los machos, nuestro estudio concuerda con el trabajo clásico de Gandelman (1973c) en el que se propone que en una primera exposición a las crías ~40% de los machos adultos de ~60 días de edad despliegan infanticidio. En el presente trabajo, ninguno de los machos adultos alcanzó el criterio de comportamiento parental en la primera exposición a las crías (100% no parentales e infanticidas). Sin embargo, fueron propensos a mostrar algunos componentes del comportamiento parental después de una exposición previa de 15 min a las crías. Por otra parte, el 100% de los machos inexperimentados de 100 días de edad desplegó infanticidio. La ausencia de respuesta parental en machos inexperimentados, así como la alta incidencia de infanticidio, está de acuerdo con una vasta literatura (Gandelman, 1972; 1973c; Gandelman & Vom Saal, 1975; McCarthy & vom Saal, 1986; Svare & Broida, 1982; Svare & Mann, 1981). La mayoría de estudios realizados en las diferentes cepas de ratón, muestran que aproximadamente el 40-50% de los machos inexperimentados despliegan infanticidio cuando son expuestos a crías por primera vez, mientras que un porcentaje muy bajo puede eventualmente mostrar alguna conducta parental dependiendo de la cepa y de las condiciones.

El infanticidio, un comportamiento agonístico es considerado un comportamiento sexualmente dimórfico, siendo generalmente (aunque no siempre) exhibido por los machos (Elwood & Kennedy, 1991; Hrdy, 1979; Svare & Mann, 1981). Sin embargo, esta respuesta es dependiente de la etapa del desarrollo, así como de factores genéticos, hormonales, y ambientales (Elwood & Kennedy, 1991; Svare & Broida, 1982; Svare & Mann, 1981; Tachikawa et al., 2013). En este sentido, nuestros resultados están de acuerdo con trabajos previos en los que se muestra un aumento de la incidencia de la respuesta infanticida con la edad. Por ejemplo, machos juveniles (~22 días de edad) de diferentes cepas muestran baja incidencias de respuesta infanticida (Gandelman, 1973c; Olazábal & Alsina-Llanes, 2015). McCarthy y vom Saal (1986) encontraron que machos de 40-45 días de edad del ratón doméstico desplegaban infanticidio con menor frecuencia (~36%) que machos adultos (~80%). Del mismo modo, Svare y Broida (1981) también encontraron un

incremento de la respuesta infanticida desde los 25 a 65 días de edad en ratones de las cepas C57BL/6 y DBA.

Sin embargo, machos inexperimentados expuestos a una hembra gestante por un periodo de 10 días, no muestran infanticidio y son capaces de desarrollar comportamiento parental (Gandelman et al., 1970). Se han propuesto diferentes hipótesis para explicar el fenómeno de inhibición del infanticidio y facilitación de la conducta parental en los machos. Se han planteado que fenómenos de reconocimiento de las crías, de posible pareja o de un ambiente familiar, y fenómenos fisiológicos como la eyaculación, la exposición a las feromonas de la hembra gestante y la subordinación a la misma podrían estar involucrados (Elwood, 1985; 1986; Matsumoto & Kimura, 1995; Vom Saal, 1984; Tachikawa et al., 2013). En este sentido, machos que permanecieron con la hembra durante la gestación y hasta el día 7 del posparto, inhiben la respuesta infanticida y despliegan comportamiento parental cuando son testeados con crías propias o ajenas (67% y 78%, respectivamente, Olazábal & Alsina-Llanes, en preparación). Asimismo, Tachikawa y col. (2013) encontraron que aquellos machos que permanecen con la hembra lactante y las crías durante 2 días, y son posteriormente aislados y testeados con sus crías, despliegan comportamiento parental.

El hecho de que en el presente trabajo, una segunda exposición a las crías, en machos de 60 días de edad facilite la respuesta parental (~33.3% PC y PI), sumado a resultados obtenidos en contexto reproductivo en el laboratorio (datos no publicados), plantea que si bien los machos son mayormente no parentales, un porcentaje de machos, bajo ciertas circunstancias, son capaces de ser sensibilizados a desplegar comportamiento parental. Sin embargo, estos resultados no concuerdan con algunos trabajos que muestran que en una primera exposición a las crías, el 95%-100% de los machos realiza al menos dos de las conductas parentales, principalmente acarreo y lamido o acarreo y construcción de nido (Noirot, 1964c, 1969). No obstante, observamos que en la mayoría de los casos en que los machos acarreaban, posteriormente atacaban. Esta observación ya había sido reportada en machos de la cepa Rockland-Swiss (Gandelaman, 1973c). Asimismo, nuestros resultados difieren de otros estudios en los que se reporta comportamiento parental espontáneo. Por ejemplo, en el estudio clásico de Leblond (1938) encuentran mayores niveles (50%) de comportamiento parental de los machos a los 22-28 días de edad y en la adultez. Sin embargo, en este último no se deja en claro si los animales fueron expuestos a las crías por primera vez ya que los autores también proponen que los juveniles requerirían al menos 4 días de exposición continua a las crías (sensibilización)

para desplegar comportamiento parental. McCarthy y vom Saal (1986) también encontraron que algunos machos (20-40% adolescentes y adultos) realizaban postura de amamantamiento sobre las crías en el nido (test de 30 min). Asimismo, estos autores encontraron más animales parentales (30-40%) y menos infanticidas en ratones CF-1 en comparación con los ratones domésticos salvajes, sugiriendo diferencias entre cepas. Lamentablemente, en este estudio los autores no registran todos los componentes conductuales en detalle. Del mismo modo, Svare y Mann (1981) encontraron que el 0-20% de ratones macho (C57BL/6 o DBA) acarrear a las crías. Las discrepancias en la incidencia del comportamiento parental han sido explicadas en término de diferencias en las cepas estudiadas (McCarthy & vom Saal, 1986; Svare, & Mann, 1981), en las condiciones de alojamiento (Svare & Broida, 1982), o las definiciones utilizadas para considerar un animal parental (Alsina-Llanes et al., 2015). Es probable que la incidencia de respuesta parental inmediata en algunos machos, mostrada en otros estudios, pueda deberse a diferencias en edad o experiencia previa con hembras y crías, como sugieren los resultados de la presente tesis y otros resultados obtenidos en el laboratorio (Gubernick & Laskin, 1994; Olazábal & Alsina-Llanes, 2015). En este sentido, si bien la respuesta inmediata de los machos jóvenes de ratón es principalmente NP e I, éstos pueden ser sensibilizados a mostrar comportamiento parental en otras condiciones.

EXPERIMENTO II: *Inducción de comportamiento parental completo en hembras inexperimentadas adultas del ratón de laboratorio (C57BL/6).*

Debido a que muy pocos animales mostraron comportamiento PC (Experimento I) durante la primera exposición (15 min) a las crías, sumado a que en trabajos previos los animales habían sido expuestos durante 15 o 45 min antes de realizar los test (Gandelman & vom Saal, 1975; Leussis et al., 2008; Stolzenberg & Rissman, 2011), nos propusimos determinar el número de exposiciones repetidas (60 min) necesarias para inducir comportamiento PC en las hembras de ratón (C57BL/6).

MÉTODOS ESPECÍFICOS

Se utilizaron 8 hembras inexperimentadas adultas (~60 días de edad). Se realizaron dos exposiciones diarias (60 min) a las crías, una en la mañana y otra en la tarde, ambas en fase de luz, separadas aproximadamente 6-8 horas. Se registró detalladamente la respuesta parental durante los primeros 15 min, y de acuerdo a ésta, los animales fueron categorizados según el criterio antes mencionado. También se registró la incidencia de postura de amamantamiento y la presencia o ausencia de las crías en el nido al final de la hora. Luego de este tiempo, las crías fueron devueltas a la caja materna. Las exposiciones fueron repetidas hasta que todos los animales alcanzaran el criterio de comportamiento PC al menos en 2 registros consecutivos (Figura 1, Panel II). Si los sujetos desplegaban infanticidio, el test era interrumpido y las crías inmediatamente sacrificadas.

Se analizó la secuencia de los principales componentes asociados al comportamiento parental en los animales asignados a cada categoría conductual. Se realizaron matrices que expresan la frecuencia con la que cada comportamiento fue desplegado y el número de veces que cada comportamiento fue seguido de otro (frecuencia de transición) cuando los animales mostraron comportamiento NP, PI o PC. Cada matriz conteniendo todos los registros comportamentales durante los primeros 15 min de exposición a las crías fue utilizada para crear los diferentes diagramas de flujo. Un grupo adicional de hembras lactantes en el día 7 posparto (en este caso testeadas con 5 crías) fue analizado para comparar el diagrama de flujo resultante con aquel obtenido de las hembras ciclantes inexperimentadas que desplegaron comportamiento PC.

Análisis estadístico

Los datos comportamentales fueron analizados del mismo modo que fue mencionado anteriormente (Experimento I). Fueron chequeados para el ajuste de Normalidad y

Homogeneidad de Varianza. Como los datos no se ajustaron a estos supuestos, fueron analizados mediante Test no paramétricos: Test de Friedman seguido de la prueba pareada de Wilcoxon para datos dependientes. Los datos son expresados como medianas (rango semi-intercuartil, RSIQ). La significancia estadística fue establecida en $p < 0,05$.

RESULTADOS

El porcentaje de animales que desplegó comportamiento PC, PI, NP e I varió en las sucesivas exposiciones. Más animales desplegaron comportamiento PC durante el registro de los primeros 15 min en la cuarta (80%) y quinta exposición (100%; Figura 3) en comparación a la primera y segunda exposición a las crías respectivamente.

Sin embargo, el registro del comportamiento maternal finalizados 60 min de exposición a las crías (Figura 4) mostró que al final de la tercera exposición a las crías, todos los animales (100%) fueron encontrados con las crías en el nido y realizando postura de amamantamiento sobre las mismas. Al menos tres exposiciones repetidas de una hora fueron necesarias para inducir comportamiento parental en todos los animales (Figura 4). Durante la primera exposición, una hembra atacó a las crías (I) por lo que fue excluida del subsecuente análisis comportamental de los siguientes días.

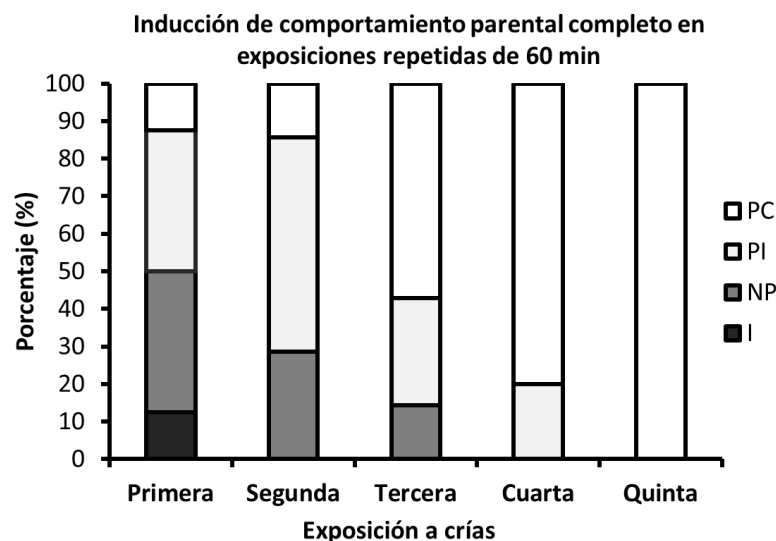


Figura 3. Porcentaje de hembras que desplegó comportamiento parental o no parental durante los primeros 15 min de una serie de exposiciones repetidas (60 min) a las crías. PC: parental completo, PI: parental incompleto, NP: no parental, I: infanticida.

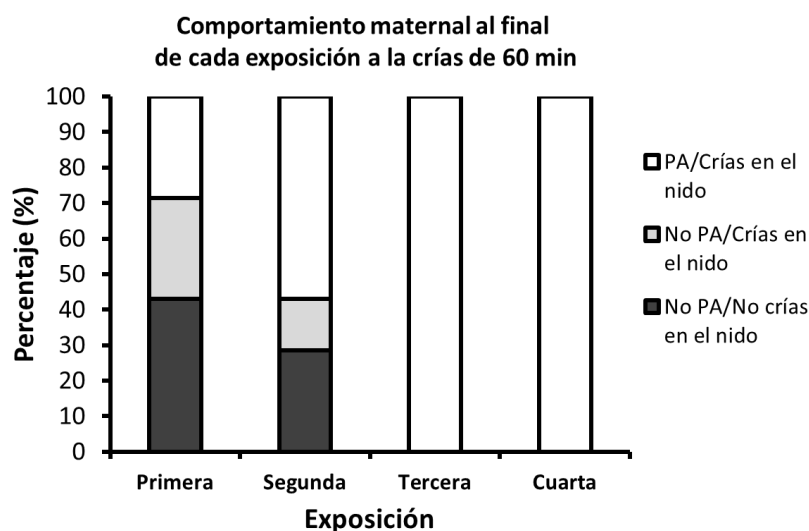


Figura 4. Porcentaje de animales encontrados con las crías en el nido y/o realizando postura de amamantamiento (PA) al final de cada exposición de 60 min. Los datos son expresados como porcentajes (número de animales en cada condición/ número total de animales por grupo).

El análisis discriminado por cada componente del comportamiento parental durante los primeros 15 min en tres exposiciones (60 min) a las crías, sólo mostró diferencias significativas en el número de veces que construyeron nido (Tabla 2), así como en su duración. Los animales construyeron nido significativamente más veces y durante un mayor período de tiempo en la segunda ($T(7)=1,9$; $p=0,06$; $T(7)=2,2$; $p<0,05$) y tercera exposición ($T(7)=2,3$; $p<0,05$; $T(7)=2,3$; $p<0,05$) en comparación a la primera exposición a las crías. Del mismo modo, el tiempo construyendo nido fue significativamente mayor en la tercera exposición en comparación a la segunda ($T(7)=2,3$; $p<0,01$).

Las hembras olfatearon a las crías con menor frecuencia y permanecieron menos veces alejadas de las crías (Tabla 2) durante la segunda ($T(7)=2,2$; $p<0,05$; $T(7)=2,4$; $p<0,05$) y tercera ($T(7)=2,2$; $p<0,05$; $T(7)=2,4$; $p<0,05$) exposición, en comparación a la primera exposición. Asimismo, durante la tercer exposición ($T(7)=2,3$; $p<0,05$) permanecieron menos distante de las crías en comparación a la segunda exposición. No se muestra el análisis de la cuarta y quinta exposición a las crías ya que los animales que alcanzaron el criterio de comportamiento PC en dos registros consecutivos fueron excluidos de los siguientes test y por tanto el número de animales por exposición se redujo.

Tabla 2. Comportamiento maternal durante los primeros 15 min de tres exposiciones repetidas de 60 min

Exposición a crías	Primeros 15 min de test (n=7)		
	Primera	Segunda	Tercera
Porcentaje			
Acarreo	25,0%	28,5%	57,1%
Frecuencia (15 min)			
Olfateo	14,0 (5,1)	2,0 (1,7) *	1,0 (1,8) *
Lamido	24,0 (11,2)	23,0 (12,1)	15,0 (5,6)
Postura de amamantamiento	10,0 (8,1)	9,0 (4,0)	8,0 (2,2)
Construcción de nido	0,0 (0,8)	11,0 (2,3)	10,0 (2,3) *
Distancia > 10cm	23,0 (4,3)	5,0 (1,2) *	2,0 (0,5) *#
Duración (s)			
Olfateo	3,8 (1,7)	1,4 (0,8) *	0,8 (0,7) *
Lamido	52,0 (25,8)	81,4 (44,1)	14,7 (24,3)
Postura de amamantamiento	26,9 (24,0)	44,4 (17,2)	31,0 (18,1)
Construcción de nido	0,0 (8,6)	294,8 (78,6) *	566,2 (68,0) *#
Distancia > 10cm	190,0 (146,4)	63,2 (18,0) *	16,6 (5,4) *#

Datos expresados como medianas (SIQR).

