

Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas

Sub-área Neurociencias

PEDECIBA -Biología

***Bases neurales del comportamiento
parental o infanticida en ratones (C57BL/6)***

MSc. Marcela Alsina-Llanes

Orientador: Dr. Daniel Olazábal

Tribunal:

Dra. Ana Silva

Dra. Daniella Agrati

Dr. Pablo Torterolo

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor y maestro, Daniel, por la confianza y dedicación, por compartir todos sus conocimientos conmigo y permitirme crecer.

A los miembros del tribunal, Ana, Daniella y Pablo, por su contribución durante todo el proceso de formación.

A las chicas del laboratorio, Natalia S. y Agus, que acompañaron en este proceso.

A Nathalia, Andre, Mari y Beto, por su apoyo y contención, y un gracias muy especial a mi querida amiga y compañera, Nath.

A mis amigos, y en especial a la gran amiga que me regaló la ciencia, Valen.

Al Departamento de Fisiología y todos mis compañeros por el apoyo.

Al Departamento de histología por permitirme utilizar sus instalaciones.

A mi gran familia por ser incondicionales.

A Fer por el amor, la contención y construir una vida juntos.

A las instituciones financiadoras: CAP, CSIC, PEDECIBA.

INDICE

RESUMEN	5
ABREVIACIONES DE ÁREAS CEREBRALES	7
ANTECEDENTES.....	8
Generalidades del comportamiento parental en mamíferos	8
Inducción hormonal de comportamiento parental	9
Inducción del comportamiento parental por la cría	10
Comportamiento parental en roedores	12
Comportamiento maternal.....	12
Comportamiento paternal.....	13
Respuesta comportamental hacia las crías en ratones inexperimentados	13
Comportamiento infanticida	14
Bases neurales del comportamiento parental en roedores	15
Facilitación del comportamiento parental.....	15
Inhibición del comportamiento parental.....	16
Bases neurales del comportamiento parental e infanticida en ratones inexperimentados.....	17
OBJETIVO GENERAL.....	19
CAPÍTULO I.....	20
OBJETIVO GENERAL.....	21
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
ABORDAJE EXPERIMENTAL	22
Contribución del comportamiento paternal durante el posparto	22
Comportamiento paternal hacia crías ajenas.....	23
Inducción del comportamiento parental en machos juveniles	24
Análisis estadístico	25
RESULTADOS	26
Contribución del comportamiento paternal durante el posparto.....	26
Comportamiento parental durante un test de 15 min	26
Comportamiento parental en tres sesiones diarias observacionales de 60 min	27
Comportamiento paternal hacia crías ajenas.....	28
Inducción del comportamiento parental en machos juveniles	29
DISCUSIÓN.....	30
CAPÍTULO II.....	36
OBJETIVO GENERAL.....	37
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
ABORDAJE EXPERIMENTAL	38
Análisis estadístico	39
RESULTADOS	41
Patrón de expresión de c-Fos durante la respuesta comportamental parental o no parental en hembras vírgenes de ratones expuestas a crías por primera vez.....	41
Grupos de animales expuestos a crías durante 15 min	41

Grupos de animales expuestos a crías durante 60 min	44
Patrón de expresión de c-Fos durante la respuesta comportamental parental o infanticida en machos vírgenes de ratones expuestos a crías por primera vez	48
Grupos de animales expuestos a crías durante 15 min	48
Grupos de animales expuestos a crías durante 60 min	48
DISCUSIÓN.....	51
CAPÍTULO III.....	57
OBJETIVO GENERAL.....	58
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	58
ABORDAJE EXPERIMENTAL	58
Análisis estadístico	59
RESULTADOS	60
A. Lesiones neurotóxicas de la CPFm en hembras y machos de ratones	60
Efectos de las lesiones sobre el comportamiento maternal.....	60
Análisis histológico	60
Respuesta comportamental hacia las crías.....	61
Actividad exploratoria y locomotora	63
Efectos de las lesiones sobre el comportamiento infanticida	64
Análisis histológico	64
Respuesta comportamental hacia las crías.....	64
Actividad exploratoria y locomotora	65
B. Lesiones neurotóxicas del NA en hembras y machos de ratones	66
Efectos de las lesiones sobre el comportamiento maternal e infanticida.....	66
Análisis histológico	66
Respuesta comportamental hacia las crías.....	67
Actividad exploratoria y locomotora	69
DISCUSION.....	70
Efectos de las lesiones neurotóxicas sobre el comportamiento maternal	70
Efectos de las lesiones neurotóxicas sobre el infanticidio.....	74
Efectos de las lesiones neurotóxicas sobre la ansiedad	76
ANEXO CAPÍTULO III	78
Diseño experimental	78
Cirugía estereotáxica	78
Test comportamentales	78
Análisis histológico	79
Análisis estadístico	79
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	80
BIBLIOGRAFÍA.....	83

RESUMEN

La respuesta comportamental parental e infanticida hacia las crías, desplegada por individuos inexperimentados, son dos conductas observadas en muchas especies de vertebrados. Sin embargo, este comportamiento es variable y los orígenes de esa variabilidad, así como sus bases neurales, no son aún bien conocidos. La presente tesis, apuntó a entender mejor la respuesta que despliegan los machos de ratón hacia las crías en diferentes contextos reproductivos y fisiológicos, las diferencias neurales evidentes en hembras y machos que despliegan diferentes comportamientos ante el mismo estímulo (crías), y el papel de la corteza prefrontal y el núcleo accumbens en la regulación de estos comportamientos (parental e infanticida).

Cuando machos vírgenes inexperimentados (juveniles o adultos) de ratón se encuentran con crías por primera vez, la respuesta comportamental es principalmente no paternal o infanticida. Sin embargo, el apareamiento con una hembra y/o la exposición a una hembra gestante, inhibe la respuesta infanticida y facilita el comportamiento paternal. En el capítulo I, nos planteamos determinar la contribución de los machos adultos y juveniles de ratón (CB57/BL6) en el cuidado de las crías en contexto reproductivo. Encontramos que, a diferencia de la idea predominante en la literatura, los machos adultos cuidan de sus crías, toleran y cuidan crías ajenas, no interfieren en el correcto despliegue del comportamiento maternal y su presencia reduce el tiempo que las crías permanecen solas en el nido. Nuestros resultados sugieren que en el ratón, una especie que se considera con un sistema de crianza uniparental, el cuidado paternal tiene un rol facultativo, es decir que el macho puede o no contribuir a la crianza de la descendencia. Los machos juveniles por su parte, y en el contexto de superposición de camadas, no despliegan comportamiento paternal, aun permaneciendo en el nido, y siendo expuestos a sus hermanos recién nacidos, sugiriendo que los juveniles podrían estar adaptados a dispersarse rápidamente del nido sin contribuir a la crianza de sus hermanos.

En el segundo capítulo, y debido al desconocimiento de las bases neurales de la variabilidad (completamente parental, parcialmente parental, no parental o infanticida) en la respuesta comportamental desplegada por hembras y machos inexperimentados de ratón cuando son expuestos a crías por primera, nos propusimos determinar las áreas cerebrales que participan (expresan la proteína c-Fos) cuando los animales son expuestos a 2 crías por primera vez y despliegan uno u otro comportamiento. Encontramos que las hembras maternas expuestas a crías sólo 15 min presentan mayor expresión de c-Fos en la corteza prefrontal medial (CPFm) en relación a las no maternas o a los animales no expuestos a crías (CTL). Por otro lado, la expresión de

c-Fos en el núcleo accumbens (NA) aumentó en la mayoría de los grupos de hembras expuestas a crías en comparación a las CTL, pero también en machos, siendo la región shell del NA la que presentó mayor expresión de c-Fos en machos infanticidas. Otras regiones cerebrales tales como los núcleos amigdalinos no mostraron un patrón de expresión de c-Fos claramente asociado a uno u otro comportamiento.

Dado los resultados obtenidos en el Capítulo II, en el Capítulo III nos propusimos determinar cómo afectaban las lesiones neurotóxicas de la CPFm y el NA a la conducta parental e infanticida. Encontramos que lesiones de la CPFm, retrasan el inicio del comportamiento maternal en las hembras, sin afectar el comportamiento infanticida en machos. Asimismo, encontramos que las lesiones indujeron un perfil de mayor ansiedad en hembras y machos evaluados en una prueba de open field. Efectos opuestos se encontraron con lesiones en el NA, las cuales no afectaron la conducta maternal de las hembras, pero retrasaron la respuesta infanticida en machos.

Esta tesis contribuye al mejor entendimiento de la regulación de dos conductas adaptativas y antagónicas frente a un mismo estímulo (crías), una conducta compleja como la conducta parental y otra probablemente más impulsiva como el infanticidio. Específicamente, concluimos que la CPFm es crítica para la flexibilidad comportamental requerida para desarrollar y expresar rápidamente la conducta parental pero no para el infanticidio. Creemos que la comunicación entre la CPFm y otras áreas límbicas, como el NA es fundamental en la toma de decisiones que llevan al inicio del comportamiento parental en las hembras, y probablemente en machos. En el caso del infanticidio, proponemos que existe una desconexión entre la CPFm y el NA, lo que removería el control o freno que ejerce el CPFm sobre conductas fuertemente aversivas y emocionales, facilitando la expresión de la conducta infanticida.

ABREVIACIONES DE ÁREAS CEREBRALES

CoA- Amígdala cortical

CPFm- Corteza prefrontal medial

IL- Corteza infralimbica

MA- Amígdala medial

MPN- núcleo preóptico medial

MPOA- área preóptica media

MPOAd- MPOA dorsal

MPOAvl- MPOA ventrolateral

NA- núcleo acumbens

PL- Corteza prelimbica

VMH- Núcleo hipotalámico ventromedial.

VMHdm- VMH dorsomedial

VMHc- VMH central

VMHvl- VMH ventrolateral

ANTECEDENTES

Generalidades del comportamiento parental en mamíferos

El comportamiento parental es un conjunto de conductas dirigidas 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). En mamíferos, éste comportamiento es muy diverso y se expresa principalmente al momento del parto, siendo la hembra quién generalmente realiza las actividades de cuidado de las crías. Sin embargo, en algunas especies de mamíferos, el macho y otros miembros de la familia despliegan comportamiento parental y contribuyen a la crianza de la descendencia (Numan & Insel, 2003; Olazábal et al., 2013a). Por lo que el comportamiento parental se puede expresar tanto a través de los cuidados maternos como paternos.

El cuidado parental se manifiesta a través de la construcción de un nido o la búsqueda de un refugio, el transporte o acarreo de las crías acompañado de conductas como el lamido y las posturas de protección. Sin embargo, hay especies en las que las madres no realizan éstas conductas y el despliegue de cuidado parental se expresa solamente a través de lamidos, conductas de protección y vocalizaciones (González-Mariscal & Poindron, 2002; Numan & Insel, 2003; Olazábal et al., 2013a.)

El patrón de comportamiento parental está, en parte, determinado por las características de las crías al nacer (Numan & Insel, 2003; Olazábal et al., 2013a; Poindron, 2001). 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. En este sentido, se pueden distinguir diferentes tipos de interacción con las crías dependiendo del desarrollo de las mismas, *precoces* o *altriciales*. En las especies en que las crías son *precoces*, como ungulados y pinnípedos, las crías nacen completamente desarrolladas y bastante autónomas. Pocos minutos después de nacer, las crías se paran y comienzan a lactar. En estas especies, las madres pueden dirigir a sus crías, o ser seguidas por ellas (Lévy & Keller, 2008). En la cabra o el ciervo por ejemplo, el patrón de comportamiento se adapta principalmente a proteger a las crías de los depredadores. En este caso, las crías permanecen ocultas en un refugio durante varios días antes de empezar a seguir a su madre o rebaño, mientras que la madre regresa periódicamente para alimentarlas (Ralls et al., 1986). En especies como cerdos y algunos primates (incluyendo humanos), las crías nacen con un grado de desarrollo *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 en estos casos 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 permanece en el nido con las mismas durante al menos las dos primeras semanas de vida (Algers & Uvnäs-Moberg, 2007). Por último, las 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). Los marsupiales constituyen un caso extremo, en el que las crías nacen con un estado de desarrollo muy incompleto, e inicialmente son transportadas todo el tiempo por sus madres dentro del marsupio, hasta que finalmente emergen totalmente desarrolladas y móviles (Kimble, 1997).

Además de la diversidad en el patrón conductual, existen diferencias en términos de la selectividad del vínculo entre la madre y la cría. Por ejemplo, en muchas especies con crías altriciales, roedores en particular, las madres pueden reconocer a sus crías, sin embargo, cuidan a crías ajenas, por lo que el vínculo no es selectivo (Lévy & Keller, 2009). En contraste, en especies como por ejemplo la oveja y la cabra, en las que las madres paren crías precoces en grandes grupos sociales, parece haberse favorecido un mecanismo para el establecimiento de un vínculo exclusivo y selectivo, el cual se manifiesta a través de cuidados dirigidos únicamente hacia su cría e implica el rechazo de otras crías, asegurando así que su descendencia sea la única beneficiada de los cuidados maternos (Numan & Insel, 2003; Poindron et al., 2007). No obstante, en especies como murciélagos, carpinchos, búfalos, que también viven en grupo, las madres no desarrollan una fuerte selectividad y despliegan comportamiento maternal hacia crías de otras madres (Kerth, 2008; Macdonald et al., 2007). Por lo que en ciertas especies que viven en grupo, la cría comunitaria puede ser una alternativa a la selectividad materna, resolviendo así el conflicto de inversión parental (Kerth, 2008; Macdonald et al., 2007; Olazábal et al., 2013a).

Inducción hormonal de comportamiento parental

El cuidado parental en mamíferos generalmente está a cargo de la madre. En este sentido, el desarrollo del comportamiento maternal en las hembras de mamífero,

depende principalmente de los cambios hormonales de la gestación y el parto. 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; Pointron, 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 la oxitocina (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). En este sentido, el estradiol promovería, en parte, las conductas parentales actuando sobre la liberación de prolactina y/o la producción de receptores de oxitocina (Tate-Ostroff & Bridges, 1987).

Inducción del comportamiento parental por la cría

A pesar de la fuerte influencia de las hormonas reproductivas en el comportamiento maternal, es posible inducir al desarrollo de dicho comportamiento en hembras vírgenes no lactantes inexperimentadas e incluso en machos, únicamente mediante cohabitación o exposición continua a las crías (Rosenblatt, 1967). Este proceso, al cual se lo denomina *sensibilización*, ha sido muy estudiado en roedores y varía entre las distintas especies, como por ejemplo rata, ratón, ratón de California y voles de la pradera (Alsina-Llanes et al., 2015; Horrell et al., 2017; Noirot, 1972; Roberts et al., 1998; Rosenblatt, 1967). Durante el proceso de sensibilización comportamental, se produce un cambio profundo en el comportamiento del individuo que culmina con el desarrollo de interés y cuidados de las crías. En la rata por ejemplo, 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 parental. El comportamiento en ratas sensibilizadas, con la excepción de que no pueden amamantar, incluye todo el repertorio conductual parental, como son el acarreo de las crías hacia el nido, el lamido, las posturas de amamantamiento y termorregulación, y las construcción de un nido (Numan et al., 2006, Kuroda et al., 2011).

En voles de la pradera (*Microtus ochrogaster*), una especie de ratón socialmente 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. Así, 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.

En el caso del ratón, existiría dimorfismo sexual en la respuesta comportamental, ya que sólo las hembras adultas serían capaces de desplegar comportamiento parental rápidamente (15 min- 2 días), y en algunos casos no todos los componentes de la conducta parental se observan inmediatamente (Alsina-Llanes et al., 2015; Kuroda et al., 2011; Lucas et al., 1998). En este sentido, un estudio previo de nuestro laboratorio que formó parte de mis estudios de maestría mostró que la respuesta parental en las hembras de ratón (C57BL/6) consiste, en general, en un rápido proceso de sensibilización (Alsina-Llanes et al., 2015).

Por tanto, existen diferentes niveles basales de cuidado parental en las distintas especies, los cuales son independientes de la estimulación hormonal y son inducidos por la exposición breve o continua a las crías. Además, este supuesto es apoyado por el hecho de que el comportamiento parental inducido por la cría no se bloquea por hipofisectomía o gonadectomía (Rosenblatt, 1967).

Comportamiento parental en roedores

Comportamiento maternal

El repertorio de la conducta maternal, consiste en acarrear o agrupar a las crías en un nido (Numan & Insel, 2003; Olazábal et al., 2013a; Rosenblatt, 1967), y adoptar una posición llamada postura de amamantamiento que consiste en cubrir a las crías con la región ventral del cuerpo. Esta postura está ligada a la lactancia y su función nutritiva, pero no necesariamente, ya 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). Por tanto, la función de esta postura estaría también ligada a la protección y termorregulación de las crías.

El comportamiento maternal también incluye lamer a las crías activamente (Gubernick & Albert, 1985; Kuroda et al., 2011; Numan, 2010; Numan & Insel, 2003; Olazábal & Young, 2006a; Rosenblatt, 1967). El lamido anogenital por su parte, tiene como objetivo estimular 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). Sin embargo, el lamido no sólo se exhibe dentro del contexto reproductivo de la crianza. Por ejemplo, el lamido fuera de dicho contexto está asociado al reconocimientos de las crías y es exhibido por animales no parentales, e incluso por machos infanticidas los cuales pueden lamer a las crías antes de atacarlas (Alsina-Llanes et al., 2015; Olazábal & Alsina-Llanes, 2016). Por lo que el lamido no es una conducta exclusiva del comportamiento parental y no siempre es un buen predictor de la misma (Alsina-Llanes et al., 2015; Ostermeyer & Elwood, 1983).

Las hembras de roedores, dependiendo de su estado reproductivo, construyen dos tipos de nido con características diferentes. El nido de sueño es construido por hembras vírgenes y se caracteriza por ser relativamente pequeño y poco "profundo". El nido reproductor, por su parte es construido por hembras pre-parturientas o lactantes, es dos o tres veces mayor que el nido de sueño y es más profundo. Las características de éste último le permite envolver a las crías y favorecer que se mantenga elevada su temperatura corporal que, como ya se mencionó, por su condición de altricial no tienen la capacidad de termorregular (Kuroda et al., 2011, Gandelman, 1973a). Finalmente, cuando una hembra 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 maternal, 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 paternal

Si bien el cuidado de las crías en la mayoría de los roedores, depende principalmente de las conductas exhibidas por la madre, en muchas especies el macho también cuida de la descendencia (Numan & Insel, 2003; Olazábal et al., 2013a). El comportamiento paternal es menos común entre los roedores y se describe principalmente para las especies con un sistema reproductivo monógamo y de crianza biparental, como por ejemplo el ratón de California y voles de la pradera (Bales & Saltzman, 2016; Brown 1993; Gubernick & Alberts, 1987; Lee & Brown, 2002; 2007).

Por su parte, el ratón de laboratorio, es una especie considerada promiscua y con un sistema de crianza uniparental, por lo que la contribución del padre en el cuidado de las crías en contexto reproductivo no se ha estudiado en detalle (Gandelman et al., 1970; Ostermeyer & Elwood, 1983; Priestnall & Young, 1978; Wright & Brown, 2000). Clásicamente, se asume que luego de la cópula, los machos adultos abandonarían el nido para así poder acceder a otras hembras. Sin embargo, estudios en condiciones semi-naturales muestran que los machos reproductores son quienes desplazan mayormente a los machos juveniles, teniendo estos últimos una tasa de dispersión del doble a la de las hembras juveniles (Gerlach, 1996). Estudios clásicos, a partir de estudiar los mecanismos que inhiben el infanticidio en machos adultos y evitan que éstos maten a las crías, muestran que los machos pueden tolerar e incluso cuidar a las crías (Bales & Saltzman, 2016; Brooks & Schwarzkopf, 1983; Cheetham et al., 2007; Elwood, 1985; Gubernick et al., 1994; Huck et al., 1982; Kennedy & Elwood, 1988; Matsumoto & Kimura, 1995; Soroker & Terkel, 1988; Tachikawa et al., 2013). Por tanto, y dado a que se desconoce en detalle cuál es la contribución de los padres de ratón en la crianza de las crías, así como si los machos juveniles que permanecen en el nido (junto con la madre, padre y hermanos) muestran comportamiento parental, en el primer capítulo de la presente tesis, abordaremos estas preguntas.

Respuesta comportamental hacia las crías en ratones inexperimentados

La respuesta comportamental desplegada por hembras y machos inexperimentados de ratón de laboratorio cuando son expuestos a crías por primera vez es muy variable.

Como ya se mencionó, la respuesta comportamental parental en las hembras de ratón puede ser completa (**Figura 1**), parcial o no ser parental. Asimismo, las hembras

son sensibilizadas rápidamente (de 15 min a 2 días) a mostrar todo el repertorio conductual parental (Alsina-Llanes et al., 2015; Kuroda et al., 2011; Lucas et al., 1998).



Figura 1. Comportamiento parental en ratones. Hembra inexperimentada acarreado a una cría (A), lamiendo (B) y en postura de amamantamiento sobre dos crías (C).

Por su parte, los machos adultos inexperimentados del ratón de laboratorio de varias cepas (129S, Balb/c, C57BL/6, CBA, DBA) son mayormente no parentales o infanticidas (Gandelman, 1973b; Gandelman & vom Saal, 1975; Olazábal & Alsina-Llanes, 2016; Tachikawa et al., 2013).

Comportamiento infanticida

El infanticidio en roedores se caracteriza por acercarse, oler, y morder a las crías dentro de unos pocos segundos o minutos de presentadas las crías (Brooks & Schwarzkopf, 1983; Tachikawa et al., 2013). Asimismo, se describen otras patrones conductuales como son el entrecerrar los ojos y los movimientos de tipo “traqueteo de la cola” (Brooks & Schwarzkopf, 1983; Tachikawa et al., 2013). El infanticidio es una respuesta conductual evolutivamente conservada entre vertebrados, que se cree sería parte de una estrategia reproductiva en los machos (vom Saal & Howard, 1982). Sin embargo, aunque en un muy bajo porcentaje, el infanticidio también puede ser exhibido por las hembras (Alsina-Llanes et al., 2015). Si bien es considerado una respuesta agresiva, aún no está claro la distinción entre el infanticidio y otras formas de agresión. En este sentido, la agresión es una conducta que se expresa principalmente en el contexto de la defensa u obtención de recursos (Ferris et al., 2008; Nelson & Trainor, 2007), mientras que la agresión hacia las crías o infanticidio, no necesariamente implica la obtención de un recurso o la percepción de una amenaza.

Bases neurales del comportamiento parental en roedores

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 de rata y oveja durante el parto, se ha evidenciado que la acción hormonal 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, pero también en animales adultos sensibilizados. Existe una vasta evidencia que propone que la acción de los estrógenos, prolactina y oxitocina en el MPOA y la porción ventral del núcleo de la estría terminalis (BNST) facilita el comportamiento parental (Bridges et al., 1990; Numan, 1994; Numan et al., 1977). En este sentido, tanto la prolactina como la oxitocina 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). Lesiones de ésta misma área y específicamente de la región central, deterioran el comportamiento maternal en hembras vírgenes, lactantes y también en los padres del ratón de laboratorio (Tsuneoka et al., 2013; 2015); así como también en hembras y machos del ratón de california, una especie de ratón biparental (Lee & Brown, 2002; 2007). Por lo que el MPOA es crítica tanto para la expresión del comportamiento maternal como paternal (Bales & Saltzman, 2016). Asimismo, el despliegue de comportamiento maternal induce la expresión de c-fos¹ y fosB en el MPOA (y otras áreas asociadas a la respuesta parental) en la rata, ratón de laboratorio, volos de la pradera y ratón de california (de Jong et al., 2009; Calamandrei & Keverne, 1994; Kirkpatrick et al., 1994b; Kuroda et al., 2007; Numan & Numan, 1994; Tsuneoka et al., 2013).

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).

Dos sistemas dopaminérgicos se encuentran involucrados en la conducta materna: 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 (NA, 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 envían proyecciones al NA (Numan & Stolzenberg, 2009; Numan 2010). La dopamina actúa en el NA durante el comportamiento maternal, y se ha demostrado que interrupciones en la acción de dopamina en el NA interfiere con los componentes activos del comportamiento (como acarreo), pero no parece alterar comportamientos pasivos o inmóviles como la postura de amamantamiento (Hansen, 1994; Hansen et al., 1991ab; Numan, 2010; Olazábal et al., 2013a). Agonistas de los receptores dopaminérgicos en el NA aceleran el despliegue de la respuesta maternal en ratas (Stolzenberg et al., 2007). Por otra parte, lesiones electrolíticas que afectan al NA pueden provocar efectos menores sobre la respuesta maternal en la rata y el ratón de California (Lee et al., 1999; Lee & Brown, 2007; Li & Fleming, 2003ab; Numan et al., 2005; Olazábal et al., 2013a).

