

Tesina de Grado de la Licenciatura en Bioquímica

EVALUACIÓN DE LA MOTIVACIÓN MATERNAL Y LA ACTIVACIÓN DEL CIRCUITO NEURAL MATERNAL DE RATAS CON CAMADAS SUPERPUESTAS

Br. Sabrina Pose

Orientadora: Dra. Natalia Uriarte

Co-orientadora: MSc. María José Zuluaga

Lugar de Ejecución:

Laboratorio de Neurociencias

Laboratorio de Experimentación Animal

Facultad de Ciencias, Universidad de la República

- Montevideo, Febrero 2019 -



RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	5
Comportamiento Maternal	5
Áreas Neurales Relevantes Para El Comportamiento Maternal	6
Variaciones en el Comportamiento y la Motivación Maternal a lo Largo de la Lactancia.....	6
Figura 1: Modelo de camadas superpuestas: crías de la segunda camada siendo cuidadas por su madre y uno de los hermanos de la camada anterior.....	7
Genes de expresión temprana y actividad neural	8
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPÓTESIS.....	8
OBJETIVOS GENERALES	9
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	9
ANIMALES.....	10
PROCEDIMIENTO DE CRIA	10
.....	11
Figura 2: Procedimiento de obtención de camadas superpuestas.....	11
PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	11
Experimento 1: Determinación del valor de incentivo relativo de neonatos vs juveniles..	11
Grupo Experimental	11
Modelo de preferencia.....	11
Experimento 2: Activación del circuito neural de madres con camadas superpuestas ante la exposición a una de sus camadas.....	12
Grupo Experimental	12
Parte 1: Prueba de comportamiento maternal.....	12
Figura 3: Esquema de los grupos experimentales y el cronograma de las pruebas necesarios correspondiente al experimento 2.	13
Parte 2: Cuantificación de la expresión de c-Fos en SNC por inmunohistoquímica	13
Preparación del tejido	13
Inmunohistoquímica	13
Análisis de la expresión de c-Fos.....	14
Análisis estadístico de c-Fos.....	15
RESULTADOS	16
Experimento 1: Determinación del valor de incentivo relativo de neonatos vs juveniles.....	16
Figura 4:	16
Experimento 2: Activación del circuito neural de madres con camadas superpuestas ante la exposición a una de sus camadas	16
Parte 1: Prueba de comportamiento maternal.....	16
Tabla 1.....	17
Parte 2: Cuantificación de la expresión de c-Fos en SNC por inmunohistoquímica	17

Área preóptica media y Bed nucleus of the stria terminalis	17
Área Prefrontal Medial.....	18
Figura 5: Expresión de c-Fos en el área preóptica media (APOm) y en la porción ventral de <i>bed nucleus of the stria terminalis</i> (vBNST) de MCS en los grupos no exposición, neonatos y juveniles.	19
Núcleo Accumbens.....	20
Amígdala.....	20
Figura 6: cuantificación de c-Fos de las subregiones cingulada (Cg1), prelímbica (PrL) e infralímbica (IL) de la corteza prefrontal medial (CPFm)	21
DISCUSIÓN.....	22
REFERENCIAS.....	28

RESUMEN

El comportamiento maternal de la rata cambia de forma dinámica durante el período posparto, ajustándose a las características sensoriales y necesidades fisiológicas de las crías. Esta adaptación ha sido atribuida a modificaciones funcionales en el circuito neural maternal, que afectan tanto la motivación maternal como la expresión del comportamiento. El comportamiento maternal también puede adaptarse de forma flexible de acuerdo a la composición familiar. Así, madres con dos camadas superpuestas pueden cuidar simultáneamente crías neonatas y juveniles, dirigiendo su atención principalmente a los neonatos. Sin embargo, se desconocen los efectos de la interacción y convivencia con estos dos tipos de camadas sobre la activación del circuito maternal o los procesos motivacionales. Hipotetizamos que las madres con camadas superpuestas exhiben variaciones en su motivación maternal respecto a hembras lactantes con camadas simples, y que su circuito neural maternal muestra un patrón de activación diferencial dependiendo del estímulo cría presentado. Para comprobarlo, evaluamos en ratas con camadas superpuestas el valor de incentivo relativo de neonatos y juveniles utilizando un laberinto en Y como prueba de preferencia, así como la activación de varias áreas del circuito maternal luego de una prueba de comportamiento maternal, utilizando inmunoreactividad de c-Fos como marcador de activación neuronal. En el primer experimento se encontró que las madres de camadas superpuestas estuvieron cantidades similares de tiempo en los compartimientos de juveniles y neonatos, pero realizaron más intentos de acceder a los neonatos. En el segundo experimento, la interacción con neonatos o con juveniles mostró una variación en la respuesta comportamental de las madres de camadas superpuestas, la cual se asoció con patrones específicos de activación del circuito neural maternal. En este sentido, ambas interacciones provocaron una expresión similar de c-Fos en áreas claves del circuito maternal y motivacional, tales como área preóptica media y núcleo accumbens, mientras que se observó una activación diferencial en otras áreas tales como la región ventral de *bed nucleus of the stria terminalis*, las subregiones infralímbica y prelímbica de la corteza prefrontal medial, así como los núcleos basolateral y medial de la amígdala. Estos diferentes perfiles de activación del circuito neural que controla el comportamiento y la motivación maternal en madres con camadas superpuestas podrían permitirles responder adecuadamente a neonatos y juveniles y adaptarse al contexto y las necesidades de las crías.

INTRODUCCIÓN

Comportamiento Maternal

Inmediatamente luego del parto, las hembras de mamíferos presentan comportamiento maternal, un comportamiento altamente motivado, crucial para la supervivencia y el adecuado desarrollo neuroendócrino y comportamental de las crías (Numan & Insel, 2003). En la rata, este comportamiento incluye el desarrollo de una serie de componentes, tales como acarreo, amamantamiento, lamidos corporales y anogenitales, etc., cuya expresión es máxima luego del parto (Reisbick, Rosenblatt, & Mayer, 1975) y cambia a medida que transcurre el postparto, adaptándose a las necesidades y características de las crías. Así, a medida que la lactancia progresa y las crías crecen, las madres disminuyen el tiempo de contacto con la camada, así como la duración y la frecuencia de amamantamiento, lamidos y acarreo, llegando a niveles mínimos en el período próximo al destete (Reisbick et al., 1975). Estos cambios se interpretan frecuentemente como un proceso pasivo durante el cual la motivación y el comportamiento maternal “declinan” hasta niveles mínimos, determinando el destete de los juveniles (Wansaw, Pereira, & Morrell, 2008).

Otra posible explicación para este fenómeno es que los cambios observados en la intensidad del comportamiento maternal no corresponden a una “extinción” a lo largo del tiempo, sino a un ajuste de este comportamiento a las necesidades de las crías a medida que éstas crecen y ganan independencia (Pereira & Morrell, 2009). Esta adecuación del comportamiento maternal a las demandas cambiantes de las crías requeriría la participación activa de los circuitos neurales involucrados en su regulación para asegurar esta “plasticidad comportamental” a lo largo de la lactancia.

El rápido desarrollo del comportamiento maternal inmediatamente luego del parto, incluso en hembras sin experiencia previa con crías neonatas, es determinado por los eventos endócrinos asociados con la gestación y el parto, principalmente el aumento de los lactógenos placentarios: prolactina, estradiol y oxitocina; y la drástica caída en los niveles de progesterona (Bridges, 1984; Moltz, Lubin, Leon, & Numan, 1970; Numan & Insel, 2003). A pesar de esta fuerte influencia hormonal en el inicio rápido del comportamiento maternal tras el parto, su mantenimiento durante el posparto dependería principalmente de la estimulación sensorial provista por las crías (Numan & Insel, 2003).

Áreas Neurales Relevantes Para El Comportamiento Maternal

Las bases neurales del comportamiento maternal involucran varias áreas del cerebro, incluyendo regiones clave tales como el área preóptica media (APOm) y la porción ventral de *bed nucleus of the stria terminalis* (vBNST), así como regiones implicadas en el procesamiento de estímulos biológicos relevantes, como la amígdala (Amy). Otras regiones importantes son los sistemas de motivación en general, tales como el sistema mesolímbico dopaminérgico, que incluye el núcleo accumbens (NA), y áreas implicadas en la atención selectiva y toma de decisiones, tales como la corteza prefrontal medial (CPFm) (Numan, 2006; Pereira & Ferreira, 2016).

Muchos estudios han resaltado la importancia de estas áreas en la regulación del comportamiento maternal, demostrando que lesiones en APOm o vBNST (Hansen, Harthorn, Wallin, Lofberg, & Svensson, 1991; Lee, Clancy, & Fleming, 1999; Numan, 1990; Numan, Corodimas, Numan, Factor, & Piers, 1988; Oxley & Fleming, 2000), así como la interrupción de la conexión entre APOm/vBNST y el sistema mesolímbico dopaminérgico (Numan & Numan, 1991; Numan et al., 2005; Numan & Smith, 1984), eliminan su expresión. Basado en estos y otros estudios, Numan propone que los eferentes de APOm/vBNST hacia el área tegmental ventral (VTA) facilitan las aferencias dopaminérgicas hacia el NA, que por su parte libera al pálido ventral de su influencia inhibitoria, promoviendo así la expresión de la respuesta maternal voluntaria hacia las crías (Numan, 2006; Numan & Stolzenberg, 2009). En este modelo neural, la actividad del circuito es modulada por aferencias de distintos núcleos de la amígdala y la CPFm, que transmite información relacionada al estímulo crías (Fleming & Walsh, 1994; Sheehan, Paul, Amaral, Numan, & Numan, 2001).