*p<.05, vs. primera exposición.

#p<.05, vs. segunda exposición.

Prueba de Friedman seguida de Prueba Pareada de Wilcoxon.

Las secuencia de los componentes asociados al comportamiento parental (olfateo, lamidos, acarreo, transporte, postura de amamantamiento y construcción de nido) fueron analizados en las sucesivas exposiciones a las crías cuando las hembras desplegaron comportamiento PC, PI o NP (Figura 5). El diagrama de flujo muestra la frecuencia con la que cada componente comportamental fue desplegado y la frecuencia de sus transiciones (el porcentaje de veces que un comportamiento fue procedido de otro). La secuencia característica del comportamiento maternal exhibido por las hembras inexperimentadas adultas sensibilizadas fue similar a la secuencia desplegada por las hembras lactantes en el día 7 posparto (n=10). Cuando los animales exhibían comportamiento PI o NP, tanto la frecuencia de los componentes comportamentales y sus transiciones fueron cualitativamente diferentes. Los resultados indican que la respuesta parental del ratón de laboratorio no es espontánea sino el resultado de un rápido proceso de sensibilización. Sin embargo, dicho proceso es de menor latencia del exhibido en la rata. Asimismo, cuando los animales despliegan comportamiento PC, la secuencia de éste no es cualitativamente diferente del exhibido por las hembras lactantes.

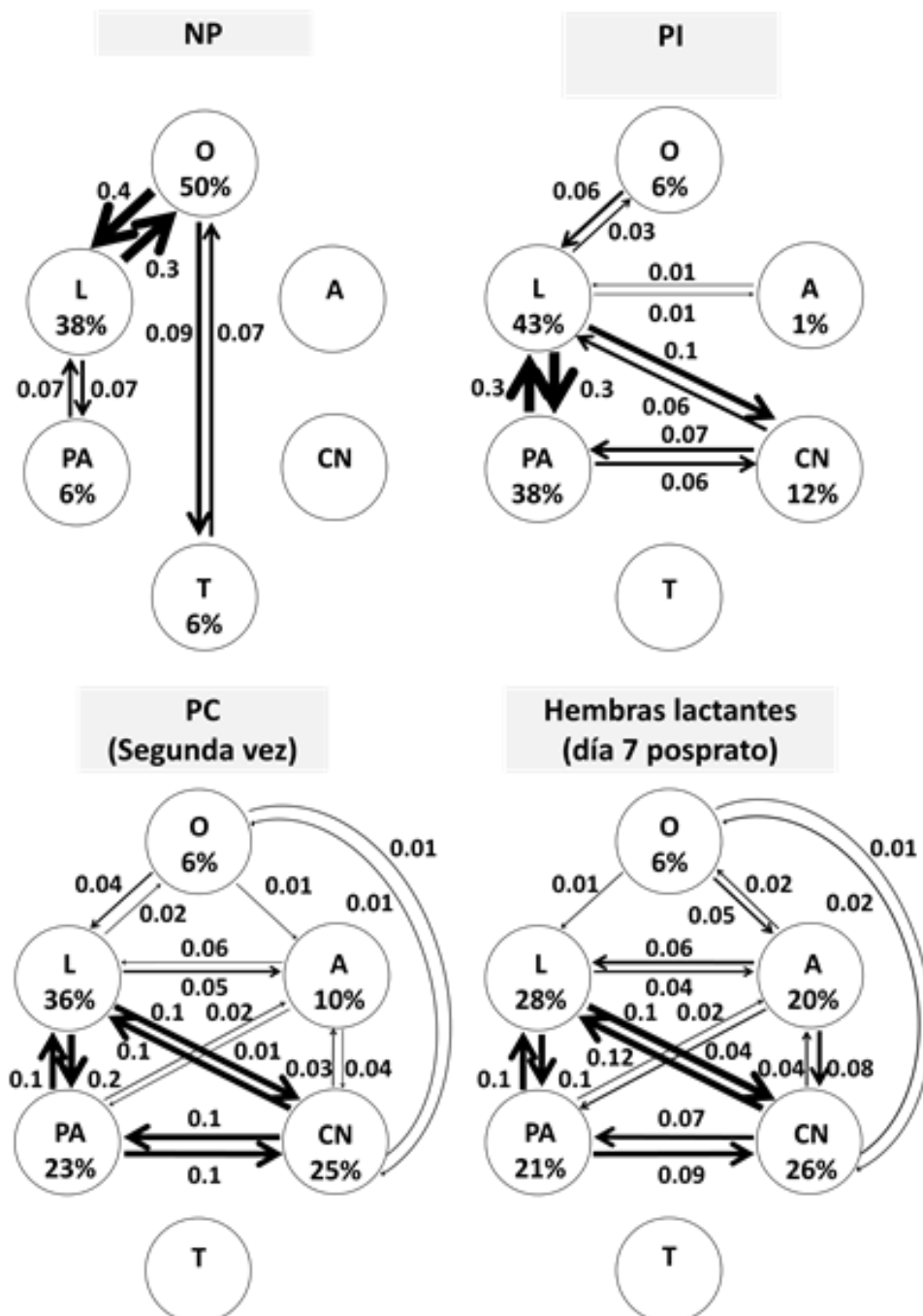


Figura 5. Diagrama de flujo de la frecuencia de los componentes comportamentales y sus frecuencias de transiciones cuando las hembras inexperimentadas exhibieron comportamiento NP (no parental, n=4), PI (parental incompleto, n=6), PC (parental completo por segunda vez, n=5) o lactantes al día 7 posparto (n=10). La frecuencia de los componentes comportamentales son expresados como porcentajes. Las frecuencias de transiciones están representadas por el número en la flecha y el ancho de la misma. La dirección de la flecha indica sentido de las transiciones conductuales. O: olfateo, L: lamido, A: acarreo, PA: postura de amamantamiento, CN: construcción de nido, T: transporte.

DISCUSIÓN

El presente Experimento, muestra un análisis detallado de todos los parámetros conductuales cuando hembras adultas de ratón son expuestas en forma repetida a las crías. Del mismo, se desprende que la respuesta parental en el ratón no es espontánea sino que consiste de un rápido de proceso de sensibilización. Asimismo, el análisis de todas las transiciones conductuales a partir del diagrama de flujo, cuando los animales desplegaron o no comportamiento parental confirmó que la definición, de cada uno de los grupos conductuales fue apropiada. El análisis de la secuencia conductual durante diferentes estados de sensibilización reveló claramente un cambio en la ocurrencia de los principales componentes de la conducta parental. La secuencia comportamental desplegada con mayor frecuencia en los animales NP consistió de olfateos seguidos de lamidos, sin embargo, olfateos y lamidos no fueron seguidos de acarreo o construcción de nido. En el caso de las hembras PI, las transiciones conductuales más comunes fueron lamido y postura de amamantamiento (postura activa). Las hembras investigan menos, pero rápidamente comienzan a lamer y construir nido, pero no despliegan acarreo. A diferencia de otros trabajos (Calamandrei & Keverne, 1994; Noirot, 1964ab; 1969; Stolzenberg & Rissman, 2011), el acarreo fue observado sólo después de la segunda o tercer exposición de 60 min a las crías. En concordancia con Gandelman (1973b), nosotros mostramos que los animales inicialmente olfateaban y lamían a las crías, mientras el comportamiento de acarreo apareció tardíamente (Rosenblatt, 1967). La construcción de nido fue exhibido con mayor frecuencia y duración en aquellos animales completamente parentales. En este sentido y a diferencia de lo reportado en la literatura, la construcción de nido fue el primer componente de la conducta parental que mostró un incremento significativo (en las sucesivas exposiciones) en aquellos sujetos que alcanzaban el criterio de parental, mientras que el acarreo, como ya se mencionó fue el último componente en ser desplegado. Sin embargo, en el transcurso de las exposiciones y una vez que los sujetos mostraron comportamiento PC repetidamente, el acarreo fue el primer componente de la secuencia comportamental en ser exhibido. Esto podría explicar que en algunos trabajos en los cuales se realiza una exposición previa a las crías, el 100% de los animales realice acarreo de las mismas.

El tiempo que las hembras permanecieron lamiendo no aumentó en las sucesivas exposiciones. Por tanto, esto sugiere que el lamido no constituye un buen predictor de la conducta parental inmediata, estando este último mayormente asociado con la exploración y reconocimiento de las crías como ya ha sido sugerido por Ostermeyer y Elwood (1983).

Resulta interesante notar la ausencia de postura de amamantamiento pasiva, observándose únicamente el componente activo de dicho parámetro. El tiempo que las hembras inicialmente permanecieron realizando postura de amamantamiento durante los primeros 15 min de interacción con las crías fue mayormente consecuencia de la postura adoptada por las hembras mientras éstas lamían a las crías, y no una postura de protección o termorregulación. Sin embargo, la postura de amamantamiento (activa y pasiva) estuvo claramente asociada a la respuesta completamente parental de las hembras cuando éstas permanecieron con las crías en el nido al final de los 60 min de exposición.

De lo expuesto hasta aquí se desprende que la conducta parental, tanto en animales vírgenes como lactantes, consiste en un patrón conductual complejo y, por tanto, a la hora de definir a un animal como parental es necesario realizar un análisis detallado de todos y cada uno de los componentes parentales. En este sentido, el análisis de la secuencia comportamental de las hembras lactantes en día 7 del pos-parto con su propia camada (5 crías), revela que éstas, al igual que las hembras vírgenes inexperimentadas cuando muestran comportamiento PC, muestran una baja frecuencia y duración de olfateos y lamidos.

En la presente tesis se muestra que la respuesta inmediata no es espontánea (como se observa en prairie voles) sino que la respuesta parental consiste en un rápido proceso de sensibilización. Sin embargo, la latencia de sensibilización es menor a la exhibida en ratas sugiriendo que estas diferencias surgen probablemente como consecuencia de diferentes estrategias sociales y reproductivas entre las diferentes especies.

EXPERIMENTO III: *Expresión de c-fos en hembras y machos que muestran respuesta inmediata parental, infanticida o de desinterés.*

Muchos trabajos han explorado los circuitos que subyacen a la respuesta parental mediante la utilización de inmunohistoquímica para Fos. Clásicamente se ha propuesto un rol esencial del MPOA en la respuesta parental tanto en animales lactantes como sensibilizados, así como el NAc como parte del sistema dopaminérgico. Las diferentes subregiones del LS han sido implicadas tanto en la facilitación como en la inhibición de la respuesta parental. Por otra parte, la amígdala, hipotálamo anterior y ventromedial han sido asociados a la inhibición del comportamiento de la respuesta parental (Olazábal et al., 2013a).

Sin embargo, estos abordajes se han centrado en el análisis de las áreas implicadas en un contexto reproductivo, durante el posparto en la rata, o en animales sensibilizados luego de varios días de inducción (Olazábal et al, 2013a), lo cual excluye áreas del cerebro críticas para la respuesta parental inmediata. Las hembras de ratón han sido descritas en la literatura como espontáneamente parentales (Gandelman, 1973b; Noiro, 1969; 1972). Calamandrei & Keverne (1994) analizaron las áreas implicadas en el comportamiento parental del ratón (luego de una exposición previa a las crías de 30 min). Sin embargo, según estos autores, el 100% de los animales realizarían todos los componentes del comportamiento parental, un hecho que difiere de lo encontrado en esta tesis. Del mismo modo, Tsuneoka y col. (2013), analizaron las subregiones del MPOA luego de 30 min de interacción con las crías pero sólo en aquellos animales que desplegaron comportamiento PC.

En la presente tesis, nos propusimos analizar (a través de los niveles de Fos), las diferencias en las áreas cerebrales reclutadas ante las distintas respuestas conductuales: infanticida (aversión o agresión a las crías), parental espontánea (atracción y cuidados) o indiferencia (aquellos que mayormente ignoran a las crías). La ventaja de este estudio de Fos respecto a otros previos son: 1) es la primera vez que este tipo de estudio se realiza en el ratón simultáneamente para hembras y machos que despliegan respuesta parental, indiferente o infanticidas en un contexto no reproductivo, lo que nos permite determinar la especificidad de la respuesta neural en uno u otro comportamiento, 2) es la primer vez que se analiza las áreas implicadas en la respuesta inmediata a las crías (parental o no parental) durante una única interacción y de tan corta duración (15 min), 3) estudios previos en ratas sensibilizadas observan respuesta de *c-fos* luego de varios días de inducción lo cual excluye áreas del cerebro críticas para el comportamiento parental en forma

transitoria/inmediata, 4) en este estudio todos los animales fueron expuestos a las crías el mismo tiempo (a excepción de machos infanticidas, ver métodos), y en las mismas condiciones, diferenciándose únicamente en el estado afectivo y comportamental desplegado al momento del test, diferencias cuyo correlato neural buscamos identificar.

MÉTODOS ESPECÍFICOS

En el Experimento III, se utilizaron 26 hembras ciclantes adultas inexperimentadas y 13 machos adultos (60-100 días de edad) inexperimentados. Todos los animales fueron habituados a la caja durante 1 hora. Los animales fueron expuestos a dos crías o al objeto novedoso una única vez (Figura 1, Panel III). A cada uno de los grupos se le permitió interaccionar con las crías durante 15 min y de acuerdo al despliegue conductual los animales fueron asignados a una de las categorías ya mencionada (PC, PI, NP o I, Tabla 3). Transcurrido este tiempo o al momento del primer ataque (en el caso de aquellos animales que se mostraron infanticidas), las crías fueron retiradas y devueltas a sus madres. En caso de ataque, las crías fueron sacrificadas inmediatamente de modo de evitar su sufrimiento. Se realizaron dos grupos controles, machos expuestos a una esfera de maya (objeto novedoso, 4 cm de diámetro, (Figura 1, Panel III, B) durante 15 min, y hembras sin ningún tipo de exposición previa. Luego de una hora de iniciada la exposición a las crías, o al objeto novedoso, los animales fueron anestesiados con una mezcla de Ketamina/Xilacina i.p (100mg/Kg de Ketamina-14mg/Kg de Xilacina). En el caso de las hembras controles (sin ningún tipo de exposición previa), los animales fueron habituados a la caja durante una hora, luego de este tiempo la caja fue abierta y cerrada de modo de simular la colocación de las crías, transcurrida una hora de este último, los animales fueron anestesiados del mismo modo que los grupos ya mencionados.

Tabla 3. Grupos experimentales

<i>Hembras</i>		<i>Machos</i>	
Grupo	N	Grupo	N
PC	6	I	6
PI	5	Cto	5
NP	5		
Ctl	5		

PC: parental completo; PI: parental incompleto; NP: no parental; Ctl: control sin exposición; I: Infanticida; Cto: exposición canasto.

Inmunohistoquímica

Para la identificación del número de neuronas inmunoreactivas (IR) que expresan *c-fos*, se llevó a cabo el siguiente procedimiento. Previamente se realizaron ensayos de inmunohistoquímica piloto de manera de evaluar las mejores diluciones y condiciones de reacciones. Los animales fueron perfundidos en forma sistémica con 100 ml de buffer PBS, pH 7,6, seguido de 400 ml de paraformaldehído al 4% en buffer PBS. En todos los procedimientos, la concentración del buffer PBS fue 25 mM. Los cerebros fueron extraídos del cráneo y mantenidos a 4° C en paraformaldehído por 24 horas. Luego los cerebros fueron colocados en sacarosa-PBS al 15% hasta ser seccionados (dentro de las 48 horas). Se utilizó un criostato para cortar secciones delgadas de 30 µm. Se realizaron tres series de secciones de las regiones cerebrales de interés. Posteriormente, éstas fueron colocadas en una solución crioprotectora conteniendo etilenglicol y finalmente fueron almacenadas a -20°C hasta su posterior procesamiento para la detección inmunohistoquímica de Fos.