Estudios más reciente, han propuesto que el cuidado de las crías activa muchas áreas corticales, en particular la corteza prefrontal medial (CPFm) y orbitofrontal, las cuales podrían estar involucradas en la organización temporal de los componentes del comportamiento parental (Febo et al., 2008; Olazábal et al., 2013a; Pereira & Morrell, 2011). En este sentido, los estudios clásicos de Slotnick (1967) y Slotnick y Nigrosh (1975) en ratas y ratones respectivamente, mostraron que lesiones electrolíticas de la CPFm afectaban el comportamiento maternal en hembras lactantes, principalmente por aumentar la latencia de acarreo.

Inhibición del comportamiento parental

El circuito neural que media la inhibición del comportamiento parental y/o la respuesta neofóbica o aversiva hacia las crías ha sido muy estudiado principalmente en ratas, dada las características de su respuesta comportamental inmediata a las crías (no parental y de evitación). Aunque aún no está completamente dilucidado, se han propuesto algunas estructuras asociadas a algunos aspectos de éstas conductas. Se ha reportado que 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 comportamiento parental (Fleming & Rosenblatt, 1974). Las áreas asociadas a la inhibición del comportamiento parental y a la respuesta aversiva a las crías incluyen también a la amígdala medial (MA) y cortical (CoA), que reciben

aferencias del sistema olfativo. Lesiones de éstas áreas y del hipotálamo dorsal, hipotálamo anterior y el núcleo ventromedial del hipotálamo (VMH) (Bridges et al., 1999; Fleming et al., 1980; Morgan et al., 1997) facilitan el comportamiento parental en la rata. Estas regiones a su vez, proyectarían a la sustancia periacueductal gris, promoviendo la aversión a los estímulos de las crías, la respuesta defensiva y de evitación, inhibiendo así la expresión de la conducta maternal (Bales & Saltzman, 2016; Olazábal et al., 2013a). Asimismo, Sheehan y col. (2000) encontraron otras áreas cerebrales que podrían estar relacionadas a la inhibición de la conducta parental en ratas vírgenes, como la región ventrolateral del MPOA (vIMPOA).

Las áreas asociadas a la inhibición del comportamiento parental han sido menos estudiada en el ratón. Como se mencionó anteriormente, el ratón no muestra respuesta de evasión o neofobia a las crías. No obstante, hembras y machos muestran una llamativa variabilidad en la respuesta comportamental inmediata hacia las crías: parental, no parental o infanticida. Esta variabilidad en la respuesta comportamental de ratones expuestos a crías por primera vez, es una oportunidad única que nos permite determinar las áreas cerebrales que se reclutan específicamente durante el despliegue de estos comportamientos.

Bases neurales del comportamiento parental e infanticida en ratones inexperimentados

Las bases neurales del comportamiento parental en ratones vírgenes inexperimentados han sido poco exploradas. Debido al rol esencial del MPOA en el comportamiento parental durante el posparto y en animales sensibilizados, esta es una de las regiones a la que se le ha prestado mayor atención. 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; Kuroda et al., 2007; Tsuneoka et al., 2013; 2015). Lesiones excitotóxicas bloquean el comportamiento parental en hembras inexperimentadas (Tsuneoka et al., 2013). Asimismo, se ha propuesto que la activación de fosB en dicha área es crítica para el correcto despliegue de comportamiento parental en el ratón (Brown et al., 1996).

Por otra parte, se sabe bastante poco acerca del circuito neural que subyace a la respuesta infanticida en el ratón. Kuroda y cols. (2007) mostraron que los machos infanticidas exhibían un aumento moderado de c-Fos en la región dorsal del MPOA cuando eran expuestos a las crías por primera vez en relación a los no expuestos a crías. También se ha reportado que en machos que previamente habían desplegado infanticidio, la sola presencia de las crías dentro de un canasto, inducía un aumento

significativo de la expresión de c-Fos en el bulbo olfatorio, MA, división medio-posterior del BNST, hipotálamo anterior y VMH en comparación a los no expuestos a ningún estímulo (Tachikawa et al., 2013). Asimismo, la extirpación del órgano vomeronasal bloqueaba la respuesta infanticida e inducía a los machos a mostrar comportamiento parental (Tachikawa et al., 2013). Más recientemente, se encontró que la región romboidal del BNST exhibe mayores niveles de c-Fos en machos infanticidas y que la lesión de ésta región bloquea al infanticidio (Tsuneoka et al., 2015).

En conjunto, la evidencia apunta a que el infanticidio sería controlado a nivel subcortical y por áreas o circuitos diferentes al del control del comportamiento parental. No obstante, en la mayoría de los estudios citados, se compara la expresión de c-Fos de grupos de ratones parentales o infanticidas con grupos de animales no expuestos a crías, o en diferentes contextos reproductivos. Llama mucho la atención la no utilización de grupos de animales no parentales como control. Por lo que creemos que la expresión de c-Fos encontrada en algunos estudios podría no estar específicamente asociado con el comportamiento parental o infanticida, sino más bien con el procesamiento de estímulos relacionados con las crías o un estado fisiológico diferente. Por lo que en la presente tesis pretendemos determinar la activación cerebral (expresión de c-Fos) específica durante la ejecución de las diferentes respuestas comportamentales. Además, el hecho de que la respuesta parental en las hembras de ratón consista en un rápido proceso de sensibilidad, nos ofrece la oportunidad de explorar cambios neuronales rápidos que ocurren cuando los animales responden de manera diferente al mismo estímulo. Creemos que las áreas cerebrales que participan en las etapas iniciales de la interacción con las crías son diferentes de las que participaron después de una interacción de mayor duración, cuando la conducta está establecida.

OBJETIVO GENERAL

El ratón de laboratorio exhibe una importante variabilidad en la respuesta comportamental inmediata cuando es expuesto a crías por primera vez, fuera del contexto reproductivo. Mientras que la mayoría de las hembras adultas inexperimentadas despliegan comportamiento maternal o pueden ser sensibilizadas rápidamente, la respuesta comportamental de los machos inexperimentados es mayormente no paternal o infanticida.

Dado a que se ha propuesto que sería necesaria la copula y/o la exposición a una hembra preñada para inhibir el infanticidio en los machos y facilitar el comportamiento paternal, en la presente tesis nos planteamos determinar, si en contexto reproductivo los machos adultos y juveniles cuidan a las crías y cuál es su contribución a la crianza (Capítulo I).

Por otra parte, y dada la variabilidad conductual exhibida por hembras y machos adultos inexperimentados, pretendemos profundizar en la comprensión de las bases neurales de dicha variabilidad (Capítulos II y III).

Los experimentos diseñados para evaluar los objetivos generales se presentan en los tres capítulos a continuación. Los resultados dieron lugar a tres publicaciones en revistas internacionales arbitradas.

Cabe señalar que esta tesis fue financiada por la beca de doctorado otorgada por la Comisión académica de posgrado (CAP, 2017). Asimismo, contó con el apoyo del PEDECIBA y la CSIC.

CAPÍTULO I

Contribución del macho adulto y de juveniles en el cuidado de las crías en ratones (C57BL/6)

Los experimentos que componen este capítulo, dieron lugar a la publicación: *Do sires and juvenile male mice (C57BL/6) contribute to the rearing of the offspring?* Alsina-Llanes M & Olazábal DE. (2018). *Acta ethologica*, 21, 185-193.

El ratón de laboratorio, es una especie considerada uniparental, por lo que la contribución del padre en el cuidado de las crías en contexto reproductivo no ha sido estudiada en detalle (Gandelman et al., 1970; Ostermeyer & Elwood, 1983; Priestnall & Young, 1978; Wright & Brown, 2000). Sin embargo, la literatura asume que los machos de ratón son mayormente infanticidas y no parentales. La mayoría de la evidencia, sobre el comportamiento paternal en los machos de ratón, proviene de estudios que han centrado el análisis en los mecanismos que inhiben el infanticidio y evitan que los machos maten o ataquen a sus crías (Bales & Saltzman, 2016; Brooks & Schwarzkopf, 1983; Cheetham et al., 2007; Elwood, 1985; Gubernick et al., 1994; Huck et al., 1982; Kennedy & Elwood, 1988; Matsumoto & Kimura, 1995; Soroker & Terkel, 1988; Tachikawa et al., 2013). Existen varias hipótesis sobre los mecanismos que inhiben el infanticidio y facilitan la respuesta paternal en los machos reproductores del ratón, pero la evidencia no es concluyente y en algunos casos incluso contradictoria. Estas hipótesis incluyen la del reconocimiento individual de la descendencia por un etiquetado genético, el reconocimiento de pareja u ambiente asociado a la hembra, la subordinación a la hembra pos-cópula, y los cambios a largo plazo inducidos por el propio contexto reproductivo (Bales & Saltzman, 2016; Brooks & Schwarzkopf, 1983; Cheetham et al., 2007; Elwood, 1985; Gubernick et al., 1994; Huck et al., 1982; Kennedy & Elwood, 1988; Matsumoto & Kimura, 1995; Soroker & Terkel, 1988; Tachikawa et al., 2013). Por tanto sería necesaria la cópula y/o exposición a una hembra preñada para facilitar el comportamiento parental en ratones machos. Sin embargo, varios autores sugieren que una vez que se inhibe la respuesta infanticida hacia las crías y se establece el comportamiento paternal en el ratón, los machos podrían cuidar y tolerar, incluso a crías ajenas (Brooks & Schwarzkopf, 1983; Brown, 1993; Huck et al., 1982; Labov, 1980; Ostermeyer & Elwood, 1983; Tachikawa et al. 2013). Por lo que en el presente capítulo, analizamos en detalle la contribución a la crianza de sus crías y la selectividad o no en el comportamiento paternal de los machos hacia sus propias crías.

Los machos vírgenes e inexperimentados (juveniles o adultos) de varias cepas de ratón (129S, Balbc, C57BL/6, CBA, DBA), son mayormente no parentales e infanticidas cuando son expuestos a crías por primera vez y muestran un desarrollo gradual de la respuesta infanticida con la edad (Gandelman, 1973; Gandelman & vom Saal, 1975; Olazábal & Alsina-Llanes, 2016; Tachikawa et al., 2013). En este sentido, se propone que la mayoría de los machos juveniles se dispersarían rápidamente del nido, a diferencia de las hembras juveniles que permanecerían más tiempo (Gerlach 1990). En un estudio previo encontramos que las hembras juveniles que permanecían en contexto de camada superpuesta, eran rápidamente inducidas a mostrar comportamiento parental (Alsina-Llanes et al., 2015). Sin embargo, se desconoce si al igual que ocurre con las hembras juveniles, cuando los machos juveniles permanecen en contexto de camada superpuesta son sensibilizados a mostrar comportamiento parental. Sobre lo expuesto, nos planteamos las siguientes hipótesis:

H1a. En contexto reproductivo, los padres participan en el cuidado de las crías, son capaces de cuidar y/o tolerar crías ajenas, sin interferir en el correcto despliegue del comportamiento maternal de la madre.

H1b. La permanencia en el nido durante el parto de una segunda camada y la exposición a la madre gestante/parturienta, los fluidos del parto y hermanos, no estimula el comportamiento paternal en machos juveniles.

OBJETIVO GENERAL

Determinar en qué contextos los machos de ratón (C57BL/6) pueden desplegar cuidado paternal y cuál es su contribución a la crianza.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

i. Determinar la contribución de los machos en el cuidado de las crías cuando cohabitan con una hembra lactante durante el posparto (días 7 y 14).

ii. Determinar si los machos que cohabitan con una hembra lactante cuidan o toleran crías ajenas durante el posparto (días 3 y 7).

iii. Determinar si los machos juveniles que cohabitaron con su madre gestante/parturienta y camada superpuesta pueden ser rápidamente inducidos a mostrar comportamiento paternal.

ABORDAJE EXPERIMENTAL

Los detalles se describen en el artículo Alsina-Llanes & Olazábal, 2018 el cual adjunto al final de la tesis. A continuación se describen los aspectos más relevantes de la metodología.

Contribución del comportamiento paternal durante el posparto

Para el primer objetivo específico (**Figura 2**, A y B), dos grupos de hembras fueron apareadas con machos. En un grupo los machos (n=17) se retiraron luego de 5 días de haber sido puestos a aparear. En el otro grupo, los machos (n=19) permanecieron con las hembras durante toda la gestación y hasta el día 24 del posparto. El comportamiento maternal y paternal (en el grupo en el que el macho estaba presente) fue evaluado en los días 7 y 14 del posparto mediante dos protocolos experimentales diferentes (**Figura 2**, A y B).

En un grupo de animales, las 5 crías fueron retiradas de la caja durante 5 min. Luego de este período, fueron recolocadas en el lado opuesto a donde la hembra o la hembra junto con el macho, tenían el nido. El comportamiento paternal fue registrado durante un test de 15 min: acarreos, lamidos, postura de amamantamiento, construcción de nido o ataque. Los machos fueron considerados paternos si acarreaban al menos un cría o lamian (≥ 30 seg) y realizaban postura de amamantamiento (≥ 30 seg). Este criterio fue establecido considerando la presencia de la hembra lactante.

Por otra parte, en otro grupo de animales, se registró el comportamiento, sin ningún tipo de intervención, mediante 3 sesiones observaciones diarias (10:00a.m., 14:00p.m., 18:00p.m), de 60 min cada una, en los días 7 y 14 del posparto. Durante cada sesión el comportamiento exhibido fue registrado cada 3 min. Por tanto, se realizaron 63 observaciones por animales, en cada día del posparto. Se registró distancia de las crías, lamidos corporales y anogenitales, posturas de amamantamiento (arqueada alta o baja), postura supina, acarreos, construcción de nido y ataques.

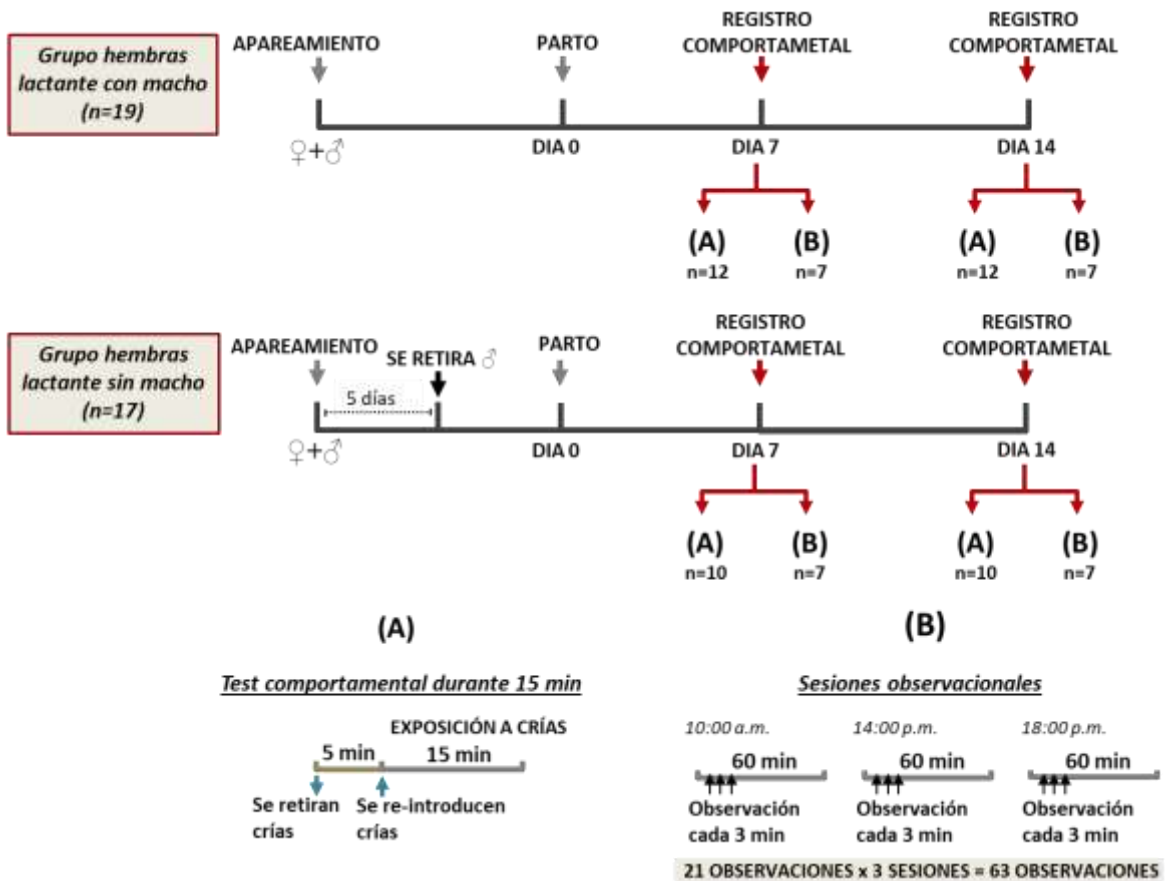


Figura 2. Diseño experimental utilizado para determinar la contribución del comportamiento paternal durante el posparto.

Comportamiento paternal hacia crías ajenas

Para el segundo objetivo (**Figura 3**), tres grupos de hembras fueron apareadas con macho. En un primer grupo (n=6) las hembras permanecieron con el macho durante la gestación y hasta el día 3 del posparto. En la mañana del día 3 del posparto, todas las crías fueron retiradas, y luego de 5 min, se colocaron 2 crías provenientes de una hembra donadora (*Grupo crías ajenas - día 3*, n=6) de la misma edad de las propias, en el lado opuesto al nido. Se registró detalladamente el comportamiento maternal y paternal. En una segunda instancia, se utilizaron dos grupos de hembras que permanecieron con el macho durante la gestación y hasta el día del posparto 7. El día 7 del posparto, luego de retirar la camada de crías durante 5 min, hembras y machos fueron expuestos a 2 crías propias (*Grupo crías propias - día 7*, n=9) o expuestos a 2 crías ajenas (*Grupo crías ajenas - día 7*, n=9). En todos los casos, se registró detalladamente el comportamiento desplegado por las hembras y los machos durante 15 min: acarreo, lamidos, postura de amamantamiento, construcción de nido o ataque.

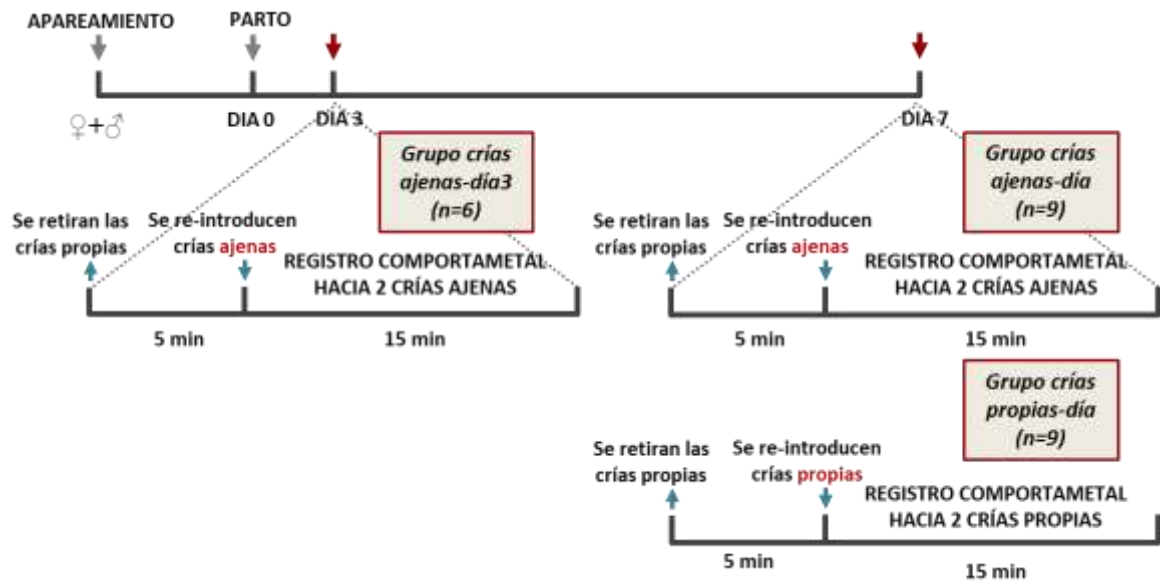


Figura 3. Diseño experimental utilizado para determinar la expresión de comportamiento paternal hacia crías ajenas.

Inducción del comportamiento parental en machos juveniles

Para el tercer objetivo específico (**Figura 4**), se pusieron a aparear 12 hembras con macho. Siete hembras fueron separadas del macho luego de 7 días (*Camada simple*), mientras que cinco hembras permanecieron con el macho durante la gestación, el parto de la primera camada y gestación de la segunda camada (*Camada superpuesta*).

En el día 25-30 del posparto, todos los machos juveniles (primera camada) fueron destetados. Los machos juveniles que cohabitaban con la madre gestante/parturienta y crías hermanas (12-24 hrs, *Camada superpuesta*) fueron individualmente alojados y habituados (45-60 min) a una caja para test. Luego fueron re-expuestos a 2 crías hermanas. Los machos juveniles provenientes de camadas simples fueron expuestos a 2 crías recién nacidas por primera vez. En todos los casos se registró detalladamente el comportamiento parental desplegado por los machos juveniles durante 15 min. De acuerdo al despliegue conductual, los machos juveniles fueron asignados a las siguientes categorías: *parental completo* (PC) si acarreaban o agrupaban a las crías, lamian las crías al menos 60 s, adoptaban postura de amamantamiento por más de 30 s, y no atacan a las crías, *parental incompleto* (PI) si desplegaban 2 de las conductas mencionadas anteriormente; *no parental* (NP) si exhibían sólo una o ninguna de las conductas, e *infanticidas* (I) si atacaban a las crías.

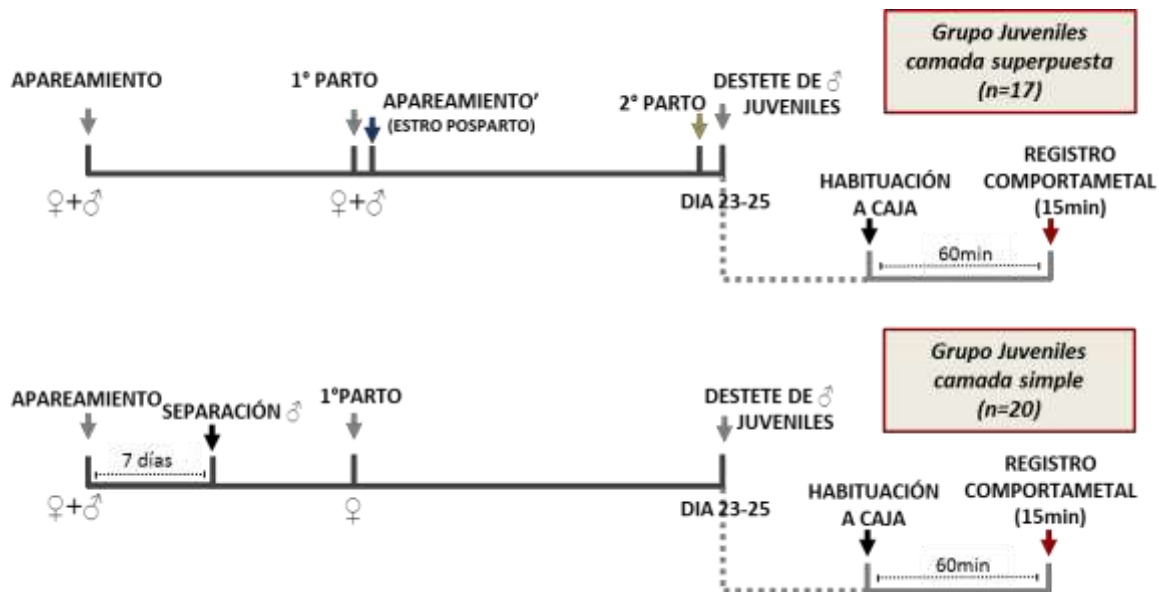


Figura 4. Diseño experimental utilizado para determinar si los machos juveniles son inducidos a mostrar comportamiento parental en contexto de camada superpuesta.

Análisis estadístico

Todos los datos se analizaron utilizando el paquete estadístico StatView (SAS Institute Inc., Cary, NC). Los datos fueron chequeados para normalidad (Prueba de Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianza (Prueba de Bartlett). Si los datos pasaban dichos requisitos, se aplicaron test paramétricos (prueba t). En el caso de que los datos no pasaran los supuestos de distribución normal y homogeneidad de varianza, fueron analizados mediante pruebas no paramétricas para datos independientes (Prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba U de Mann-Whitney) o para datos dependientes (análisis de varianza de Friedman seguido de la prueba pareada de Wilcoxon). Los datos se expresan como media \pm ES si se analizaron mediante pruebas paramétricas, o mediana (SIQR) si se analiza por pruebas no paramétricas. Se utilizó la prueba de McNemar o exacta de Fisher para analizar las frecuencias de comportamientos entre los grupos en el caso de grupos dependientes o independientes respectivamente. El nivel de significancia estadística fue $p < .05$.