Variaciones en el Comportamiento y la Motivación Maternal a lo Largo de la Lactancia

De forma interesante, el comportamiento maternal cambia de forma dinámica a medida que avanza el periodo posparto, ajustándose a las características sensoriales y necesidades fisiológicas de las crías (Grieb, Holschbach, & Lonstein, 2018; Mattson, Williams, Rosenblatt, & Morrell, 2001; Pereira & Morrell, 2009; Reisbick et al., 1975), y esta adaptación ha sido atribuida a modificaciones funcionales del circuito maternal (Grieb et al., 2018; Pereira & Morrell, 2009, 2011). Así, la inactivación transitoria del APOm en el posparto temprano, cuando el comportamiento maternal es máximo, elimina su expresión, mientras que la inactivación de esta área en los días 13-14 posparto, cuando el

comportamiento maternal esta reducido, aumenta su expresión (Pereira & Morrell, 2009). Además, mediante la inactivación transitoria de las subregiones de la CPFm durante el posparto temprano y tardío, Pereira & Morrell (Pereira & Morrell, 2011) proponen que la subregión infralímbica (IL) promueve la expresión del comportamiento maternal durante el posparto temprano, mientras que más tarde la subregión prelímbica (PrL) adquiere un rol más relevante en la regulación de la respuesta maternal. Juntos, estos resultados sugieren que la respuesta maternal apropiada en relación a las necesidades de las crías durante el periodo posparto se da gracias a los cambios funcionales en el APOm y la CPFm.



Figura 1: Modelo de camadas superpuestas: crías de la segunda camada siendo cuidadas por su madre y uno de los hermanos de la camada anterior.

La motivación maternal también cambia a lo largo del período posparto. En este sentido, en una prueba de preferencia por condicionamiento a lugares (conditioned place preference – CPP) las hembras lactantes que se encuentran en postparto temprano prefieren la cámara asociada a las crías sobre una no asociada a las crías (Fleming et al., 1994; Wansaw et al., 2008), mientras que más tarde en el período posparto la mayoría de las hembras prefieren la cámara no asociada a las crías (Wansaw et al., 2008). Asimismo, las características sensoriales y necesidades fisiológicas de las crías pueden variar la motivación maternal. Estudios previos han comprobado que las ratas madres prefieren a las crías más demandantes (con necesidades fisiológicas aumentadas) que a las crías menos demandantes en una prueba de preferencia, indicando que las crías más demandantes tienen un valor de incentivo mayor para las madres (Pereira & Ferreira,

2006). Además, hembras maternas, tanto lactantes como vírgenes, exhiben mayor cantidad de respuestas maternas hacia crías demandantes en comparación con crías no demandantes (Pereira & Ferreira, 2006)

Genes de expresión temprana y actividad neural

Es posible determinar la actividad neural a través del análisis de la expresión del marcador de activación neuronal c-Fos (N. Matsushita, Y. Muroi, K. Kinoshita, & T. Ishii, 2015). *c-Fos* es un proto-oncogén que puede ser expresado de forma transitoria en el cerebro en respuesta a varios estímulos. Si bien su función no es conocida con precisión, se cree que la proteína que codifica, fos, actúa como tercer mensajero en sistemas de transducción de señal, donde acopla señales intracelulares de corto plazo, provocadas por una variedad de estímulos extracelulares con respuesta de largo plazo mediante la alteración de la expresión de genes (Walsh, Fleming, Lee, & Magnusson, 1996).

La inmunoreactividad de c-Fos ha sido utilizada para identificar neuronas que están activadas durante la ejecución del comportamiento materno (Kalinichev, Rosenblatt, Nakabeppu, & Morrell, 2000; Mattson & Morrell, 2005; Numan & Numan, 1994). Además, estudios empleando c-Fos como marcador de actividad neural han documentado que las áreas principales del circuito materno de ratas lactantes se activan luego de interactuar con crías (Fleming & Walsh, 1994). Por otra parte, en la prueba de CPP utilizando crías o cocaína como estímulos, la elección de las ratas lactantes a lugares asociados con crías está asociada con expresión elevada de c-Fos dentro del área infralímbica (IL) y cingulada (Cg1) de la CPFm (Mattson & Morrell, 2005).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPÓTESIS

Si bien la adaptación del comportamiento materno a las características de las crías a lo largo del postparto ha sido descrita, pocos estudios abordan este fenómeno en un momento y contexto particular. Recientemente se validó el modelo de camadas superpuestas (CS) en la rata (Uriarte et al., 2014; Uriarte, Ferreira, Rosa, & Lucion, 2009; Uriarte, Ferreira, Rosa, Sebben, & Lucion, 2008), en el cual, como consecuencia del apareamiento durante el estro postparto (Gilbert, Burgoon, Sullivan, & Adler, 1983; Gilbert, Pelchat, & Adler, 1980), la madre cría a dos camadas sucesivas que se superponen temporalmente en el nido. Las crías de las dos camadas difieren en edad, características sensoriales, demandas fisiológicas y capacidades comportamentales (presencia o no de pelo, movilidad, capacidad de termorregulación y excreción de

deshechos), por lo que las madres deben modificar su comportamiento maternal para adecuarse a las distintas necesidades de las mismas. Se ha demostrado que las ratas con camadas superpuestas logran esta adaptación cuidando en forma diferente a crías neonatas y crías juveniles, dirigiendo mayores cuidados a los individuos neonatos, pero permitiendo el contacto con los juveniles (Uriarte et al., 2008), sugiriendo que el valor de incentivo entre ambas crías varía.

De acuerdo a estas características, la superposición de camadas representa un valioso modelo para estudiar la plasticidad maternal, ya que nos permite explorar los sustratos neuronales y endócrinos asociados con la adaptación del comportamiento maternal a las diferentes necesidades de ambas crías de forma simultánea. Dado que hasta el momento no se ha estudiado cómo es la motivación maternal de las hembras con CS en pruebas específicas ni el circuito neural subyacente, nos planteamos las siguientes hipótesis:

- 1) Los cambios en la expresión del comportamiento maternal en hembras con camadas superpuestas hacia crías juveniles y neonatas responden a diferencias en la asignación de valores de incentivo relativo entre esos estímulos.
- 2) El circuito maternal de hembras con camadas superpuestas mostrará un patrón de activación diferencial dependiente del estímulo presentado.

OBJETIVOS GENERALES

1. Evaluar la actividad neuronal de áreas del circuito maternal de hembras con camadas superpuestas frente a la interacción con neonatos o juveniles.
2. Determinar si existe un patrón de activación diferencial en ciertas áreas involucradas con el control del comportamiento maternal en hembras con camadas superpuestas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el valor de incentivo relativo de neonatos y juveniles para las MCS mediante el registro de la preferencia en un laberinto tricameral en forma de Y.
2. Analizar el comportamiento maternal de dichas ratas hacia las crías juveniles o neonatas
3. Determinar la expresión de c-Fos en área preóptica media, porción ventral de *bed nucleus of the stria terminalis*, corteza prefrontal medial y amígdala en

hembras con en camadas superpuestas, producto de la interacción con neonatos o juveniles luego de una prueba de comportamiento maternal.

MATERIALES Y MÉTODOS

ANIMALES

Se utilizaron ratas hembras y machos (*Rattus norvegicus*, cepa *Wistar*), criadas en el Laboratorio de Experimentación Animal (LEA) de Facultad de Ciencias. El bioterio se mantiene bajo un ciclo de luz-oscuridad 12:12 horas y con temperatura ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$) y humedad (65%) constante. Los animales tuvieron libre acceso a agua y ración, y se alojaron en cajas residencia (53 x 36 x 25 cm) en grupos de 3-4 del mismo sexo, excepto durante el apareamiento y en el caso de las hembras lactantes, que se alojaron con sus crías en cajas residencia de 53 x 36 x 25 cm. El protocolo experimental correspondiente a este proyecto fue aprobado por la Comisión de Ética en el Uso de Animales de Facultad de Ciencias (N° Exp. 240011-001541-17).

PROCEDIMIENTO DE CRIA

Se realizó de acuerdo con el protocolo de Uriarte et al. (2008) (Uriarte et al., 2008). En resumen, para obtener las MCS se alojaron hembras sexualmente activas con machos sexualmente activos durante el período de oscuridad. Las hembras preñadas permanecieron en grupos de 3 o 4 individuos. Una semana antes del primer parto, las ratas gestantes fueron separadas y colocadas con macho para permitir el apareamiento en estro post-parto. Al día siguiente al parto se verificó la presencia de espermatozoides en el exudado vaginal, y se retiró el macho. Las camadas fueron unificadas en 8 crías (preferentemente 4 hembras y 4 machos). A los 21 días de edad, las crías juveniles fueron destetadas, excepto un macho y una hembra, que permanecieron con la madre (Uriarte et al., 2009). Posteriormente al destete, se controló diariamente la presencia de crías, estableciéndose el día del parto como día 1 postparto (Figura 2).

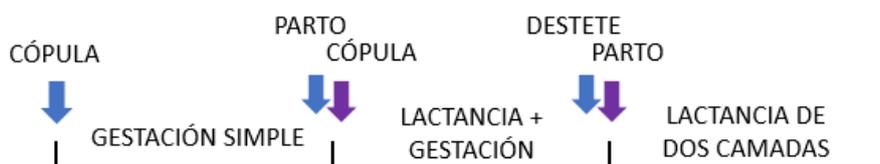


Figura 2: Procedimiento de obtención de camadas superpuestas

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Experimento 1: Determinación del valor de incentivo relativo de neonatos vs juveniles

Para determinar la influencia de la exposición hormonal de la gestación y el parto y de la experiencia maternal previa sobre la motivación maternal de las madres de camadas superpuestas se registró la preferencia en un laberinto en forma de Y de cada hembra hacia las crías neonatas y juveniles en el día 2 o 3 posparto de la segunda camada.

Grupo Experimental

Madres de Camadas Superpuestas, MCS, (n=10): ratas lactantes con camadas superpuestas (neonatos y juveniles) que pasaron por la gestación y el parto de ambas camadas luego del apareamiento en el estro posparto.