En el primer día de inmunohistoquímica, las secciones fueron removidas del freezer, permitiendo el equilibrio con la temperatura ambiente durante 1 hora, se realizaron lavados en PBS y luego se realizó el bloqueo para peroxidasa endógena (15 min) en PBS conteniendo 2% de peróxido de hidrógeno y 10% metanol. Posteriormente, las secciones se lavaron en PBS durante 5 min y fueron colocadas en suero normal de cabra al 4% (Sigma) diluido en 0,3% triton-PBS (pH 7,2-7,4) durante 1 hora de modo de bloquear la unión no-específica del anticuerpo. Las secciones se incubaron en anticuerpo primario anti *c-Fos* (anticuerpo policlonal en conejo, sc-54, Santa Cruz biotechnology, USA) diluido (1:2000) en una solución de suero normal de cabra al 1% en PBS a 4°C por 40-43 horas. Posteriormente se realizaron lavados en PBS y las secciones se incubaron por una hora en anticuerpo secundario (1:200, anti conejo en cabra) diluido en una solución de suero normal de cabra al 1% en PBS. Las secciones fueron lavadas y colocadas por 1 hora en ABC (complejo avidina-biotina, PK-4001, Vector Laboratories), seguido de lavados en PBS y buffer acetato de sodio 100 mM. La reacción de visualización se llevó a cabo mediante el uso de níquel sulfato, diaminobencidina (DAB) y peróxido de hidrogeno en buffer acetato de sodio. Después de aproximadamente 2 minutos 15 segundos, la reacción fue interrumpida y se realizaron lavados en buffer acetato seguido por buffer PBS. Por último, las secciones se montaron en portaobjetos, se secaron al aire, se deshidrataron, y se cubrieron con cubreobjetos. Las secciones cerebrales de animales de diferentes grupos fueron procesadas simultáneamente de modo de compensar la variabilidad de la técnica.

Análisis microscópico y cuantificación

El análisis de las neuronas IR para *c-Fos* se llevó a cabo mediante la utilización de métodos estándares previamente publicados (Olazábal & Morrell, 2005, Kalinichev et al., 2000). Para cada cerebro, se realizaron tres series completas de secciones. Sólo una serie de secciones correspondiente a cada animal fue utilizada para el análisis y la misma fue procesada simultáneamente con secciones cerebrales de diferentes grupos comportamentales. Las secciones cerebrales fueron examinadas microscópicamente para las neuronas *c-Fos-IR*, estas neuronas se caracterizan por presentar una forma redondeada y una tinción muy oscura de su núcleo, negro o morado/purpura. El número de neuronas que expresan *c-fos* en cada una de las áreas de interés fueron cuantificadas unilateralmente y utilizando un área cuadrada de $0,06 \text{ mm}^2$ ($0,25 \text{ mm} \times 0,25 \text{ mm}$, Figura 6 y 7). Se estableció un criterio densitométrico para identificar las células marcadas y éstas fueron contadas automáticamente utilizando el Software ImageJ. El análisis consistió en crear una imagen binaria, la cual es invertida y se elimina el background (55 píxeles). Posteriormente, se ajustó el umbral de la imagen al punto en el que las células inmunomarcadas con *c-Fos* eran detectadas por el programa (“máximo local” de la imagen: 140). Asimismo, se verificó visualmente que el número de neuronas identificadas como IR automáticamente coincidiera con lo observado visualmente. La localización de la unidad de muestreo (representado por el cuadrado negro) en cada una de las áreas de interés: NAc (*core* y *shell*), dLS, vLS, dmMPOA, MPN, cMPOA, vlMPOA, AH, VMH, AmC y AmM, se muestran en las figuras 6 y 7.

Análisis estadístico

Los datos para el número de neuronas que expresan *c-fos* en cada una de las regiones cerebrales, fueron chequeadas para los supuestos de Normalidad y Homogeneidad de Varianza, y analizados mediante ANOVA de una vía seguida de Fisher's pos hoc o t test en el caso de machos. En el caso de aquellas áreas en donde el número de neuronas IR para *c-fos* en hembras PC y PI no fueron diferentes, los datos fueron agrupados y comparados con las hembras NP y Ctl. Los datos son expresados como media $\pm$ error estándar (ES). La significancia estadística fue establecida en $p < 0,05$.

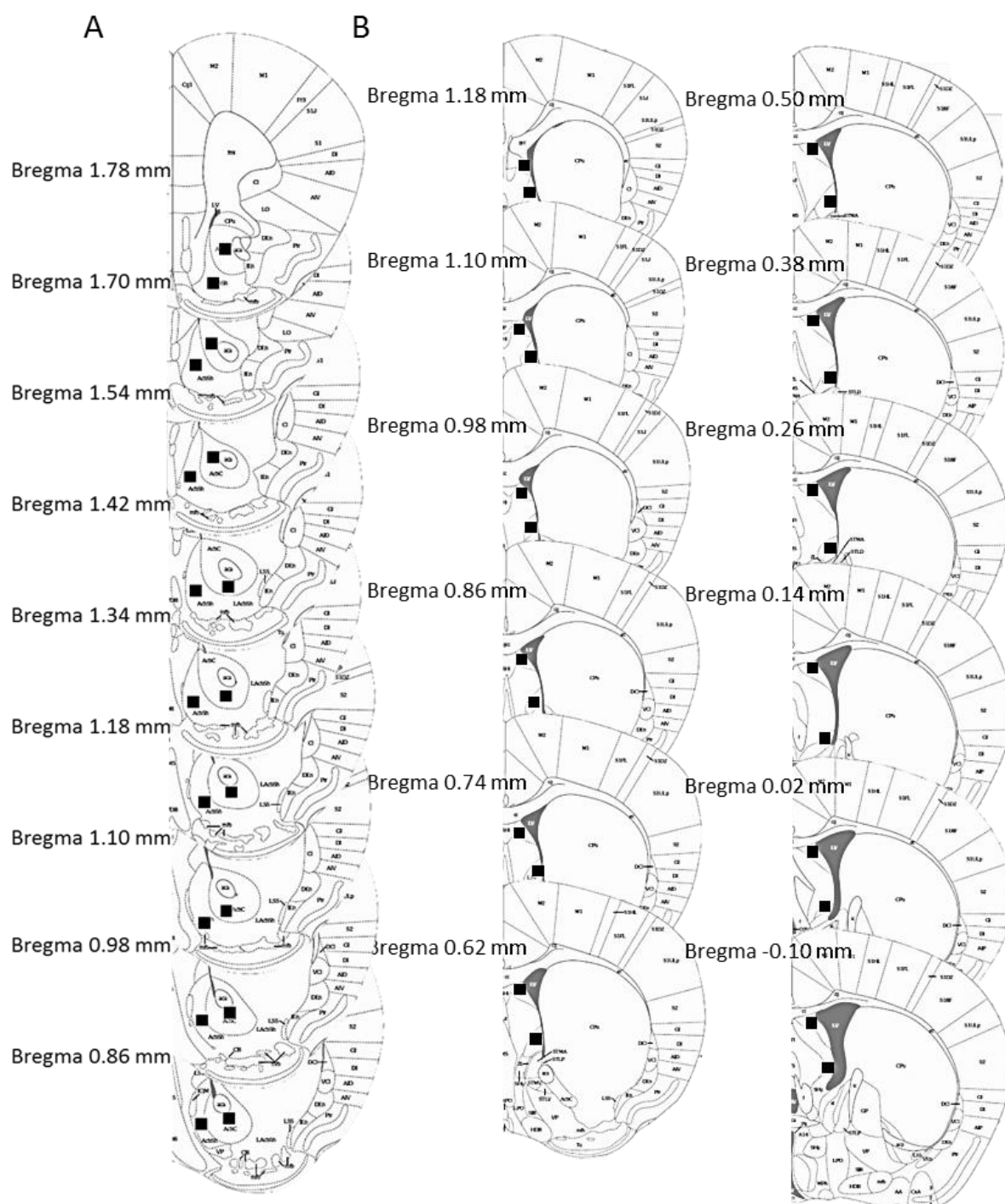


Figura 6. Diagrama del cerebro de ratón mostrando la localización de muestreo (cuadrado negro) de las neuronas inmunoreactivas (IR) para c-Fos. *Panel A*, muestreo en el Núcleo Accumbens (NAc) en las subregiones *core* y *shell*. A la derecha, *Panel B*, muestreo en el septo lateral dorsal (dLS) y septo lateral ventral (vLS). Diagrama tomado de: The mouse brain in Stereotaxic Coordinates, 3th ed., K. Franklin and G.Paxinos.

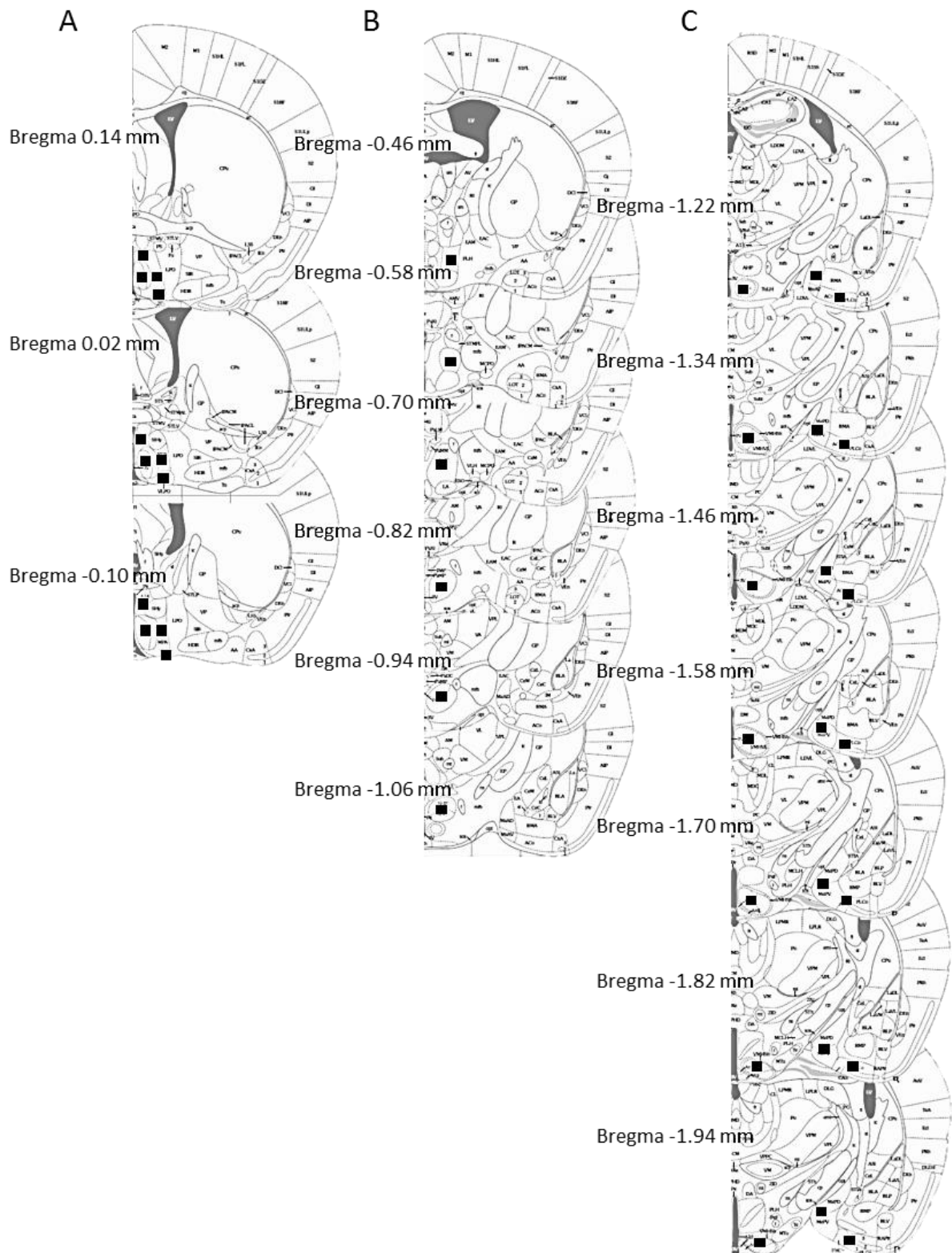


Figura 7. Diagrama del cerebro de ratón mostrando la localización de muestreo (cuadrado negro) de neuronas inmunoreactivas (IR) para c-Fos. *Panel A*, muestreo en el MPOA región dorso-medial (dmMPOA), Núcleo preóptico medial (MPN), MPOA región central (cMPOA), MPOA región vetrolateral (vlMPOA). A la derecha muestreo de neuronas inmunoreactivas (IR) en el hipotálamo anterior (AH, *Panel B*). El *Panel C* muestra la representación de las muestras tomadas en el

hipotálamo ventromedial (VMH), Amígdala cortical (AmC) y Amígdala medial (AmM). Diagrama tomado de: The mouse brain in Stereotaxic Coordinates, 3th ed., K. Franklin and G. Paxinos.

RESULTADOS

Durante los primeros 15 min de exposición a las crías el 37,5% (6/16), 31,3% (5/16), 31,3% (5/16), 0% (0/16) de las hembras inexperimentadas adultas desplegó comportamiento PC, PI, NP e I respectivamente. A lo largo de todas las series de experimentos (5), cinco hembras fueron descartadas ya que su despliegue conductual (categoría asignada) ya había sido obtenida durante esa sección. Por otra parte, el 25% (2/8) y 75% (6/8) de los machos inexperimentados mostraron comportamiento PI e I respectivamente. Todos los machos atacaron a las crías dentro de los primeros 5 min ($2,0 \pm 0,7$ min) de exposición a las crías. Como el número de machos que desplegó comportamiento PI (2) no alcanzó al n óptimo, los mismos fueron eliminados de subsiguiente análisis. Asimismo, ningún macho desplegó comportamiento NP. No se utilizaron machos sin ninguna exposición ya que esperábamos obtener animales NP para compararlos con aquellos infanticidas, así la exposición a un canasto nos permitiría determinar las áreas reclutadas en respuesta a la presencia de las crías vs. a la de un objeto no social novedoso.

Expresión de *c-fos* en hembras que despliegan comportamiento parental o no parental

El análisis de la expresión de *c-fos* en la región core del NAc no mostró diferencias significativas entre los diferentes grupos de hembras ($F=1,2$; $p=0,3$; Figura 8, Panel A). En la región *shell* del NAc aquellas hembras que desplegaron comportamiento PC durante 15 min de exposición a las crías, expresaron significativamente más *c-fos* en dicha área ($F=1,8$; $df=3$; $p<0,05$, Figura 8, Panel B) pero únicamente en comparación a las hembras NP. Las hembras PC no fueron significativamente diferentes de las hembras Ctl ($p=0,4$) o PI ($p=0,1$).

El número de neurona *c-Fos-IR* en las diferentes subregiones del MPOA de los diferentes grupos de hembras no mostró diferencias significativas (MNP, $p=0,6$; cMPOA, $p=0,3$; dmMPOA, $p=0,9$; vlMPOA, $p=0,7$, Figura 9, Panel, A, B, C, D). Tampoco cuando fueron agrupadas las hembras PC y PI (MNP, $p=0,3$; cMPOA, $p=0,1$; dmMPOA, $p=0,9$; vlMPOA, $p=0,7$). Sin embargo, en el cMPOA tendieron a mostrar niveles más altos de *c-fos* las hembras parentales (PC más PI) en relación a las NP ($p=0,08$). No se encontraron

diferencias significativas en el análisis de la expresión de *c-fos* en las subregiones dorsal ($p=0,3$) y ventral ($p=0,7$) del LS (Figura 10).