RESULTADOS

Contribución del comportamiento paternal durante el posparto

Comportamiento parental durante un test de 15 min

Ningún macho atacó a las crías en el test comportamental durante 15 min, luego de haberlas retirado durante 5 min y volverlas a introducir en la caja.

El 66,6% y 16,7% de los machos alcanzó el criterio establecido de comportamiento parental en los días 7 y 14 del posparto respectivamente. Un mayor porcentaje de padres realizaron postura de amamantamiento según el criterio establecido ($M=6,0$, $p<,05$) el día 7 del posparto (58,3%) respecto al día 14 (18,1%).

El análisis discriminado de los diferentes componentes del comportamiento parental (acarreo, lamido, postura de amamantamiento y construcción de nido) desplegado por los padres en el test de 15 min los días 7 y 14 del posparto respectivamente se muestra en la **Tabla 1**. El día 7, los padres adoptaron postura de amamantamiento ($Z=1,95$, $p=,05$) y lamieron ($Z=1,95$, $p=,05$) durante un periodo de tiempo mayor con respecto al día 14 del posparto (**Tabla 1**). No se encontraron diferencias en la frecuencia [2,0 (2) vs. 3,5 (2)] o duración [3,5 (3,6) vs. 3,25 (3,5) segundos] de olfateos en los días 7 y 14 del posparto, respectivamente.

Tabla 1. Comportamiento paternal en el día 7 y 14 del posparto en presencia de la madre (test de 15 min)

		Día 7 del posparto (n=12)	Día 14 del posparto (n=12)
Porcentaje	Acarreo	33,3%	0,0%
Frecuencia	Lamido	4,0 (2,0)	1,5 (2,0)
	Postura de amamantamiento	2,5 (2,5)	,5 (1,3)
	Construcción de nido	5,0 (2,0)	4,0 (2,0)
Duración (s)	Lamido	13,4 (17,3) #	2,9 (4,1)
	Postura de amamantamiento	27,9 (27,2) #	,9 (12,3)
	Construcción de nido	353,7 (174,9)	259,1 (226,3)

Datos expresados como medianas (RSIQ), Prueba pareada de Wilcoxon.

* $p<,05$, # $p=,05$, día 7 vs. 14 del posparto.

No se encontraron cambios significativos en el comportamiento maternal cuando las hembras lactantes fueron testeadas en presencia o ausencia del macho en el día 7 o 14 del posparto (**Tabla 2**). Sin embargo, encontramos que las hembras que permanecieron con el macho, construyeron nido con mayor frecuencia el día 7 del posparto ($U=20,5$, $p<,05$, **Tabla 2**) que las hembras que tuvieron el macho ausente.

Tabla 2. Comportamiento maternal en el día 7 y 14 del posparto en presencia o no del padre (test de 15 min)

		Día 7 del posparto		Día 14 del posparto	
		♀ + ♂ (n=12)	♀ (n=10)	♀ + ♂ (n=12)	♀ (n=10)
Porcentaje	Acarreo	100,0%	100,0%	58,3%	46,2%
Frecuencia	Lamido	4,0 (3,0)	4,0 (3,0)	4,0 (2,5)	4,0 (1,0)
	Postura de amamantamiento	6,5 (2,5)	6,5 (3,5)	3,5 (3,2)	3,0 (1,0)
	Construcción de nido	7,0 (1,3) *	4,5 (1,0)	7,0 (1,7)	5,5 (1,0)
Duración (s)	Lamido	20,0 (39,1)	31,8 (23,9)	14,7 (18,7)	13,0 (11,3)
	Postura de amamantamiento	116,9 (49,8)	50,9 (78,5)	17,2 (50,0)	16,9 (23,0)
	Construcción de nido	511,4 (72,5)	393,7 (233,8)	356,3 (117,8)	503,7 (86,7)

Datos expresados como medianas (RSIQ), Prueba U de Mann-Whitney.

*p<,01 vs. hembras sin macho.

Comportamiento parental en tres sesiones diarias observacionales de 60 min

El análisis de las tres sesiones observacionales de 60 min, no mostró diferencias significativas en el comportamiento paternal entre las tres sesiones diarias en el día 7 o 14 del posparto (Datos no mostrados). Por tanto, se promedió la frecuencia total de los comportamientos observados de un total de 63 observaciones, para cada animal y cada día del posparto analizado. Los padres exhibieron baja frecuencia de lamido ($0,3 \pm 0,2$; $1,0 \pm 0,4$), postura de amamantamiento arqueada alta ($3,4 \pm 1,8$; $1,7 \pm 1,4$), postura de amamantamiento arqueada baja ($10,7 \pm 3,6$; $11,0 \pm 4,0$), y construcción de nido ($1,0 \pm 0,8$; $0,4 \pm 0,3$) en los días 7 y 14 del posparto, respectivamente. La postura de amamantamiento arqueada alta fue registrada mayormente cuando las hembras estaban fuera del nido (92,4% de las veces en el día 7, y 83,3% en el día 14 del posparto). No obstante, la frecuencia de la postura de amamantamiento arqueada baja registrada, fue similar cuando las hembras estuvieron fuera (34,7% de las veces en el día 7, y 59,7% en el día 14) o dentro del nido. Finalmente, la frecuencia con la que los padres estuvieron alejados de las crías ($16,1 \pm 3,8$; $14,3 \pm 2,4$) o en el nido en contacto con las crías pero sin realizar ningún comportamiento ($31,9 \pm 3,2$; $35,3 \pm 4,4$) no fue diferentes en los días 7 y 14 del posparto, respectivamente.

Al igual que en el test de 15 min, en el que las crías fueron retiradas y re-introducidas, el análisis de las tres observaciones diarias mostró que la presencia del macho no afectó la conducta maternal en el día 7 o 14 de posparto (**Figura 5**). El lamido y la construcción de nido fueron comportamientos que estuvieron casi ausentes y no fueron diferentes entre los grupos (Datos no mostrados). Sin embargo, las madres permanecieron fuera

del nido más frecuentemente que los padres en el día 7 ($t=2,0$, $df=12$, $p=,05$) y 14 ($t=2,9$, $df=12$, $p<,05$) del posparto. La frecuencia que las crías permanecieron solas en el nido fue menor ($t=4,6$, $df=12$, $p<,05$) en el día 14 del posparto cuando ambos padres estaban presentes ($5,8 \pm 2,3$) respecto a la hembra sola ($30,1 \pm 5,8$), pero no alcanzó la significancia estadística establecida en el día 7 ($11,2 \pm 2,0$, $21,0 \pm 6,5$, $p=,08$, respectivamente).

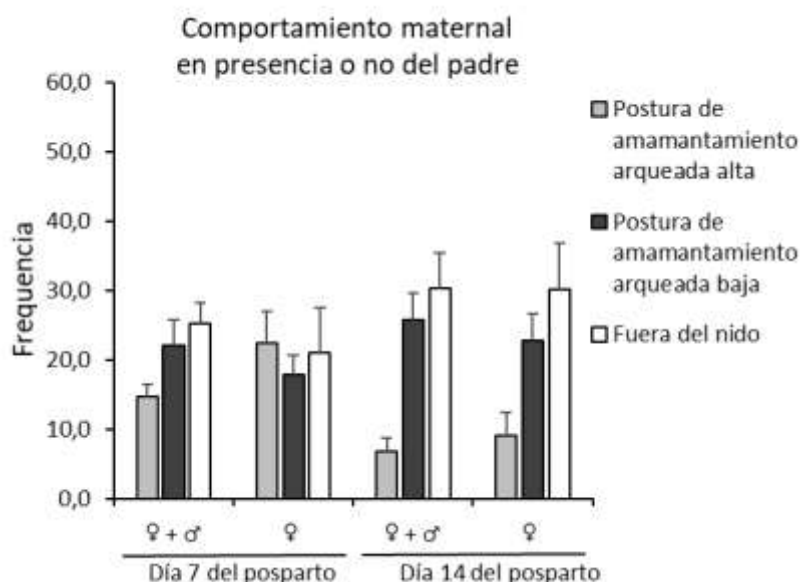


Figura 5. Comportamiento maternal en el día 7 y 14 del posparto en presencia o no del padre durante 3 secciones observacionales de 60 min. Los datos se expresan como media \pm ES de la frecuencia registrada de un total de 63 observaciones. Los comportamientos fueron registrados cada 3 min, durante 60 min, 63 observaciones/animal/día.

Comportamiento paternal hacia crías ajenas

Reemplazar las crías propias con dos crías ajenas en el días 3 o 7 del posparto no afectó el comportamiento paternal en los machos (**Tabla 3**). Ningún macho atacó a las crías luego de retirar a las propias y ser re-expuesto a crías ajenas o sus propias crías. El 60,0% (4/6) y 66,7% (6/9) de los machos expuestos a crías ajenas el día 3 y 7 del posparto respectivamente, alcanzó el criterio establecido de comportamiento parental. No encontramos diferencias significativas en el comportamiento paternal desplegado hacia crías propias o ajenas en el día 7 del posparto. Los padres testeados con crías ajenas mostraron menor latencia ($U=64,5$, $p<,05$) a realizar postura de amamantamiento [135,6 (49,6)] que los padres testeados con sus propias crías [561,8 (236,6)]. El análisis de la conducta maternal no mostró diferencias significativas entre las hembras expuestas a crías ajenas o propias en presencias del macho (Datos no mostrados).

Tabla 3. Comportamiento paternal hacia crías ajenas y propias en el día 3 o 7 del posparto (test de 15 min)

		Día 3 del posparto (crías ajenas) n=6	Día 7 del posparto (crías ajenas) n=9	Día 7 del posparto (crías propias) n=9
Porcentaje	Acarreo	33,3%	22,2%	33,3%
Frecuencia	Lamido	7,0 (1,5)	4,0 (2,1)	3,0 (2,0)
	Postura de amamantamiento	4,5 (1,5)	4,0 (1,2)	2,0 (1,7)
	Construcción de nido	7,5 (3,0)	5,0 (1,3)	5,0 (2,3)
Duración (s)	Lamido	67,2 (47,4)	29,3 (16,0)	4,6 (13,0)
	Postura de amamantamiento	66,1 (54,8)	46,0 (28,7)	23,5 (19,6)
	Construcción de nido	202,1 (77,8)	255,4 (192,8)	399,8 (196,7)

Datos expresados como medianas (RSIQ).

Inducción del comportamiento parental en machos juveniles

El porcentaje de machos juveniles provenientes de camada superpuesta o simple que desplego comportamiento PC (5,8%, 5,0%), PI (29,4%, 25,0%), NP (64,7%, 65,0%) o I (0,0%, 5,0%) respectivamente, no fue diferente ($F=1,1$, $p=ns$, **Figura 6**). El porcentaje de animales que acarreo (11,7%, 10,5%, $p=ns$), lamió (17,6%, 40,0%, $p=ns$), o adoptó postura de amamantamiento (29,4%, 25,0%, $p=ns$) tampoco fue diferente entre los juveniles de camada superpuesta o simple. Los machos parentales (PC y PI) de camada superpuesta ($n=6$) lamieron a las crías con menor frecuencia [$U=31,5$, $p<,05$; *Camada superpuesta*: 8,0 (1,0); *Camada simple*: 13,5 (1,5)] y durante menos tiempo [$U=30,0$, $p=,054$; *Camada superpuesta*: 46.2 (28.9); *Camada simple*: 123.6 (35.9)] que los de camada simple ($n=6$).

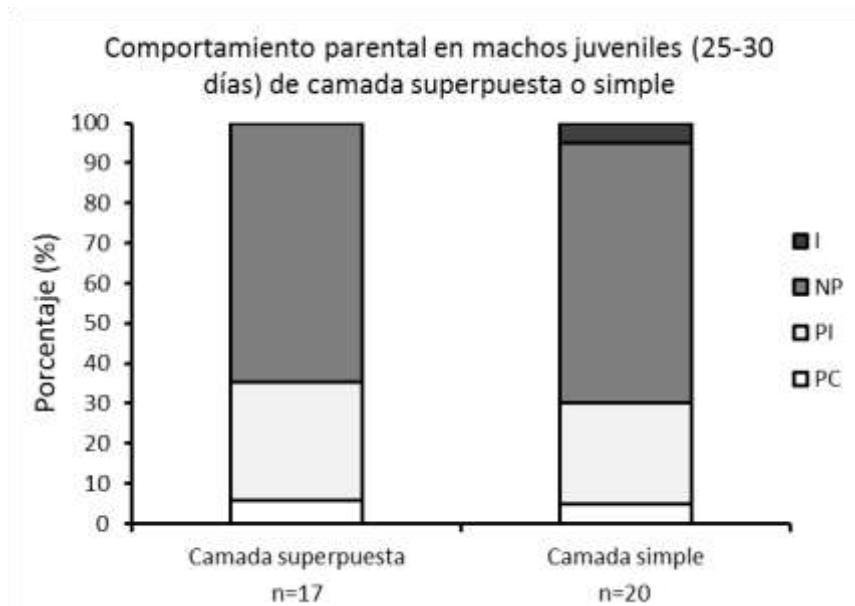


Figura 6. Porcentaje de machos juveniles de 25-30 días que desplegaron comportamiento parental completo (PC), parental incompleto (PI), no parental (NP) o infanticida (I) cuando fueron testeados (15min) individualmente en una caja nueva. Grupo camada superpuesta: juveniles expuestos previamente a la madre gestante/parturienta y hermanos recién nacidos durante ~12-24 horas. Grupo camada simple: juveniles sin exposición previa a crías.

DISCUSIÓN

En el presente capítulo, se hizo un análisis detallado del comportamiento paternal en el ratón de laboratorio (C57BL/6). De los resultados más destacados, mostramos que los padres despliegan comportamiento paternal hacia crías propias y ajenas, sin interferir o afectar el comportamiento de la madre. Aunque el ratón, no es una especie considerada biparental, los machos son capaces de cuidar a las crías, y su presencia puede beneficiar a las mismas reduciendo el tiempo que éstas permanecen solas en el nido. Los machos juveniles por su parte, en contraste a otras especies (por ejemplo ratas y voles de la pradera) y particularmente a las hembras juveniles de ratón, no exhibieron comportamiento parental, incluso luego de ser expuestos a la madre parturienta y crías hermanas. Estos resultados sugieren que en contraste a las hembras juveniles, los machos juveniles estarían adaptados a dispersarse del nido sin contribuir significativamente a la crianza de sus hermanos.

La baja frecuencia de postura de amamantamiento exhibida por los padres en comparación con las madres, coincide con estudios previos en la misma cepa de ratón (Gandelman et al., 1970). Sin embargo, otros estudios en ratones albinos (Ostermeyer & Elwood, 1983; Priestnall & Young, 1978; Wright & Brown, 2000) no encontraron diferencias en el comportamiento parental entre hembras y machos. Las discrepancias podrían deberse a que en dichos estudios todos los componentes conductuales son agrupados y/o promediados durante todo el período del posparto. En el caso de

Ostermeyer & Elwood (1983), particularmente, nuestros resultados coinciden parcialmente porque ellos muestran solamente los datos de olfateos y lamidos, dos componentes comportamentales que en nuestro estudio no fueron diferentes entre machos y hembras. Por tanto, estas diferencias podrían no haberse detectado dada la ausencia de información detallada sobre los diferentes componentes conductuales o sus cambios en los diferentes días del posparto.

Nuestros resultados también muestran que cuando los machos fueron desafiados a acarrear a las crías durante un test de 15 min (luego de haberlas retirado del nido por 5 min) en el día 7 del posparto, la mayoría de los padres responden parentalmente aun cuando la madre estaba presente. Sin embargo, cuando los machos fueron observados durante 3 sesiones diarias sin ningún tipo de intervención, mostraron mínimamente los componentes de la conducta parental, lo cual coincide con lo reportado por Wright & Brown (2000).

En este estudio, no encontramos ningún efecto negativo de la presencia del padre sobre la conducta de la madre. En este sentido, estudios previos en ratones albinos (Priestnall & Young, 1978; Wright & Brown, 2000) tampoco encontraron que la presencia del macho tuviese un efecto negativo sobre el desarrollo o supervivencia de las crías (Priestnall & Young, 1978; Wright & Brown, 2000). Aunque algunos estudios usando ratón doméstico y ratón de California en condiciones de cautiverio en el laboratorio, tampoco encontraron ningún efecto de la presencia del padre sobre la supervivencia de las crías (Brown, 1993; Cantoni & Brown, 1997; Gerlach, 1990; Wright & Brown, 2000; Priestnall & Young, 1978), no podemos excluir la posibilidad de que los padres jueguen un rol importante en la naturaleza, en condiciones adversas o más desafiantes (Brown et al., 1999; Gubernick et al., 1993). Por ejemplo, la contribución de los machos podría manifestarse como parte de la defensa del nido. En este sentido, algunos autores han propuesto que en la naturaleza, los padres principalmente contribuyen defendiendo a la hembra o harem y a las crías (McCarthy, 2010). Particularmente en nuestro estudio, la presencia del macho resultó en una reducción del tiempo que las crías permanecieron solas en el nido, lo cual puede ser considerado como una ventaja en términos de termorregulación, contacto físico y también de la posible defensa de las crías. En este sentido, estudios previos en el ratón de California (*Peromyscus californicus*) mostraron que el contacto físico entre crías hermanas era mayor si el padre estaba presente (Vieira & Brown, 2003).

De acuerdo a los mecanismos que se proponen que inhiben el infanticidio, la ausencia de agresividad hacia las crías ajenas en los machos, puede deberse a que, o los machos ya estaban subordinados a las madres en los días 3 y 7 del posparto, o que sufrieron cambios a largo plazo, luego de la inducción y el establecimiento del

comportamiento paternal, que resultan en una respuesta conductual parental no selectiva. Gandelman y col. (1970) encontraron que los machos de ratón de las cepas C57BL/6 y Rockland-Albino Swiss que habían cohabitado, pero no copulado, con una hembra preñada/lactante y sus crías, fueron paternas cuando fueron testeados con esas crías ajenas en forma aislada. Sin embargo, en dicho caso los machos no fueron testeados con crías provenientes de una hembra diferente a la que cohabitaron, como en la presente tesis. Por su parte, Brooks y Schwarzkopf (1983) encontraron que machos de las cepas C57BL/6 y DBA que copularon y cohabitaron durante una semana con una hembra preñada, y luego fueron colocados en la caja de otra hembra con sus crías (de la misma o de una cepa diferente) en el día 1 del posparto, tampoco atacaron a las crías. Los mismos machos tampoco atacaron a las crías cuando se testearon de forma aislada en una caja nueva (Brooks & Schwarzkopf, 1983). Además, McCarthy y vom Saal (1986) encontraron que, machos vírgenes adultos que se introducían en la caja de una hembra lactante en día 7 del posparto, raramente atacaban a las crías. Estos autores, utilizando dos cepas de ratón (CF-1 albino y ratón doméstico), propusieron que las hembras inhiben el infanticidio en los machos atacándolos y subordinándolos (McCarthy & vom Saal, 1986; ver también Elwood, 1986). Por ejemplo, en el día 2 del posparto, los machos mataban a las crías (de 2 o de 7 días de edad) si las hembras lactantes no mostraban agresión maternal hacia ellos (Vom Saal & Howard, 1982; McCarthy & vom Saal, 1986). Interesantemente, cuando hemos tratado de completar una camada de crías, sumando crías ajenas en el día 1 del posparto, hemos observado a los machos atacar a dichas crías. Sin embargo, nuestros resultados actuales muestran que desde el tercer día del posparto los machos fueron capaces de tolerar y cuidar crías ajenas. Estos resultados no pueden ser explicados sobre la hipótesis de que el macho reconoce algún olor o etiqueta genética que evita la respuesta infanticida, dado a que los machos habían copulado con la hembra y habían sido expuestos a sus propias crías. Una posible explicación podría estar relacionada con la presencia del estro posparto en las siguientes 48 horas al parto que también podría contribuir, de alguna manera, al ataque de las crías por parte de los machos (Mennella & Moltz, 1988ab). Por lo tanto, nuestros resultados coinciden con la hipótesis de que una vez que el comportamiento paternal se establece y/o los machos se subordinan a las hembras, algo que podría ocurrir durante los dos primeros días del posparto, el olor de crías ajenas no necesariamente desencadenaría la respuesta infanticida. De hecho, nuestros resultados sugieren que inicialmente la inhibición del infanticidio probablemente sea por factores químicos y comportamentales asociados con la hembra y al territorio/lugar físico que comparten, pero luego la exposición continúa a la

estimulación sensorial proveniente de las crías, estimula la atracción hacia las mismas y la motivación de cuidarlas.

Finalmente, nuestros resultados indican que a diferencia de las hembras juveniles, los machos juveniles no son inducidos a comportarse parentalmente luego de haber sido expuestos en la caja materna a su madre gestante/parturienta, los fluidos del parto, y hermanos recién nacidos durante 12-24hrs. Este resultado coincide con el hecho de que mientras la mayoría de los machos de ratón se dispersan del nido, las hembras permanecen más tiempo (Gerlach, 1990). Por lo tanto, aunque existe variabilidad en la naturaleza y algunas hembras podrían dispersarse tempranamente y/o los machos podrían permanecer cerca del nido, los machos estarían mejor adaptados a dispersarse sin mayor o ninguna contribución en la crianza de sus hermanos recién nacidos. Tan pronto como los machos crecen, se desarrolla la respuesta infanticida hacia las crías (Olazábal & Alsina-Llanes, 2016) la cual será revertida por la copula y/o la cohabitación con una hembra preñada. Sin embargo, sería interesante explorar por qué algunas machos vírgenes, en particular los juveniles (en este estudio, el 30% en ambos grupos) muestran algunos componentes de la conducta parental. Estudios previos (Leblond, 1938) encontraron una alta incidencia (50%) de comportamiento parental en machos juveniles de 22-28 días de edad. Sin embargo, en ese estudio clásico, no está claro si los machos fueron inexperimentados ya que los autores también reportaron que los juveniles requirieron alrededor de 4 días de exposición a las crías para ser inducidos a mostrar comportamiento parental, lo que sugiere una sensibilización comportamental. Gandelman (1973) también reportó que alrededor de la mitad de los machos juveniles (22 días de edad) de la cepa Rockland-Swiss, desplegaron algunos componentes de la conducta parental (acarreo y lamido o postura de amamantamiento). De forma similar, Svare y Mann (1981) encontraron que el 15 y el 20% de ratones machos de 25 días de edad (cepas C57BL/6 y DBA respectivamente) acarrearón una cría. Finalmente, McCarthy y vom Saal (1986) también encontraron que durante un test de 30 min el 20% de ratones machos adolescentes fueron encontrados en el nido realizando postura de amamantamiento. La variabilidad en la incidencia del comportamiento parental observado en juveniles podría ser consecuencia de diferencias entre cepas (McCarthy & vom Saal, 1986; Svare & Mann, 1981) o diferencias en el criterio para considerar un animal parental, entre otras diferencias metodológicas menores (Alsina-Llanes et al., 2015; Priestnall & Young, 1978; Svare & Broida, 1982). Por ejemplo, el lamido es usualmente una conducta usada para definir como parental a un animal. Sin embargo, en nuestros resultados, los juveniles parentales expuestos a crías desconocidas por primera vez, lamieron a las mismas durante un mayor período de tiempo y con mayor frecuencia que los juveniles testeados con crías hermanas, lo que apoya la idea de que,

en este contexto, el lamido juega un rol importante en el reconocimiento de las crías más que en la estimulación. Previamente también encontramos que tanto las hembras lactantes como las juveniles cuando eran testeadas (en la caja maternal) con crías desconocidas lamian más en comparación a las hembras expuestas a crías propias o hermanos recién nacidos respectivamente (Alsina-Llanes et al., 2015).

Queremos señalar que no podemos excluir la posibilidad de que una exposición de mayor duración (3-4 días en vez de 24 hrs) a las crías podría facilitar el establecimiento del comportamiento paternal en machos juveniles (C57BL/6). Por ejemplo, el estudio clásico de Gubernick y Laskin (1994) en ratones de california, (especie considerada biparental y socialmente monógama) mostró que alrededor del 70% de ratones de 35-40 días de edad (hembras y machos agrupados) que habían cohabitado con sus padres y crías hermanas durante 3 días, fueron inducidos a mostrar comportamiento parental. Sin embargo, cuando cohabitaron con sus hermanos por un periodo de tiempo más corto (4 hr) solo el 40% mostraron comportamiento parental (lamido o postura de amamantamiento durante 10 min). Por lo tanto, la duración del período de cohabitación con las crías en un contexto de camada superpuesta tiene impacto en la incidencia del comportamiento parental en dicha especie. Sin embargo, como ya se mencionó, el ratón de california muestra una estrategia reproductiva diferente y, a diferencia de los ratones machos adultos inexperimentados C57BL/6, los machos del ratón de california pueden ser rápidamente inducidos a ser parentales (Horrell et al., 2017).