Modelo de preferencia

El modelo consiste de un laberinto transparente de acrílico en forma de Y con tres cámaras de igual tamaño (25 x 30 x 18 cm) al final de cada brazo (10 x 60 x 10 cm). Cada cámara presenta una división de acrílico transparente perforada, que permite percibir los estímulos ubicados en ellas, sin permitir el contacto físico con los mismos. Los animales experimentales se ubicaron en el centro de un laberinto y exploraron el modelo vacío por 15 minutos para habituarse. Posteriormente, se colocaron en dos de las cámaras los estímulos a evaluar de manera contrabalanceada, mientras que la tercera cámara permaneció vacía (cámara neutra). Durante 20 minutos se registró: tiempo de permanencia en cada cámara, exploración (número total de entradas a las cámaras+número de entradas a los brazos) y el número de comportamientos de acicalamiento e intentos de obtener acceso a los estímulos (mordeduras y arañazos de la pared divisoria). Las medidas de preferencia a utilizar incluyen: el porcentaje de hembras en cada grupo que permanezca más del 50% del tiempo total en uno de los tres

compartimientos, con la condición adicional de que este tiempo debe ser 25% mayor que el tiempo de permanencia en cualquier de los otros 2 compartimientos, y el porcentaje de tiempo total de la prueba en cada compartimiento. Los datos se compararon utilizando el análisis de Wilcoxon para muestras dependientes.

Experimento 2: Activación del circuito neural de madres con camadas superpuestas ante la exposición a una de sus camadas

Para determinar las diferencias en el comportamiento maternal de las MCS hacia neonatos o juveniles se llevó a cabo una prueba en la que se registraron comportamientos tales como olfateos, lamidos, acarreos, y amamantamiento. Con el objetivo de determinar qué áreas del cerebro están involucradas en las diferencias cualitativas observadas en esta prueba, se comparó la expresión de c-Fos, un marcador de la activación neuronal, en áreas del cerebro involucradas en la regulación del comportamiento maternal.

Grupo Experimental

Para lograr discernir la activación de las distintas áreas del circuito neural maternal asociado con el comportamiento maternal de MCS, evaluamos la inmunoreactividad de c-Fos en hembras con camadas superpuestas luego de una prueba de comportamiento maternal 1) con crías neonatas (5 a 6 días de edad) (n=6), 2) con crías juveniles (26 a 27 días de edad) (n=6), y 3) sin reexposición a crías (grupo no exposición) (n=5).

Parte 1: Prueba de comportamiento maternal

En el día posparto 5, las MCS con sus crías fueron transportadas en sus cajas nido al cuarto de pruebas, donde fueron dejadas sin perturbaciones durante 60 minutos. Luego, todas las crías fueron removidas y dejadas fuera de la habitación. Después de 10 minutos, se realizó la prueba de comportamiento maternal de las madres con únicamente neonatos o juveniles. Se midieron comportamientos seleccionados - acarreo de las crías al nido, lamidos corporales y anogenitales y olfateos, así como la latencia de acarreo de la primer cría durante 15 minutos (Phillips-Farfan & Fernandez-Guasti, 2007). Para el grupo no exposición se removieron las crías y luego de 10 minutos la caja fue manipulada en la misma manera que los otros grupos, pero no se introdujeron crías. Todas las madres permanecieron bajo las condiciones de la prueba durante 90 minutos (Figura 3).

Las comparaciones entre grupos independientes se realizaron mediante la prueba de U de Mann Whitney en el caso de dos grupos y la prueba de Kruskal-Wallis en el caso de más de dos grupos.

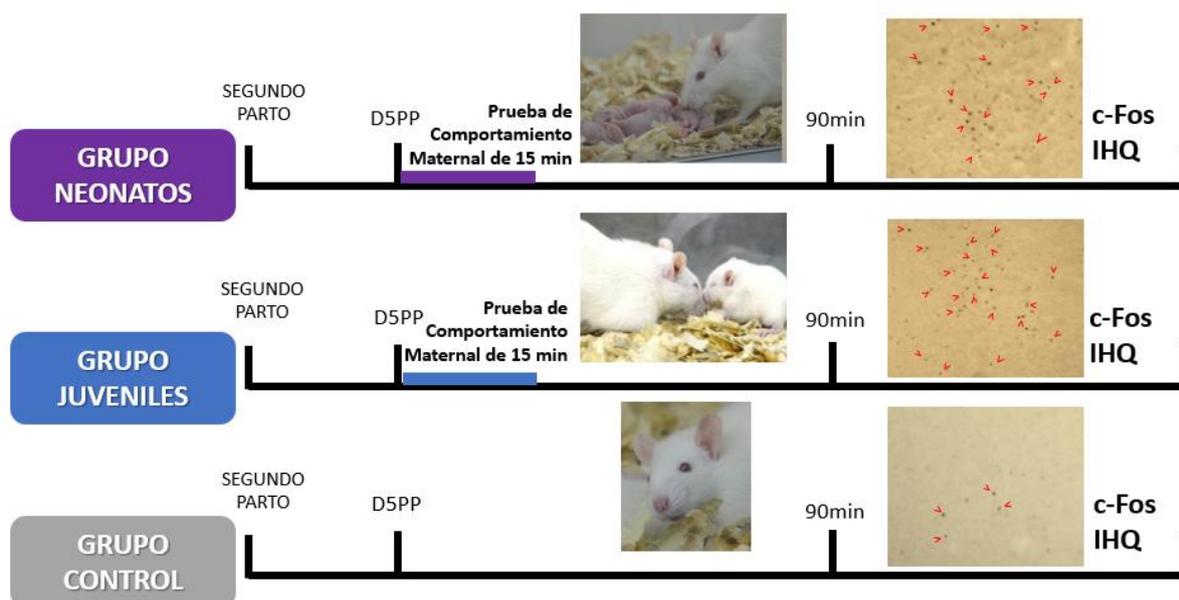


Figura 3: Esquema de los grupos experimentales y el cronograma de las pruebas necesarios correspondiente al experimento 2.

Parte 2: Cuantificación de la expresión de c-Fos en SNC por inmunohistoquímica

Preparación del tejido

Las ratas madres se anestesiaron con tiopental (80mg/kg) y se perfundieron de forma transcardíaca con solución buffer-fosfato salina heparinizada (PBS 200 ml con heparina 0,1 ml), seguida de solución de paraformaldehído al 4% (PAF 4%, 400 ml). El cerebro se removió y sumergió para su post-fijación en una solución de paraformaldehído al 2% durante 48 hs, seguido de una solución de sacarosa al 30% para criopreservar el tejido, y se almacenó a -80°C . Se cortaron secciones del cerebro de las áreas de interés de 40 μm de espesor, y se guardaron en *free float* en solución *antifreeze* a -20°C . Una serie de secciones por animal se utilizó para la inmunohistoquímica, mientras que la serie adyacente se coloreó por la técnica de Nissl para la identificación de las áreas (Phillips-Farfan & Fernandez-Guasti, 2007).

Inmunohistoquímica

La expresión de la proteína c-Fos fue determinada por inmunohistoquímica en secciones que se encuentran en *free-floating*. Dichas secciones fueron procesadas siguiendo el

protocolo de Phillips-Farfán & Fernandez-Guasti (2007) (Phillips-Farfan & Fernandez-Guasti, 2007). En resumen, luego de varios lavados con solución amortiguadora, las rodajas se incubaron con peróxido de hidrógeno para inactivar las peroxidasas endógenas. Posteriormente, para evitar el bloqueo inespecífico, las secciones se incubaron con una solución conteniendo suero de caballo y albúmina bovina. Luego de varios lavados, se incubaron con el anticuerpo primario (anticuerpo policlonal de cabra contra proteína c-Fos de humanos sc-52-G, *Santa Cruz Biotechnology Inc.*) diluido 1 en 2600 durante 36 hs a 4 °C. Posteriormente, las secciones se lavaron e incubaron con el anticuerpo secundario (anticuerpo policlonal de caballo biotinizado, *Vector Laboratories*) dilución 1:200 por 3 hs. Luego de lavar, las secciones fueron incubadas con el complejo AB para amplificar la señal y se visualizaron con la solución conteniendo DAB (ambos procedimientos de acuerdo a los kits comerciales *Vector Laboratories*). Finalmente, las secciones se lavaron y montaron para la posterior identificación de áreas y cuantificación, utilizando el software de acceso libre *ImageJ*. Todos los grupos experimentales fueron analizados juntos, simultáneamente, y en todos los ensayos se incluyó un control negativo (no se agregó anticuerpo primario, todos los demás pasos son idénticos)

Análisis de la expresión de c-Fos

Las células positivas para c-Fos fueron contabilizadas en las áreas bilaterales de cada sección de las imágenes capturadas, y para cada sujeto se calculó la media. Se analizó la expresión de c-Fos en áreas del cerebro importantes para el comportamiento maternal y su modulación, basado en estudios previos (Numan et al., 2010; Numan & Young, 2016). Dichas áreas fueron: CPFm (áreas cingulada -Cg1-, prelímbica -PrL- e infralímbica -IL), NA (shell y core), APOm, vBNST y amígdala (central -CeA-, medial -MeA-, y basolateral -BLA). Las áreas fueron identificadas utilizando tanto áreas adyacentes teñidas con Nissl como el atlas estereotáxico “*The rat brain in stereotaxic coordinates*” (Paxinos & Watson, 2007). Las regiones de interés (ROI) para cada sección del cerebro fueron mantenidas constantes para todas las determinaciones de núcleos positivos para c-Fos y fueron definidas utilizando la sección adyacente teñida con Nissl. Los límites anteroposteriores (conocidos como Bregma) de las regiones contabilizadas y sus respectivos ROI fueron: CPFm: 3.24 a 3.00 mm (Cg1 ROI = 0.2mm², PrL ROI = 0.2mm² and IL ROI = 0.2mm²); NA: 1.92 a 1.44 mm (Core ROI = 0.5mm² and Shell ROI = 0.4mm²); APOm and vBNST: 0.12 a -0.48 mm (APOm ROI = 0.5mm², vBNST ROI

=0.16 mm²); Amy: -2.76 a -3.12 mm (CeA ROI = 0.2 mm², BLA ROI =0.15 mm², MeA ROI = 0.4 mm²).