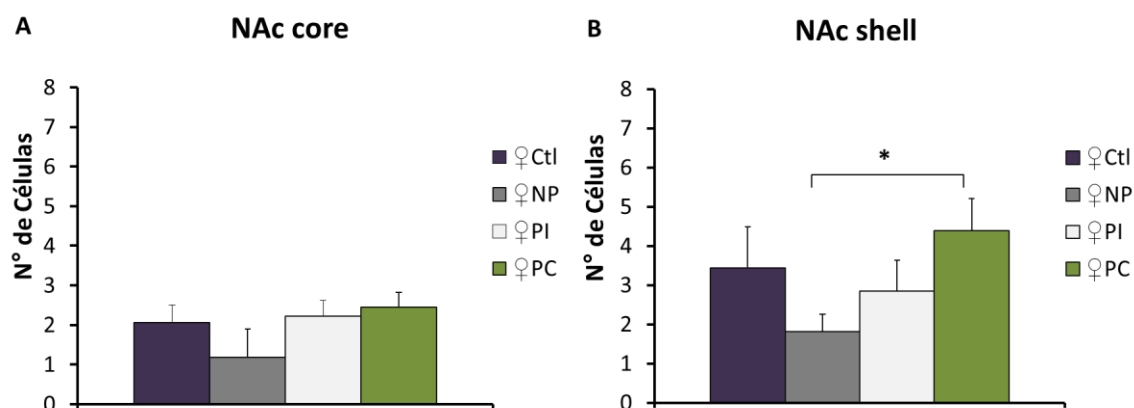


Figura 8. Número de neuronas c-Fos-IR ($\pm$ ES) en el *core* (Panel A) o en el *shell* (Panel B) del NAc, cuando hembras desplegaron o no comportamiento parental. PC: parental completo, PI: parental incompleto, NP: no parental, Ctl: control, sin ninguna exposición. La significancia estadística entre los grupos es indicada con $*(p<0,05)$. Los datos son expresados como media $\pm$ ES.

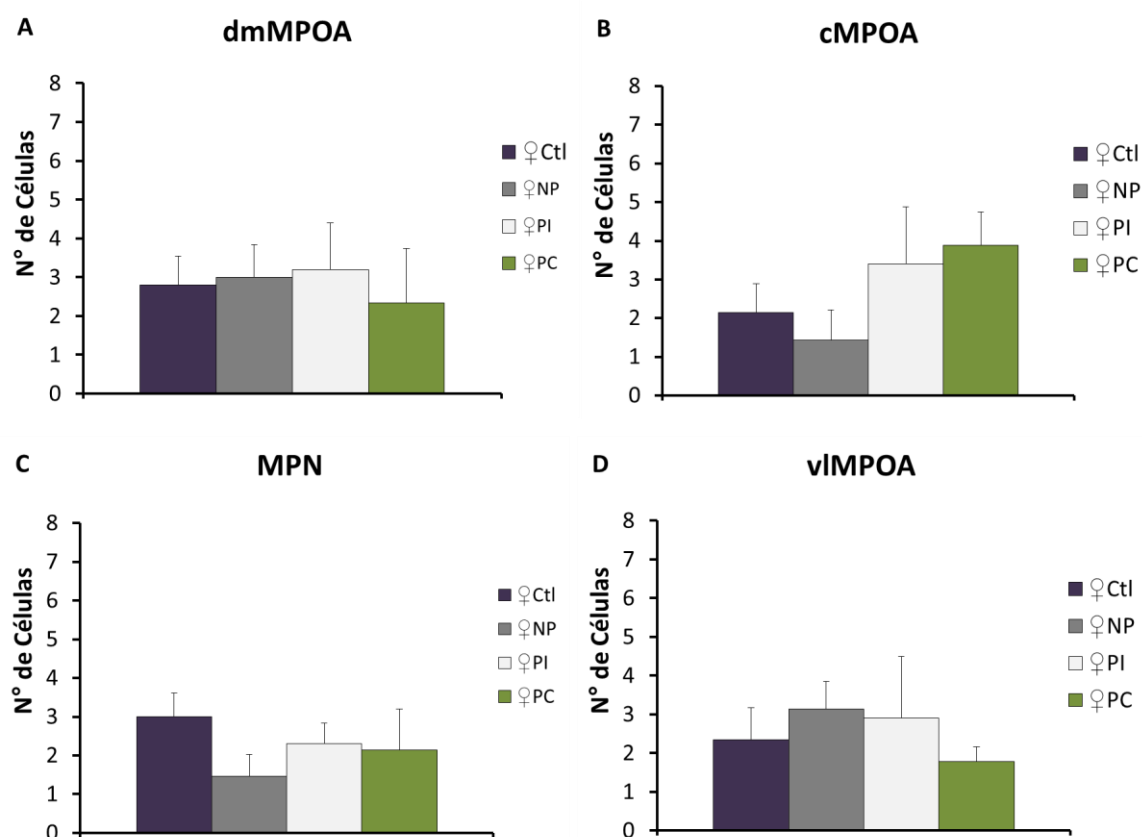


Figura 9. Número de neuronas c-Fos-IR ($\pm$ ES) en dmMPOA (Panel A), cMPOA (Panel B), MPN (Panel C), vIMPOA (Panel D), cuando hembras desplegaron o no comportamiento parental. PC:

parental completo, PI: parental incompleto, NP: no parental, Ctl: control, sin ninguna exposición. Los datos son expresados como media $\pm$ ES.

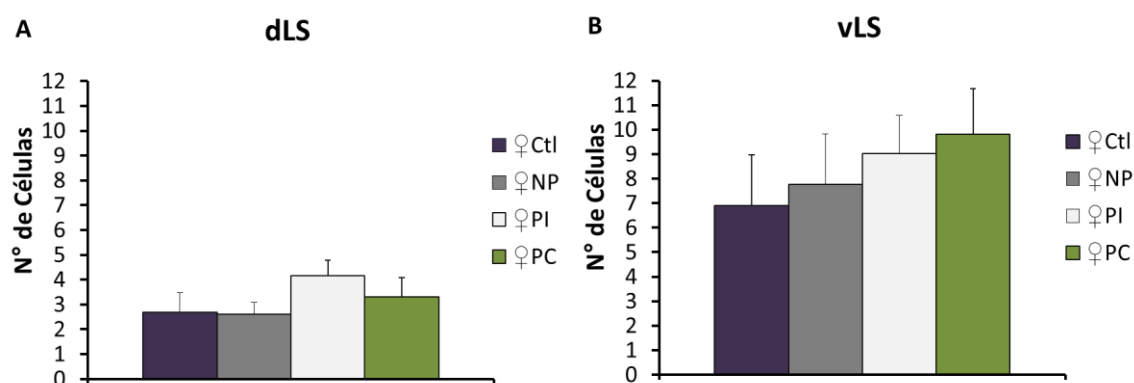


Figura 10. Número de neuronas c-Fos-IR ($\pm$ ES) en el vLS (Panel A) y dLS (Panel B), cuando hembras desplegaron o no comportamiento parental. PC: parental completo, PI: parental incompleto, NP: no parental, Ctl: control, sin ninguna exposición. Los datos son expresados como media $\pm$ ES.

El análisis de la expresión de *c-fos* en el AH (Figura 11, Panel A) no mostró diferencias significativas entre los diferentes grupos de hembras ($p=0,6$). Los diferentes grupos conductuales de hembras expuestas a crías tampoco mostraron diferencias significativas en el número de células c-Fos-IR en el VMH ($p=0,3$, Figura 11, Panel B). Si bien no alcanzó la significancia estadística establecida, aquellas hembras que fueron parcialmente parentales, tendieron a mostrar niveles más altos de *c-fos* en dicha área en comparación a las hembras Ctl ($p=0,09$), NP ($p=0,05$) y PC ($p=0,08$).

En la AmC, no se encontraron diferencias significativas, sin embargo, las hembras PI mostraron un aumento en el número de las células c-Fos-IR cercano al nivel de significancia establecida ($F=1,4$; $df=3$; $p=0,07$, Figura 11, Panel C, Figura 12) en comparación al Ctl. No se encontraron diferencias entre las hembras PC ($p=0,5$) o NP ($p=0,5$) respecto al control. Se evidenció un aumento significativo en las neuronas c-Fos-IR en la AmM de hembras PI ($F=1,4$; $df=3$; $p<0,05$, Figura 11, Panel D, Figura 12) en comparación a las hembras Ctl. Las hembras PC y NP no fueron diferentes en comparación al Ctl ($p=0,4$; $p=0,3$, respectivamente).

Los presentes resultados sugieren que en las hembras de ratón, la activación de la subregión *shell* podría estar implicada en la respuesta PC, mientras que la amígdala estaría participando en la transición de no parental a completamente parental durante una exposición de 15 min a las crías.

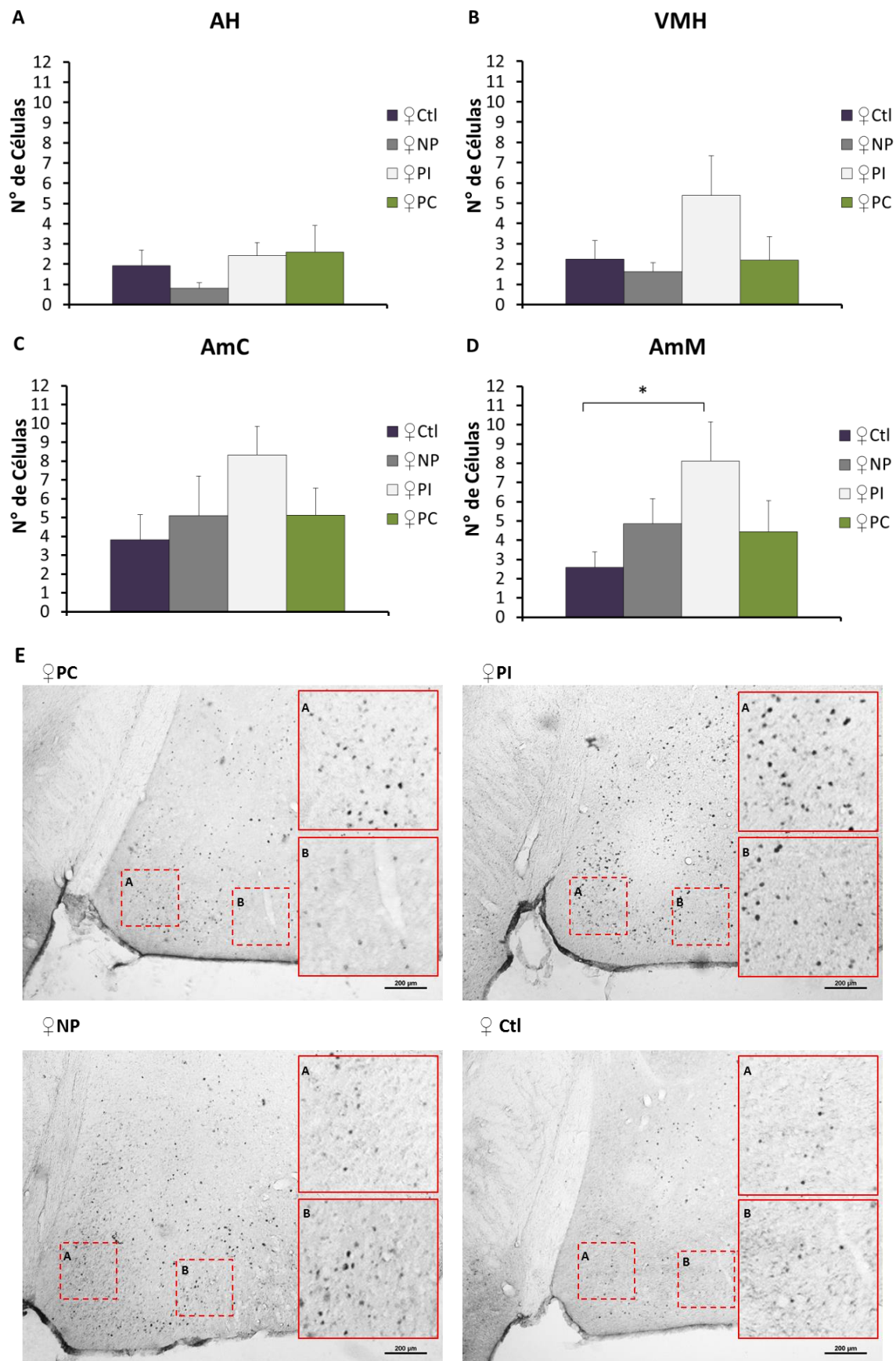


Figura 11. Número de neuronas c-Fos-IR ($\pm$ ES) en el AH (Panel A), VMH (Panel B), AmC (Panel C) y AmM (Panel D), cuando hembras desplegaron o no comportamiento parental. PC:

parental completo, PI: parental incompleto, NP: no parental, Ctl: control, sin ninguna exposición. La significancia estadística entre los grupos es indicada con * ($p < 0.05$). Los datos son expresados como media $\pm$ ES. Panel E. Representación fotográfica de las neuronas que expresan *c-fos* en la AmM (A) y AmC (B). El área enmarcada dentro del área de línea continua representada una mayor magnificación del área punteada. Barra de escala 200 μ m.

Expresión de *c-fos* en machos que despliegan infanticidio

Los machos infanticidas o aquellos que fueron expuestos a un objeto novedoso (canasto) no mostraron diferencias en la expresión de *c-fos* en el *core* o *shell* del NAc ($t=0,96$; $t=0,97$; $df=1$; $p=0,3$, Figura 13). Tampoco se encontraron diferencias significativas entre machos infanticidas y expuestos a un canasto en el dLS ($t=1,5$; $p=0,1$; Figura 13) o vLS ($t=0,2$; $p=0,8$; Figura 13).

La expresión de *c-fos* mostró un aumento significativo en vMPOA de los machos que desplegaron infanticidio ($t=2,4$; $df=1$; $p < 0,05$; Figura 14) en comparación a los machos expuestos a un objeto novedoso. No se encontraron diferencias en las restantes subregiones del MPOA entre machos infanticidas y los expuestos a un canasto (MNP, $t=0,2$; cMPOA, $t=1,1$; dmMPOA, $t=0,1$; pvMPOA, $t=0,4$; Figura 14).

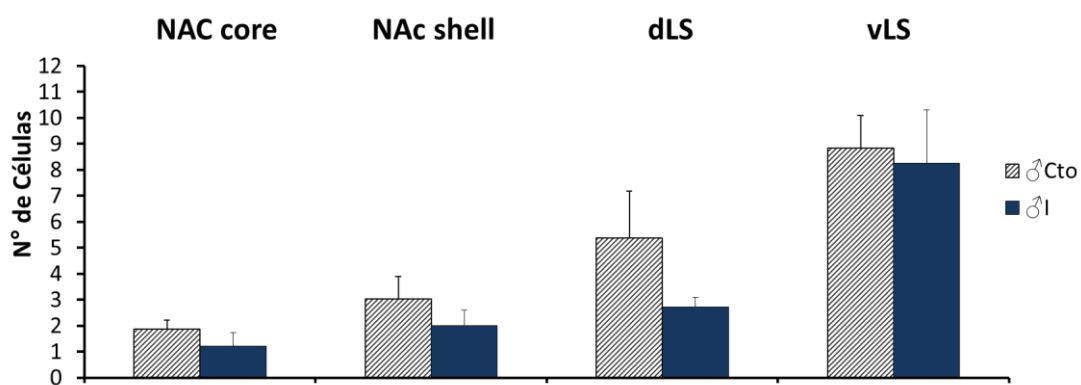


Figura 13. Número de neuronas c-Fos-IR ($\pm$ ES) en el *core* y *shell* del NAc, en la región dorsal (dLS) y ventral (vLS) del LS, cuando machos desplegaron infanticidio (I) o fueron expuestos a un objeto novedoso (canasto). Los datos son expresados como media $\pm$ ES.