En resumen, a pesar de la enorme variabilidad reportada en la literatura, atribuida generalmente a la diferencia de cepas, manejo, o condiciones de alojamiento, un análisis cuidadoso de los datos comportamentales mostró un patrón conductual claro en ratones machos de laboratorio. Aunque la mayoría de los machos inexperimentados no son paternos, muestran una respuesta de comportamiento bastante flexible hacia las crías, lo que sugiere que, bajo ciertas condiciones, el comportamiento paternal en machos vírgenes podría ganar importancia biológica. Por ejemplo, las especies consideradas promiscuas o polígamas generalmente se asocian con niveles más bajos de comportamiento paternal que las especies socialmente monógamas. Sin embargo, los machos de las especies promiscuas generalmente cuidan a las crías y son capaces de contribuir a la crianza de su descendencia resultando en una reducción en el tiempo que las crías permanecen solas. Por ejemplo, en otros roedores no monógamos (como *Rhabdomys pumilio*, Schradin & Pillay, 2003) no es infrecuente encontrar alta incidencia de comportamiento paternal, lo que sugiere que la denominación de especies como biparentales podría estar en algunos casos subestimada y sesgada por su estrategia reproductiva (monógama o no monógama) más que por el comportamiento observado en los machos reproductores. Aunque el beneficio del cuidado paternal en ratones de

laboratorio no está claro, no podemos descartar la posibilidad de que bajo determinadas condiciones ecológicas más desafiantes se favorezca la presencia del padre en el nido, lo que tendría efectos a largo plazo sobre el desarrollo de las crías. Por lo tanto, la presencia del padre en el nido y su contribución a la crianza probablemente será específica del contexto. Estudios futuros en el campo y/o laboratorio en especies de roedores no tradicionales con diferentes estrategias sociales y reproductivas, o en diferentes condiciones ecológicas, podrían contribuir a nuestro mejor entendimiento de la función biológica del comportamiento paternal en los machos.

CAPÍTULO II

Expresión de c-Fos en hembras y machos inexperimentados que despliegan comportamiento parental, no parental o infanticida

Los experimentos que se describen a continuación dieron lugar a la siguiente publicación: *Prefrontal cortex is associated with the rapid onset of parental behavior in inexperienced adult mice (C57BL/6)*. Alsina-Llanes M & Olazábal DE. (2020a). *Behavioural brain research*, 385:112556.

Existe una vasta bibliografía que ha proporcionado evidencia sobre el sustrato neuronal que subyace al comportamiento parental en diferentes especies y contextos reproductivos (Numan & Insel, 2003; Olazábal et al., 2013a). Sin embargo, la mayoría de estos estudios se realizaron en ratas o en animales lactantes. Por otro lado, se sabe mucho menos sobre las bases neurales del comportamiento infanticida (Tachikawa et al., 2013; Tsuneoka et al., 2015).

Como se mencionó anteriormente, el ratón muestran una importante variabilidad en la respuesta comportamental inmediata cuando es expuesto a crías por primera vez: parental, parcialmente parental, no parental o indiferente, o infanticida (Alsina-Llanes et al., 2015; Olazábal & Alsina-Llanes, 2016). Esta variabilidad en la respuesta comportamental en las hembras y los machos de ratón, es una oportunidad única que nos permite determinar las áreas cerebrales que se reclutan en los diferentes comportamientos en respuesta a un mismo estímulo. Asimismo, nos permite discriminar las áreas que participan específicamente en el comportamiento parental o infanticida, de aquellas involucradas en el procesamiento de los estímulos relacionados a las crías u otros estímulos sociales.

Previamente, Calamandrei y Keverne (1994) analizaron las áreas cerebrales que expresan c-Fos en el ratón cuando hembras inexperienced despliegan comportamiento parental (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 inmediatamente, un hecho que difiere de lo encontrado por nosotros y otros autores (Alsina-Llanes et al., 2015; Kuroda et al., 2011; Lucas et al., 1998). Del mismo modo, Tsuneoka y col. (2013), analizaron la expresión de c-Fos en las distintas subregiones del MPOA en hembras inexperienced luego de 30 min de interacción con las crías, pero centrando su análisis en aquellos animales

que desplegaron todo el repertorio conductual parental. Cabe señalar, que algunos de estos estudios comparan la expresión de c-Fos de grupos de animales parentales o infanticidas con a animales no expuestos o en una condición fisiológica diferentes (Calamandrei & Keverne, 1994; Kuroda et al., 2007; Tachikawa et al., 2013; Tsuneoka et al., 2013; 2015). Resulta curioso el hecho de que nunca ha sido incluido un grupo control de animales no parentales. Por lo que la expresión de c-Fos reportada previamente podría no ser específica del despliegue del comportamiento parental o infanticida, y estar más bien asociada con la propia exposición a las crías y su procesamiento u otra condición fisiológica.

Además, considerando el hecho de que la respuesta parental en el ratón es un rápido proceso de sensibilización, el ratón es un modelo que permite comparar las áreas cerebrales que participan en los estadios iniciales de la interacción con las crías y el despliegue de la conducta, con aquellas que participan en una interacción de mayor duración. En base a lo expuesto, hipotetizamos que:

H2a. El patrón de activación cerebral (expresión de c-Fos) durante el procesamiento de las crías en un animal parental, parcialmente parental, no parental o infanticida es diferente.

H2b. El patrón de activación (expresión de c-Fos) de las áreas cerebrales que participan en el procesamiento inmediato de las crías, y las implicadas durante una interacción de mayor duración son diferentes.

OBJETIVO GENERAL

Determinar las áreas cerebrales que participan (expresan la proteína c-Fos) cuando hembras y machos de ratones son expuestos a las crías por primera vez y despliegan comportamiento parental, no parental e infanticidas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i.** Determinar las áreas cerebrales que participan (expresan la proteína c-Fos) cuando hembras y machos de ratones son expuestos a las crías por primera vez durante 15 min y despliegan comportamiento parental, no parental o infanticidas.
- ii.** Determinar las áreas cerebrales que participan (expresan la proteína c-Fos) cuando hembras y machos de ratones son expuestos a las crías por primera vez durante 60 min y despliegan comportamiento parental, no parental o infanticidas.

ABORDAJE EXPERIMENTAL

Los detalles se describe en el artículo Alsina-Llanes & Olazábal, 2020a adjunto al final de la tesis.

Brevemente, hembras y machos adultos (60-100 días de edad) inexperimentados fueron expuestas a 2 crías neonatas por primera vez. Como grupos controles, se utilizaron hembras y machos sin ningún tipo de exposición previa (Grupo Control, CTL), y machos expuestos a un objeto novedoso (Grupo Objeto novedoso, ObN). El objeto novedoso, consistió en un canasto de té de malla de alambre el cuál, además de ser utilizado como control de novedad, también se utilizó para proteger a las crías de lesiones en un grupo de machos infanticidas.

Se utilizaron dos tiempos de exposición a las crías (o el objeto novedoso, **Figura 7**):

i) *15 min de exposición*: las crías (o el objeto novedoso) fueron retirados de la caja luego de 15 min y los animales fueron dejados sin ningún tipo de intervención hasta completar 60 min desde el inicio del test.

ii) *60 min de exposición*: las crías (o el objeto novedoso) permanecieron en la caja durante 60 min.

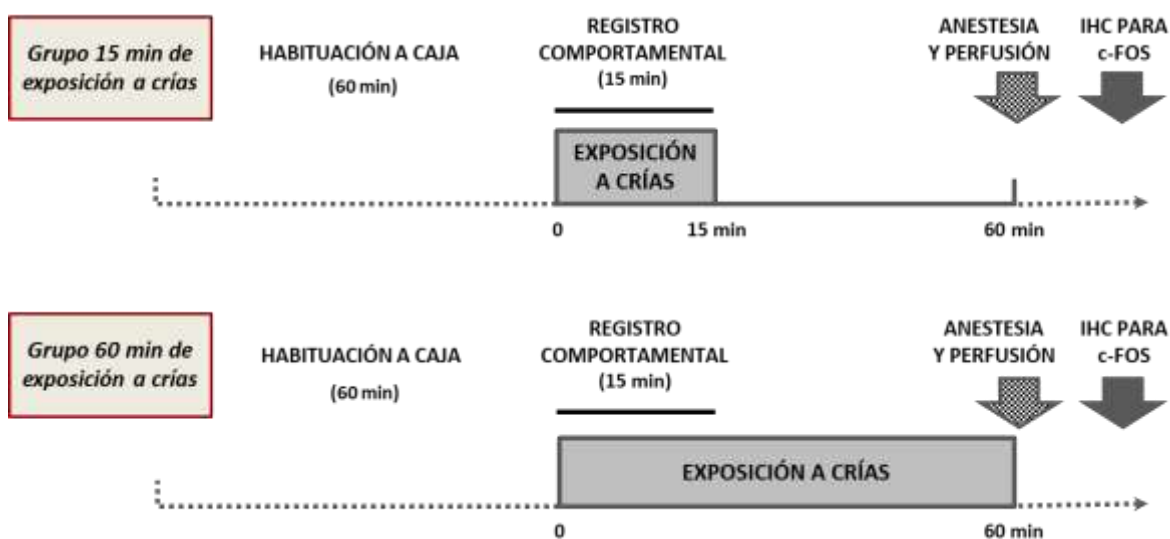


Figura 7. Diseño experimental.

En todos los casos en que los animales fueron expuestos a 2 crías, se realizó un test comportamental durante 15 min (ver Figura 7). De acuerdo a las respuestas comportamentales, los animales fueron categorizados como *parental completo* (PC) si desplegaban todos los componentes de la conducta parental (acarreo de al menos una cría, lamido ≥ 60 s, postura de amamantamiento ≥ 30 y construcción de nido ≥ 60 s); *parental incompleto* (PI) si desplegaban 2 o 3 de los componentes del comportamiento

parental; *no parental* (NP) si exhibían 1 o ninguna de las conductas; e *infanticida* (I) si atacaban a las crías. Dada las respuestas comportamentales (PC, PI, NP e I) exhibidas y las duraciones de las exposiciones a las crías (15 o 60 min), se crearon 7 grupos experimentales de hembras y 7 de machos (**Tabla 4**).

Tabla 4. Grupos experimentales

Grupo	Hembras		Grupo	Machos	
	15 min N	60 min N		15 min N	60 min N
PC	7	8	PI	6	5
PI	7	7	I	7	8
NP	8	6	CTL	7	7
CTL	8	8	ObN	6	6

PC: parental completo; PI: parental incompleto; NP: no parental; I; infanticida; CTL: control sin exposicion; ObN: exposicion objeto

Una vez finalizados los protocolos comportamentales, se analizó la inmunoreactividad (ir) para c-Fos unilateralmente en la Corteza prelimbica (PL) e infralimbica (IL), regiones core y shell del Nucleo accumbens (NA), área preóptica media (MPOA), amígdala medial (MA) y cortical (CoA), y subregiones del núcleo ventromedial del hipotálamo (VMH). La localización del muestreo se muestra en la **Figura 8**.

Análisis estadístico

Todos los datos se analizaron utilizando el paquete estadístico IBM SPSS statistics 22. Los datos para el número de neuronas c-Fos-ir fueron chequeados para normalidad (Prueba de Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianza (Prueba de Bartlett). Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA; grupos como factores), seguido de la prueba Fisher post hoc para todas las comparaciones de 2 grupos. La significancia estadística establecida fue $p < .05$. Para las correcciones de Bonferroni, se utilizó $p < .01$.

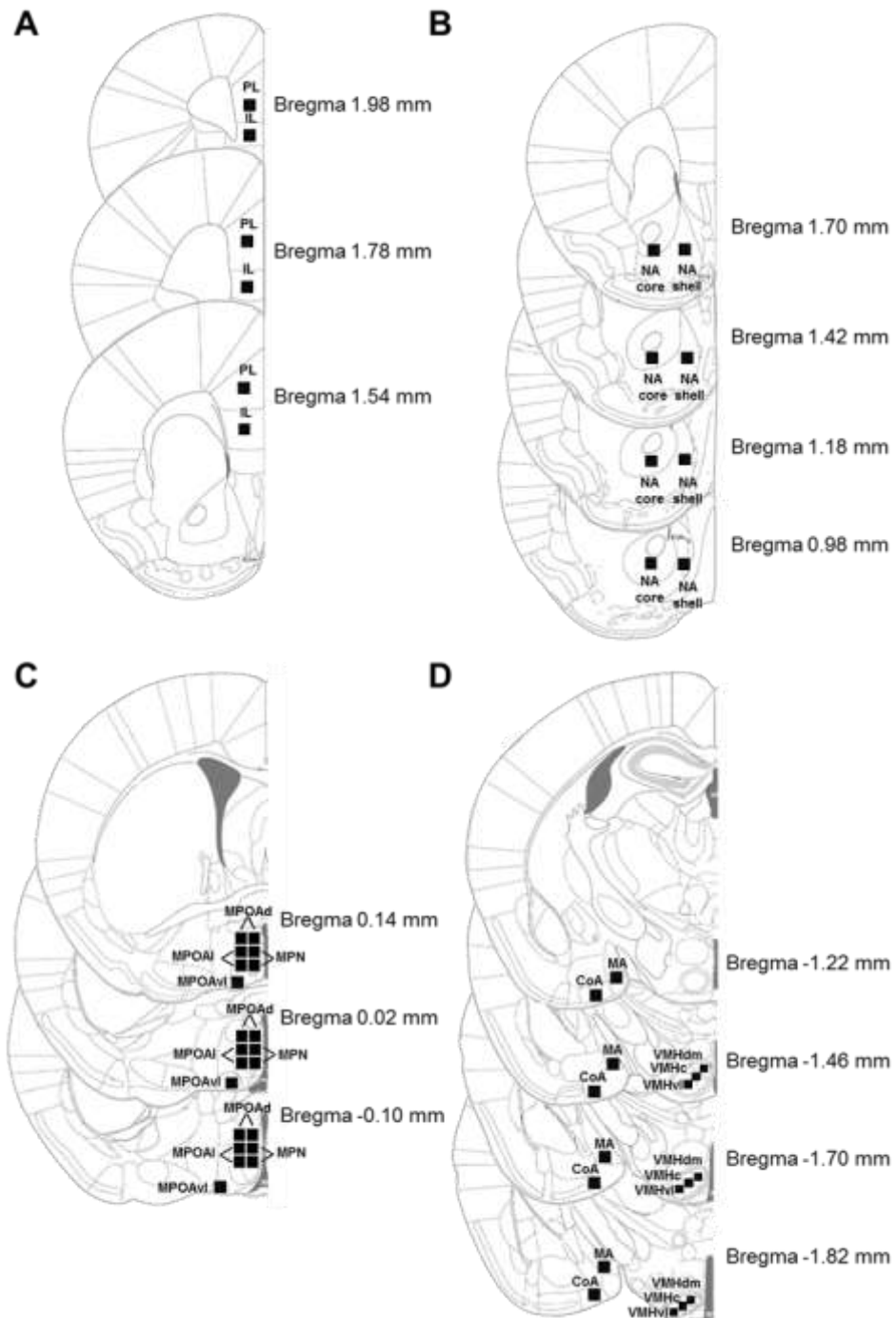


Figura 8. Diagrama del cerebro de ratón mostrando la localización del muestreo (cuadrado negro) de las neuronas inmunoreactivas (ir) para c-Fos a nivel de la Corteza Prelimbica (PL) e Infralimbica (IL) (A); Núcleo accumbens (NA) core y shell (B); diferentes regiones del área preóptica medial (MPOA), MPOA dorsal (MPOAd), núcleo preóptico medial (MPN), MPOA lateral (MPOAI) y MPOA ventrolateral (MPOAvl) (C); amígdala medial (MA), amígdala cortical (CoA), y núcleo ventromedial del hipotálamo (VMH, D). El cuadrado negro representa la unidad de muestreo de 0,04 mm² para PL, IL, NA, MPOA, MA, CA o 0,02 mm² para el VMH. Diagrama tomado de: The mouse brain in Stereotaxic Coordinates, 3th ed., K. Franklin y G. Paxinos, 2008.

RESULTADOS

Patrón de expresión de c-Fos durante la respuesta comportamental parental o no parental en hembras vírgenes de ratones expuestas a crías por primera vez

Grupos de animales expuestos a crías durante 15 min

El 100% de las hembras que fueron categorizados como PC (n=7) lamieron, acarrearón a las crías, realizaron postura de amamantamiento y construyeron nido. Los porcentajes de dichas conductas fueron 100%, 0%, 75%, y 87,5% en las hembras PI (n=7) y 14%, 0%, 0%, y 14% en las NP (n=8) respectivamente.

Encontramos diferencias significativas entre los grupos en el número de neuronas c-Fos-ir en la PL (F=7,8, df=3, p<,001), mientras que en la IL las diferencias no alcanzaron la significancia estadística establecida (F=2,6, df=3, p=,07). Ambos grupos parentales, PI y PC, mostraron niveles significativamente mayores de c-Fos en la PL (p<,01, p<,01 vs. CTL n=8; p<,04, p<,04 vs. NP, **Figuras 9A y 10**). Cuando ambos grupos parentales (PC y PI) se combinaron en un grupo parental, ambas regiones de la corteza prefrontal (PL, F=11,2, df=2, p<,01; IL, F= 4,0, df= 2, p<,05) mostraron diferencias significativas. El número de neuronas c-Fos-ir en la PL (32,3 ± 1,3) e IL (26,6 ± 2,1) en dicho grupo parental fue significativamente mayor que en el grupo CTL (PL 20,6 ± 2,9; IL 18,5 ± 2,6, p<,01). El grupo parental fue significativamente diferente al grupo NP en PL (24,0 ± 2,0, p<,01), pero no alcanzó significancia en la IL (22,3 ± 1,7, p=,1).

El número de neuronas c-Fos-ir en el NA core (F=3,6, df=3, p<,03) y shell (F=3,9, df=3, p<,02) fue estadísticamente diferente entre los grupos. Los grupos de hembras expuestas a las crías por primera vez (grupos NP, PI y PC) mostraron un número mayor de neuronas c-Fos-ir tanto en el NA core como en el NA shell en comparación con el grupo CTL (**Tabla 5**).

También se observaron diferencias significativas entre los grupos en la expresión de c-Fos en la MA (F=4,1, df=3, p<,02) y CoA (F=5,8, df=3, p<,01). Las hembras que fueron PI mostraron niveles significativamente mayor de neuronas c-Fos-ir en el MA (p <,01 vs. CTL, **Figuras 9A y 11**) y CoA (p<,001 vs. CTL, p<,01 vs. NP, p<,01 vs. PC, **Figuras 9A y 11**).

La comparación de la expresión de c-Fos en las diferentes subregiones del MPOA no mostró ninguna diferencia entre los cuatro grupos experimentales (MPOAd, MPN, MPOA y MPOAvl, **Tabla 5**). Tampoco se encontraron diferencias entre los grupos en el número total de neuronas c-Fos-ir cuando todas las regiones del MPOA se combinaron. Asimismo, no se encontraron diferencias entre los grupos en las tres subregiones del VMH analizadas (VMHdm, VMHc, VMHvl, **Tabla 5**).

La combinación de los grupos parentales (PC y PI) tampoco proporcionó información adicional sobre diferencias en el NA, MA, MPOA y VMH.

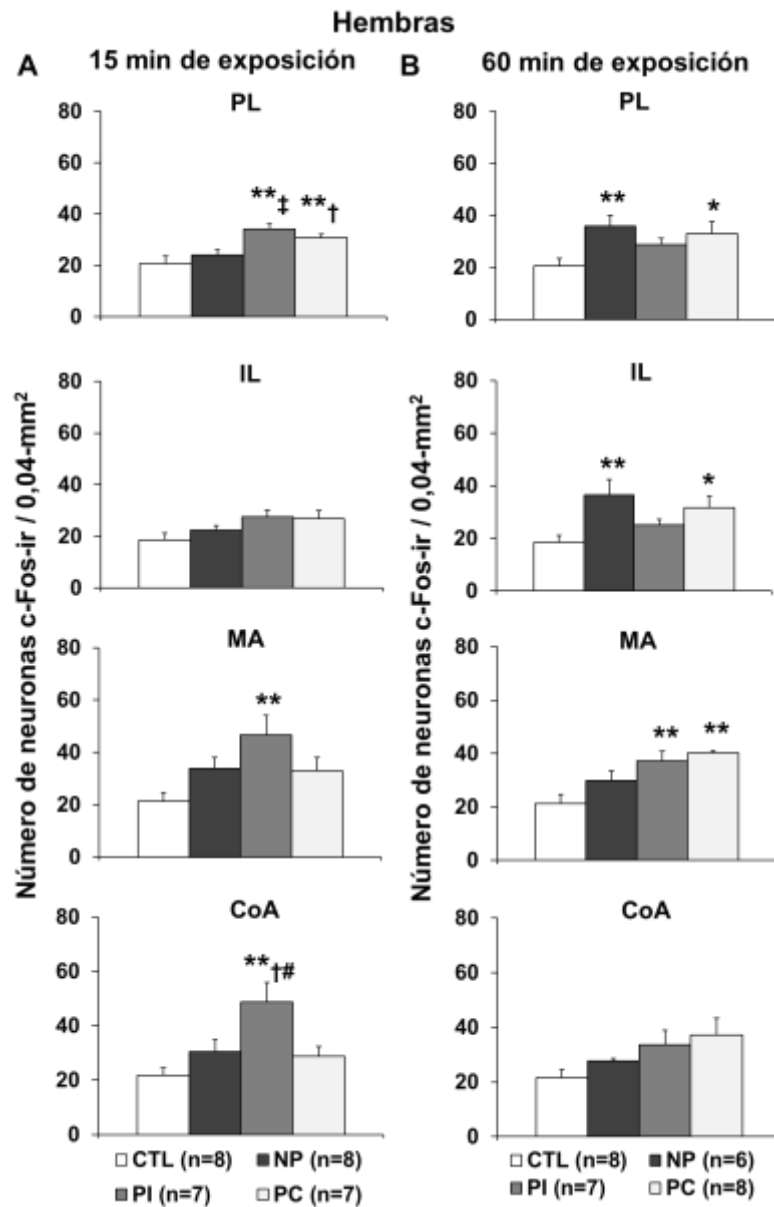


Figura 9. Numero de neuronas c-Fos-ir (\pm ES) en la corteza prelímbica (PL) e infralímbica (IL), amígdala medial (MA) y cortical (CoA) de hembras adultas inexperimentadas expuestas a crías durante 15 (A) o 60 min (B). CTL: sin ninguna exposición, NP: no parental, PI: parental incompleto; PC: parental completo. * $p < ,05$ y ** $p < ,01$ vs. CTL, † $p < ,05$ y ‡ $p < ,01$ vs. NP, y # $p < ,01$ vs. PC, post hoc Fisher LSD.

Tabla 5. Número de neuronas inmunoreactivas para c-Fos en hembras adultas inexperimentadas expuestas a crías por primera vez durante 15 min

Area cerebral	CTL	NP	PI	PC	F(3, 26)	p
NA core	14,8 ± 1,5	22,1 ± 2,2 *	23,1 ± 3,3 **	24,5 ± 1,8 **	3,6	< ,03
NA shell	18,7 ± 1,8	24,4 ± 2,1 *	25,8 ± 2,3 **	27,6 ± 1,4 **	3,9	< ,02
VMHdm	15,2 ± 1,3	14,3 ± 2,2	15,8 ± 2,9	11,6 ± 1,4	0,8	ns
VMHc	14,8 ± 1,3	15,7 ± 2,0	20,5 ± 3,1	14,7 ± 2,2	1,4	ns
VMHvl	13,7 ± 1,6	13,1 ± 1,5	18,1 ± 2,4	14,6 ± 2,4	1,1	ns
MPOAd medial	23,8 ± 3,7	26,2 ± 2,7	36,9 ± 5,0	27,6 ± 3,6	2,2	ns
MPOAd lateral	21,8 ± 3,9	20,4 ± 1,4	31,5 ± 6,1	22,8 ± 2,7	1,7	ns
MPN superior	27,9 ± 5,5	25,6 ± 1,6	36,9 ± 5,8	28,6 ± 3,7	1,2	ns
MPN inferior	25,0 ± 5,7	25,9 ± 2,4	35,8 ± 7,5	28,9 ± 4,0	0,9	ns
MPOA superior	18,7 ± 3,9	19,6 ± 1,2	29,6 ± 4,5	24,7 ± 2,6	2,4	ns
MPOA inferior	19,1 ± 3,9	21,1 ± 1,5	30,4 ± 4,7	25,0 ± 2,9	2,1	ns
MPOAvl	27,5 ± 2,0	31,8 ± 3,0	32,5 ± 4,8	29,9 ± 2,9	0,4	ns

CTL: sin ninguna exposición; NP: no parental; PI: parental incompleto; PC: parental completo; NA: Núcleo Accumbens; VMH: núcleo ventromedial del hipotálamo; VMHdm: VMH dorsomedial; VMHc: VMH central; VMHvl: VMH ventrolateral; MPOA: área preóptica medial; MPOAd: MPOA dorsal; MPN: núcleo preóptico medial; MPOAvl: MPOA ventrolateral; ns: no significativo. Datos expresados como media ± ES del número de neuronas inmunoreactivas para c-Fos en muestreos de 0,04 mm² (NA core, NA shell y subregiones del MPOA) o 0,02 mm² (subregiones del VMH). F y p valor para ANOVA se muestran en las dos ultimas columnas. *p<0,03, **p<0,01 vs. CTL, post hoc Fisher LSD.