Las regiones fueron visualizadas utilizando un microscopio de epifluorescencia *Nikon Eclipse 80i 241*, con un aumento de 10x. Las imágenes de las áreas del cerebro seleccionadas fueron tomadas con una cámara digital *Nikon DS-5Mc-U2*, utilizando el software *Nikon NisElements 3.1 Advanced Research*. Para optimizar la detección y análisis de células positivas para c-Fos, las imágenes fueron convertidas a 8 bits utilizando el software *FIJI*(Schindelin et al., 2012). Una célula fue marcada como positiva para c-Fos cuando la inmunoreactividad era nuclear (verificado visualmente), y el núcleo tenía las siguientes características (restringidas con los filtros del software *FIJI*): eran entre 70 y 100% negras, de tamaño entre 10 y 100 μm y aproximadamente circulares (radio entre 0.5 y 1.0 μm). El número de células positivas para c-Fos fue reportado como la media entre el número de células a ambos lados del cerebro para cada área.

Análisis estadístico de c-Fos

En general la activación neuronal medida por inmunohistoquímica es una variable cuantitativa que presenta una distribución normal, con lo cual para su análisis se utilizaron métodos estadísticos paramétricos. Para este caso, los resultados se expresarán como media \pm SEM y se analizaron mediante un ANOVA (Sokal & Rohlf, 1969). El nivel de significancia escogido para las comparaciones estadísticas es $p < 0,05$.

RESULTADOS

Experimento 1: Determinación del valor de incentivo relativo de neonatos vs juveniles

Las madres de camadas superpuestas permanecieron una cantidad similar de tiempo en los compartimientos de neonatos y de juveniles (figura 4A). Al comparar la cantidad de entradas a los compartimientos de neonatos y juveniles (figura 4B), se observó que, si bien el 29% de las hembras prefirió a los neonatos, la mayoría (71%) no demostraron preferencia por ninguno de los compartimientos donde se encontraban las crías.

A pesar de que no hubo diferencias en los tiempos que las hembras permanecieron en cada compartimiento, las MCS realizaron una cantidad significativamente mayor de intentos por obtener el estímulo neonatos, en comparación con el estímulo juveniles ($T(14)=14.0, p<0.01$).

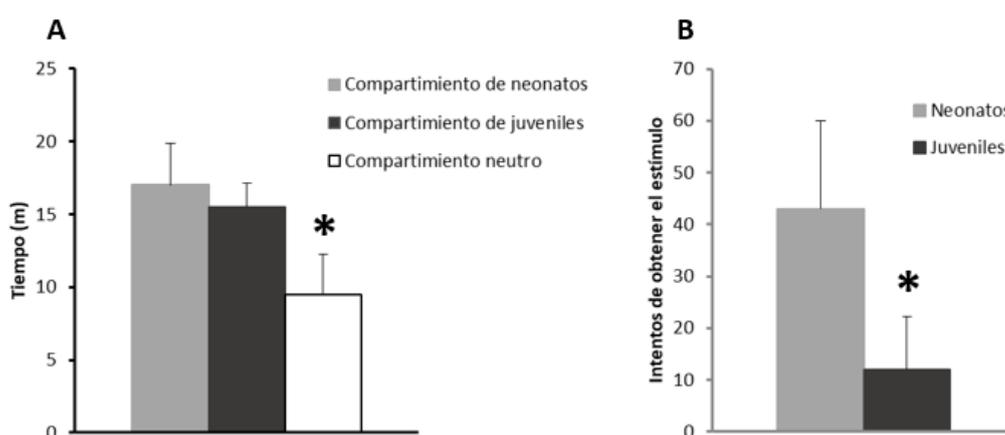


Figura 4: **A**) Tiempo (en minutos) invertido en los compartimientos de las crías neonatas, juveniles y en el compartimiento neutro y **B**) número de intentos por obtener los estímulos –neonatos o juveniles– de hembras con camadas superpuestas. * $p<0,05$ vs. neonatos y juveniles, prueba pareada de Wilcoxon. Los datos se expresan como medianas (RSIC).

Experimento 2: Activación del circuito neural de madres con camadas superpuestas ante la exposición a una de sus camadas

Parte 1: Prueba de comportamiento maternal

En la tabla 1 se pueden observar los comportamientos realizados por la MCS hacia las crías juveniles o neonatas durante la prueba de comportamiento maternal de 15 minutos. Las MCS exploraron ambos tipos de crías y no se observó diferencia en el comportamiento de olfateo de las madres hacia juveniles o neonatos ($U_{(6,6)}=13.5, p=0.73$).

Sin embargo, las MCS realizaron mayor cantidad de comportamientos maternales dirigidos hacia los neonatos que a los juveniles. Así, las crías neonatas provocaron en las madres mayores niveles de lamidos corporales ($U_{(6,6)}=4.5, p<0.05$), lamidos anogenitales ($U_{(6,6)}=5.5, p<0.05$), mouthing (rearreglos de la cría en el nido) ($U_{(6,6)}=6.0, p<0.05$) y acarreos ($U_{(6,6)}=0.0, p<0.01$) que los juveniles. Además, solo las madres que se encontraban en presencia de neonatos realizaron comportamientos tales como construcción del nido ($U_{(6,6)}=0.0, p<0.05$), y reunieron a todas las crías en el nido (0/6 grupo juveniles vs. 6/6 grupo neonatos).

Comportamiento maternal de hembras con camadas superpuestas

	Olfateo	Acarreo	Mouthing	Lamidos corporales	Lamidos anogenitales	Construcción del nido	Latencia de acarreo de crías
<i>Crías Neonatas</i>	4.0 (2.9)	6.5 (1.1)	1.0 (0.1)	5.0 (1.1)	2.5 (1.9)	4.5 (2.4)	31.5 (24.6)
<i>Crías Juveniles</i>	6.0 (2.0)	0.0 (0.1)*	0.0 (0.0)*	0.0 (0.0)*	0.0 (0.0)*	0.0 (0.0)*	900 (0.0)*

Tabla 1: Componentes del comportamiento demostrado por hembras de camadas superpuestas durante una prueba de comportamiento maternal de 15 minutos, realizada con una de las dos camadas (neonatos o juveniles). Los datos se muestran como medianas (SIQR). * $p < 0.05$ en comparaciones entre grupos con prueba U de Mann-Whitney.

Parte 2: Cuantificación de la expresión de c-Fos en SNC por inmunohistoquímica

La tinción obtenida en las secciones procesadas fue exclusivamente nuclear y se asemeja a reportes previos de expresión de c-Fos (Phillips-Farfan & Fernandez-Guasti, 2007). No se observó tinción en los controles negativos. Debido a problemas relacionados con la conservación del tejido, un cerebro de las hembras testeadas con juveniles y uno de las hembras testeadas con neonatos fueron descartados del análisis de c-Fos.

Área preóptica media y Bed nucleus of the stria terminalis

Como se puede observar en la figura 5, los niveles de activación de c-Fos en APOm y vBNST varían en los distintos grupos ($F(2,15)= 8.44; p<0.05$ y $F(2,11)= 30.04; p<0.05$, respectivamente). Las MCS mostraron niveles similares de activación de c-Fos luego de exposición a neonatos o juveniles ($p= 0.97$), y dichos niveles fueron significativamente

mayores a aquellos observados en el grupo no exposición ($p < 0.05$ vs. grupo neonatos y grupo juveniles). Por otra parte, si bien el número de células positivas para c-Fos en el vBNST de hembras que interactuaron con ambos tipos de crías fue mayor que el número observado en las hembras del grupo no exposición ($p < 0.05$ neonatos y juveniles vs no exposición), las MCS que interactuaron con neonatos presentaron mayor cantidad de células positivas para c-Fos que aquellas que interactuaron con juveniles ($p < 0.05$ vs. juveniles y grupo no exposición).

Área Prefrontal Medial

La figura 6A ilustra la expresión de c-Fos en el área prefrontal medial, donde se pueden observar diferencias significativas en el número de células positivas para c-Fos entre los grupos en las subregiones PrL ($F_{(2,13)}=209.31$, $p < 0.001$) e IL ($F_{(2,13)}=9.93$, $p < 0.01$).

El número de células positivas para c-Fos en el área PrL fue significativamente mayor en las hembras expuestas a neonatos o juveniles que en las del grupo no exposición ($p < 0.05$ neonatos y juveniles vs. no exposición). De forma interesante, en esta área la expresión de c-Fos luego de la prueba de comportamiento maternal con juveniles fue significativamente mayor que luego de la prueba con neonatos ($p < 0.05$). En el área IL, si bien luego de la interacción con neonatos o juveniles los niveles de expresión de c-Fos fueron más altos que en el grupo no exposición ($p < 0.05$ neonatos y juveniles vs. no exposición), las MCS que interactuaron con neonatos durante la prueba de comportamiento maternal exhibieron una mayor expresión de c-Fos que aquellas que interactuaron con juveniles ($p < 0.05$). El análisis cuantitativo de los niveles de expresión de c-Fos en el área Cg1 no mostraron diferencias significativas entre los grupos experimentales ($F_{(2,13)}=1.19$; $p= 0.34$).