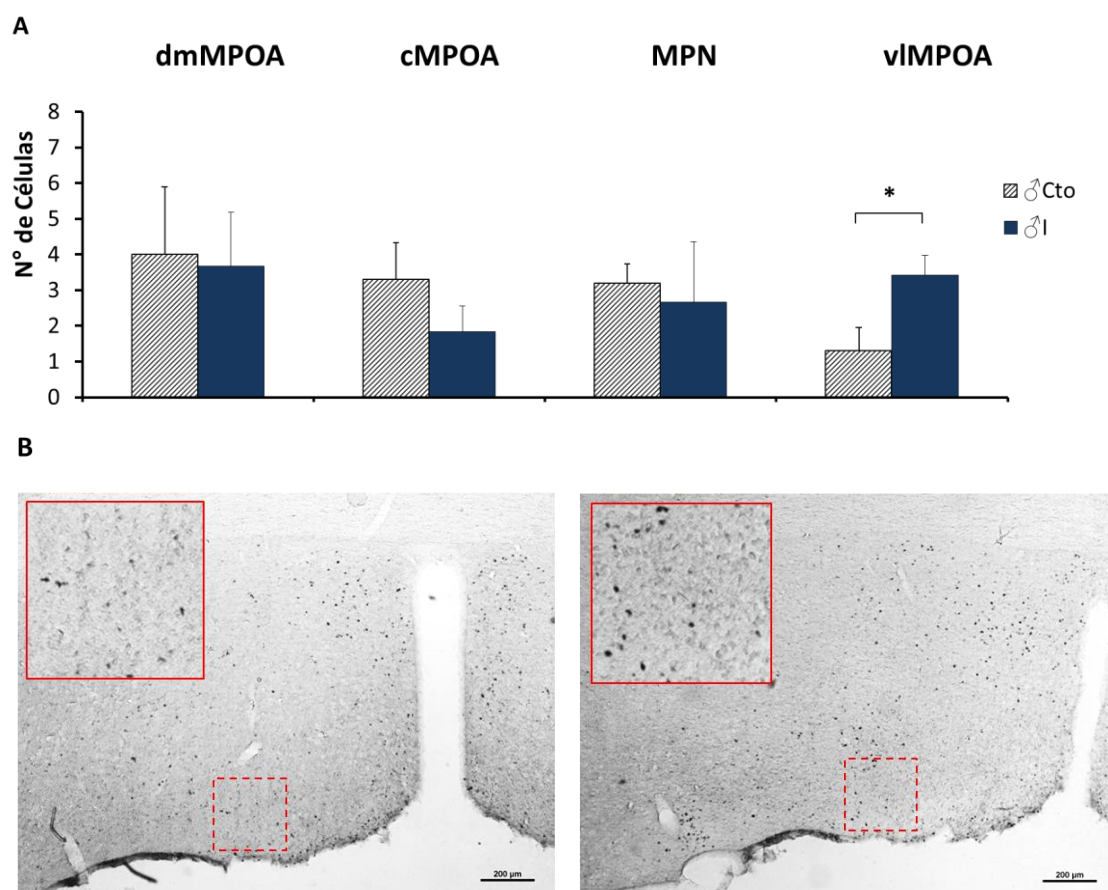


Figura 14. Número de neuronas c-Fos-IR ($\pm$ ES) en las diferentes subregiones de MPOA (*Panel A*) dorso-medial, central, núcleo medial del MPOA y ventro-lateral, cuando machos desplegaron infanticidio (I) o fueron expuestos a un objeto novedoso (canasto). La significancia estadística entre los grupos es indicada con * ($p < 0,05$). Los datos son expresados como media $\pm$ ES. *Panel B.* Representación fotográfica de las neuronas c-Fos-IR en el vIMPOA cuando machos adultos fueron expuestas a 2 crías y desplegaron Infanticidio (izquierda) o fueron expuestos a canasto (derecha). El área enmarcada dentro del cuadrado de línea continua representada una mayor magnificación del área punteada. Barra de escala 200 μ m.

No se encontraron diferencias significativas en la expresión de *c-fos* en aquellos machos que desplegaron infanticidio o fueron expuestos a un objeto novedoso en el AH ($p=0,1$; Figura 15), en la AmC ($p=0,4$; Figura 15) y AmM ($p=0,8$; Figura 15). Sin embargo, aquellos machos que fueron expuestos a un canasto, mostraron un mayor número de neuronas c-Fos-IR en el VMH en comparación a los infanticidas ($t=2,3$; $df=1$; $p < 0,05$; Figura 15).

Los resultados muestran que la respuesta infanticida desplegada por los machos de ratón y el ataque a las crías podría estar mediada por una mayor activación de la región ventrolateral del MPOA.

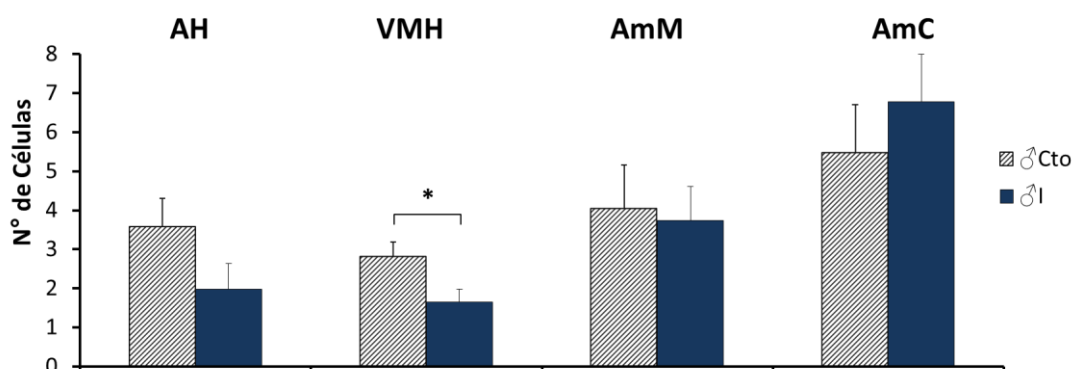


Figura 15. Número de neuronas c-Fos-IR ($\pm$ ES) en el AH, VMH, AmC y AmM, cuando machos desplegaron infanticidio (I) o fueron expuestos a un objeto novedoso (canasto). La significancia estadística entre los grupos es indicada con * ($p < 0,05$). Los datos son expresados como media $\pm$ ES.

DISCUSIÓN

Expresión de c-fos en hembras que despliegan comportamiento parental o no parental

El NAc ha sido implicado clásicamente en la integración entre motivación y la respuesta comportamental frente a estímulos tanto apetitivos, como aversivos. La función de este núcleo sería una interface entre el sistema límbico y el sistema motor extrapiramidal o del comportamiento motor-asociado (Mogenson et al., 1980). Dicha área está formada por dos subdivisiones denominadas *shell* y *core* (Heimer, et al., 1991; Záborszky et al., 1985). Asimismo, existe una vasta evidencia que propone que el NAc estaría implicado en el procesamiento de las crías y facilitación del comportamiento parental (Hansen et al., 1993; Lonstein et al., 1998; Keer & Stern, 1999; Li & Fleming, 2003ab; Numan & Insel, 2003; Champagne et al., 2004; Olazábal et al., 2013; Olazábal & Morrell, 2005; Olazábal & Young, 2006ab). El modelo clásico de Numan (2006) y Numan & Stolzenberg (2009) propone que el MPOA bajo la acción de las hormonas de la preñez, activa neuronas dopaminérgicas del VTA que proyectan al NAc promoviendo así comportamiento parental. En la presente tesis no se encontraron diferencias significativas en la activación de la región *core* del NAc en los diferentes grupos de hembras. Clásicamente se ha atribuido al *core* del NAc un carácter de orientación motora, así, los procesos de

integración mesolímbica tendrían lugar en el *shell*, el cual modificaría la actividad motora del *core* a través de la corteza prefrontal (Salamone, 1992). Experimentos en ratas, han mostrado una mayor expresión de *c-fos* en el *core* de aquellos animales NP que son expuestos a las crías por primera vez sugiriendo un rol en acciones asociadas a su presencia (Olazábal & Morrell, 2005). Sin embargo, en la rata la respuesta inmediata a las crías es de evasión y neofobia, mientras que esta respuesta es ausente en el ratón. La ausencia de diferencias podría sugerir que las diferentes respuestas conductuales (durante 15 min) no recaerían en una activación diferencial de esta área. En cuanto al *shell* del NAc, encontramos que sólo aquellos animales que desplegaron todos los parámetros comportamentales asociados a la respuesta parental (PC) mostraron niveles más altos en la expresión de *c-fos* pero únicamente en comparación a los NP, no difiriendo del grupo Ctl. El *shell* recibe además, aferencias glutamatérgicas, desde el VTA, hipocampo, amígdala y corteza prefrontal (Heimer et al., 1991). Olazábal y Morrell (2005) examinaron dicha área en ratas hembras juveniles y adultas, maternas (sensibilizadas) y no maternas. Estos autores encontraron una mayor activación de dicha áreas sólo en ratas adultas NP expuestas a las crías por primera vez en relación a aquellas sensibilizadas, sugiriendo que esta área podría estar participando en el procesamiento de las crías como estímulo novedoso y la asignación de una mayor saliencia a las mismas en este grupo. En esta tesis, todos los animales fueron expuestos a las crías por primera vez, diferenciándose únicamente en el interés por las crías y el comportamiento desplegado. El hecho de que sólo aquellas hembras que desplegaron comportamiento PC mostraran una mayor expresión de *c-fos* en esta área, sugiere que el despliegue de comportamiento parental y la presencia de las crías por primera vez resulta en una mayor saliencia en este grupo en relación a las hembras NP. Sin embargo, este resultado podría esclarecerse luego de un mayor período de interacción con las crías, el cual aumente el valor/saliencia de las mismas en los animales parentales. Dicha posibilidad será evaluada en futuros experimentos de modo de obtener un correlato temporal de activación más claro a la hora de concluir. No obstante, es posible que la activación de la región *shell* del NAc esté participando en el procesamiento de las crías y el despliegue de respuesta inmediata PC durante 15 min. En la presente tesis, el número de células cuantificadas que expresan *c-fos* (dentro de una unidad de área de 0.055 mm^2 , $\sim 200 \text{ células/mm}^2$) parece ser muy bajo; sin embargo coincide con los valores reportados por Szymanski y Keller (2014) en el MPOA y VMH del ratón (CD-1), utilizando áreas de muestreo muy similares. Asimismo, no se

aleja demasiado de lo reportado por Olazábal y Morrell (2005) en la rata utilizando una unidad de muestreo mayor (0.142 mm^2 , $\sim 500 \text{ células/mm}^2$).

El MPOA, ha sido extensamente asociado a la facilitación y expresión de comportamiento maternal en roedores (de Jong et al., 2009; Calamandrei & Keverne, 1994; Kirkpatrick et al., 1994; Kuroda et al., 2007; Numan et al., 1977; Numan & Numan 1994; Tsuneoka et al., 2013). Sin embargo, en el presente trabajo el análisis del MPOA y sus diferentes subdivisiones, no mostró ninguna diferencia significativa, lo que sugiere que 15 min no serían suficientes para reclutar la expresión de *c-fos* en dicha área, incluso en animales completamente parentales. Resulta interesante el hecho de que los animales son capaces de desplegar comportamiento PC a pesar de no mostrar una mayor activación de ésta área. No obstante, este hecho ya ha sido reportado por otros autores, quienes encontraron que ratas juveniles sensibilizadas, no exhiben un aumento sustancial en la activación de dicha área (MPOA) a pesar de ser parentales, lo que también sugeriría que otras áreas deben estar participando en la respuesta parental en aquellas especies que son rápidamente inducidos a desplegar comportamiento parental y/o la expresión de *c-fos* en el MPOA no sería necesaria para la ejecución de la conducta (Olazábal & Morrell, 2005). El trabajo clásico de Calamandrei & Keverne (1994) propone que la activación de *c-fos* en el MPOA fue mayor sólo en aquellas hembras de ratón que podían interaccionar con las crías durante 30 min, sin embargo estos autores encuentran que el 100% de los animales despliega todos los componentes del comportamiento parental, resultado que difiere de lo encontrado en la presente tesis y otros trabajos. Además, dicha cuantificación incluye todo el MPOA. Asimismo, diferentes subregiones del MPOA, como la región vMPOA, también muestran activación de *c-fos* en ratas no maternas (NP) expuesta a las crías por primera vez (Sheehan et al., 2000), así como el MPN en ratones infanticidas (Tachikawa et al., 2013). En este sentido, los resultados de machos de la presente tesis, indican que el procesamiento aversivo o el ataque de las crías podría estar vinculado a una mayor activación de la región ventrolateral del MPOA. En la rata, las hembras que muestran comportamiento parental expresan *c-fos* en el MPOA, sin embargo la mayoría de estos trabajos ha sido llevado a cabo en animales lactantes o sensibilizados por varios días, lo que implica, además del perfil hormonal, un mayor tiempo de interacción (Fleming & Korsmit, 1996; Numan & Numan 1994; Numan et al., 1998; Stack & Numan, 2000). Asimismo, la región dorsal del MPOA ha sido implicada en el acarreo de las crías en la rata y ratón (Lee & Brown, 2002, Numan et al 1990; Sheehan et al., 2000). No obstante, también se ha reportado un aumento de *c-fos* en la región dorsal del MPOA de machos

infanticidas (Kuroda et al., 2007), sugiriendo que su participación podría ser más generalizada en el procesamiento de las crías. El MPOA tiene una población neuronal heterogénea, el 25-45% tiene receptores para estrógenos y el 53% para GABA, por lo que diferentes poblaciones de neuronas podrían jugar diferentes rol en el procesamiento de la información relacionada al comportamiento parental o al procesamiento de las crías (Lonstein & De Vries, 2000; Kuroda et al., 2007; 2011). Asimismo, un estudio reciente propone que un porcentaje de neuronas que se activan en el MPOA durante el despliegue de comportamiento parental en el ratón expresan galanina, por lo que éste neuropéptido podría estar implicado en la facilitación de la respuesta parental y sería un buen predictor del comportamiento parental (Wu et al., 2014). Finalmente, nuestros resultados difieren de lo reportado por Tsuneoka y col. (2013), donde el despliegue de comportamiento PC durante 30 min llevó a un aumento significativo en el MPOA particularmente en la región central (región donde lesiones inducen infanticidio). Sin embargo, en dicho trabajo, los autores encuentran un número muy bajo de neuronas c-Fos-IR, lo que los llevó a establecer un umbral más bajo a la hora de poder cuantificar. Si bien en el presente trabajo, en una interacción con las crías de 15 min, no encontramos un aumento significativo en ninguna de las subregiones del MPOA, no descartamos la posibilidad de que una interacción durante un tiempo mayor (60 min), pongan en evidencia el rol del MPOA. En este sentido, particularmente de la región central ya que las hembras parentales (PC más PI) tendieron a mostraron niveles más altos de *c-fos* en esta subregión pero sólo en comparación a las NP.