Tabla 6. Número de neuronas inmunoreactivas para c-Fos en hembras adultas inexperimentadas expuestas a crías por primera vez durante 60 min

Area cerebral	CTL	NP	PI	PC	F(3, 26)	p
NA core	14,8 ± 1,5	25,1 ± 5,2	25,9 ± 3,8 *	31,5 ± 3,9 **	4,0	< ,02
NA shell	18,7 ± 1,8	28,7 ± 2,6 *	28,2 ± 3,4 *	32,6 ± 3,2 **	4,7	< ,01
VMHdm	15,2 ± 1,3	20,3 ± 1,7	21,1 ± 3,5	25,5 ± 3,6	2,3	ns
VMHc	14,8 ± 1,3	20,2 ± 2,6	21,7 ± 2,4	22,0 ± 2,4	2,4	ns
VMHvl	13,7 ± 1,7	20,4 ± 2,3	21,7 ± 3,0	19,8 ± 2,2	2,4	ns
MPOAd medial	23,8 ± 3,7	31,5 ± 3,7	26,6 ± 2,7	33,9 ± 2,2	2,3	ns
MPOAd lateral	21,8 ± 3,9	29,4 ± 2,8	22,6 ± 1,9	31,6 ± 3,3	2,4	ns
MPN superior	27,9 ± 5,5	30,9 ± 5,4	26,6 ± 2,6	30,9 ± 2,7	0,2	ns
MPN inferior	25,0 ± 5,7	20,6 ± 5,7	31,2 ± 4,0	34,0 ± 4,2	1,4	ns
MPOA superior	18,7 ± 3,9	28,2 ± 4,6	22,1 ± 1,4	27,0 ± 3,3	1,6	ns
MPOA inferior	19,1 ± 3,8	24,5 ± 3,3	23,4 ± 3,9	28,4 ± 2,2	1,4	ns
MPOAvl	27,5 ± 2,1	38,4 ± 5,3	42,4 ± 7,4	48,3 ± 7,0	2,4	ns

CTL: sin ninguna exposición; NP: no parental; PI: parental incompleto; PC: parental completo; NA: Núcleo Accumbens; VMH: núcleo ventromedial del hipotálamo; VMHdm: VMH dorsomedial; VMHc: VMH central; VMHvl: VMH ventrolateral; MPOA: área preóptica medial; MPOAd: MPOA dorsal; MPN: núcleo preóptico medial; MPOAvl: MPOA ventrolateral; ns: no significativo. Datos expresados como media ± ES del número de neuronas inmunoreactivas para c-Fos en muestreos de 0,04 mm² (NA core, NA shell y subregiones del MPOA) o 0,02 mm² (subregiones del VMH). F y p valor para ANOVA se muestran en las dos ultimas columnas. *p<0,04, **p<0,01 vs. CTL, post hoc Fisher LSD.

Grupos de animales expuestos a crías durante 60 min

Todas las hembras PC (n=8) lamieron, acarrearón a las crías, realizaron postura de amamantamiento y construyeron nido. Los porcentajes de dichas conductas fueron 100%, 0%, 100%, y 62,5 % en las hembras PI (n=7) y 16 %, 0%, 0%, y 33,3% en las NP (n=6) respectivamente. Una hembra atacó a las crías y por tanto fue eliminada del estudio. Al final de los 60 min de exposición a las crías, todas las hembras NP fueron encontradas alejadas de las crías, mientras que las hembras PC estaban en el nido sobre las crías. Ninguna de las hembras PI acarreo a las crías ni construyó nido asociado a la presencia de las crías, sin embargo el 42,8% (3/7) fue encontrada sobre al menos una cría realizando postura de amamantamiento.

El número de neuronas c-Fos-ir fue significativamente diferente en la PL (F=3,3, df=3, p<,04, **Figuras 9B y 10**) e IL (F=4,0, df=3, p<,02, **Figuras 9B y 10**) entre los grupos. Encontramos un aumento en los niveles de c-Fos en las hembras PC (p<,02) y NP

($p < ,01$) en comparación con las CTL ($n=8$). Asimismo, cuando los grupos parentales fueron combinados, encontraron diferencias significativas en ambas regiones cerebrales (PL $F=4,6$, $df=2$, $p < ,02$; IL $F=5,2$, $df = 2$, $p < ,01$). Los niveles de c-Fos en la PL ($31,1 \pm 2,7$) e IL ($28,6 \pm 2,7$) fueron significativamente mayores en los animales parentales (PC más PI) en comparación a las CTL (PL $20,6 \pm 2,9$, $p < ,02$; IL $18,5 \pm 2,7$, $p < ,04$). La expresión de c-Fos en las hembras NP fue significativa diferente en la PL (PL $35,9 \pm 4,3$, $p < ,01$) e IL ($36,6 \pm 5,9$, $p < ,01$) en comparación a las CTL.

Encontramos diferencias significativas entre los grupos en los niveles de c-Fos en el NA core ($F=4,0$, $df=3$, $p < ,02$) y shell ($F=4,7$, $df=3$, $p < ,01$). La mayoría de las hembras expuestas a las crías mostraron niveles mayores de c-Fos en el NA core y shell en comparación a las CTL (**Tabla 5**).

La expresión de c-Fos en la MA ($F=4,9$, $df= 3$, $p < ,01$) pero no en la CoA ($F=2,2$, $df=3$, $p=,1$) mostró diferencias entre los grupos. Encontramos un aumento en el número de neuronas c-Fos-ir en las hembras PC ($p < ,01$ vs. CTL, **Figura 9B y 11**) y PI ($p < ,01$ vs. CTL, **Figura 9B y 11**) en la MA.

No se encontraron diferencias entre los grupos en la expresión de c-Fos en las diferentes subregiones del MPOA (MPOAd, MPN, MPOA y MPOAvl, **Tabla 6**), incluso cuando todas las regiones del MPOA fueron combinadas.

El análisis del número de neuronas c-Fos-ir en el VMH no mostró diferencias significativas (VMHdm, VMHc, VMHvl, **Tabla 6**). Sin embargo, cuando se combinaron los grupos parentales PC y PI, se encontraron diferencias significativas entre los grupos ($p < ,05$) en el VMHc y VMHvl. La expresión de c-Fos en el VMHc y VMHvl fue mayor en los animales parentales en comparación al CTL ($p < ,01$ y $p < ,02$ respectivamente), pero no fue diferente de las hembras NP ($p=,06$ y $p=,09$ respectivamente).

No se encontraron otras diferencias en el NA, MA, CoA, MPOA o VMHdm al combinar los grupos parentales.

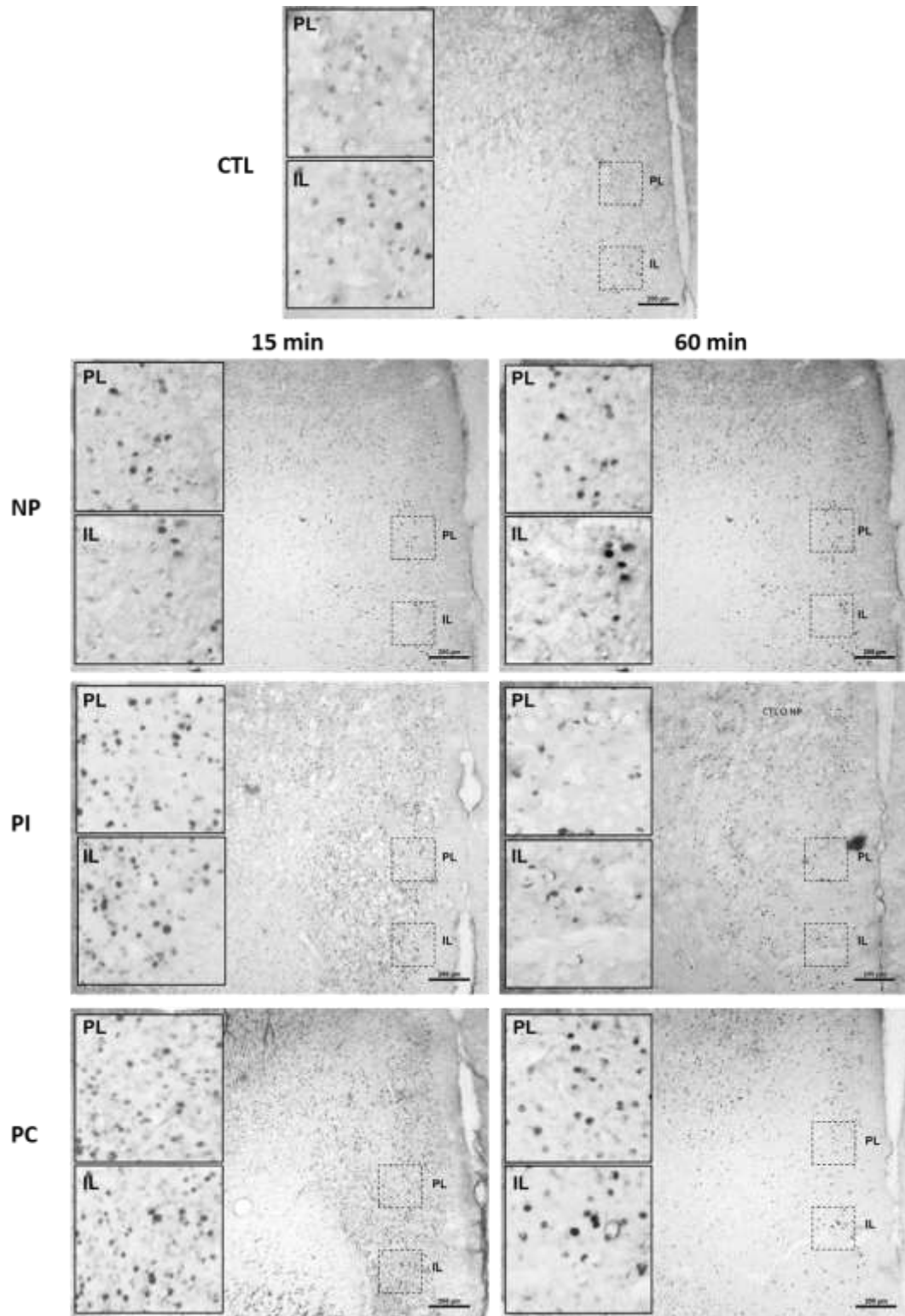


Figura 10. Representación fotográfica de las neuronas que expresan c-Fos en la Corteza Prelímbica (PL) e Infralímbica (IL) en hembras adultas expuestas a crías durante 15 (izquierda) o 60 min (derecha). CTL: sin ninguna exposición, NP: no parental, PI: parental incompleto; PC: parental completo. El área enmarcada dentro del área de línea continua representada una mayor magnificación del área punteada. Barra de escala 200 µm.

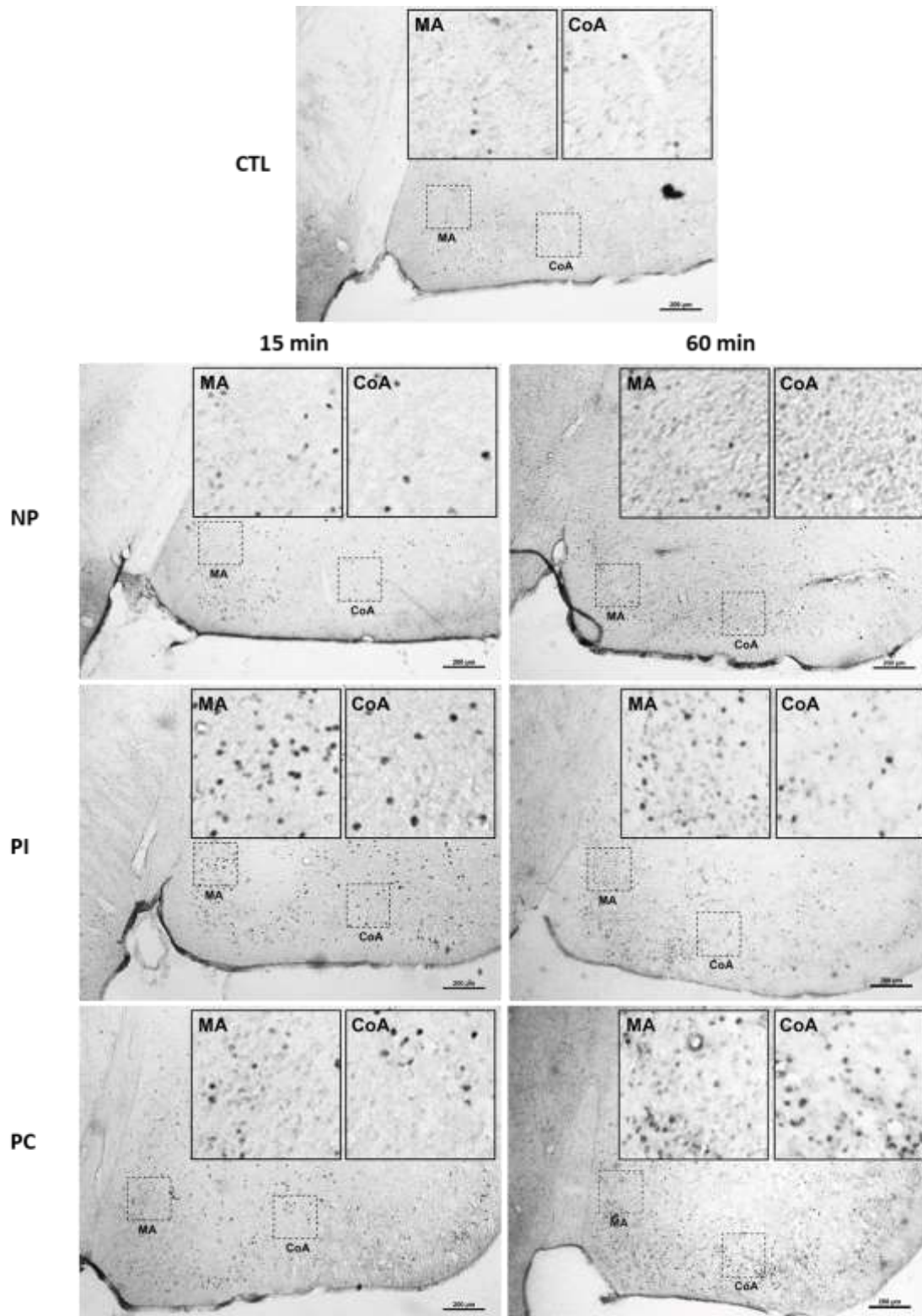


Figura 11. Representación fotográfica de las neuronas que expresan c-Fos en la amígdala medial (MA) y cortical (CoA) en hembras adultas expuestas a crías durante 15 (izquierda) o 60 min (derecha). CTL: sin ninguna exposición, NP: no parental, PI: parental incompleto; PC: parental completo. El área enmarcada dentro del área de línea continua representada una mayor magnificación del área punteada. Barra de escala 200 µm.

Patrón de expresión de c-Fos durante la respuesta comportamental parental o infanticida en machos vírgenes de ratones expuestos a crías por primera vez

Grupos de animales expuestos a crías durante 15 min

Todos los machos incluidos en el grupo I (n=7), atacaron a las crías con una latencia de $98,3 \pm 1,6$ s y no mostraron ninguna conducta parental previa. En el grupo PI (n=6), el 100%, 83,3%, y 16,6% de los machos, lamió, adoptó postura de amamantamiento y construyó nido respectivamente, y ningún machos (0%) acarreo a las crías durante los primeros 15 min del test.

El análisis de la expresión de c-Fos no mostró diferencias entre los grupos en la PL (**Figura 12A**) e IL (**Figura 12A**), en el NA core y shell (**Tabla 7**), en las subregiones del VMH (VHMdm, VMHc, VMHvl, **Tabla 7**) y subregiones de la MPOA (MPOAd, MPN, MPOA y MPOAvl, **Tabla 7**).

Se encontraron diferencias significativas en el número de neuronas c-Fos-ir en la CoA ($F=3,1$, $df=3$, $p<,05$) pero no en la MA ($F=2,8$, $df=3$, $p=,06$). Los machos PI, mostraron significativamente más neuronas c-Fos-ir en la CoA ($p<,03$ vs. CTL n=7, $p<,03$ vs. ObN n=6, **Figura 12A**).

Grupos de animales expuestos a crías durante 60 min

Los machos incluidos en el grupo I (n=8), atacaron a las crías con una latencia de $120,9 \pm 2,0$ s y no exhibieron conductas parentales previas, mientras que en los machos PI (n=5), el 100% lamió a las crías, el 80,0% adoptó postura de amamantamiento, el 20,0% construyó nido y ningún machos (0%) acarreo a las crías durante los primeros 15 min del test. Al final de los 60 min de exposición a las crías, el 40% de los machos PI fueron encontrados realizando postura de amamantamiento al menos sobre una cría, y un macho fue visto transportando una cría. En el grupo de machos I, en el que las crías fueron colocadas dentro del canasto hasta completar 60 min de exposición, el 75% de los machos fue encontrado mordiendo el canasto.

No encontramos diferencias significativas entre los grupos en la PL (**Figura 12B**) e IL (**Figura 12B**).

Se encontraron diferencias significativas en el número de neuronas c-Fos-ir entre los grupos en NA shell ($F=3,4$, $df=3$, $p<,04$) pero no en el NA core ($F=1,2$, $df=3$, $p=,32$). Los machos I que fueron expuestos a las crías dentro de un canasto, mostraron mayores niveles de c-Fos en el NA shell en comparación al CTL (n=7, $p<,03$, **Tabla 8**) y el ObN (n=6, $p<,2$, **Tabla 8**).

La expresión de c-Fos en la amígdala (MA F=3,7, df=3, p<,03; CoA F=8,0, df=3, p<,01) mostró diferencias significativas entre los grupos. Los machos PI exhibieron un número significativamente mayor de neuronas c-Fos-ir en el MA (p<,01 vs. CTL, **Figura 12B**) y CoA (p<,03 vs. CTL, p<,03 vs. OE, **Figura 12B**). Además, los machos que desplegaron infanticidio y fueron expuestos a crías dentro del canasto, también exhibieron mayores niveles de c-Fos en la MA (p<,03 vs. CTL, **Figura 12B**) y CoA (p<,01 vs. CTL, p<,01 vs. ObN, **Figura 12B**).

El análisis de la expresión de c-Fos entre los grupos no reveló diferencias significativas en las subregiones del VMH (VMHdm, VMHc, VMHvl, Tabla 8) y del MPOA (MPOAd, MPN, MPOA y MPOAvl, **Tabla 8**).

Tabla 7. Número de neuronas inmunoreactivas para c-Fos en machos adultos inexperimentados expuestos a crías por primera vez durante 15 min

Area cerebral	CTL	ObN	PI	I	F(3, 22)	p
NA core	12,8 ± 1,9	13,7 ± 1,6	22,0 ± 3,6	17,5 ± 4,1	1,7	ns
NA shell	17,6 ± 1,7	13,7 ± 2,6	23,3 ± 2,5	20,6 ± 4,7	1,5	ns
VMHdm	15,6 ± 2,2	16,5 ± 1,9	14,5 ± 2,0	15,8 ± 1,8	0,1	ns
VMHc	18,4 ± 2,3	17,1 ± 1,4	14,6 ± 2,2	17,0 ± 2,0	0,5	ns
VMHvl	15,7 ± 2,4	18,8 ± 1,2	14,2 ± 0,8	15,9 ± 1,6	1,2	ns
MPOAd medial	26,5 ± 2,1	31,7 ± 3,1	26,8 ± 3,6	36,9 ± 5,5	1,6	ns
MPOAd lateral	24,2 ± 2,0	23,9 ± 2,5	25,3 ± 4,3	25,1 ± 4,0	0,0	ns
MPN superior	26,9 ± 2,4	26,9 ± 3,6	28,4 ± 3,4	31,0 ± 5,6	0,2	ns
MPN inferior	29,1 ± 3,5	27,5 ± 2,9	29,9 ± 4,1	29,5 ± 5,2	0,1	ns
MPOA superior	24,9 ± 2,6	23,2 ± 4,8	27,1 ± 5,0	21,6 ± 5,1	0,2	ns
MPOA inferior	22,7 ± 3,4	23,0 ± 5,1	28,0 ± 4,3	22,5 ± 5,3	0,3	ns
MPOAvl	26,5 ± 3,3	38,5 ± 6,0	33,0 ± 5,9	39,5 ± 4,9	1,5	ns

CTL: sin ninguna exposición; ObN: exposición objeto novedoso; PI: parental incompleto; I: infanticida; NA: Núcleo Accumbens; VMH: núcleo ventromedial del hipotálamo; VMHdm: VMH dorsomedial; VMHc: VMH central; VMHvl: VMH ventrolateral; MPOA: área preóptica medial; MPOAd: MPOA dorsal; MPN: núcleo preóptico medial; MPOAvl: MPOA ventrolateral; ns: no significativo. Datos expresados como media ± ES del número de neuronas inmunoreactivas para c-Fos en muestreos de 0,04 mm² (NA core, NA shell y subregiones del MPOA) o 0,02 mm² (subregiones del VMH). F y p valor para ANOVA se muestran en las dos ultimas columnas.

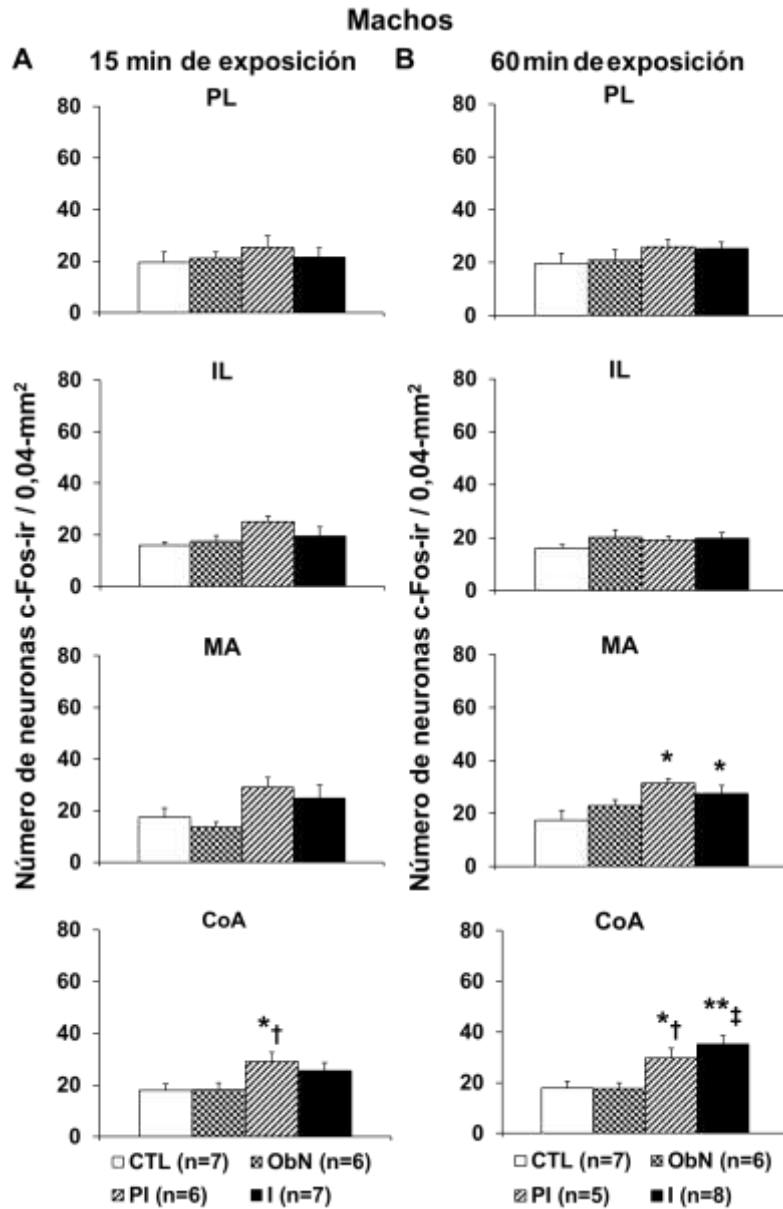


Figura 12. Número de neuronas c-Fos-ir (\pm ES) en la corteza prelímbica (PL) e infralímbica (IL), amígdala medial (MA) y cortical (CoA) de machos adultos inexperimentados expuestas a crías durante 15 (A) o 60 min (B). CTL: sin ninguna exposición, ObN: exposición a objeto novedoso, PI: parental incompleto; I: infanticida. * $p < ,05$ y ** $p < ,01$ vs. CTL, † $p < ,05$ y ‡ $p < ,01$ vs. ObN, post hoc Fisher LSD.