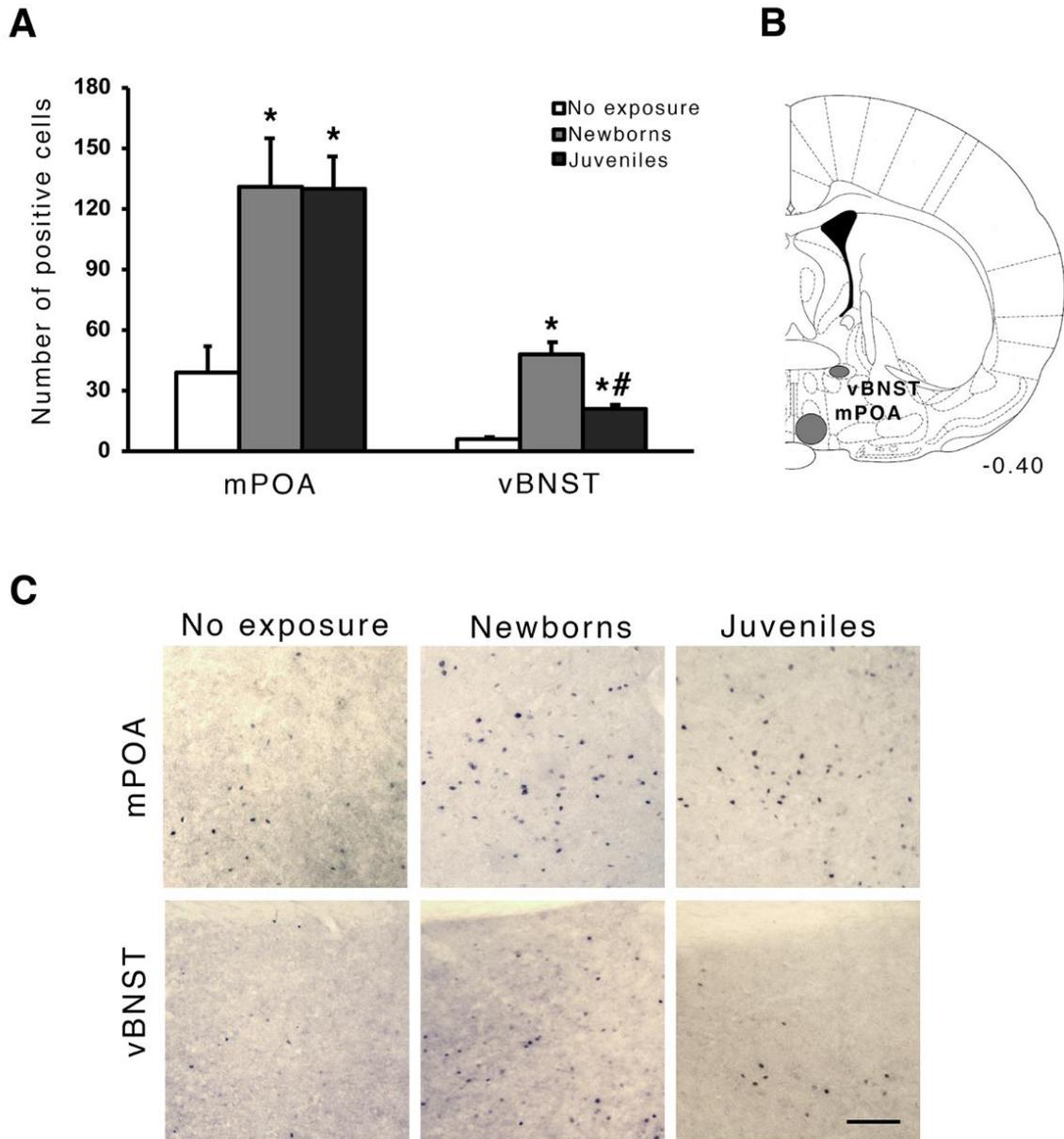


Figura 5: Expresión de c-Fos en el área preóptica media (APOM) y en la porción ventral de *bed nucleus of the stria terminalis* (vBNST) de MCS en los grupos no exposición, neonatos y juveniles. **A)** El gráfico muestra el número de células positivas para c-Fos en APOM y vBNST. Los datos se muestran como media \pm S.E.M. del número de neuronas positivas para c-Fos. * $p < 0.05$ vs. grupo no exposición; # $p < 0.05$ vs. grupo neonatos, one-way ANOVA test, seguido de Fisher LSD post-hoc test; **B)** Representación esquemática de la ROI cuantificada en APOM y vBNST, basado en el atlas estereotáxico de coordenadas de Paxinos & Watson (Paxinos & Watson, 2007). Los números al costado del esquema indica la distancia a Bregma en mm. **C)** Fotomicrografías representativas de la expresión de c-Fos en APOM y vBNST de MCS en los tres grupos evaluados. Barra de escala: 100 μ m. Magnificación: 10X.

Núcleo Accumbens

Los niveles de activación de c-Fos en el NA (Figura 6C) variaron entre los grupos tanto en la subregión core ($F_{(2,13)}= 4.28$; $p<0.05$) como en la subregión shell ($F_{(2,13)}= 4.51$; $p<0.05$). Tanto en el core como en el shell de NA, las MCS que interactuaron con neonatos o juveniles en la prueba de comportamiento maternal presentaron mayor expresión de c-Fos en comparación con el grupo no exposición (neonatos y juveniles vs. no exposición: core: $p<0.05$ y shell: $p<0.05$). Los niveles de expresión de c-Fos en ambas subregiones no presentaron diferencias entre las MCS que interactuaron con neonatos o juveniles (neonatos vs juveniles: core: $p=0.98$ and shell: $p=0.98$).

Amígdala

Como puede observarse en la figura 6E, no se observaron diferencias en los niveles de activación de c-Fos en CeA ($F_{(2,12)}=1.55$; $p= 0.25$) entre los grupos. En contraste, tanto en el área MeA como en el área BLA, la expresión de c-Fos presentó diferencias entre los grupos (MeA: $F_{(2,12)}=1.55$; $p<0.05$ and BLA: $F_{(2,12)}=1.55$; $p<0.05$). Los niveles de c-Fos en MeA fueron mayores en las MCS testeadas con juveniles en comparación con los otros grupos ($p<0.05$ vs. neonatos y no exposición), mientras que no se encontró diferencia entre los grupos neonatos y no exposición ($p= 0.65$). Además, en BLA, el número de células positivas para c-Fos encontrado fue significativamente mayor en el grupo juveniles en comparación con los grupos neonatos y no exposición ($p<0.05$ vs. neonatos y no exposición).

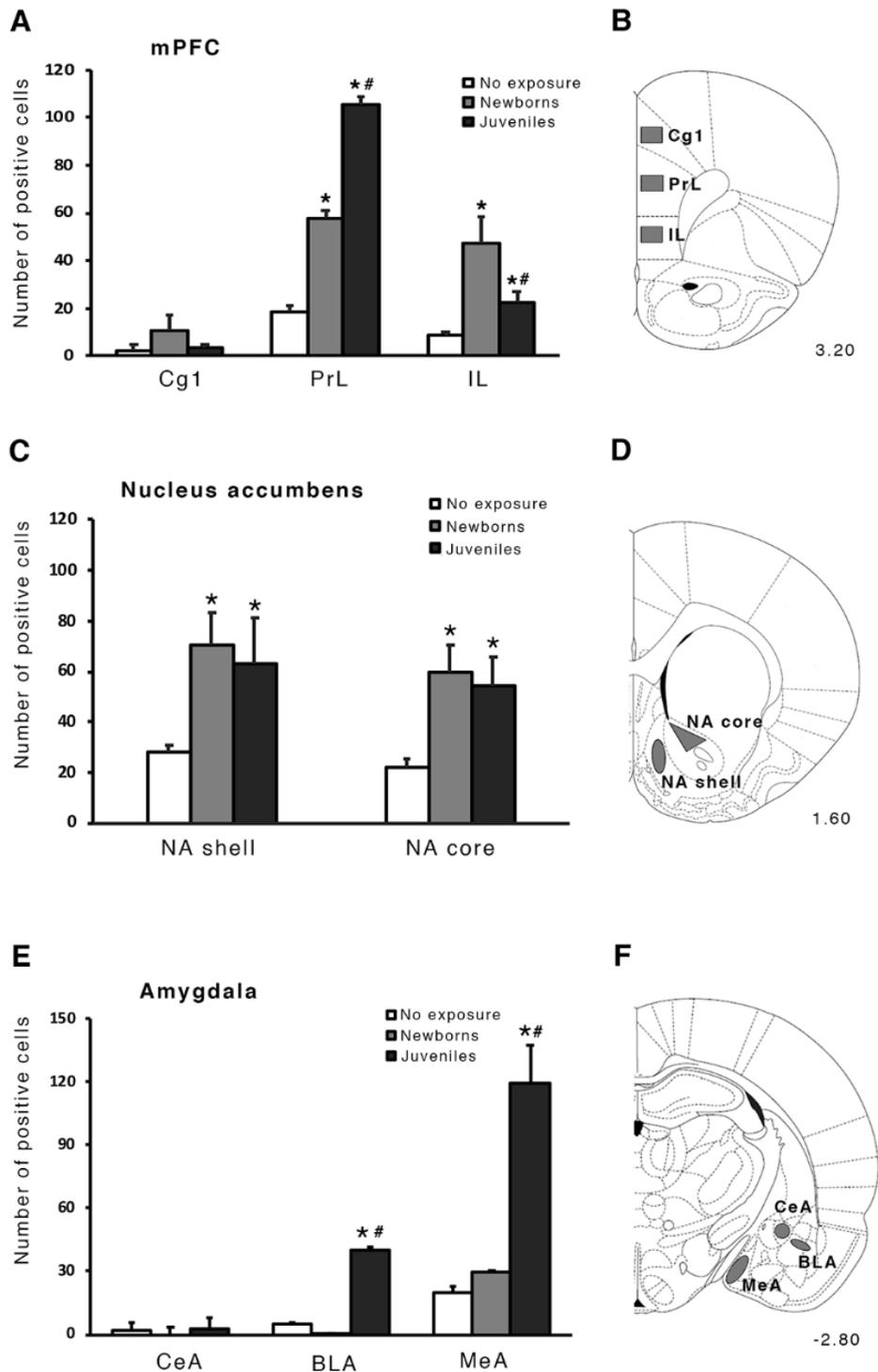


Figura 6: cuantificación de c-Fos de las subregiones cingulada (Cg1), prelímbica (PrL) e infralímbica (IL) de la corteza prefrontal medial (CPFm) (A); núcleo accumbens (NA) shell y core (C) y porciones central (CeA), basolateral (BLA) y medial (MeA) de la amígdala (E) de MCS en las condiciones no exposición, neonatos y juveniles. Los datos se muestran como media± SEM del número de células positivas para c-Fos para cada región. * $p < 0.05$ vs. grupo no exposición; # $p < 0.05$ vs. grupo neonatos, one-way ANOVA test, seguido de Fisher LSD post-hoc test; en secciones B, D y F se muestran las representaciones esquemáticas de las ROI cuantificadas en cada región, basado en el atlas estereotáxico de coordenadas de Paxinos & Watson (Paxinos & Watson, 2007). Los números al costado de cada esquema indican la distancia de Bregma en mm.