El LS, es un área del sistema límbico el cual recibe inervación glutamatérgica principalmente desde el hipocampo y contiene neuronas de proyección GABAérgicas, las cuales están densamente interconectados con el hipotálamo (lateral y medial), y regiones del cerebro medio, como la sustancia periacueductal gris, las cuales resultan clave en el control de varias respuestas motivadas (Sheehan et al., 2004). Asimismo, recibe inervación desde la amígdala, núcleo de la estría terminalis, corteza prefrontal y entorrinal, las cuales han sido implicadas en la regulación de estados emocionales (Sheehan et al., 2004). Muchos autores han estudiado el rol del LS en el despliegue de comportamiento parental. Lesiones electrolíticas del LS en hembras lactantes de ratón (Carlson & Thomas, 1968; Slotnick & Nigrosh, 1975), rata (Fleischer & Slotnick, 1978) y conejo (Cruz & Beyer, 1972) provocarían un deterioro importante del comportamiento parental y un aumento de la respuesta infanticida. Diferentes subregiones del LS han sido propuestas en la facilitación o inhibición del comportamiento parental en la rata, conejo y ratón

(González-Mariscal et al., 2009; Kirkpatrick et al., 1994; Sheehan et al., 2000). Específicamente, la región dorsal del LS ha sido asociada a la facilitación del comportamiento parental, mientras la región ventral (vLS) a la inhibición (Olazábal et al., 2013a; Sheehan et al., 2000). Los resultados de ésta tesis muestran una ausencia de participación de las subregiones dorsal y ventral del LS, en las diferentes respuestas conductuales durante una exposición de corta duración. En este sentido, el LS recibe inervación dopaminérgica y oxitocinérgica, dos sistemas que están involucrados en el comportamiento parental, por tanto dicha inervación podría desinhibir o estimular dicha área facilitando la respuesta parental (Champagne et al., 2001; Olazábal et al., 2013a). Clásicamente, el LS también ha sido asociado a la regulación de la respuesta de ansiedad/estrés. Así, muchos estudios han mostrado una mayor activación de esta área en animales expuestos a una variedad de estímulos que provocan estrés-ansiedad (ver Sheehan et al., 2004). Sin embargo, la expresión de *c-fos* inducida ante estímulos del tipo estresor no es homogénea dentro de todo el LS. Tanto en el ratón (Mongeau et al., 2003) como en la rata (Salomé et al., 2004) prevalece la activación de la región ventral del LS. En el estudio de Sheehan y col. (2000) ratas vírgenes no maternales, expuestas a crías por primera vez (2 hr), mostraron una mayor activación de dicha área, lo que llevó a involucrar esta área en la inhibición del comportamiento parental. Sin embargo, a diferencia del ratón, la respuesta inmediata de la rata es NP o respuesta de aversión/neofobia. No obstante, el ratón de California, una especie biparental, también muestra una mayor expresión de *c-fos* en el vLS cuando los animales resultan parentales en una primera exposición a las crías durante 3 hrs (Kirkpatrick et al., 1994). Estas discrepancias podrían explicarse en términos del análisis de especies diferentes y en diferentes tiempos de exposición. En este sentido, en la presente tesis se analiza la respuesta inmediata durante 15 min de exposición a las crías, y los resultados sugieren que el reclutamiento de estas subregiones no serían clave en la ejecución de uno u otro comportamiento

En la rata se ha propuesto la existencia de un circuito neural que regula la inhibición de la conducta parental, el cual incluye al sistema olfatorio principal y accesorio, y sus proyecciones hacia el sistema límbico, como la amígdala (Fleming et al., 1980; Numan et al., 2006). Lesiones de la amígdala inducen comportamiento parental rápidamente en la rata (Fleming et al., 1980). Por lo que se sugirió que la principal función de la amígdala era la detección de una amenaza en el ambiente y la respuesta de miedo, y el procesamiento emocional e información social relevante. En el ratón de la pradera el

despliegue de comportamiento parental induce expresión de *c-fos* en la amígdala, asimismo, lesiones de la misma deteriora la respuesta parental (Kirkpatrick et al., 1994). Por otra parte, en el ratón, la presencia de las crías per se (con o sin interacción) recluta la amígdala corticomedial (Calamandrei & Keverne, 1994). De modo interesante, en ésta tesis, encontramos que solo aquellas hembras categorizadas como PI, mostraron una sustancial expresión de *c-fos* en la AmM, mientras que en la AmC el aumento de *c-fos* estuvo cercano al nivel de significancia. Este resultado apoya que las hembras adultas de ratón a diferencia de la rata, no muestra aversión hacia a las crías, ya que aquellas hembras que no cuidaron de las crías (NP), no mostraron una mayor activación en comparación a aquellas que fueron completamente parentales (Sheehan et al., 2000). Solo las hembras que realizaron algunas conductas parentales pero no todas, mostraron una activación de dicha área, un área que clásicamente ha sido asociada a la inhibición del comportamiento parental. Por lo que dicha área podría tener una mayor activación transitoria hasta que el animal despliegue todos los componentes de la conducta parental. El hecho de que sean parcialmente parentales podría sugerir que estén frente a la resolución de un conflicto o ambivalencia, motivación maternal vs. temor o inexperiencia o conflicto con otras motivaciones, por tanto el procesamiento emocional sería diferencial. Asimismo, este resultado está de acuerdo con el Experimento I y II de la presente tesis, el análisis detallado de todos los parámetros comportamentales y secuencia conductual, así como las bases neurales, difiere en aquellas hembras que despliegan comportamiento PC o PI.

Finalmente, otras áreas que han sido asociadas con la inhibición del comportamiento parental incluyen el Hipotálamo anterior (AH) y el núcleo ventromedial del hipotálamo (VMH) (Bridges et al., 1999; Fleming et al., 1980; Morgan et al., 1997; Numan et al., 1993). En este sentido, no encontramos diferencias significativas en la activación del AH en ninguno de los grupos. Con respecto al VMH, las hembras no exhibieron cambios significativos en la expresión de *c-fos* en los diferentes grupos, sin embargo, las hembras que realizaron algunas conductas parentales (PI) mostraron niveles más altos de *c-fos* que estuvieron cercanos a los niveles de significancia establecida, sugiriendo una posible participación de ésta en la ausencia de respuesta parental completa. Asimismo, esta posibilidad está de acuerdo con el resultado obtenido en la AmM.

Expresión de *c-fos* en machos que despliegan infanticidio

En el caso de los machos, esta tesis muestra que la respuesta infanticida y el procesamiento de las crías, no estaría asociada a la participación de las subregiones *core* y *shell* del NAc. Es interesante destacar que el valor asignado (atractivo o aversivo) a las crías en la respuesta infanticida no está del todo claro aún. En este sentido, como ya se mencionó el NAc ha sido implicado en la respuesta comportamental frente a estímulos tanto atractivos como aversivos. En la presente tesis todos los machos atacaron a las crías dentro de los primeros 5 min de exposición a las crías. Por tanto, la ausencia de expresión diferencial de *c-fos* sugiere que la respuesta infanticida podría ajustarse a una respuesta inmediata la cual no requeriría una sustancial integración motivacional-motora o una activación diferencial de estas subregiones. Sin embargo, experimentos adicionales deben realizarse en el que los animales infanticidas puedan ser expuestos a las crías durante un tiempo mayor (por ejemplo fijos en un estereotáxico) ya que en este diseño los animales no fueron expuestos más de 5 min a las crías. De forma interesante, cabe mencionar que a pesar de la corta exposición a las crías, ésta fue suficiente para evocar una mayor activación de la región ventrolateral del MPOA.

El hallazgo de que machos infanticidas muestren una mayor activación de *c-fos* en vlMPOA, coincide con los resultados de Sheehan y col. (2000) en el que ratas no maternales tienen una concomitante activación de dicha área (ver también Olazábal et al., 2013a). Curiosamente, se ha propuesto una correlación entre la calidad del comportamiento parental desplegado por hembras lactantes y el aumento de los receptores de OXT en la región ventral del MPOA (Champagne et al., 2001), por lo que una menor expresión de receptores de OXT en el vlMPOA de ratones machos podrían facilitar el despliegue de infanticidio. Estudios complementarios son necesarios para corroborar la especificidad del rol del vlMPOA en la respuesta infanticida y parental. Por otra parte, estos resultados están en desacuerdo con los resultados previos de Kuroda y col (2007) en el que machos infanticidas expuestos a las crías durante un tiempo mayor al utilizado por nosotros (2 hr) muestran una mayor activación de *c-fos* específicamente en dmMPOA. Sin embargo estos autores no detallan aspectos metodológicos, como por ejemplo, si los animales estuvieron expuestos a las crías sólo hasta el momento del primer ataque, cuanto tiempo fue que los animales estuvieron expuestos a las crías, es decir, en que momento de las 2 hr los animales atacaron. Asimismo, los resultados de Tachikawa et al., 2013, proponen que los machos infanticidas expuestos a las crías (2 hr) pero dentro de un canasto similar al utilizado por nosotros, induce una mayor expresión de *c-fos* en el

MPOA (MPN y cMPOA), sin embargo la expresión no fue diferentes de exhibida por machos parentales en contexto reproductivo, sugiriendo una participación más generalizada de esta área en el procesamiento de las crías. Asimismo, diferencias en el tiempo de exposición a las crías (2 hr vs. ~5min) pueden explicar parte de las discrepancias.

El análisis de la expresión de *c-fos* en el LS, sugieren que las subregiones examinadas de esta área no estarían implicadas en la respuestas infanticida. Específicamente, la región ventral ha sido asociadas a la respuesta de ansiedad/estrés frente a estímulos estresores (Mongeau et al., 2003; Salomé et al., 2004). Por lo tanto, podría interpretarse que la presencia de las crías en aquellos machos infanticidas no resultaría en un estímulo estresante.

Finalmente, los machos expuestos a un canasto mostraron un número mayor de neuronas c-Fos-IR en el VMH. Esto difiere de lo reportado por Tachikawa y col. (2013), en el que machos infanticidas vírgenes, re-expuestos a las crías expresan significativamente más Fos en AH y VMH (específicamente en la región central y ventrolateral). Sin embargo, durante la segunda exposición, las crías eran colocadas dentro de un canasto similar al utilizado por nosotros (Tachikawa et al., 2013). No obstante, Sheehan y col. (2000) encontraron que cuando utilizaron bolitas como objetos novedosos, éstas inducen un aumento de Fos en el AH, región anterior de la AmM y vBST. El objeto novedoso (en nuestro caso un canasto), parece tener aspectos que lo vuelven un estímulo muy fuerte e incluso aversivo. En este sentido, el tiempo que los machos permanecieron alejados del canasto así como la frecuencia con la que olfatearon al mismo, fue significativamente mayor en comparación a las hembras expuestas a crías, incluso a aquellas que fueron NP (datos no mostrados). Por lo tanto, un estímulo cualitativamente diferente como un canasto, puede inducir una mayor expresión de Fos en relación a un estímulo social como son las crías, en áreas asociadas comúnmente al procesamiento y respuesta conductual hacia las crías, pero que también participan en el procesamiento de otros estímulos en general. Por otra parte, Lin y col. (2011) y Falkner y col. (2014), encontraron una sustancial asociación en el ratón entre la activación de la subdivisión ventrolateral del VMH y el despliegue de agresión. Asimismo, Olazábal y Morrell (2005), encontraron una mayor activación de la región ventrolateral y dorsomedial del VMH en ratas adultas NP que muestran aversión a las crías, no mostrando diferencias en la región central. Estas evidencias nos sugieren que el análisis de las diferentes subregiones del VMH, resulta necesario a la hora de interpretar estos resultados. En cuanto a la falta de

diferencias en la amígdala y AH, este hecho puede explicarse en términos de que el canasto *per se* podría tener un fuerte valor emocional, por lo que el análisis de las neuronas c-Fos-IR en animales NP y sin ninguna exposición resultan necesarios.

Todos estos resultados deben ser evaluados mediante un diseño que permita exponer a machos infanticidas durante un tiempo mayor, ya que como ya se mencionó, los machos infanticidas no fueron expuestos a las crías más de 5 min. Del mismo modo, el estímulo objeto novedoso (canasto) puede tener aspecto cualitativamente diferentes e incluso del tipo estresor, por tanto podrían estar enmascarando la respuesta en estas áreas en el grupo infanticida vs canasto, por lo que la adición del grupo sin exposición en los machos resulta indispensable para interpretar estos resultados.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El presente trabajo muestra que:

I. Existe una importante variabilidad en la respuesta inmediata desplegada por las hembras de ratón hacia las crías. Sólo un ~20% de las hembras adultas inexperimentadas son capaces de desplegar comportamiento parental completo, en una primera exposición a las crías.

II. Aunque las hembras de ratón son descriptas como “espontáneamente parentales”, esta respuesta es el resultado de un rápido proceso de sensibilización, similar al descrito en ratas aunque de menor duración.

III. Las hembras que exhiben comportamiento PC durante los primeros 15 min de exposición a las crías, mostraron niveles más altos en la expresión de *c-fos* en el *shell* del NAc, sin embargo esta diferencia fue únicamente en relación a las hembras no parentales (NP) ya que no fueron diferentes del Ctl.

IV. El MPOA, un área que ha sido extensivamente asociada a la facilitación/expresión del comportamiento parental, no mostró diferencias significativas en la expresión de *c-fos*. Este resultado sugiere que la activación diferencial de esta área o la expresión de *c-fos* no serían necesaria para el despliegue de la respuesta parental inmediata durante 15 min, por lo que otras áreas podrían estar participando en dicha respuesta.

V. El hecho de que la presencia de las crías durante 15 min indujo un aumento significativo de las neuronas expresando *c-fos* en la AmM en animales que no son completamente paternos (PI), sugeriría que la respuesta parental incompleta o la

ambivalencia comportamental podría estar dada por a una mayor activación transitoria de ésta área, un área clásicamente asociada a la inhibición del comportamiento parental.

VI. Por otra parte, si bien en una primera exposición a las crías, los machos de 60 días de edad fueron principalmente NP e I, una segunda exposición a las crías durante 15 min facilitó el despliegue de algunas conductas parentales (33.3%, PC o PI), sugiriendo que dependiendo del contexto y de la experiencia previa los machos inexperimentados pueden ser inducidos a desplegar comportamiento parental.

VII. A los 100 días de edad, el 100% de los machos desplegó I en una primera exposición. A diferencias de los machos de 60 días edad, una segunda exposición a las crías, no facilitó la respuesta parental, sugiriendo el desarrollo de la respuesta infanticida con la edad.

VIII. En los machos infanticidas, las neuronas del vIMPOA expresaron significativamente más *c-fos*. Interesantemente, mayores niveles de Fos en esta área han sido asociados a la inhibición de la respuesta parental en la rata. En el ratón, dicha área podría estar participando en el despliegue de infanticidio y/o inhibición de la respuesta parental.

La presente tesis constituye una primera etapa en la determinación de las bases neurales que están asociadas a la variabilidad en la respuesta inmediata hacia las crías en el ratón de laboratorio (C57BL/6). Fos constituye una herramienta correlacional ampliamente utilizada en el estudio del comportamiento parental. Si bien ésta técnica no nos permite adjudicar causalidad, ya que se debe considerar aspectos como por ejemplo, la posible activación de un área sin expresión de *c-fos* en la misma (falsos negativos), ésta constituye herramienta fundamental en un primer abordaje en el estudio de la variabilidad de la respuesta inmediata en el ratón. En este sentido, a partir de los resultados expuestos, planeamos continuar éstos experimentos.

En una primera instancia nos planteamos adicionar animales a cada grupo conductual así como incorporar un grupo de machos sin ninguna exposición (Ctl), machos que no despliegan comportamiento parental (NP) o fueron parcialmente parentales (PI) cuando son expuestos a las crías durante 15 min. Este diseño nos permitirá no solo obtener resultados más claros, sino que también determinar la especificidad en la respuesta comportamental.