Tabla 8. Número de neuronas inmunoreactivas para c-Fos en machos adultos inexperimentados expuestos a crías por primera vez durante 60 min

Area cerebral	CTL	ObN	PI	I	F(3, 22)	p
NA core	12,8 ± 1,9	14,7 ± 1,6	17,1 ± 2,7	17,4 ± 1,7	1,2	ns
NA shell	17,6 ± 1,7	16,9 ± 1,1	23,9 ± 3,0	24,6 ± 2,5 *#	3,4	<0,04
VMHdm	15,6 ± 2,2	24,0 ± 2,0	19,3 ± 3,5	21,6 ± 2,0	2,3	ns
VMHc	18,4 ± 2,3	24,1 ± 1,6	22,3 ± 4,4	24,0 ± 1,6	1,3	ns
VMHvl	15,7 ± 2,4	22,8 ± 1,6	21,6 ± 4,2	21,7 ± 2,4	1,9	ns
MPOAd medial	26,5 ± 2,2	23,6 ± 2,3	30,5 ± 4,6	25,3 ± 2,5	0,9	ns
MPOAd lateral	24,2 ± 2,0	22,9 ± 1,3	29,1 ± 2,8	24,3 ± 1,9	1,5	ns
MPN superior	26,9 ± 2,4	22,4 ± 2,4	27,4 ± 4,2	26,2 ± 1,2	0,8	ns
MPN inferior	29,1 ± 3,5	20,0 ± 1,4	29,1 ± 5,7	24,8 ± 2,0	1,7	ns
MPOA superior	24,9 ± 2,6	21,5 ± 2,4	27,9 ± 5,4	21,3 ± 0,9	1,2	ns
MPOA inferior	22,7 ± 3,4	19,9 ± 1,9	25,0 ± 3,0	23,7 ± 1,6	0,6	ns
MPOAvl	26,5 ± 3,3	28,7 ± 2,9	36,2 ± 2,9	35,7 ± 1,7	2,5	ns

CTL: sin ninguna exposición; ObN: exposición objeto novedoso; PI: parental incompleto; I: infanticida; NA: Núcleo Accumbens; VMH: núcleo ventromedial del hipotálamo; VMHdm: VMH dorsomedial; VMHc: VMH central; VMHvl: VMH ventrolateral; MPOA: área preóptica medial; MPOAd: MPOA dorsal; MPN: núcleo preóptico medial; MPOAvl: MPOA ventrolateral; ns: no significativo. Datos expresados como media ± ES del número de neuronas inmunoreactivas para c-Fos en muestreos de 0,04 mm² (NA core, NA shell y subregiones del MPOA) o 0,02 mm² (subregiones del VMH). F y p valor para ANOVA se muestran en las dos últimas columnas. *p<0,03 vs. CTL, #p<0,02 vs.ObN, post hoc Fisher LSD.

DISCUSIÓN

En el presente capítulo, se investigaron qué áreas cerebrales participan (expresen c-Fos) cuando hembras y machos adultos son expuestos a crías por primera vez (15 o 60 min) y despliegan diferentes respuestas comportamentales. Los principales resultados consisten en mostrar que: **i)** el comportamiento parental en las hembras estuvo específicamente asociado a una mayor expresión de c-Fos en la PL durante los primeros 15 min de exposición a las crías; **ii)** el NA se activó de forma no específica (en respuesta a la presencia de las crías) en las hembras, pero el shell del NA también mostró mayores niveles de c-Fos en los machos infanticidas expuestos a crías dentro de un canasto; **iii)** la activación de la MA y CoA en hembras y machos PI después de 15 min de exposición a las crías, pero también en machos infanticidas (60 min de exposición), sugiere que estas subregiones participarían en la transición de no parental

a parental así como también en la respuesta infanticida; **iv**) los niveles más altos de c-Fos en algunas de las subregiones del VMH en animales parentales en comparación con el CTL pero no con el grupo NP, sugieren una activación inespecífica de estas subregiones o un patrón de activación temporal diferente en esta área; **v**) el tiempo utilizada (60 min) entre el inicio de la exposición a las crías y la perfusión no fue suficiente para detectar una participación específica del MPOA en ningún comportamiento; **vi**) no hubo activación de c-Fos específicamente asociada con el comportamiento infanticida en ninguna de las áreas investigadas. A continuación, discutiremos nuestros hallazgos para cada región específica del cerebro en el contexto de trabajos previos en ratones y otras especies.

El rol de la CPFm en el comportamiento parental ha ganado importancia en los últimos años (Febo et al., 2008; Pereira & Morrell, 2011; Olazábal et al., 2013a). La CPFm es parte del sistema límbico y ha sido asociada al procesamiento de las emociones, aprendizaje, memoria, y la organización temporal de los componentes del comportamiento parental (Febo et al., 2008, Olazábal et al., 2013a; Slotnick & Nigrosh, 1975). Previamente, Slotnick & Nigrosh (1975) mostraron que lesiones electrolíticas de la CPFm (que incluían a la PL e IL) deterioraban el comportamiento maternal durante el posparto en ratones. Asimismo, se han reportado mayores niveles de c-Fos en la CPFm durante el establecimiento de preferencia por el ambiente asociado a las crías, y que su inactivación afecta aspectos organizacionales del comportamiento parental durante el posparto en la rata (Pereira & Morrell, 2011). Los hallazgos de este capítulo muestran principalmente que la activación de la PL estuvo asociada con la respuesta parental durante los primeros 15 min de interacción con las crías, mientras que durante 60 min de interacción, los animales no parentales también mostraron un aumento de c-Fos en la PL e IL. Dado a que las hembras de ratón son inducidas a ser parentales rápidamente mediante un proceso de sensibilización, es posible que las hembras que fueron no parentales durante los primeros 15 min, al final de los 60 min hayan comenzado a desarrollar cambios neurales en la PL e IL que le permitan ser parentales. Por lo tanto, la PL e IL regularían y/o coordinarían temporalmente los diferentes componentes comportamentales de la conducta parental y participaría además en la toma de decisión o proceso motivacional que resulta en la ejecución del comportamiento parental en las hembras de ratón. Cabe señalar que a pesar de que la expresión de c-Fos en la PL/IL de machos no alcanzó la significancia estadística establecida (quizás debido al bajo número de individuos en dicho grupo n=6), los animales que fueron PI mostraron mayores niveles de c-Fos que los CTL durante la exposición a de 15 min.

Por otra parte, la activación no específica del NA en las hembras, sugiere una respuesta neural asociada al procesamiento de información proveniente de las crías,

independiente de la respuesta comportamental exhibida. En este sentido, estudios previos en ratas han mostrado una asociación entre la activación del NA y la respuesta de novedad a las crías (Lonstein et al., 1998; Olazábal & Morrell, 2005). Los machos infanticidas también mostraron mayores niveles de c-Fos en el shell del NA en comparación con ambos grupos controles (CTL y ObN). Quizás, diferentes subpoblaciones neuronales podrían estar involucradas en las diferentes respuestas comportamentales a las crías en hembras y machos. En este sentido, previamente se han asociado diferentes poblaciones neuronales del shell con el procesamiento de respuestas tanto gratificantes como aversivas (Berridge, 2009). Por tanto, el NA podría estar involucrado en el procesamiento y asignación de saliencia de los estímulos relacionados con las crías que podría resultar en el comportamiento tanto parental como infanticida.

La MA, CoA y VMH son áreas asociadas a la inhibición del comportamiento parental en la rata. En este sentido, lesiones de la amígdala y el VMH facilitan la inducción del comportamiento parental en la rata (Bridges et al., 1999; Fleming et al., 1980; Morgan et al., 1997). Sin embargo, en el ratón y voles de la pradera la presencia de las crías induce la expresión de c-Fos en la amígdala corticomedial de hembras parentales (Calamandrei & Keverne, 1994; Kirkpatrick et al., 1994). En contraste a la rata, las lesiones de la amígdala corticomedial bloquean el comportamiento parental en voles de la pradera (Kirkpatrick et al., 1994). En el presente estudio, se encontró un aumento en la expresión de c-Fos en la MA y CoA de hembras y machos que fueron PI durante los primeros 15 min de exposición. Sin embargo, tanto las hembras maternas como los machos infanticidas también mostraron mayores niveles de c-Fos en la MA y CoA luego de 60 min de exposición. Nuestros resultados coinciden parcialmente con los estudios previos en la rata en los que los animales no parentales y parentales mostraron mayores niveles de c-Fos en la MA y CoA (Numan & Numan, 1994; Sheehan et al., 2000). No obstante, ratas y ratones difieren en cómo procesan inicialmente a las crías y/o la respuesta comportamental parental que exhiben. En contraste a la rata que muestran una típica respuesta de evasión o neofobia, el ratón explora a las crías inmediatamente, independientemente de la respuesta comportamental final. Nuestros resultados sugieren que en el ratón, la MA y CoA sería crítica para la inducción normal del comportamiento parental e infanticida, probablemente procesando información olfativa crítica que desencadenará una u otra respuesta comportamental. Sin embargo, la activación observada en los animales PI podría representar un conflicto o un periodo transición entre dos potenciales respuestas comportamentales.

El MPOA es un área que es crítica en la inducción y el mantenimiento del comportamiento parental en mamíferos (Numan & Insel, 2003; Olazábal et al., 2013a).

En este sentido, existe una vasta bibliografía que asocia una mayor expresión de c-Fos y fosB en el MPOA con el comportamiento parental en ratas lactantes y sensibilizadas, así como en el ratón común, voles de la pradera y ratón de california (de Jong et al., 2009; Calamandrei & Keverne, 1994; Kirkpatrick et al., 1994; Kuroda et al., 2007; Lee and Brown, 2002; 2007; Numan & Numan, 1994; Stack & Numan, 2000; Tsuneoka et al., 2013; 2015). Particularmente, en el ratón de laboratorio, se ha propuesto que la región central del MPOA es crítica en el despliegue de comportamiento parental (Tsuneoka et al., 2013; 2015). En este sentido, lesiones de esta región bloquea el comportamiento parental en hembras vírgenes, hembras lactantes y padres de ratón (Tsuneoka et al., 2013; 2015), así como también en hembras lactantes y padres del ratón de california (Lee & Brown, 2002; 2007). Dichas lesiones en el ratón, inducen a las hembras vírgenes, lactantes y a los padres a ser infanticidas (Tsuneoka et al., 2013; 2015).

Sin embargo, en el presente estudio, la expresión de c-Fos en el MPOA y sus diferentes subdivisiones, no mostró ninguna diferencia significativa. Parte de las discrepancias con nuestros resultados actuales del análisis de c-Fos en el MPOA (pero también en las demás áreas cerebrales), pueden explicarse en términos de que en la mayoría de los trabajos previos en ratones, no se utilizan animales no parentales como control. Por lo tanto, es posible que parte de la evidencia previa no sea específica, algo que es respaldado además por nuestro estudio al agregar más grupos controles. Además, en la mayoría de los trabajos previos los animales se sacrificaron dos horas después de iniciada la exposición a las crías, algo que podría ser necesario para alcanzar niveles detectables de c-Fos en el MPOA. En este sentido, el MPOA tiene un patrón temporal de expresión de c-Fos diferente al de las áreas corticales (Stack & Numan, 2000), por lo que sacrificar y perfundir a los animales 60 min después de iniciada la exposición a las crías, puede no ser suficiente para detectar diferencias en esta región del cerebro que comúnmente se observan luego de 2 horas de exposición a las crías. Resulta interesante también el hecho de que los animales son capaces de desplegar comportamiento parental completo a pesar de no mostrar una mayor activación de c-Fos en ésta área. No obstante, este hecho ya ha sido reportado en ratas juveniles sensibilizadas que, a pesar de ser parentales, no expresan un aumento significativo de c-Fos en el MPOA (Kalinichev et al., 2000; Olazábal & Morrell, 2005). Además, otras especies de roedores que muestran comportamiento parental rápidamente, como es el caso de voles de la pradera y ratón de california, exhiben, en algunos casos, c-Fos en el MPOA pero bajo condiciones experimentales diferentes. Kirkpatrick y cols. (1994) encontraron mayores niveles de c-Fos en el MPOA pero solo luego de 3 hrs de ser hembras y machos de voles de la pradera expuestos a las crías. En concordancia con

nuestros resultados, De Jong y cols. (2009 y 2010) encontraron que en el ratón de california, sólo los padres, pero no machos vírgenes o machos que habían sido únicamente apareados con una hembra, mostraron mayores niveles de c-Fos en el núcleo preóptico medial cuando fueron expuestos a crías dentro de un canastro de maya de alambre. De forma similar a nuestro estudio, en los estudios de De Jong y cols. (2009 y 2010), los animales fueron sacrificados luego de 70 min de exposición a las crías. Por tanto, los niveles más bajos de c-Fos en el MPOA no excluye la participación de esta área cerebral en el inicio del comportamiento parental. Creemos que en ratones vírgenes e inexperimentados, el inicio de la conducta parental dependería de las regiones corticales en dónde se seleccionaría la respuesta conductual y luego esa información se enviaría al MPOA sin una activación rápida o diferencial de la expresión de c-Fos en esta región.

Estudios previos han reportado mayores niveles de c-Fos en la subdivisión central del VMH en ratas no parentales, en comparación a hembras maternas o no expuestas a crías (Sheehan et al., 2000). Asimismo, se ha encontrado una mayor expresión de c-Fos en la subdivisión ventrolateral del VMH en ratas no parentales (Olazábal & Morrell, 2005), o tanto en ratas parentales como no parentales (Sheehan et al., 2000), según el estudio, en comparación con ratas no expuestas. Estos resultados sugirieron una activación no específica del VMH a la exposición de las crías, pero también un posible papel inhibitorio de algunas de estas subregiones en el comportamiento parental (Olazábal & Morrell, 2005; Sheehan et al., 2000). Por su parte, en el ratón, se encontró una mayor expresión de c-Fos en el VMHvl en machos infanticidas en comparación con machos sexualmente inexperimentados, o padres no expuestos a crías (Tachikawa et al., 2013), lo que apoya un papel inhibitorio de esta subregión en el comportamiento parental. Asimismo, otros autores reportaron que la estimulación de la subdivisión ventrolateral del VMH en ratones promueve agresión hacia otros machos, hembras e incluso objetos inanimados (Falkner et al., 2014; Lin et al., 2011). No obstante, nosotros no encontramos diferencias significativas en el número de neuronas c-Fos-ir en ninguna de las subregiones del VMH cuando comparamos los cuatro grupos. Cuando los grupos de hembras PI y PC fueron combinados, el análisis de la exposición de 60 minutos a las crías, mostró un aumento significativo de c-Fos en el VMHc, y el VMHvl en los animales parentales en comparación sólo al grupo CTL. Este resultado no respalda un rol del VMHc o VMHvl en la inhibición del comportamiento parental en ratones, sino sólo una activación no específica en respuesta a las crías, como también se encontró en el VMHvl en un estudio previo en ratas (Sheehan et al., 2000). También es posible que el VMH, al igual que el MPOA, tenga un patrón temporal diferente de expresión de c-Fos, y por

tanto para encontrar una activación diferencial de dicha región sea necesario sacrificar a los animales a las 2 horas de iniciada la exposición.

En conclusión, la falta de grupos controles adecuados en estudios previos en ratones, diferencias en los diseños experimentales así como las diferencias comportamentales que existen entre ratas, ratones y otras especies de roedores, hacen necesario ser cautelosos a la hora de trasladar los resultados de una especie a otra. En este estudio, mostramos por primera vez que la PL participa específicamente en el inicio del comportamiento parental en hembra de ratón. También mostramos por primera vez que 15 minutos de exposición a las crías son suficientes para detectar asociaciones entre la expresión de c-Fos y las respuestas comportamentales hacía las crías. Destacamos la importancia de utilizar grupos controles adecuados para detectar la participación cerebral diferencial en el procesamiento de las crías y en la expresión del comportamiento parental o infanticida. Finalmente, el análisis del patrón temporal de activación de las diferentes áreas cerebrales también puede brindarnos información nueva y novedosa sobre los cambios neuronales adaptativos que ocurren y preparan a un animal para tomar decisiones comportamentales rápidas. Cabe mencionar que, las diferencias en el momento en que se sacrifican los animales, podría también revelar una participación diferencial de las diferentes regiones del cerebro implicadas en el inicio del comportamiento parental. Si en este trabajo los animales hubiesen sido sacrificados a las dos horas de iniciada la exposición a las crías, quizás no se hubiese detectado la participación de la CPFm, debido a su rápido aumento (y probable disminución) de expresión de c-Fos (Cullinan et al., 1995).

CAPÍTULO III

Contribución de la CPFm y NA en el comportamiento parental o infanticida en ratones inexperimentados

La primera parte de los experimentos que se describen a continuación dieron lugar a la siguiente publicación: *NMDA-lesions in the prefrontal cortex delays the onset of maternal, but not infanticidal behavior in pup-naïve adult mice (C57BL/6)*. Alsina-Llanes M, Olazábal DE. (2020b). *Behavioral neuroscience*.

Los resultados del capítulo previo, en el que las hembras que despliegan comportamiento parental expresaron mayores niveles de c-Fos en la PL en comparación a las hembras sin exposición y las no parentales, sugieren que la CPFm o específicamente la PL, participaría en el despliegue de comportamiento parental inmediato en las hembras inexperimentadas de ratón. Sin embargo, los machos infanticidas no mostraron una mayor expresión de c-Fos en esta región del cerebro, lo que sugiere que la PL juega un papel diferente en el inicio del comportamiento parental pero no en el infanticida.

Por otra parte, también encontramos una activación de c-Fos no específica (provocada sólo por la presencia de crías) en el NA de hembras inexperimentadas expuestas a crías por primera vez. Sin embargo, los machos infanticidas expuestos a las crías dentro de un canasto, mostraron una mayor activación del NA shell en comparación a los no expuestos o al canasto mismo. Dado a que el NA ha sido implicado clásicamente en la integración entre la motivación y la respuesta comportamental frente a estímulos tanto apetitivos, como aversivos, nuestros resultados sugirieron que el NA podría jugar un papel diferente en la conducta parental y la infanticida. Sin embargo, la literatura muestra que lesiones en esta área cerebral no afectan la conducta maternal. De acuerdo a lo expuesto hipotetizamos que:

H3a. Lesiones neurotóxicas de la CPFm bloquean el comportamiento parental en las hembras, pero no afectan la respuesta infanticida en machos.

H3b. Lesiones neurotóxicas del NA afectan la respuesta infanticida en machos pero no afectan el comportamiento parental en hembras.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si lesiones de la CPFm y el NA afectan diferencialmente el despliegue de comportamiento parental e infanticida en ratones inexperimentados.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i. Determinar si lesiones neurotóxicas (NMDA) de la CPFm inhiben la conducta parental en hembras sin afectar la respuesta infanticida en machos.
- ii. Determinar si lesiones neurotóxicas (NMDA) del NA inhiben la respuesta infanticida en machos sin afectar la conducta parental en hembras.

ABORDAJE EXPERIMENTAL

El abordaje experimental (ver **Figura 13**) y la metodología empleada para el primero objetivo específico se describen en detalle en el artículo Alsina-Llanes & Olazábal, 2020b adjunto al final de la tesis. Los detalles para el segundo objetivo específico se describen en el anexo al final del presente capítulo.

Brevemente, en un primer experimento, hembras vírgenes adultas inexperimentadas (n=6) fueron inyectadas bilateralmente con 0,4 µl de una solución que contenía 10 µg de NMDA (ácido N-metil-D-aspartico) en la CPFm (dirigida a la PL). Dado a que las lesiones eran grandes y se extendían a otras regiones del cerebro, a un segundo grupo de hembras (n=6) se les inyectó bilateralmente 0,2 µl de una solución que contenía 5 µg de NMDA en la CPFm para inducir lesiones más pequeñas. Como control, se utilizaron hembras que recibieron 0,4 µl de vehículo (buffer fosfato salino 25 mM, PBS, n=5) o hembras que fueron anestesiadas y sometidas a la cirugía sin inyección cerebral (n=5). Debido a que no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos controles en ninguno de los comportamientos analizados, los agrupamos en un solo grupo, hembras Control (CTL, n=10). Por otra parte, a machos vírgenes adultos inexperimentados se les inyectó bilateralmente en la CPFm, 0,2 µl de vehículo (CTL, n=6) o 0,2 µl de una solución que contenía 5 µg de la neurotoxina NMDA (NMDA, n=7).

Para el segundo objetivo específico, a hembras (n=8) y machos (n=5) adultos inexperimentados se les inyectó bilateralmente 0,1 µl de una solución que contenía 2,5 µg de NMDA en el NA. Asimismo a hembras (n=6) y machos (n=6) adultos inexperimentados se les inyectó bilateralmente 0,2 µl de vehículo (PBS).

En todos los casos y luego de la cirugía, a los animales se les permitió recuperar durante 3-5 días sin ninguna alteración hasta el test comportamental (ver **Figura 13**). El

día del test, todos los animales fueron expuestos a 2 crías por primera vez durante 15 min y de acuerdo a las respuestas comportamentales, los animales fueron categorizados como *parental completo* (PC), *parental incompleto* (PI), *no parental* (NP) o *infanticida* (I). En la tarde del mismo día, los animales fueron sometidos a un test de open field (10 min) de modo de evaluar los niveles generales de actividad locomotora, exploración y ansiedad.

Las hembras que no fueron completamente parentales en la primera exposición a las crías, fueron sometidas a un protocolo de sensibilización parental en los siguientes 2 días (ver **Figura 13**).

Una vez finalizados todos los protocolos experimentales, los animales fueron anestesiados, perfundidos y se analizó la localización y extensión de la lesión mediante tinción de Nissl (violeta de cresilo) e inmunohistoquímica para NeuN.

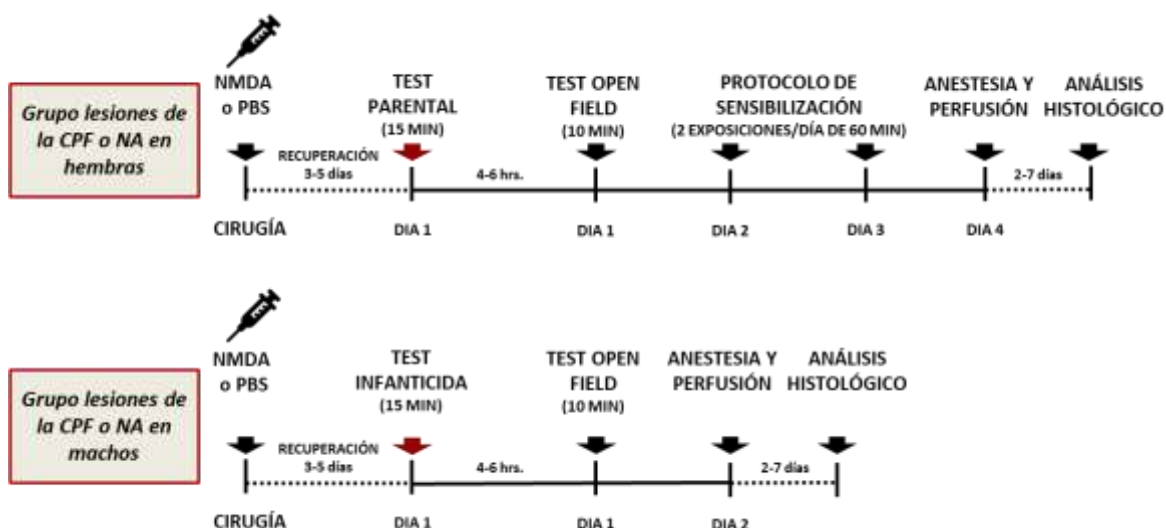


Figura 13. Diseño experimental.