DISCUSIÓN

En el experimento 1, la falta de preferencia de las MCS hacia las crías neonatas o juveniles sugiere que ambos estímulos tienen un valor de incentivo alto para ellas. Sin embargo, la mayor cantidad de intentos por alcanzar a los neonatos, en comparación con los juveniles, podría ser un indicativo de que el valor de incentivo relativo de los neonatos es mayor al de los juveniles. El alto valor de incentivo asignado por la madre a ambos tipos de cría apoyaría la idea de que los bajos niveles de comportamiento maternal hacia juveniles observados en la prueba de comportamiento maternal del experimento 2 representan una adaptación al cuidado de las crías “menos demandantes”, y no una falta de interés por ellas.

Curiosamente, el número de intentos realizados por las MCS para alcanzar las crías neonatas es similar al observado en madres en posparto temprano evaluadas en el mismo modelo de preferencia, (Ferreno et al., 2018). Tanto MCS como madres en posparto temprano experimentaron un parto reciente, por lo tanto, podría proponerse que la exposición hormonal correspondiente a la segunda gestación y el segundo parto son cruciales para volcar la balanza hacia los neonatos en las MCS, asignándoles un mayor valor de incentivo, promoviendo que los neonatos reciban los cuidados maternos que demandan.

Asimismo, la falta de preferencia entre neonatos y juveniles por parte de las MCS, junto con la respuesta diferencial (número de intentos) hacia las crías de cada camada en el laberinto en Y contribuyen a la idea de que los procesos motivacionales que subyacen a la respuesta maternal contribuye a la adaptación de la respuesta de las madres a las necesidades de sus crías y el contexto en el que se encuentran (Pereira & Ferreira, 2016).

Los resultados del experimento 2 concuerdan con investigaciones previas (Uriarte et al., 2008), en donde se observa que las MCS manifiestan distintas respuestas comportamentales hacia sus crías neonatas en comparación con los juveniles. De forma interesante, estos comportamientos se asociaron con patrones específicos de activación en el circuito neural maternal. Así, pudo observarse una expresión similar de c-Fos en áreas clave, como ser APOm y NA, mientras que en áreas tales como vBNST, las subregiones IL y PrL de la CPFm, y los núcleos basolateral y medial de la amígdala, se cuantificó una activación diferencial entre los grupos.

Los altos niveles de expresión de c-Fos observados en APOm y vBNST de las MCS luego de la prueba de comportamiento maternal con crías neonatas o juveniles son comparables con una gran cantidad de estudios previos, los cuales muestran que las hembras maternas muestran un aumento en la activación de estas áreas luego de la interacción con sus crías (Fleming & Walsh, 1994; Lonstein, Simmons, Swann, & Stern, 1998; Numan & Numan, 1994, 1997; Walsh et al., 1996). En nuestro estudio se detectó una mayor activación en vBNST cuando las MCS realizaron la prueba de comportamiento maternal con neonatos en comparación con la actividad observada en MCS que interactuaron con juveniles. Si bien tanto el APOm como vBNST han sido implicados en el procesamiento multisensorial de los estímulos provenientes de las crías, y son considerados componentes críticos para la expresión del comportamiento maternal (Numan, 2006, 2007; Walsh et al., 1996), se han encontrado diferencias en la forma en que estas áreas se conectan con otras regiones relevantes para el comportamiento maternal. Numan & Numan (1997) determinaron que luego de una interacción madre-cría, la mayor proporción de neuronas positivas para c-Fos en APOm proyectan hacia el septum lateral y el hipotálamo medial, mientras que en el vBNST las neuronas positivas para c-Fos proyectan predominantemente hacia el hipotálamo medial, el *retrochiasmatic field* (RRF) y el VTA (Numan & Numan, 1997). Como el RRF y el VTA tienen neuronas dopaminérgicas que inervan el NA, podemos especular que la mayor activación de vBNST que se observa en la interacción con neonatos, en comparación con los juveniles, promueve la respuesta maternal activa de las MCS observada en la prueba de comportamiento maternal a través de las proyecciones a estas áreas.

Por otra parte, la similar activación de APOm en MCS durante la interacción con crías neonatas o juveniles puede relacionarse con el rol funcional que se le ha asignado a esta área. Pereira & Morrell demostraron que el APOm se encuentra involucrado de forma diferencial durante la lactancia en la expresión del comportamiento maternal, desde un rol facilitador, necesario durante el posparto temprano, hasta un rol inhibitorio durante el posparto tardío (Pereira & Morrell, 2009, 2011), sugiriendo que esta área procesa el estímulo sensorial de las crías para adaptar la respuesta maternal a sus necesidades específicas. Bajo este marco de referencia, el hecho de que las MCS presentaron una activación similar de APOm mientras su respuesta maternal varió en función de las características del desarrollo de las crías, apoya la idea de que la reducción del comportamiento maternal de las MCS hacia las crías juveniles responde a una adaptación maternal a sus necesidades, más que a una falta de motivación de cuidarlos. Estos

resultados están de acuerdo con lo observado en el primer experimento, en el cual determinamos que si bien las MCS dirigen mayor cantidad de actividades de cuidado hacia los neonatos (Uriarte et al., 2008), no los prefieren por sobre los juveniles en una prueba de preferencia.

En la misma línea de pensamiento, encontramos que el NA, que representa una de las proyecciones principales de APOM/vBNST, se activó de forma similar cuando las MSC interactuaron durante la prueba de comportamiento maternal con crías juveniles o neonatas. De acuerdo con esto, muchos estudios han demostrado que la interacción con crías está asociada con la expresión de c-Fos en NA (Fleming & Walsh, 1994; Lonstein et al., 1998; N. Matsushita, Y. Muroi, K.-i. Kinoshita, & T. Ishii, 2015). Además, Stack et al. (2002) demostraron que cortes unilaterales de cuchillo, o lesiones inducidas por NMDA en APOM/vBNST causan una reducción ipsilateral en la expresión de c-Fos inducida por comportamiento maternal en el shell de NA, indicando que la actividad en esta región depende de la conexión funcional entre estas regiones, que son críticas para la expresión del comportamiento maternal (Stack, Balakrishnan, Numan, & Numan, 2002).

Dado que la actividad del sistema mesolímbico dopaminérgico ha sido relacionada con los aspectos motivacionales del comportamiento maternal (Ferreño, Uriarte, Zuluaga, Ferreira, & Agrati, 2018; Numan & Stolzenberg, 2009; Stolzenberg & Numan, 2011), y que las MCS exhibieron más comportamiento maternal hacia los neonatos y hubo mayor cantidad de expresión de c-Fos en vBNST en comparación con la interacción con los juveniles, habríamos esperado una activación diferente en NA de madres expuestas a cada tipo de cría. Sin embargo, la relación entre el aumento de la motivación y el cuidado maternal, y la expresión de c-Fos no es lineal en NA. Zhao et al. (2010) encontró que la administración de haloperidol, un antagonista dopaminérgico que reduce la expresión de los componentes activos del comportamiento maternal, aumenta los niveles de c-Fos en el NA de hembras maternas (Zhao & Li, 2010). Además, la exposición de hembras posparto con experiencia a crías está asociada con una expresión c-Fos mayor en APOM pero no en NA, en comparación con hembras sin experiencia (Fleming & Korsmit, 1996). De forma similar, las madres lactantes que prefirieron un lugar previamente asociado con crías en un CPP exhibieron mayor expresión de c-Fos en APOM, pero menor en NA en comparación con madres que prefirieron un ambiente relacionado con cocaína (Mattson et al., 2001). Para lograr aclarar este problema, sería necesario realizar estudios que

analicen la actividad dopaminérgica en NA o su respuesta electrofisiológica cuando las MCS son presentadas con crías neonatas o juveniles.

Si bien la expresión de c-Fos luego de la interacción madre-cría no nos permite inferir si una región del cerebro fue activada por el estímulo de las crías previo a la ejecución del comportamiento maternal, podría especularse que si ambos tipos de crías activan de forma similar el APOm y NA, la selección de la respuesta comportamental adecuada manifestada por MCS hacia neonatos o juveniles podría estar mediada por otras áreas específicas del circuito neural maternal, como ser vBNST, pero también la CPFm, que juega un rol esencial en la flexibilidad comportamental (Floresco, Block, & Tse, 2008). Pereira & Morrell (2011) (Pereira & Morrell, 2011) proponen que las distintas subregiones de la CPFm tienen distintos roles en la expresión del comportamiento maternal durante del periodo posparto. Estas autoras demostraron que la región IL tiene un rol central en la expresión del comportamiento maternal durante el posparto temprano y disminuye a medida que este progresa, mientras que el área PrL es reclutada más tarde en el periodo posparto. En línea con estos resultados, en el presente estudio observamos que el área IL de la CPFm exhibe la mayor expresión de c-Fos luego de la interacción de la MCS con crías neonatas, mientras que en el área PrL los mayores niveles de c-Fos se encuentran en madres luego de la interacción con juveniles. Juntos, los resultados de estos experimentos sugieren que la subregión IL de la CPFm es necesaria para una respuesta maternal adecuada hacia neonatos, mientras que la subregión PrL contribuye a la expresión del cuidado maternal de crías mayores. De esta forma, las MCS exhibieron un perfil particular de activación de la CPFm, con elementos que se asemejan al posparto temprano y al tardío. Esto podría ser lo que permite que respondan de forma adecuada a crías neonatas y juveniles.

La falta de activación neuronal en el área Cg1 contrasta con los resultados obtenidos por estudios previos donde se empleó la inactivación transitoria del área, los cuales proponen que el área Cg1 es responsable de los aspectos organizacionales del comportamiento maternal durante el posparto temprano y tardío (Pereira & Morrell, 2011). Una posible explicación para esta discrepancia es que las MCS son multíparas, mientras que las empleadas en el estudio de inactivación mencionado son primíparas. Sería interesante explorar la influencia de la experiencia maternal previa en la actividad de las distintas subregiones de la CPFm luego de la interacción madre-cría. Además, si bien c-Fos es un buen indicador de la activación neuronal (Hoffman, Smith, & Verbalis, 1993; Sagar, Sharp, & Curran, 1988), no todas las neuronas activadas expresan proteínas fos

(McReynolds, Christianson, Blacktop, & Mantsch, 2018; Morgan & Curran, 1991), y por lo tanto podrían ser necesarios otros marcadores de actividad neuronal para revelar el estado de activación de esta región.