Asimismo, de acuerdo a la ausencia de Fos en algunas áreas cerebrales las cuales han sido implicadas en la respuesta parental; sumado al hecho de que la respuesta en el

ratón consiste en rápido proceso de sensibilización, nos planteamos determinar las áreas cerebrales que expresan *c-fos*, en hembras y machos que despliegan o no comportamiento parental durante una exposición de mayor duración (60 min). De esta manera obtendremos el correlato temporal de las áreas cerebrales que se activan en uno u otro comportamiento, las que participan en el procesamiento inmediato/transitorio de las crías (15 min) vs. aquellas implicadas en una interacción de mayor duración.

Finalmente, el abordaje mediante lesiones resulta indispensable. En este sentido, proponemos evaluar si las lesiones dopaminérgicas en el NAc (*core* y *shell*) así como en LSd y/o LSv, áreas que han sido asociadas tanto a la facilitación como a la inhibición de la respuesta parental, inhiben o desorganizan el comportamiento parental espontáneo y facilitan el infanticidio. Por otra parte, nos proponemos evaluar si lesiones excitotóxicas en la AmM y/o AmC, áreas que en la presente tesis muestran mayor activación en aquellas hembras que sólo muestran algunas de las conductas parentales (PI), facilitan o inhiben la respuesta parental completa.

A partir del hecho de que aquellos machos infanticidas muestran una mayor activación del vLMPOA, surge determinar si lesiones excitotóxicas en esta área facilita el despliegue de comportamiento parental. Asimismo, nos planteamos disecar en la respuesta infanticida, el componente motor del componente motivacional. Para eso nos proponemos evaluar la activación de éstas áreas pero cuando los machos son expuestos a crías fijos en un estereotáxico. De esa manera el animal puede procesar a las crías pero no puede ejecutar el acto motor de atacarlas.

REFERENCIAS

Agrati, D., Fernandez-Guasti, A., & Ferreira, A. (2008). The reproductive stage and experience of sexually receptive mothers alter the preference for pups or males. *Behavioral Neuroscience*, 122, 998-1004.

Algers, B., & Uvnäs-Moberg, K. (2007). Maternal behavior in pigs. *Hormones and Behavior*, 52, 78-85.

Alsina-Llanes, M., De Brun, V., & Olazábal, D. (2015). Development and expression of maternal behavior in naïve female C57BL/6 mice. *Developmental Psychobiology*, 57, 189-200.

Bridges, RS. (1984). A quantitative analysis of the roles of dosage, sequence, and duration of estradiol and progesterone exposure in the regulation of maternal behavior in the rat. *Endocrinology*, 114, 930-40.

Bridges, R.S. (1996). Biochemical basis of parental behavior in the rat. In: Rosenblatt, J.S., Snowdon, C.T. (Eds.), *Advance in the Study of Behavior*, vol. 25. Parental Care: Evolution, Mechanisms, and Adaptive Significance. Academic Press, pp. 215-242.

Bridges, R.S., Mann, P.E., & Coppeta, J.S. (1999). Hypothalamic involvement in the regulation of maternal behavior in the rat: Inhibitory roles for the ventromedial hypothalamus and the dorsal/anterior hypothalamic areas. *Journal of Neuroendocrinology*, 11, 259-266.

Bridges, R.S., Numan, M., Ronsheim, P.M., Mann, P.E., & Lupini, C.E. (1990). Central prolactin infusions stimulate maternal behavior in steroid-treated, nulliparous female rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87, 8003-8007.

Bridges, R.S., Zarrow, M.X., Goldman, B.D., & Denenberg, V.H. (1974). A developmental study of maternal responsiveness in the rat. *Physiology & Behavior*, 12, 149-151.

Brooks, R.J., & Schwarzkopf, L. (1983). Factors Affecting Incidence of Infanticide and Discrimination of Related and Unrelated Neonates in Male *Mus musculus*. *Behavioral & Neural Biology*, 37, 149-161.

Brown, R.E. (1993). Hormonal and experiential factors influencing parental behaviour in male rodents: An integrative approach. *Behavioural Processes*, 30, 1-28.

Brown, R.E., Mathieson, W.B., Stapleton, J., & Neumann, P.E. (1999). Maternal behavior in female C57BL/6J and DBA/2J inbred mice. *Physiology & Behavior*, 67, 599-605.

Brown, J.R., Ye, H., Bronson, R.T., Dikkes, P., & Greenberg, M.E. (1996). A defect in nurturing in mice lacking the immediate early gene *fosB*. *Cell*, 86, 297-309.

Bullitt, E. (1990). Expression of c-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 22, 517-530.

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.

Carlson, N., & Thomas, G. (1968). Maternal behavior of mice with limbic lesions. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 66, 731-737.

Champagne, F.A., Chretien, P., Stevenson, C.W., Zhang, T.Y., Gratton, A., & Meaney, M.J. (2004). Variations in nucleus accumbens dopamine associated with

individual differences in maternal behavior in the rat. *The Journal of Neuroscience*, 24, 4113-4123.

Champagne, F., Diorio, J., Sharma, S., & Meaney, M.J. (2001). Naturally occurring variations in maternal behavior in the rat are associated with differences in estrogen-inducible central oxytocin receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 98, 12736-12741.

Crawley, J.N., Chen, T., Puri, A., Washburn, R., Sullivan, T.L., Hill, J.M., Young, W.S., Nadler, J.J., Moy, S.S., Young, L.J., Caldwell, H.K., & Young, W.S. (2007). Social approach behaviors in oxytocin knockout mice: Comparison of two independent lines tested in different laboratory environments. *Neuropeptides*, 41, 145-163.

Cruz, M.L., & Beyer, C. (1972). Effect of septal lesions on maternal behavior and lactation in the rabbit. *Physiology & Behavior*, 9, 361-365.

De Jong, T.R., Chauke, M., Harris, B.N., & Saltzman, W. (2009). From here to paternity: neural correlates of the onset of paternal behavior in California mice (*Peromyscus californicus*). *Hormones and Behavior*, 56, 220-231.

Demmer, J., Dragunow, M., Lawlor, P.A., Mason, S.E., Leah, J.D., Abraham, W.C., & Tate, W.P. (1993). Differential expression of immediate early genes after hippocampal long-term potentiation in awake rats. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 17, 279-286.

Elwood, R. (1985). Inhibition of infanticide and onset of parental care in male mice (*Mus musculus*). *Journal of Comparative Psychology*, 99, 457-467.

Elwood, R. (1986). What makes male mice paternal? *Behavioral and Neural Biology*, 46, 54-63.

Elwood, R.W., & Kennedy, H.F. (1991). Selectivity in Paternal and Infanticidal Responses by Male Mice: Effects of Relatedness, Location, and Previous Sexual Partners. *Behavioral and neural Biology*, 56, 129-147.

Elwood, R., Nesbitt, A., & Kennedy, H.F. (1990). Maternal aggression in response to the risk of infanticide by male mice, *Mus domesticus*. *Animal Behavior*, 40, 1080-1086.

Falkner, A.L., Dollar, P., Perona, P., Anderson, D.J., & Lin, D. (2014). Decoding ventromedial hypothalamic neural activity during male mouse aggression. *The Journal of Neuroscience*, 34, 5971-5984.

Febo, M., Stolberg, T.L., Numan, M., Bridges, R.S., Kulkarni, P., & Ferris, C.F. (2008). Nursing stimulation is more than tactile sensation: it is a multisensory experience. *Hormones & Behavior*. 54, 330-339.

Ferreira, A., Pereira, M., Agrati, D., Uriarte, N., & Fernández-Guasti, A. (2002). Role of maternal behavior on aggression, fear and anxiety. *Physiology & Behavior*, 77, 197-204.

Fleischer, S., Slotnick, B.M. (1978). Disruption of maternal behavior in rats with lesions of the septal area. *Physiology & Behavior*, 21, 189-200.

Fleming, A.S., Korsmit, M. (1996). Plasticity in the maternal circuit: effects of maternal experience on Fos-Lir in hypothalamic, limbic, and cortical structures in the postpartum rat. *Behavioral Neuroscience*, 110, 567-582.

Fleming, A.S., & Rosenblatt, J.S. (1974). Olfactory regulation of maternal behavior in rats: II: Effects of peripherally induced anosmia and lesions of the lateral olfactory tract in pup-induced virgins. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 86, 233-246.

Fleming, A.S., Vaccarino, F., & Luebke, C. (1980). Amygdaloid inhibition of maternal behavior in the nulliparous female rat. *Physiology & Behavior*, 25, 731-743.

Gammie, S.C., & Nelson, R.J. (2001). cFOS and pCREB activation and maternal aggression in mice. *Brain Research*, 898, 232-241.

Gandelman, R. (1972). Induction of pup killing in female mice by androgenization. *Physiology & Behavior*, 9, 101-102.

Gandelman, R. (1973a). Induction of maternal nest building in virgin female mice by presentation of young. *Hormones & Behavior*, 4, 191-197.

Gandelman, R. (1973b). The ontogeny of maternal responsiveness in female Rockland-Swiss albino mice. *Hormones & Behavior*, 4, 257-268.

Gandelman, R. (1973c). The Development of Cannibalism in Male Rockland-Swiss Mice and the Influence of Olfactory Bulb Removal. *Developmental Psychobiology*, 6, 159-164.

Gandelman, R. (1973d). Maternal behavior in the mouse: Effect of estrogen and progesterone. *Physiology & Behavior*, 10, 153-155.

Gandelman, R., Paschke, R., Zarrow, M.X., & Denenberg, V.H. (1970). Care of young under communal conditions in the mouse (*Mus Musculus*). *Developmental Psychobiology*, 3, 245-250.

Gandelman, R., & Vom Saal, F. (1975). Pup-Killing in Mice: The Effects of Gonadectomy and Testosterone Administration. *Physiology & Behavior*, 15, 647-651.

González-Mariscal, G., Jiménez, A., Chirino, R., Beyer, C. (2009). Motherhood and nursing stimulate c-FOS expression in the rabbit forebrain. *Behavioral Neuroscience*, 123, 731-739.

González-Mariscal, G., Melo, A.I., Jiménez, P., Beyer, C., & Rosenblatt, J.S. (1996). Estradiol, progesterone, and prolactin facilitate maternal nest-building in rabbits. *Journal of Neuroendocrinology*, 8, 901-907.

González-Mariscal, G., & Poindron, P. (2002). Parental care in mammals: immediate internal and sensory factors of control. In: Pfaff, D., Arnold, A., Etgen, A., Fahrbach, S., Rubin, R. (Eds.), *Hormones, Brain and Behavior*. Academic Press, San Diego, pp. 215-298.

Gubernick, D.J., & Alberts, J.R.. (1985). Maternal licking by virgin and lactating rats: water transfer from pups. *Physiology & Behavior*, 34, 501-6.

Gubernick, D. J., & Laskin, B. (1994). Mechanisms influencing sibling care in the monogamous biparental California mouse, *Peromyscus californicus*. *Animal Behavior*, 48, 1235-1237.

Gubernick, D.J., Schneider, K.A., & Jeannotte, L.A. (1994). Individual Differences in the Mechanisms Underlying the Onset and Maintenance of Paternal Behavior and the inhibition of Infanticide in the Monogamous Biparental California Mouse, *Peromyscus californicus*. *Behavioral Ecology & Sociobiology*, 34, 225-231.

Hamaguchi-Hamadaa, K., Sanbo, C., Hamadaa, S., & Yagi, T. (2004). Exposure to hexanal odor influences maternal behavior and induces neonatal death in Fyn tyrosine kinase-deficient mice. *Neuroscience Research*, 48, 259-267.

Hansen, S. (1994). Maternal behaviour of female rats with 6-OHDA lesions in the ventral striatum: characterization of the pup retrieval deficit. *Physiology & Behavior*, 55, 615-20.

Hansen, S., Bergvall, A.H., & Nyiredi, S. (1993). Interaction with pups enhances dopamine release in the ventral striatum of maternal rats: a microdialysis study. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 45, 673-676.

Heimer, L., Zahm, D.S., Churchill, L., Kalivas, P.W., & Wohltmann, C. (1991). Specificity in the projection patterns of accumbal core and shell in the rat. *Neuroscience*, 41, 89-125.

Hrdy, S.B. (1979). Infanticide among animals: A review, classification and examination of the implication for the reproductive strategies of females. *Ethology and Sociobiology*, 1, 13-40.

Huck, U.W., Soltis, R.L., & Coopersmith, C.B. (1982). Infanticide in male laboratory mice: Effects of social status, prior sexual experience, and basis for discrimination between related and unrelated young. *Animal Behaviour*, 30, 1158-1165.

Hunt, S.P., Pini, A., & Evan, G. (1987). Induction of c-fos like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature*, 328, 632-634.

Jin, S., Blendy, J. A., & Thomas, S. A. (2005). Cyclic AMP response element-binding protein is required for normal maternal nurturing behavior. *Neuroscience*, 133, 647-655.

Kalamatianos, T., Faulkes, C.G., Oosthuizen, M.K., Poorun, R., Bennett, N.C., & Coen, C.W. (2010). Telencephalic binding sites for oxytocin and social organization: a comparative study of eusocial naked mole-rats and solitary cape mole-rats. *Journal of Comparative Neurology*, 518, 1792-1813.

Kalinichev, M., Rosenblatt, J.S., Nakabeppu, Y., & Morrell, J.I. (2000). Induction of c-fos-like and fosB-like immunoreactivity reveals forebrain neuronal populations involved differentially in pup-mediated maternal behavior in juvenile and adult rats. *Journal of Comparative Neurology*, 416, 45-78.

Kennedy, H.F., & Elwood, R.W. (1988). Strain Differences in the Inhibition of Infanticide in Male Mice (*Mus musculus*). *Behavioral & Neural Biology*, 50, 349-353.

Keer, S.E., & Stern, J.M. (1999). Dopamine receptor blockade in the nucleus accumbens inhibits maternal retrieval and licking, but enhances nursing behavior in lactating rats. *Physiology & Behavior*, 67, 659-669.

Kerth, G. (2008). Causes and consequences of sociality in bats. *Bioscience*, 58, 737-746.

Kimble, D.P. (1997). Didelphid behavior. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 21, 361-369.

Kirkpatrick, B., Kim, J.W., Insel, T.R. (1994). Limbic system fos expression associated with paternal behavior. *Brain Research*, 658, 112-118.

Kornhauser, J.M., Nelson, D.E., Mayo, K.E., & Takahashi, J.S. (1992). Regulation of jun-B messenger RNA and AP-1 activity by light and a circadian clock. *Science*, 255, 1581-1584.

Kuroda K.O., Meaney M.J., Uetani N., Fortin Y., Ponton A., & Kato T. (2007) ERK-FosB signaling in dorsal MPOA neurons plays a major role in the initiation of parental behavior in mice. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 36, 121-131.

Kuroda, K., Meaney, M.J., Uetani, N., & Kato, T. (2008). Neurobehavioral basis of the impaired nurturing in mice lacking the immediate early gene FosB. *Brain Research*, 1211, 57-71.

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 Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry*, 35, 1205-1231.

Leblond, C.P. (1938). Extra-hormonal factors in maternal behavior. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 38, 66-70.

Lee, A.W., & Brown, R.E. (2002). Medial Preoptic Lesions Disrupt Parental Behavior in Both Male and Female California Mice (*Peromyscus californicus*). *Behavioral Neuroscience*, 116, 968-975.