Análisis estadístico

Los datos comportamentales fueron chequeados para normalidad (Shapiro-Wilk test) y homogeneidad de varianza (Levene's test) utilizando el paquete estadístico IBM SPSS statistics 22. Se utilizaron test paramétricos (t-test) para comparar los datos que cumplieron con los supuestos. Cuando los datos no cumplieron con los requerimientos, se aplicaron test no-paramétricos (prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba U de Mann-Whitney). El test de Chi-cuadrado o prueba exacta de Fisher fue utilizado para analizar la frecuencia de los comportamientos entre los grupos. El nivel de significancia estadística fue $p < .05$.

RESULTADOS

A. Lesiones neurotóxicas de la CPFm en hembras y machos de ratones

Efectos de las lesiones sobre el comportamiento maternal

Análisis histológico

La reconstrucción de la extensión de la lesión y su localización se muestra en la **Figura 14**. El análisis del tamaño de la lesión de la CPFm (**Tabla 9**) reveló que las lesiones inducidas con 10 µg de NMDA lesionó el 75,4 ± 5,8%, 86,5 ± 8,6% y 47,0 ± 7,9% de la Corteza cingulada 1 (Cg1), PL e IL respectivamente, así como el 65,0 ± 5,7% de la Corteza cingulada 2 (Cg2). Por otra parte, las lesiones inducidas con 5 µg de NMDA dañaron alrededor del 20,7 ± 2,6% y el 11,1 ± 3,9% de la Cg1 y PL respectivamente, y no se extendió a otras regiones de la CPFm como la IL y Cg2.

En algunos casos (10 µg n=6; 5 µg n=4), el área lesionada se extendió parcialmente a la corteza orbital (10 µg <50%), corteza frontal de asociación (10 µg <15%; 5 µg <5%) y corteza motora secundaria (10 µg <60; 5 µg <13%). En sólo un animal de cada grupo, la lesión se extendió a la corteza motora primaria (<5%). Las lesiones no se extendieron ventralmente al cuerpo caloso u otras áreas como el septo lateral.

Tabla 9. Volumen y porcentaje lesionado de la CPFm

	Hembras 10 µg de NMDA	Hembras 5 µg de NMDA	Machos 5 µg de NMDA
Volumen total lesionado (mm ³)	7,28 ± 0,67	0,98 ± 0,17	4,58 ± 1,16
Volumen lesionado de la Cg1 (mm ³)	1,46 ± 0,11	0,40 ± 0,05	1,22 ± 0,20
Porcentaje lesionado de la Cg1 (%)	75,4 ± 5,8	20,7 ± 2,6	62,1 ± 10,1
Volumen lesionado de la PL (mm ³)	1,53 ± 0,17	0,19 ± 0,07	0,94 ± 0,22
Porcentaje lesionado de la PL (%)	86,5 ± 8,6	11,1 ± 3,9	54,4 ± 12,4
Volumen lesionado de la IL (mm ³)	0,27 ± 0,04	0,00 ± 0,00	0,08 ± 0,04
Porcentaje lesionado de la IL (%)	47,0 ± 7,9	0,0 ± 0,0	14,8 ± 7,4

Datos expresados como medias ± ES.

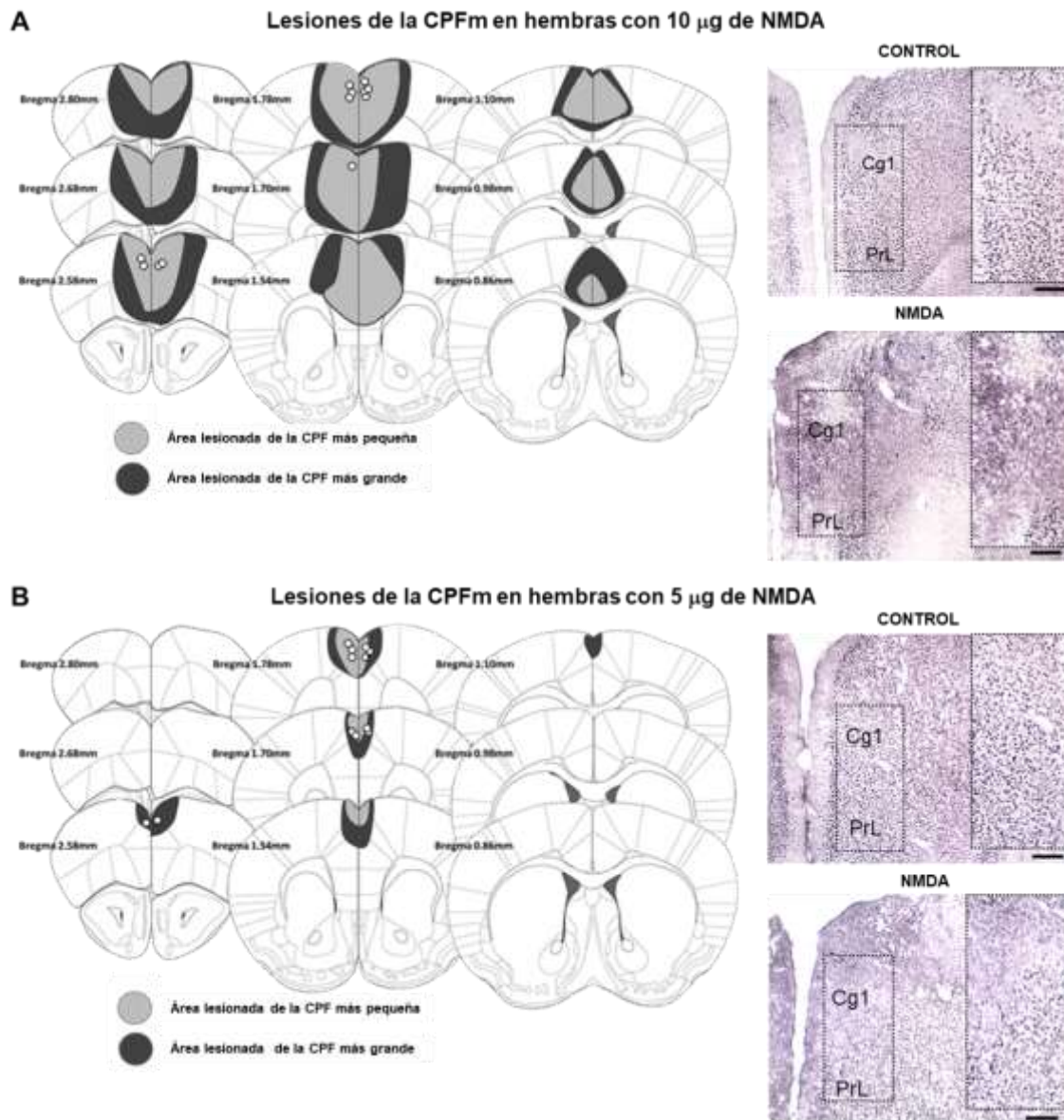


Figura 14. *Izquierda*, Reconstrucción del área de la CPFm lesionada en hembras con inyecciones de 10 (A) o 5 μ g de NMDA (B). La localización de las inyecciones se representa con círculos blancos. Diagrama tomado de: *The mouse brain in Stereotaxic Coordinates*, 3th ed., K. Franklin y G. Paxinos, 2008. *Derecha*, Representación fotográfica mostrando la inmunohistoquímica para NeuN de hembras control y hembras con lesiones de la CPFm con 10 (A) o 5 μ g de NMDA (B). El recuadro de la derecha en todas las imágenes representa una mayor magnificación del área enmarcada a la izquierda. Barra de escala 200 μ m.

Respuesta comportamental hacia las crías

La incidencia de comportamiento maternal fue significativamente mayor en el grupo Control en comparación a ambos grupos de hembras con lesionados neurotóxicas de la CPFm ($F=15,4$, $p<,01$, **Figuras 15A y B**, izquierda). Todas las hembras controles desplegaron comportamiento PC durante los primeros 15 min del test. Sin embargo, ambos grupos de hembras lesionadas con NMDA mostraron comportamiento PI (50%) y NP (50%) cuando fueron expuestas a las crías por primera vez (**Figuras 15A y B**,

izquierda). Al menos 5 exposiciones repetidas de 60 min fueron necesarias para inducir comportamiento PC en todas las hembras con lesiones de la CPFm (**Figuras 15A y B**, derecha). En la tercera exposición a las crías, el porcentaje de hembras que exhibieron comportamiento PC fue más alto en el grupo lesionado con 5 μ g que en el lesionado con 10 μ g ($F=3,3$, $p<,05$, **Figuras 15A y B**, derecha).

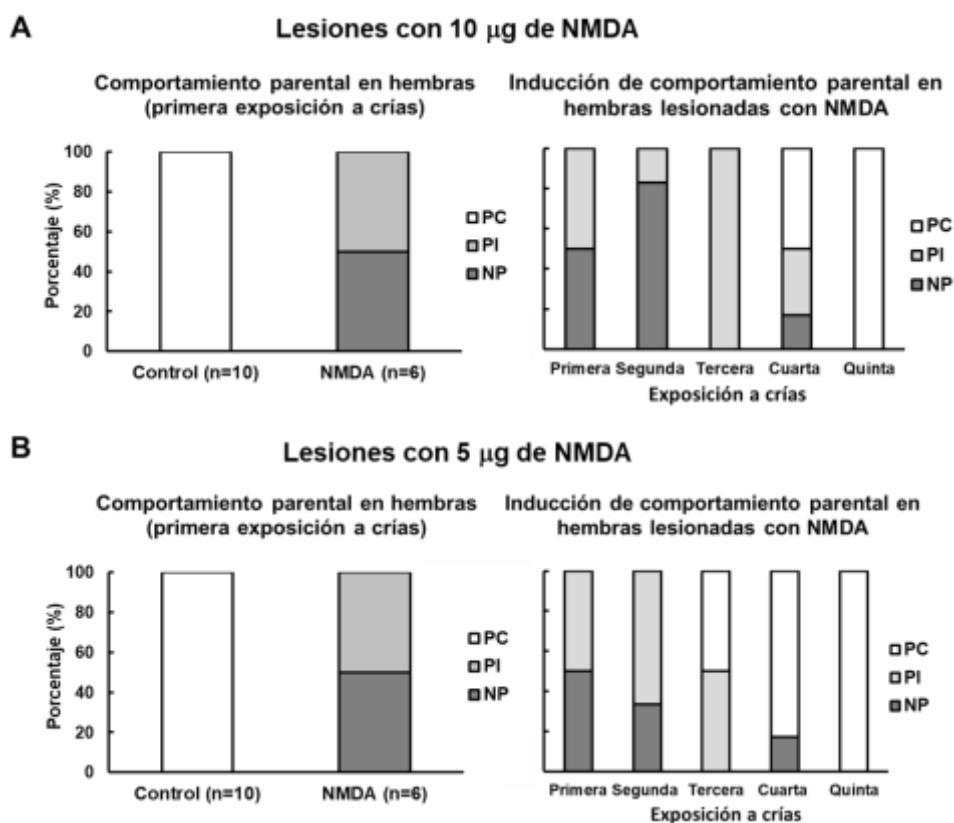


Figura 15. Porcentaje de hembras que desplegaron comportamiento parental con lesiones de la CPFm inducidas con 10 (A) o 5 μ g (B) de NMDA, durante la primera exposición a las crías (izquierda) o durante una serie de exposiciones repetidas a las crías (derecha). PC, parental completo, PI, parental incompleto, NP, no parental. Datos expresados como porcentaje, $F=15,4$, $p<,01$ vs Control (A y B, izquierda). $F=3,3$, $p<,05$ 10 μ g vs 5 μ g de NMDA a la tercera exposición (A y B, derecha).

El análisis de los diferentes componentes del comportamiento parental (**Tabla 10**) mostró que el lamido no fue diferente entre el grupo control y los grupos de hembras con lesiones de la CPFm. El porcentaje de hembras controles que acarreo a las crías (100%) fue significativamente mayor que el de las hembras lesionadas con 10 μ g (0%; $F=15,4$, $p<,01$) o 5 μ g (0%; $F=15,4$, $p<,01$) de NMDA. El grupo control adoptó postura de amamantamiento con mayor frecuencia ($U=6,5$, $p<,05$ vs. 5 μ g) y durante un mayor período de tiempo ($U=11,0$, $p<,05$ vs. 10 μ g) que los grupos de hembras con lesiones de la CPFm. Asimismo, las hembras controles construyeron nido más veces ($U=,0$,

$p < ,05$ vs. $10 \mu\text{g}$; $U=10,0$, $p < ,05$ vs. $5 \mu\text{g}$) y durante más tiempo ($U=,0$, $p < ,05$ vs. $10 \mu\text{g}$; $U=7,0$, $p < ,05$ vs. $5 \mu\text{g}$) que las hembras lesionadas con NMDA.

Tabla 10. Comportamiento parental en hembras (primera exposición a crías de 15 min)

		Control (n=10)	Lesiones de la CPFm con $10\mu\text{g}$ de NMDA (n=6)	Lesiones de la CPFm con $5\mu\text{g}$ de NMDA (n=6)
Porcentaje	Acarreo	100,0%	0,0% *	0,0% *
	Lamido	14,5 (3,5)	26,5 (7,5)	19,0 (1,5)
Frecuencia	Postura de amamantamiento	10,0 (5,5)	5,0 (6,5)	4,0 (3,0) *
	Construcción de nido	4,0 (1,0)	0,0 (0,0) *	0,0 (2,0) *
	Lamido	126,5 (133,0)	224,2 (122,0)	314,9 (66,5)
Duración (s)	Postura de amamantamiento	171,7 (130,5)	33,5 (77,5) *	68,2 (80,5)
	Construcción de nido	300,7 (69,5)	0,0 (1,0) *	0,0 (48,5) *

Datos expresados como medianas (RSIQ), Prueba U de Mann-Whitney.

* $p < ,05$ vs. Control.

Actividad exploratoria y locomotora

Las hembras en las que se lesionó la CPFm con 10 y $5 \mu\text{g}$ de NMDA, realizaron significativamente menos cruces centrales ($10 \mu\text{g}$ $t=2,3$, $p < ,05$; $5 \mu\text{g}$ $t=3,1$, $p < ,05$, respectivamente) en el open field que las hembras controles (**Figura 16A y B**). No se encontraron otras diferencias en otras variables comportamentales (**Figura 16A y B**).

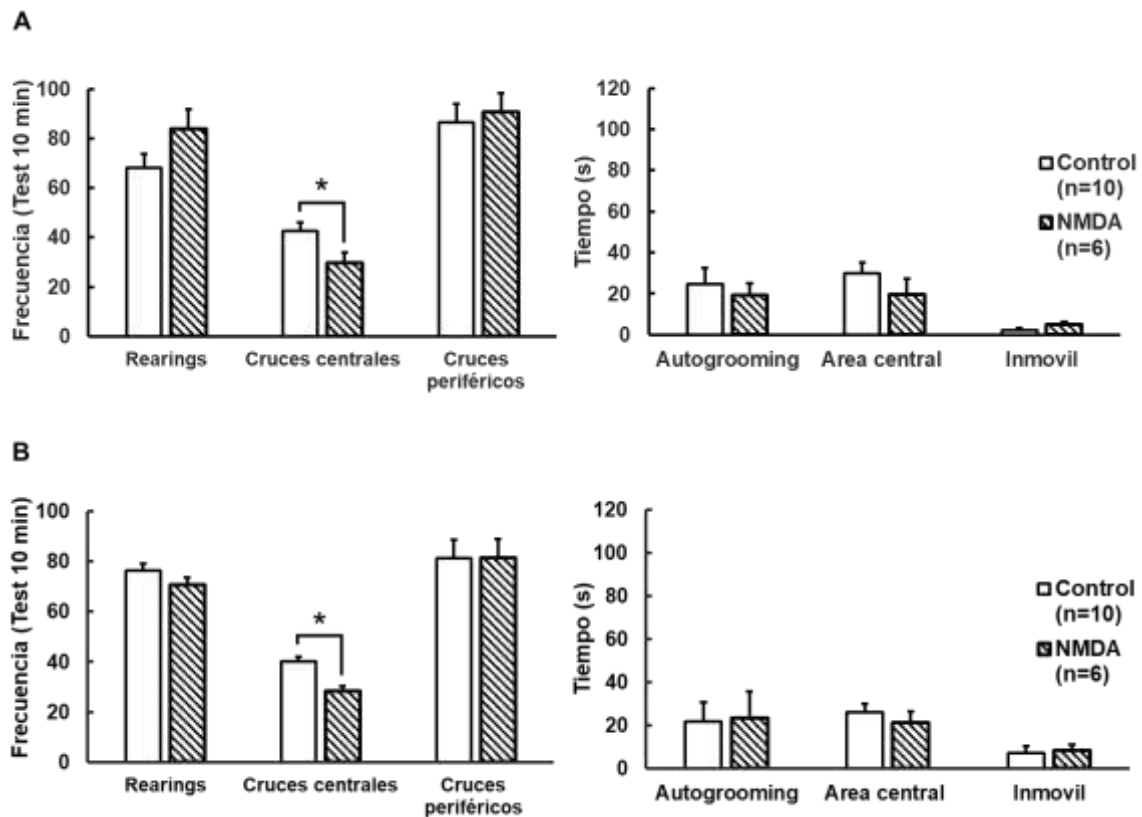


Figura 16. Actividad locomotora y exploratoria de hembras con lesiones de la CPFm con 10 (A) o 5 µg de NMDA (B) en un test de open field (10 min). Datos expresados como media ± ES. * $p < .05$ vs Control, t-test.

Efectos de las lesiones sobre el comportamiento infanticida

Análisis histológico

La localización de las lesiones de la CPFm en los machos fue similar a la reportada para las hembras. Las lesiones afectaron a la Cg1 ($62,1 \pm 10,1\%$), PL ($54,4 \pm 12,4\%$), IL ($14,8 \pm 7,4\%$) y Cg2 ($33,3 \pm 9,9\%$), y no se extendieron a otras áreas ventrales del cerebro (**Tabla 9**). En todos los machos del grupo lesionado con NMDA ($n=7$), la lesión se extendió a la corteza orbital (<20%), corteza frontal de asociación (<20%) y corteza motora secundaria (<65%). En algunos animales ($n=3$), la lesión se extendió a la corteza motora primaria (<5%). La reconstrucción de la localización y extensión de la lesión se muestra en la **Figura 17A**.

Respuesta comportamental hacia las crías

No se encontraron diferencias significativas entre los grupos en la respuesta comportamental inmediata hacia las crías. El porcentaje de machos control y con lesiones neurotóxicas de la CPFm que desplegaron I fue 83% y 100%

respectivamente ($\chi^2=1,3$, $p=ns$, **Figura 17B**). En el grupo control, el 17% de los machos no atacó a las crías y tampoco desplegó comportamiento parental. La latencia a atacar a las crías en el grupo control o con lesiones de la CPFm no fue diferente (Control: $147,5 \pm 55,6$ s; NMDA: $119,0 \pm 21,7$ s).

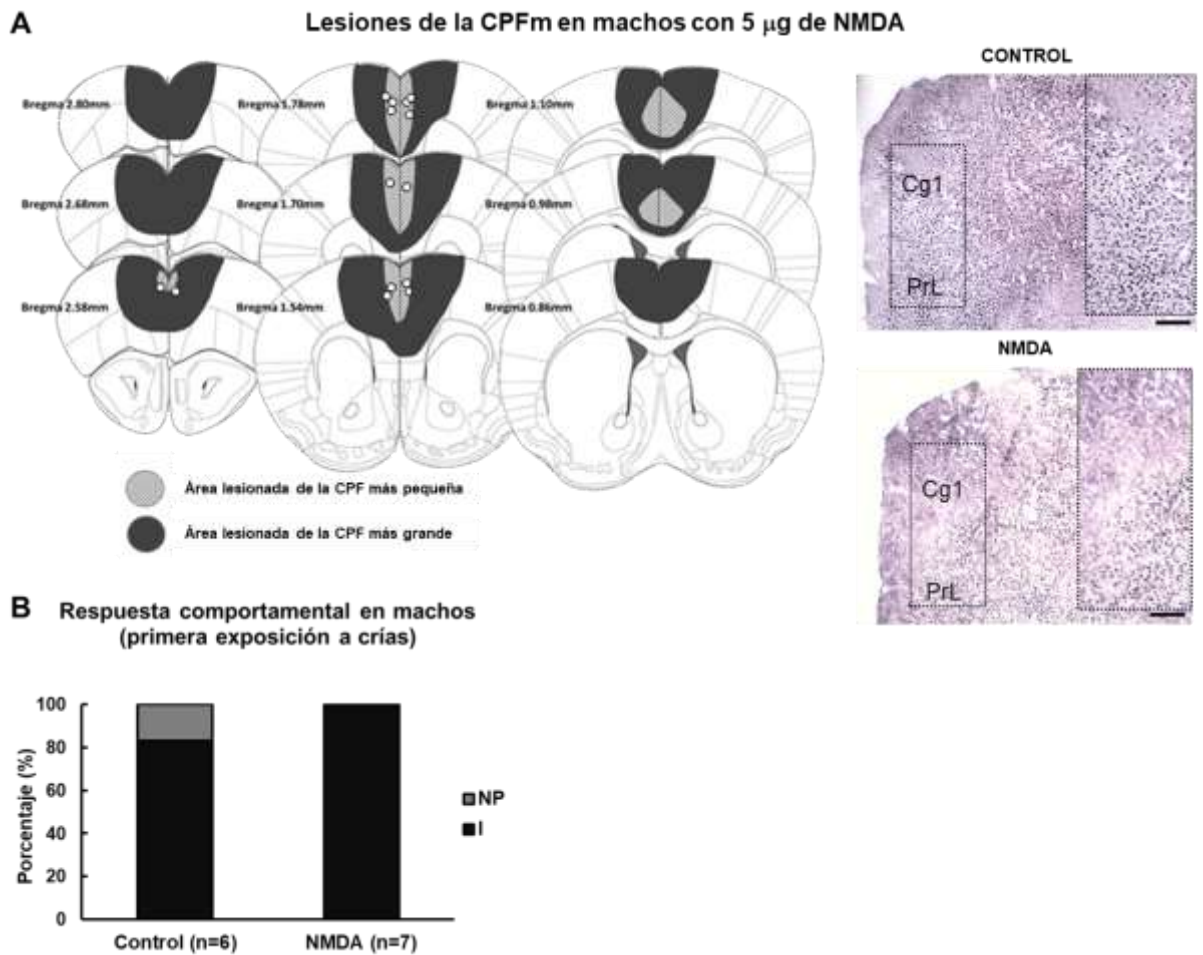


Figura 17. Panel A. (Izquierda). Reconstrucción del área de la CPFm lesionada en machos con inyecciones de 5 μ g de NMDA. La localización de las inyecciones se representa con círculos blancos. Diagrama tomado de: *The mouse brain in Stereotaxic Coordinates*, 3th ed., K. Franklin y G. Paxinos, 2008. (Derecha). Representación fotográfica mostrando la inmunohistoquímica para NeuN de machos control y machos con lesiones de la CPFm. El recuadro de la derecha en ambas imágenes representa una mayor magnificación del área enmarcada a la izquierda. Barra de escala 200 μ m. **Panel B.** Porcentaje de machos infanticidas en la primera exposición a las crías. NP, no parental, I, Infanticida. Datos expresados como porcentaje.

Actividad exploratoria y locomotora

Los machos con lesiones de la CPFm permanecieron menos tiempo en el área central del open field ($t=2,8$, $p<,05$) que los machos controles (**Figura 18**). No se encontraron otras diferencias en las variables analizadas (**Figura 18**).

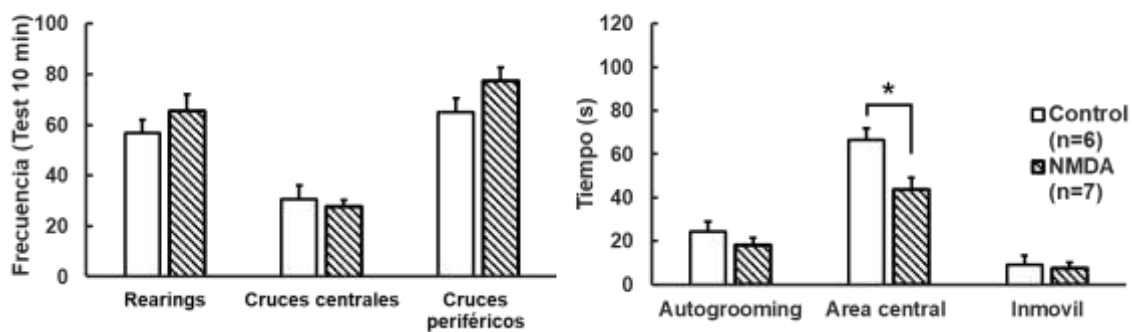


Figura 18. Actividad locomotora y exploratoria de machos con lesiones de la CPFm (5 μ g de NMDA) en un tests de open field (10 min). Datos expresados como media \pm ES. * $p < .05$ vs Control, t-test.