La mayor activación neuronal en los núcleos medial y basolateral de la amígdala de MCS luego de la prueba de comportamiento maternal con crías juveniles en comparación a las que interactuaron con neonatos sugiere un procesamiento emocional diferencial de ambos tipos de crías. La MeA es considerada una de las áreas más importantes involucradas en el procesamiento del estímulo social olfatorio en roedores (Curtis & Wang, 2003; Ferguson, Aldag, Insel, & Young, 2001). Ha sido demostrado que MeA transmite la información quimiosensorial de las crías (Fleming & Walsh, 1994) que proviene de los sistemas olfatorio y vomeronasal a través de APOm/vBNST (Scalia & Winans, 1975; Simerly & Swanson, 1986). Además, este núcleo ha sido implicado en el reconocimiento social en roedores (Noack, Murau, & Engelmann, 2015; Wang, Zhao, Liu, & Fu, 2014). Por otra parte, la BLA, la cual se sabe que es necesaria para la expresión apropiada de respuestas maternas orientadas, tales como acarreo (Numan et al., 2010), también ha sido involucrada en la formación del aprendizaje asociativo (Everitt, Morris, O'Brien, & Robbins, 1991). Por lo tanto, puede especularse que la alta activación de este núcleo de la amígdala está relacionada con el procesamiento neural asociado con el reconocimiento individual de las crías juveniles por parte de la madre.

Contrariamente a lo que se ha observado en otros estudios (Fleming, Suh, Korsmit, & Rusak, 1994; Numan & Numan, 1994), pero de acuerdo con Lonstein et al. (Lonstein et al., 1998), no encontramos un aumento en los niveles de c-Fos en MeA ni BLA de MCS luego de la interacción con neonatos en comparación con el grupo no exposición. Esta discrepancia puede ser atribuida a diferencias en el diseño experimental utilizado en este estudio, como ser el estado fisiológico de las hembras lactantes empleadas: mientras que las MCS son multíparas, los estudios previos utilizan hembras primíparas. Además, para evitar la interrupción de la dinámica de la interacción madre-cría en esta compleja composición familiar, el tiempo de separación madre-cría de las MCS antes de la prueba de comportamiento maternal fue significativamente menor que el empleado en estudios de c-Fos previos. Si bien en las condiciones experimentales utilizadas la exposición a neonatos no generó expresión de c-Fos en MeA ni BLA, las diferencias significativas en la activación de estos núcleos, al igual que en las subregiones de la CPFm luego de la interacción con juveniles o neonatos, apunta hacia un rol de estas estructuras en la discriminación entre ambos tipos de crías.

Las diferencias encontradas en la respuesta maternal y la activación neural del circuito maternal de MCS que interactuaron con neonatos o juveniles durante la prueba de comportamiento maternal, podría no solo estar respondiendo a las características distintivas de cada tipo de cría, sino que también podría estar influenciada por el número de crías presentado en cada condición (8 neonatos vs 2 juveniles). Si bien realizar la prueba con la misma cantidad de neonatos que de juveniles habría balanceado este factor, hubiese alterado significativamente la estimulación recibida normalmente por MCS, el modelo en el cual se han caracterizado previamente estas adaptaciones maternales particulares (Uriarte et al., 2008). Sería interesante determinar cómo se ajusta el comportamiento maternal de MCS, así como su respuesta neural al modificar la proporción de crías neonatas y juveniles.

En conclusión, en el modelo de camadas superpuestas tanto neonatos como juveniles tienen un alto valor de incentivo para las madres, aunque éstas hacen mayor esfuerzo por obtener los neonatos. Por otra parte, si bien los patrones de activación de c-Fos observados en MCS luego de la interacción con ambos tipos de crías podría ser el resultado directo del procesamiento del estímulo de las crías, y por lo tanto ser lo que provoca las distintas respuestas maternales observadas, también podría ser la consecuencia de estas expresiones maternales. Aun así, este estudio constituye un primer acercamiento a la exploración de las bases neurales de la flexibilidad maternal en el contexto particular de madres criando camadas superpuestas. En este estudio es posible observar que las MCS exhiben patrones específicos de activación del circuito maternal en función de la edad de las crías. Esto sugiere que dichas diferencias neurales serían lo que subyace a la selección maternal de la respuesta adecuada a crías con distintas demandas fisiológicas. Sin embargo, es necesario realizar más estudios para determinar la relevancia de las áreas que exhibieron activación diferencial en relación con la flexibilidad maternal de las MCS cuando interactuaron con crías en distintos estados de desarrollo, así como el posible rol de factores relacionados a la experiencia y endocrinos en las adaptaciones neurales y fisiológicas de estas madres.

REFERENCIAS

- Bridges, R. S. (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*(3), 930-940. doi: 10.1210/endo-114-3-930
- Curtis, J. T., & Wang, Z. (2003). Forebrain c-fos expression under conditions conducive to pair bonding in female prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Physiology & Behavior*, *80*(1), 95-101. doi: [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(03\)00226-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(03)00226-9)
- Everitt, B. J., Morris, K. A., O'Brien, A., & Robbins, T. W. (1991). The basolateral amygdala-ventral striatal system and conditioned place preference: further evidence of limbic-striatal interactions underlying reward-related processes. *Neuroscience*, *42*(1), 1-18.
- Ferguson, J. N., Aldag, J. M., Insel, T. R., & Young, L. J. (2001). Oxytocin in the Medial Amygdala is Essential for Social Recognition in the Mouse. *The Journal of Neuroscience*, *21*(20), 8278.
- Ferreno, M., Pose, S., Agrati, D., Zuluaga, M. J., Ferreira, A., & Uriarte, N. (2018). Incentive value of newborn pups relative to juveniles for mother rats raising overlapping litters. *Behav Processes*. doi: 10.1016/j.beproc.2018.07.016
- Ferreño, M., Uriarte, N., Zuluaga, M. J., Ferreira, A., & Agrati, D. (2018). Dopaminergic activity mediates pups' over male preference of postpartum estrous rats. *Physiology & Behavior*, *188*, 134-139. doi: <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2018.02.002>
- 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. *Behav Neurosci*, *110*(3), 567-582.
- Fleming, A. S., Suh, E. J., Korsmit, M., & Rusak, B. (1994). Activation of Fos-like immunoreactivity in the medial preoptic area and limbic structures by maternal and social interactions in rats. *Behav Neurosci*, *108*(4), 724-734.
- Fleming, A. S., & Walsh, C. (1994). Neuropsychology of maternal behavior in the rat: c-fos expression during mother-litter interactions. *Psychoneuroendocrinology*, *19*(5-7), 429-443.
- Floresco, S. B., Block, A. E., & Tse, M. T. (2008). Inactivation of the medial prefrontal cortex of the rat impairs strategy set-shifting, but not reversal learning, using a novel, automated procedure. *Behav Brain Res*, *190*(1), 85-96. doi: 10.1016/j.bbr.2008.02.008
- Gilbert, A. N., Burgoon, D. A., Sullivan, K. A., & Adler, N. T. (1983). Mother-weanling interactions in Norway rats in the presence of a successive litter produced by postpartum mating. *Physiol Behav*, *30*(2), 267-271.
- Gilbert, A. N., Pelchat, R. J., & Adler, N. T. (1980). Postpartum copulatory and maternal behaviour in Norway rats under seminatural conditions. *Anim Behav*, *28 Pt 4*, 989-995.
- Grieb, Z. A., Holschbach, M. A., & Lonstein, J. S. (2018). Interaction between postpartum stage and litter age on maternal caregiving and medial preoptic area orexin. *Physiol Behav*, *194*, 430-436. doi: 10.1016/j.physbeh.2018.06.025
- Hansen, S., Harthorn, C., Wallin, E., Lofberg, L., & Svensson, K. (1991). Mesotelencephalic dopamine system and reproductive behavior in the female rat: effects of ventral tegmental 6-hydroxydopamine lesions on maternal and sexual responsiveness. *Behav Neurosci*, *105*(4), 588-598.