Lee, A.W., & Brown, R.E. (2007). Comparison of medial preoptic, amygdala, and nucleus accumbens lesions on parental behavior in California mice (*Peromyscus californicus*). *Physiology & Behavior*, 92, 617-628.

Leussis, M.P., Bond, T., Hawken, C.M., & Brown, R.E. (2008). Attenuation of maternal behavior in virgin CD-1 mice by methylphenidate hydrochloride. *Physiology & Behavior*, 95, 395-399.

Lévy, F., & Keller, M. (2008). Neurobiology of maternal behavior in sheep. *Advances in the Study of Behavior*, 38, 399-437.

Lévy, F., & Keller, M. (2009). Olfactory mediation of maternal behavior in selected mammalian species. *Behavioural Brain Research*, 200, 336-345.

Li, L., Keverne, E.B., Aparicio, S.A., Ishino, F., Barton, S.C., & Surani, M.A. (1999). Regulation of maternal behavior and offspring growth by paternally expressed Peg3. *Science*, 284, 330-333.

Li, M., & Fleming, A.S. (2003a). The nucleus accumbens shell is critical for normal expression of pup-retrieval in postpartum female rats. *Behavioural Brain Research*, 145, 99-111.

Li, M., & Fleming, A.S. (2003b). Differential involvement of nucleus accumbens shell and core subregions in maternal memory in postpartum female rats. *Behavioral Neuroscience*, 117, 426-45.

Lin, D., Boyle, M.P., Dollar, P., Lee, H., Lein, E.S., Perona, P., & Anderson, D.J. (2011). Functional identification of an aggression locus in the mouse hypothalamus. *Nature*, 470, 221-226.

Lonstein, J. S., & De Vries, G. J. (2000). Sex differences in the parental behavior of rodents. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 24, 669-686.

Lonstein, J.S., Simmons, D.A., Swann, J.M., & Stern, J.M. (1998). Forebrain expression of c-fos due to active maternal behaviour in lactating rats. *Neuroscience*, 82, 267-281.

Lonstein, J.S., Wagner, C.K., & De Vries, G.J. (1999). Comparison of the “nursing” and other parental behaviors of nulliparous and lactating female rats. *Hormones and Behavior*, 36, 242-51.

Lucas, B.K., Ormandy, C.J., Binart, N., Bridges, R.S., & Kelly, P.A. (1998). Null mutation of the prolactin receptor gene produces a defect in maternal behavior. *Endocrinology*, 139, 4102-4107.

Macdonald, D.W., Herrera, E.A., Taber, A.B., & Moreira, J.R. (2007). Social organization and resource use in capybaras and maras. Chapter 33. In: Wolff, J.O., Sherman, P.W. (Eds.), *Rodent Societies: An Ecological and Evolutionary Perspective*.

Matsumoto, T., Honda, S., & Harada, N. (2003). Alteration in Sex-Specific Behaviors in Male Mice Lacking the Aromatase Gene. *Neuroendocrinology*, 77, 416-424.

Matsumoto, F., & Kimura, T. (1993). The Facilitative Influence of Experiential Factors on the Parental Behavior of Male Mice (*Mus musculus*): (i) The Effects of the Experience of Copulation and Cohabitation with a Pregnant Female. *Journal of Ethology*, 13, 23-30.

Mayer, A.D. (1983). The ontogeny of maternal behavior in rodents. In R.W. Elwood (Ed.), *Parental behavior of rodents* (pp. 1-20). Chichester, England: Wiley.

McCarthy, M.M., & vom Saal, F.S. (1985). The influence of reproductive state on infanticide by wild female house mice (*Mus musculus*). *Physiology & Behavior*, 35, 843-849.

McCarthy, M.M., & vom Saal, F.S. (1986). Infanticide by virgin CF-1 and wild male house mice (*Mus musculus*): Effects of age, prolonged isolation, and testing procedure. *Developmental Psychobiology*, 19, 279-290.

Mogenson, G.J., Jones, D.L., Yim, C.Y. (1980). From motivation to action: Functional interface between the limbic system and the motor system. *Progress in Neurobiology*, 14, 69-97.

Mongeau, R., Miller, G.A., Chiang, E., & Anderson, D.J. (2003) Neural correlates of competing fear behaviors evoked by an innately aversive stimulus. *The Journal of Neuroscience*, 23, 3855-3868.

Morgan, J.I., & Curran, T. (1989). Stimulus-transcription coupling in neurons: Role of cellular immediate early genes. *Trends in Neurosciences*, 12, 459-491.

Morgan, J.L., Cohen, D.R., Hempstead, J.L., & Curran, T. (1987). Mapping pattern of c-fos expression in the central nervous system after seizure. *Science*, 237, 192-196.

Morgan, H.D., Watchus, J.A., & Fleming, A.S. (1997). The effects of electrical stimulation of the medial preoptic area and the medial amygdala on maternal responsiveness in female rats. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 807, 602-605.

Nakamichi, M., & Yanada, K. (2009). Distribution of dorsal carriage among simians. *Primates*, 50, 153-168.

Noirot, E. (1964a). Changes in responsiveness to young in the adult mouse: The effect of external stimuli. *Journal of comparative and Physiological Psychology*, 57, 97-99.

Noirot, E. (1964b). Changes in responsiveness to young in the adult mouse. IV. The effect of an initial contact with a strong stimulus. *Animal Behaviour*, 12, 442-445.

Noirot, E. (1964c). Changes in responsiveness to young in the adult mouse: The effect of external stimuli. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 87, 87-99.

Noirot, E. (1969). Changes in responsiveness to young in the adult mouse: V. Priming. *Animal Behavior*, 17, 542-546.

Noirot, E. (1972). The onset and development of maternal behavior in rat, hamster and mice. *Advances in the Study of Behavior*, 4, 107-145.

Numan, M. (1994). Maternal behavior. In: Knobil, E., Neill, J.D. (Eds.), *The physiology of reproduction*, vol. 2. Raven, New York, pp. 221-302.

Numan, M. (2010). Parental Behavior. *Encyclopedia of Behavioral Neuroscience*, 3, 14-23.

Numan, M., Fleming, A.S., Lévy, F. (2006). Maternal behavior. In: Neill, J.D. (Ed.), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Elsevier, San Diego, pp. 1921-1993.

Numan, M., & Insel, T.R. (2003). *The neurobiology of parental behavior*. New York: Springer-Verlag, New York, pp. 69-106.

Numan, M., & Numan, M.J. (1994). Expression of Fos-Like Immunoreactivity in the Preoptic Area of maternally behaving virgin and postpartum rats. *Behavioral Neuroscience*, 108, 2, 379-394.

Numan, M., McSparren, J., & Numan, M.J. (1990). Dorsolateral connections of the medial preoptic area and maternal behavior in rats. *Behavioral Neuroscience*, 104, 964–979.

Numan, M., Numan, M.J., Marzella, S.R., & Palumbo, A. (1998). Expression of c-fos, fos B, and egr-1 in the medial preoptic area and bed nucleus of the stria terminalis during maternal behavior in rats. *Brain Research*, 792, 348-352.

Numan, M., Rosenblatt, J. S., & Komisaruk, B. R. (1977). Medial preoptic area and onset of maternal behavior in the rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 91, 146-164.

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.

Olazábal, D.E., & Morrell, J.I. (2005). Juvenile rats show immature neuronal patterns of c-Fos expression to first pup exposure. *Behavioral Neuroscience*, 119, 1097-110.

Olazábal, D.E., Pereira, M., Agrati, D., Ferreira, A., Fleming, A.S., González-Mariscal, G., Levy, F., Lucion, A.B., Morrell, J.I., Numan, M., & Uriarte, N. (2013a). Flexibility and adaptation of the neural substrate that supports maternal behavior in mammals. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 37, 1875-1892.

Olazábal, D.E., Pereira, M., Agrati, D., Ferreira, A., Fleming, A.S., González-Mariscal, G., Lévy, F., Lucion, A.B., Morrell, J.I., Numan, M., & Uriarte, N. (2013b). New theoretical and experimental approaches on maternal motivation in mammals. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 37, 1860-1874.

Olazábal, D.E., & Young, L.J. (2006a). Species and individual differences in juvenile female alloparental care are associated with oxytocin receptor density in the striatum and the lateral septum. *Hormones & Behavior*, 49, 681-687.

Olazábal, D.E., Young, L.J. (2006b). Oxytocin receptors in the nucleus accumbens facilitate “spontaneous” maternal behavior in adult female prairie voles. *Neuroscience*, 141, 559-568.

Ostermeyer, C.M., & Elwood, R.W. (1983). Pup recognition in *Mus musculus*: Parental discrimination between their own and alien young. *Developmental Psychobiology*, 16, 75-82.

Pedersen, C.A., Caldwell, J.D., Walker, C., Ayers, G., & Mason, G.A. (1994). Oxytocin activates the postpartum onset of rat maternal behavior in the ventral tegmental area and medial preoptic area. *Behavioral Neuroscience*, 108, 1163-1171.

Pedersen, C.A., Vadlamudi, S.V., Boccia, M.L., & Amico, J.A. (2006). Maternal behavior deficits in nulliparous oxytocin knockout mice. *Genes, Brain & Behavior*, 5, 274-281.

Pereira, M. (2006). Nonselective maternal bonding but pup recognition in the subterranean rodent *Ctenomys pearsoni*. *Journal of Comparative Psychology*, 120, 411-415.

Pereira, M., & Ferreira, A. (2006). Demanding pups improve maternal behavioral impairments in sensitized and haloperidol-treated lactating female rats. *Brain Research*, 175, 139-148.

Pereira, M., & Morrell, J.I. (2011). Functional mapping of the neural circuitry of rat maternal motivation: effects of site-specific transient neural inactivation. *Journal of Neuroendocrinology*, 23, 1020-1035.

Poindron, P. (2001). El control Fisiológico de la conducta materna al momento del parto en ovinos y caprinos. *Biología de la reproducción II*, 301-322.

Poindron, P., Lévy, F., & Keller, M. (2007). Maternal responsiveness and maternal selectivity in domestic sheep and goats: the two facets of maternal attachment. *Developmental Psychobiology*, 49, 54-70.

Priestnall, R., & Young, S. (1978). An observational study of caretaking behavior of male and female mice housed together. *Developmental Psychobiology*, 11, 23-30.

Ragnauth, A. K., Devidze, N., Moy, V., Finley, K., Goodwillie, A., Kow, L., & Pfaff, D.W. (2005). Female oxytocin gene-knockout mice, in a seminatural environment, display exaggerated aggressive behavior. *Genes, Brain and Behavior*, 4, 229-239.

Ralls, K., Lundrigan, B., & Kranz, K. (1986). Mother-Young relationship in captive ungulates: variability and clustering. *Animal Behaviour*, 34, 134-145.

Roberts, R.L., Williams, J.R., Wang, A.K., & Carter, C.S. (1998). Cooperative breeding and monogamy in prairie voles: Influence of the sire and geographical variation. *Animal Behaviour*, 55, 1131-1140.

Rosenblatt, J.S. (1967) Nonhormonal basis of maternal behavior in the rat. *Science*, 156, 1512-1514.

Salamone, J.D. (1992). Complex motor and sensorimotor functions of striatal and accumbens dopamine: involvement in instrumental behavior processes. *Psychopharmacology*, 107, 160-174.

Salomé, A.N., Salchner, P., Viltart, O., Sequeira, H., Wigger, A., Landgraf, R., & Singewald, N. (2004). Neurobiological correlates of high (HAB) versus low anxiety-related behavior (LAB): differential Fos expression in HAB and LAB rats. *Biological Psychiatry*, 55, 715- 723.

Sheehan, T.P., Chambers, R.A., & Russell, D.S. (2004). Regulation of affect by the lateral septum: implications for neuropsychiatry. *Brain research. Brain research reviews*, 46, 71-117.

Sheehan, T.P., Cirrito, J., Numan, M.J., Numan, M. (2000). Using c-fos immunocyto-chemistry to identify forebrain regions that may inhibit maternal behavior in rats. *Behavioral Neuroscience*, 114, 337-352.

Sheng, M., & Greenberg, M. E. (1990). The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron*, 4, 477-485.

Soroker, V. & Terkel, J. (1988). Changes in incidence of infanticidal and parental responses during the reproductive cycle in male and female wild mice *Mus musculus*. *Animal Behaviour*, 36, 1275-1281.

Stack, E.C., Balakrishnan, R., Numan, M.J., & Numan, M. (2002). A functional neuroanatomical investigation of the role of the medial preoptic area in the neural circuits regulating maternal behavior. *Behavioural Brain Research*, 131, 17-36.

Stack, E.C., & Numan, M. (2000). The temporal course of expression of c-Fos and Fos B within the medial preoptic area and other brain regions of postpartum female rats during prolonged mother-young interactions. *Behavioral Neuroscience*, 114, 609-622.

Slotnick, B.M., & Nigrosh, B.J. (1975). Maternal behaviour of mice with cingulate cortical, amygdala, or septal lesions. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 1, 118-127.

Stolzenberg, D.S., & Rissman, E.F. (2011). Oestrogen-independent, experience-induced maternal behaviour in female mice. *Journal of Neuroendocrinology*, 23, 345-354.

Svare, B., & Broida, J. (1982). Genotypic influences on infanticide in mice: Environmental, situational and experimental determinants. *Physiology & Behavior*, 28, 171-175.

Svare, B. & Mann, M. (1981). Infanticide: Genetic, Developmental and Hormonal Influences in Mice. *Physiology & Behavior*, 27, 921-927.

Szymanski, L.A., & Keller, M. (2014). Activation of the olfactory system in response to male odors in female prepubertal mice. *Behavioural Brain Research*, 271, 30-38.

Tachikawa, K.S., Yoshihara, Y., & Kuroda, K.O. (2013). Behavioral Transition from Attack to Parenting in Male Mice: A Crucial Role of the Vomeronasal System. *The Journal of Neuroscience*, 33, 5120-5126.

Tate-Ostroff, B.A., & Bridges, R.S. (1987). Regulation of prolactin secretion in parental rats: Roles of steroids priming and responsiveness. *Psychoneuroendocrinology*, 12, 385-391.

Trillmich, F. (1981). Mutual mother-pup recognition in Galapagos fur seals and sea lions: Cues used and functional significance, *Behaviour*, 78, 21-42.

Tsuneoka, Y., Maruyama, T., Yoshida, S., Nishimori, K., Kato, T., Numan, M., Kuroda, K.O. (2013). Functional, anatomical, and neurochemical differentiation of medial preoptic area subregions in relation to maternal behavior in the mouse. *The Journal of Comparative Neurology*, 521, 1633-1663.

Vom Saal, F. S. (1984). Proximate and ultimate causes of infanticide and parental behavior in male house mice. In G. Hausfater & S. B. Hrdy (Eds.), *Infanticide: Comparative and evolutionary aspects* (pp. 401-424). New York: Aldine.

Vom Saal, F.S., & Howard, L.S. (1982). The Regulation of Infanticide and Parental Behavior: Implications for Reproductive Success in Male Mice. *Science*, 215, 1270-1272.

Wright, S.L. & Brown, R.E. (2000). Maternal Behavior, Paternal Behavior, and Pup Survival in CD-1 Albino Mice (*Mus musculus*) in Three Different Housing Conditions. *Journal of Comparative Psychology*, 114, 183-192.

Wu, Z., Autry, A.E., Bergan, J.F., Watabe-Uchida, M., & Dulac, C.G. (2014). Galanin neurons in the medial preoptic area govern parental behavior. *Nature*, 509, 325-330.

Záborszky, L., Alheid, G.F., Beinfeld, M.C., Eiden, L.E., Heimer, L., Palkovits, M. (1985). Cholecystokinin innervation of the ventral striatum: a morphological and radioimmunological study. *Neuroscience*, 14, 427-53.