- Hoffman, G. E., Smith, M. S., & Verbalis, J. G. (1993). c-Fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol*, *14*(3), 173-213. doi: 10.1006/frne.1993.1006
- 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. *J Comp Neurol*, *416*(1), 45-78.
- Lee, A., Clancy, S., & Fleming, A. S. (1999). Mother rats bar-press for pups: effects of lesions of the mpoa and limbic sites on maternal behavior and operant responding for pup-reinforcement. *Behav Brain Res*, *100*(1-2), 15-31.
- 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*(1), 267-281.
- Matsushita, N., Muroi, Y., Kinoshita, K.-i., & Ishii, T. (2015). Comparison of c-Fos expression in brain regions involved in maternal behavior of virgin and lactating female mice. *Neurosci Lett*, *590*, 166-171. doi: <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.02.003>
- Matsushita, N., Muroi, Y., Kinoshita, K., & Ishii, T. (2015). Comparison of c-Fos expression in brain regions involved in maternal behavior of virgin and lactating female mice. *Neurosci Lett*, *590*, 166-171. doi: 10.1016/j.neulet.2015.02.003
- Mattson, B. J., & Morrell, J. I. (2005). Preference for cocaine- versus pup-associated cues differentially activates neurons expressing either Fos or cocaine- and amphetamine-regulated transcript in lactating, maternal rodents. *Neuroscience*, *135*(2), 315-328. doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.06.045
- Mattson, B. J., Williams, S., Rosenblatt, J. S., & Morrell, J. I. (2001). Comparison of two positive reinforcing stimuli: pups and cocaine throughout the postpartum period. *Behav Neurosci*, *115*(3), 683-694.
- McReynolds, J. R., Christianson, J. P., Blacktop, J. M., & Mantsch, J. R. (2018). What does the Fos say? Using Fos-based approaches to understand the contribution of stress to substance use disorders. *Neurobiology of Stress*, *9*, 271-285. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2018.05.004>
- Moltz, H., Lubin, M., Leon, M., & Numan, M. (1970). Hormonal induction of maternal behavior in the ovariectomized nulliparous rat. *Physiol Behav*, *5*(12), 1373-1377.
- Morgan, J. I., & Curran, T. (1991). Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annu Rev Neurosci*, *14*, 421-451. doi: 10.1146/annurev.ne.14.030191.002225
- Noack, J., Murau, R., & Engelmann, M. (2015). Consequences of temporary inhibition of the medial amygdala on social recognition memory performance in mice. *Front Neurosci*, *9*, 152. doi: 10.3389/fnins.2015.00152
- Numan, M. (1990). Long-term effects of preoptic area knife cuts on the maternal behavior of postpartum rats. *Behav Neural Biol*, *53*(2), 284-290.
- Numan, M. (2006). Hypothalamic neural circuits regulating maternal responsiveness toward infants. *Behav Cogn Neurosci Rev*, *5*(4), 163-190. doi: 10.1177/1534582306288790
- Numan, M. (2007). Motivational systems and the neural circuitry of maternal behavior in the rat. *Dev Psychobiol*, *49*(1), 12-21. doi: 10.1002/dev.20198
- Numan, M., Bress, J. A., Ranker, L. R., Gary, A. J., Denicola, A. L., Bettis, J. K., & Knapp, S. E. (2010). The importance of the basolateral/basomedial amygdala for goal-directed maternal responses in postpartum rats. *Behav Brain Res*, *214*(2), 368-376. doi: 10.1016/j.bbr.2010.06.006

- Numan, M., Corodimas, K. P., Numan, M. J., Factor, E. M., & Piers, W. D. (1988). Axon-sparing lesions of the preoptic region and substantia innominata disrupt maternal behavior in rats. *Behav Neurosci*, *102*(3), 381-396.
- Numan, M., & Insel, T. R. (2003). *Experiential factors influencing maternal behavior. The neurobiology of parental behavior*. New York: Springer-Verlag.
- Numan, M., & Numan, M. J. (1991). Preoptic-brainstem connections and maternal behavior in rats. *Behav Neurosci*, *105*(6), 1013-1029.
- Numan, M., & Numan, M. J. (1994). Expression of Fos-like immunoreactivity in the preoptic area of maternally behaving virgin and postpartum rats. *Behav Neurosci*, *108*(2), 379-394.
- Numan, M., & Numan, M. J. (1997). Projection sites of medial preoptic area and ventral bed nucleus of the stria terminalis neurons that express Fos during maternal behavior in female rats. *J Neuroendocrinol*, *9*(5), 369-384.
- Numan, M., Numan, M. J., Schwarz, J. M., Neuner, C. M., Flood, T. F., & Smith, C. D. (2005). Medial preoptic area interactions with the nucleus accumbens-ventral pallidum circuit and maternal behavior in rats. *Behav Brain Res*, *158*(1), 53-68. doi: 10.1016/j.bbr.2004.08.008
- Numan, M., & Smith, H. G. (1984). Maternal behavior in rats: evidence for the involvement of preoptic projections to the ventral tegmental area. *Behav Neurosci*, *98*(4), 712-727.
- 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. *Front Neuroendocrinol*, *30*(1), 46-64. doi: 10.1016/j.yfrne.2008.10.002
- Numan, M., & Young, L. J. (2016). Neural mechanisms of mother-infant bonding and pair bonding: Similarities, differences, and broader implications. *Horm Behav*, *77*, 98-112. doi: 10.1016/j.yhbeh.2015.05.015
- Oxley, G., & Fleming, A. S. (2000). The effects of medial preoptic area and amygdala lesions on maternal behavior in the juvenile rat. *Dev Psychobiol*, *37*(4), 253-265.
- Paxinos, G., & Watson, C. (2007). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. London: Academic Press.
- Pereira, M., & Ferreira, A. (2006). Demanding pups improve maternal behavioral impairments in sensitized and haloperidol-treated lactating female rats. *Behav Brain Res*, *175*(1), 139-148. doi: 10.1016/j.bbr.2006.08.013
- Pereira, M., & Ferreira, A. (2016). Neuroanatomical and neurochemical basis of parenting: Dynamic coordination of motivational, affective and cognitive processes. *Horm Behav*, *77*, 72-85. doi: 10.1016/j.yhbeh.2015.08.005
- Pereira, M., & Morrell, J. I. (2009). The changing role of the medial preoptic area in the regulation of maternal behavior across the postpartum period: facilitation followed by inhibition. *Behav Brain Res*, *205*(1), 238-248. doi: 10.1016/j.bbr.2009.06.026
- Pereira, M., & Morrell, J. I. (2011). Functional mapping of the neural circuitry of rat maternal motivation: effects of site-specific transient neural inactivation. *J Neuroendocrinol*, *23*(11), 1020-1035. doi: 10.1111/j.1365-2826.2011.02200.x
- Phillips-Farfan, B. V., & Fernandez-Guasti, A. (2007). c-Fos expression related to sexual satiety in the male rat forebrain. *Physiol Behav*, *91*(5), 609-619. doi: 10.1016/j.physbeh.2007.03.024
- Reisbick, S., Rosenblatt, J. S., & Mayer, A. D. (1975). Decline of maternal behavior in the virgin and lactating rat. *J Comp Physiol Psychol*, *89*(7), 722-732.
- Sagar, S. M., Sharp, F. R., & Curran, T. (1988). Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science*, *240*(4857), 1328-1331.

- Scalia, F., & Winans, S. S. (1975). The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals. *Journal of Comparative Neurology*, *161*(1), 31-55. doi: doi:10.1002/cne.901610105
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., . . . Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, *9*, 676. doi: 10.1038/nmeth.2019
- <https://www.nature.com/articles/nmeth.2019#supplementary-information>
- Sheehan, T., Paul, M., Amaral, E., Numan, M. J., & Numan, M. (2001). Evidence that the medial amygdala projects to the anterior/ventromedial hypothalamic nuclei to inhibit maternal behavior in rats. *Neuroscience*, *106*(2), 341-356.
- Simerly, R. B., & Swanson, L. W. (1986). The organization of neural inputs to the medial preoptic nucleus of the rat. *J Comp Neurol*, *246*(3), 312-342. doi: 10.1002/cne.902460304
- Sokal, R. R., & Rohlf, F. J. (1969). *Biometría. Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica*. España: Blume Madrid.
- Stack, E. C., Balakrishnan, R., Numan, M. J., & Numan, M. (2002). A functional neuroanatomical investigation of the role of the medial preoptic area in neural circuits regulating maternal behavior. *Behav Brain Res*, *131*(1-2), 17-36.
- Stolzenberg, D. S., & Numan, M. (2011). Hypothalamic interaction with the mesolimbic DA system in the control of the maternal and sexual behaviors in rats. *Neurosci Biobehav Rev*, *35*(3), 826-847. doi: 10.1016/j.neubiorev.2010.10.003
- Uriarte, N., Fernandez, M. V., Agrati, D., Zuluaga, M. J., Ferreno, M., & Ferreira, A. (2014). Maternal and affective behaviors of lactating rats reared in overlapping litters. *J Physiol Paris*, *108*(2-3), 221-230. doi: 10.1016/j.jphysparis.2014.04.001
- Uriarte, N., Ferreira, A., Rosa, X. F., & Lucion, A. B. (2009). Effects of litter-overlapping on emotionality, stress response, and reproductive functions in male and female rats. *Dev Psychobiol*, *51*(3), 259-267. doi: 10.1002/dev.20360
- Uriarte, N., Ferreira, A., Rosa, X. F., Sebben, V., & Lucion, A. B. (2008). Overlapping litters in rats: effects on maternal behavior and offspring emotionality. *Physiol Behav*, *93*(4-5), 1061-1070. doi: 10.1016/j.physbeh.2008.02.004
- Walsh, C. J., Fleming, A. S., Lee, A., & Magnusson, J. E. (1996). The effects of olfactory and somatosensory desensitization on Fos-like immunoreactivity in the brains of pup-exposed postpartum rats. *Behav Neurosci*, *110*(1), 134-153.
- Wang, Y., Zhao, S., Liu, X., & Fu, Q. (2014). Effects of the medial or basolateral amygdala upon social anxiety and social recognition in mice. *Turk J Med Sci*, *44*(3), 353-359.
- Wansaw, M. P., Pereira, M., & Morrell, J. I. (2008). Characterization of maternal motivation in the lactating rat: Contrasts between early and late postpartum responses. *Horm Behav*, *54*(2), 294-301. doi: 10.1016/j.yhbeh.2008.03.005
- Zhao, C., & Li, M. (2010). C-Fos identification of neuroanatomical sites associated with haloperidol and clozapine disruption of maternal behavior in the rat. *Neuroscience*, *166*(4), 1043-1055. doi: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.01.023>

La primera parte del presente proyecto (experimento 1) fue publicado en 2018, mientras que la segunda parte (experimento 2) fue presentada, y su versión revisada se encuentra siendo considerada para su publicación, en la revista *Journal of Neuroendocrinology*. Además, este proyecto ganó una invitación a presentar los resultados surgidos de la tesina de grado en el “*Wiley Young Investigator Symposium*”, en el marco del congreso *Parental Brain 2018*, que se realizó como satélite del “*9th Congress of Neuroendocrinology 2018*” en julio en Toronto, Canadá.

FERREÑO M, POSE S, AGRATI D, ZULUAGA MJ, FERREIRA A, URIARTE N, Incentive value of newborn pups relative to juveniles for mother rats raising overlapping litters, *Behavioural Processes* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2018.07.016>

POSE S, ZULUAGA MJ, FERREÑO M, AGRATI D, BEDÓ G, URIARTE N, Raising overlapping litters: An approach towards understanding maternal flexibility and its neural circuitry.