B. Lesiones neurotóxicas del NA en hembras y machos de ratones

Efectos de las lesiones sobre el comportamiento maternal e infanticida

Análisis histológico

La reconstrucción de la extensión de la lesión y su localización se muestra en la **Figura 19**. El análisis del tamaño de la lesión en el NA (**Tabla 11**) mostró que en el grupo de hembras (n=8) se lesionó el $21,0 \pm 9,2\%$, y el $11,0 \pm 3,7\%$ del core y shell respectivamente. Las lesiones se extendieron también al septo lateral (dorsal: $<5\%$, intermedio: $<5\%$, ventral: $<25\%$), banda diagonal ($<5\%$) y al caudado putamen ($<10\%$). En algunos animales, el área lesionada se extendió parcialmente a la parte rostral del núcleo de la estría terminal (n=6) y región anterior del área preóptica (n=2). Dos hembras fueron descartadas ya que la localización de la lesión fue posterior al NA.

Las lesiones del NA en los machos (n=5) afectaron el $13,0 \pm 5,0\%$, y el $12,4 \pm 3,9\%$ del core y shell respectivamente (**Tabla 11**). Asimismo, las lesiones se extendieron al septo lateral (dorsal: $<10\%$, intermedio: $<5\%$, ventral: $<35\%$), banda diagonal ($<2\%$) y al caudado putamen ($<1\%$). En algunos casos, la lesión se extendió mínimamente a la región anterior del núcleo de la estría terminal (n=3) y área preóptica (n=1).

Tabla 11. Volumen y porcentaje lesionado del NA

	Hembras 2,5 μ g de NMDA	Machos 2,5 μ g de NMDA
Volumen total lesionado (mm^3)	$1,29 \pm 0,60$	$0,92 \pm 0,40$
Volumen lesionado del NA core (mm^3)	$0,28 \pm 0,10$	$0,18 \pm 0,06$
Porcentaje lesionado del NA core (%)	$21,0 \pm 9,2$	$13,7 \pm 5,0$
Volumen lesionado del NA shell (mm^3)	$0,20 \pm 0,06$	$0,23 \pm 0,07$
Porcentaje lesionado del NA shell (%)	$11,0 \pm 3,7$	$12,4 \pm 3,9$

Datos expresados como medias \pm ES.

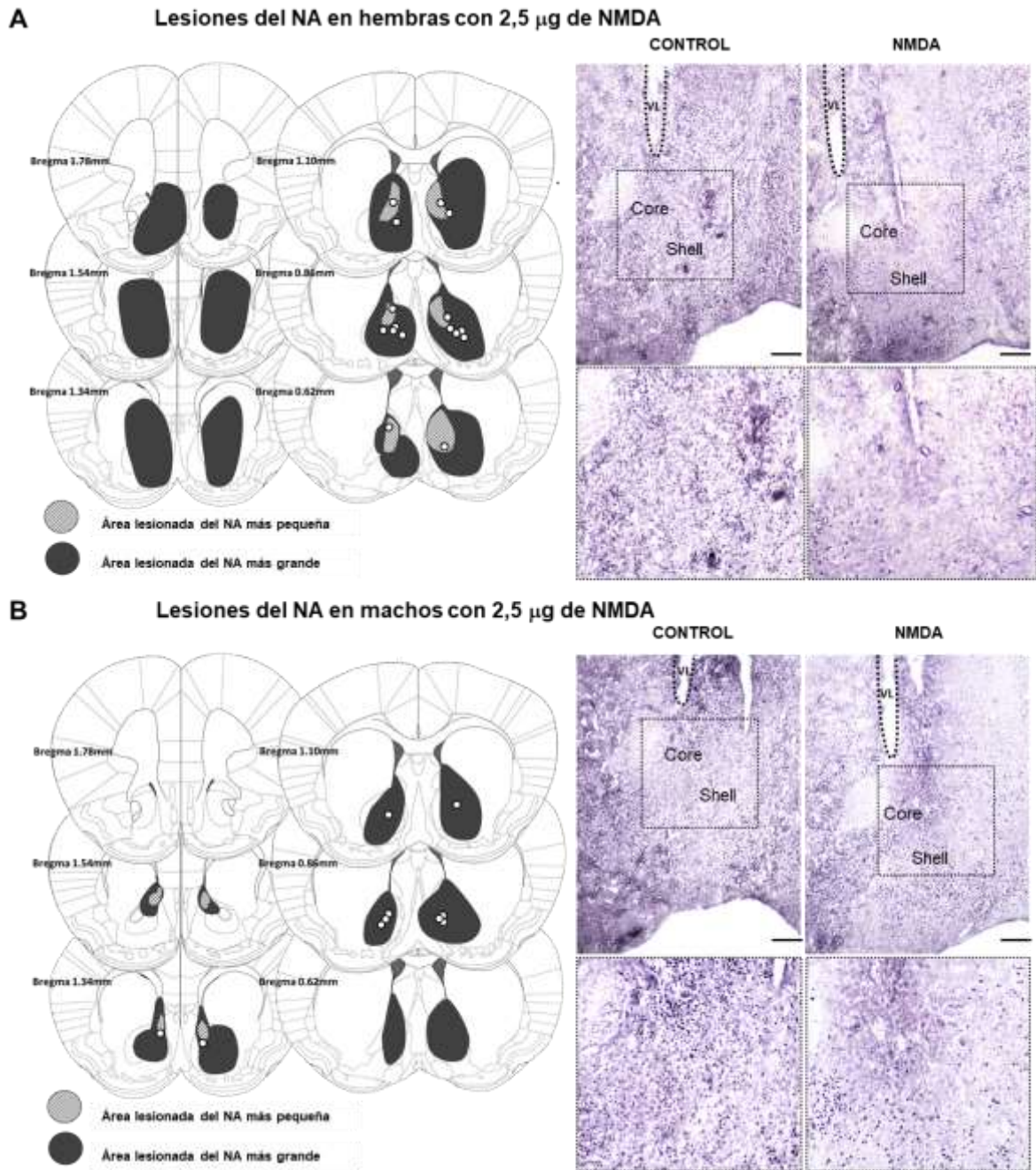


Figura 19. *Izquierda*, Reconstrucción del área del NA lesionada en hembras (A) y machos (B) con inyecciones de 2,5 μ g de NMDA. La localización de las inyecciones se representa con círculos blancos. Diagrama tomado de: *The mouse brain in Stereotaxic Coordinates*, 3th ed., K. Franklin y G. Paxinos, 2008. *Derecha*, Representación fotográfica mostrando la inmunohistoquímica para NeuN en hembras (A) y machos (B) con lesiones del NA. El recuadro de la derecha representa una mayor magnificación del área enmarcada a la izquierda. VL: ventrículo lateral. Barra de escala 200 μ m.

Respuesta comportamental hacia las crías

No se encontraron diferencias significativas en la incidencia de comportamiento maternal cuando las hembras control y con lesiones del NA fueron expuestas a crías por primera vez. El porcentaje de hembras control o con lesiones del NA que desplegó

comportamiento PC fue 100% y 75,0% respectivamente ($\chi^2=1,7$, $p=ns$, **Figura 20A**). En el grupo lesionado, el 25,0% (2/8) de las hembras mostró comportamiento PI durante la primera exposición a las crías y fueron inducidas a mostrar comportamiento PC luego de 2 exposiciones repetidas de 60 min a las crías.

El porcentaje de hembras que, de acuerdo al criterio establecido, acarreo (100%; 75%; **Tabla 12**), lamió (100%; 100%) y adoptó postura de amamantamiento (100%; 100%) no fue diferente entre las hembras control y las hembras con lesiones del NA. Sin embargo, el 62,5% (5/8) de hembras lesionadas, a pesar de acarrear, lamer y realizar postura de amamantamiento, no construyeron nido durante los primeros 15 min del test. Por lo que el porcentaje de hembras control que por definición construyo nido (100%) fue significativamente mayor que en las hembras lesionadas (37,5%, $F=3,4$, $p<,05$).

La latencia de acarreo entre las hembras control [114,1 (197,7) segundos] y con lesiones [167,3 (225,6) segundos] del NA no fue diferente. El análisis detallado de las diferencias entre los componentes del comportamiento maternal (**Tabla 12**) en la primera exposición a las crías, sólo mostró que las hembras con lesiones del NA tuvieron menos episodios de lamido ($U= 7,0$ $p<,05$) que las hembras control.

Tabla 12. Comportamiento parental en hembras (Test de 15 min)

		Control	Lesiones del NA con 2,5 μ g de NMDA
		(n=6)	(n=8)
Porcentaje	Acarreo	100,00%	75,00%
	Lamido	13,5 (2,5)	9,5 (1,7) *
Frecuencia	Postura de amamantamiento	10,5 (3,1)	4,0 (0,9)
	Construccion de nido	5,0 (1,7)	0,5 (2,5)
	Lamido	307,7 (95,8)	317,5 (84,8)
Duracion (s)	Postura de amamantamiento	244,4 (150,6)	411,1 (259,4)
	Construccion de nido	228,5 (78,7)	0,6 (133,9)

Datos expresados como medianas (RSIQ), Prueba U de Mann-Whitney.

* $p<,05$ vs. Control.

En cuanto a los machos, no se encontraron diferencias en la respuesta comportamental cuando el grupo control o con lesiones del NA fueron expuestos a crías por primera vez. El porcentaje de machos control y lesionado que desplegaron infanticidio fue 83,3% (5/6) y 60,0% (3/5) respectivamente ($p=ns$, **Figura 20B**). Sin embargo, la latencia a atacar a las crías en el grupo de machos con lesiones del NA fue significativamente mayor ($386,15 \pm 45,3s$, $t=11,9$, $p<,01$) que en los machos control ($133,9 \pm 22,4$ s).

El porcentaje de machos NP en el grupo control (16,7%) y lesionado (20,0%) tampoco fue diferente. No obstante, el macho que fue NP en el grupo lesionado nunca se acercó a las crías durante la primera exposición, y atacó a las crías durante la segunda exposición. En el grupo de machos con lesiones del NA, un macho (20,0%) mostró comportamiento parental de forma parcial (PI) en la primera exposición a las crías y a lo largo de 4 exposiciones repetidas de 60 min.

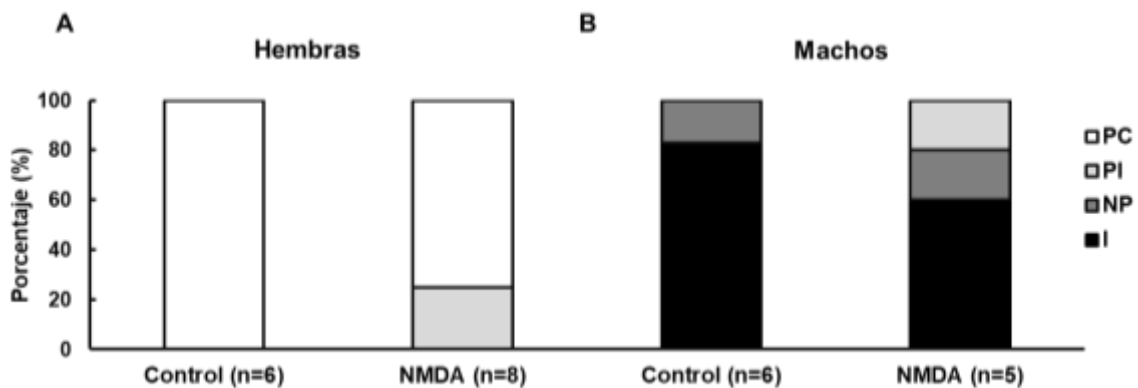


Figura 20. Porcentaje de hembras parentales (A) o machos infanticidas (B) durante la primera exposición a las crías con lesiones del NA (2,5 µg de NMDA). PC, parental completo, PI, parental incompleto, NP, no parental, I, Infanticida. Datos expresados como porcentaje.

Actividad exploratoria y locomotora

No se encontraron diferencias significativas en ninguna de las variables analizadas de la actividad locomotora y exploratoria en hembras y machos (**Figura 21A y B**).

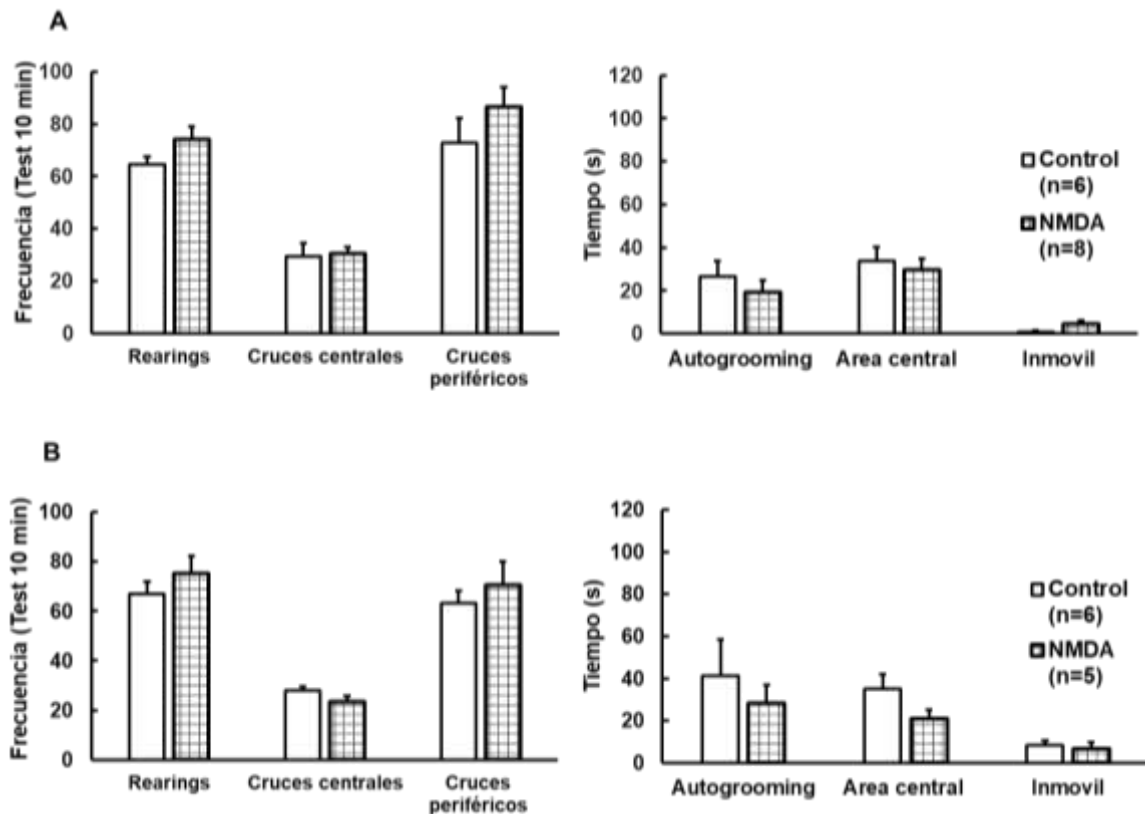


Figura 21. Actividad locomotora y exploratoria de hembras (A) y machos (B) con lesiones del NA (2,5 µg de NMDA) en un test de open field (10 min). Datos expresados como media ± ES.

DISCUSION

Efectos de las lesiones neurotóxicas sobre el comportamiento maternal

En la primera parte del presente capítulo, aportamos evidencia adicional sobre el rol crítico de la CPFm en el inicio del comportamiento maternal en las hembras, pero no del infanticidio, en ratones adultos inexperimentados. La CPFm participaría en la planificación y/o coordinación necesaria para mostrar comportamiento maternal de forma inmediata en el primer encuentro con las crías, así como en la motivación necesaria para cuidar de las mismas. Por tanto, los procesos de integración sensoriomotora, que tienen lugar en la CPFm, podrían ser críticos para que las hembras tomen rápidamente la decisión de cuidar a la crías.

Estudios previos en ratones, ratas y humanos han propuesto que la CPFm tiene un rol importante en el comportamiento maternal durante el posparto (Afonso et al., 2007; Febo, 2012; Febo et al., 2008; 2010; Gryksa et al., 2019; Nishitani, et al., 2014; Pereira & Morrel, 2011; Slotnick, 1967; Slotnick & Nigrosh, 1975). Afonso y col. (2007) encontraron que la CPFm sería esencial en la organización de la secuencia temporal de los componentes comportamentales de la conducta maternal en la rata durante el

posparto, ya que lesiones excitotóxicas de la CPFm aumentaban la latencia a acarrear la última cría y reducían el número crías acarreadas. Además, la inactivación de la CPFm con TTX o su inhibición mediada por GABA, también altera la expresión del comportamiento maternal en ratas lactantes, principalmente por reducir el acarreo de las crías (Febo et al., 2010). Del mismo modo en ratones, se ha reportado que lesiones electrolíticas de la CPFm y la corteza cingulada enlentecen el acarreo de las crías en hembras lactantes (Slotnick & Nigrosh, 1975).

En roedores, la CPFm se subdivide en Cg1, PL e IL, y estas subregiones tienen conexiones específicas con áreas corticales y sucorticales, mediante las cuales controla un amplio rango de funciones cognitivas y comportamientos motivados (Gabbott, Warner, Jays, Salway, & Busby, 2005; Granon & Changeux, 2012; Gutman et al., 2012; Peters et al., 2005; Vertes, 2004). En este sentido, Pereira y Morrell (2011) encontraron que dichas subregiones contribuyen diferencialmente en la regulación del comportamiento maternal durante el posparto en la rata. Específicamente, la inactivación transitoria de la Cg1 altera los aspectos organizacionales de la conducta maternal tanto en el posparto temprano como tardío; mientras que la PL e IL tendrían un rol facilitador específico durante el posparto tardío o temprano respectivamente (Pereira & Morrell, 2011). En el capítulo anterior, nosotros reportamos que, las hembras inexperimentadas que desplegaban comportamiento maternal cuando eran expuestas a crías (durante 15 min) por primera vez, expresaban mayores niveles de c-Fos específicamente en la PL en comparación a las no maternas y no expuestas (Alsina-Llanes & Olazábal, 2020a). Sin embargo, en el trabajo anterior no analizamos la asociación entre la expresión de c-Fos en la Cg1 y el comportamiento maternal. En el estudio actual, las lesiones abarcaron a la Cg1 y PL en ambos grupos de hembras. Sólo en el grupo de hembras con lesiones inducidas con 10 µg de NMDA, la lesión se extendió a las IL y/o a la Cg2. No obstante, y a pesar de las diferencias en la extensión de las lesiones inducidas en ambos grupos de hembras (5 y 10 µg), no encontramos diferencias en el porcentaje de hembras que desplegó comportamiento maternal en el primer encuentro con las crías. Aunque, durante la tercera exposición a las crías, las hembras que recibieron inyecciones de 5 µg de NMDA en la CPFm, mostraron una mayor incidencia de comportamiento maternal en comparación con las que recibieron 10 µg de NMDA, la diferencia entre los grupos no persistió en las siguientes 2 exposiciones. En contraste a estudios previos, nosotros no encontramos cambios en la secuencia comportamental ni en sus transiciones una vez que las hembras eran inducidas a mostrar comportamiento maternal completo. Cabe recordar que en este estudio, las hembras lesionadas fueron expuestas a las crías repetidamente hasta ser sensibilizadas. Por tanto, dichas exposiciones adicionales a las crías, podrían haber

dado tiempo a que los animales se recuperen. Sin embargo, también es posible que nuestras lesiones hayan afectado más a las funciones que son controladas por la PL, ya que se sugiere que los aspectos organizacionales de la conducta recaerían más sobre la Cg1 (Pereira & Morrel, 2011). En suma, nuestros resultados sugieren que el retraso en el establecimiento del comportamiento maternal en las hembras fue principalmente inducido por la lesión de la Cg1 y PL, pero no de la IL.

En la segunda parte de este capítulo encontramos que las lesiones del NA tuvieron efectos mínimos en comparación a los descriptos para las lesiones de la CPFm. El NA forma parte del circuito motivacional que, mediante las proyecciones del sistema dopaminérgico mesolímbico, regula la conducta maternal (Hansen et al., 1993; Numan & Insel, 2003; Numan & Stolzenberg, 2009; Olazábal et al., 2013b). Existe una vasta evidencia que propone que el NA estaría implicado en el procesamiento de las crías y facilitación del comportamiento parental (Champagne et al., 2004; Hansen et al., 1993; Keer & Stern, 1999; Li & Fleming, 2003ab; Lonstein et al., 1998; Numan & Insel, 2003; Olazábal & Morrell, 2005; Olazábal & Young, 2006ab). Se ha demostrado que interrupciones en la acción de la dopamina en el NA en ratas lactantes, interfiere con comportamientos activos (como acarreos), sin alterar otros comportamientos como por ejemplo el amamantamiento (Keer & Stern, 1999; Numan et al., 2005). Sin embargo, las lesiones neurotóxicas del NA en ratas sólo producen efectos menores o ninguno. Algunos estudios encontraron que las lesiones en el NA enlentecían la respuesta maternal, inducían déficit en la memoria maternal u otros efectos menores (Li & Fleming, 2003ab; Hansen, 1994). En los ratones de california las lesiones del NA tuvieron efectos leves sobre el acarreo de las crías en los padres y no tuvieron efectos sobre el comportamiento maternal (Lee & Brown, 2007). Por tanto, el hecho de que las lesiones del NA carezcan de efecto o tenga efectos leves sobre la conducta maternal ya ha sido reportado en otras especies. Además, coincide con nuestro estudio anterior en el que no encontramos una asociación entre la activación de c-Fos en el NA y el despliegue de comportamiento parental en hembras de ratón, sino más bien estuvo asociada con una activación no específica provocada sólo por la presencia de crías (Alsina-Llanes & Olazábal, 2020a). Estos resultados además, coinciden con trabajos previos, en el que el NA se ha asociado más al procesamiento de las crías como estímulos novedosos, tanto en animales parentales como no parentales e incluso animales infanticidas (Alsina-Llanes & Olazábal, 2020a; Olazábal & Morrell, 2005).

El NA por su parte, se subdivide en dos subdivisiones, el core y shell (Heimer, et al., 1991; Záborszky et al., 1985). El patrón distinto de aferencias y eferencias en el core y shell sugieren que estas dos subregiones pueden mediar diferentes procesos comportamentales (Heimer, et al., 1991; Záborszky et al., 1985). Se relaciona al core

más con la función de orientación motora, mientras que al shell se lo asocia a la integración mesolímbica la cual modificaría a su vez la actividad motora a través de la interacción con la CPFm (Salamone, 1992). Como ya mencionamos, las hembras de ratón son capaces mostrar comportamiento parental rápidamente (Alsina-Llanes et al., 2015). Por tanto, los animales motivados a cuidar a las crías, procesan la información olfativa, auditiva, táctil y visual crítica y ésta es enviada a los núcleos de la amígdala y de allí quizás al NA y la CPFm (Ko, 2017; Olazábal et al., 2013a). En este sentido, es probable que en la CPFm se produzca de forma inmediata la integración sensorial y límbica necesaria para traducir esos estímulos en un estado motivacional, y así favorecer la toma de decisiones, planificación y/o coordinación de los componentes conductuales que permiten ejecutar una acción motora como puede ser el acarreo de las crías. A continuación, la CPFm mediante sus proyecciones y control descendente en áreas subcorticales como el NA, podría acelerar el rápido establecimiento del comportamiento parental (Bacon et al., 1996; Gabbott et al., 2005; Groenewegen & Uylings, 2000; Gutman et al., 2012; Muroi & Ishii, 2019; Nephew et al., 2009; Takahashi et al., 2014).

Una observación adicional es que las lesiones de la CPFm afectaron el acarreo y demás componentes de la conducta maternal, pero no al lamido. Mientras que las lesiones del NA sólo afectaron la frecuencia de lamido y el nido. En este sentido, nosotros (Alsina-Llanes et al., 2015) y otros autores (Gandelman, 1973; Ostermeyer & Elwood, 1983) hemos encontrado que los déficits motivacionales en la conducta maternal están relacionados más con el acarreo que con el lamido. Asimismo, en estudios previos (y en el primer capítulo de esta tesis) discutimos y mostramos que, en individuos inexperimentados, el lamido no es un buen predictor de los animales parentales (Alsina-Llanes et al., 2015). Además, la duración total del lamido no fue diferente en los dos grupos. En cuanto al nido, si bien las comparaciones en duración y frecuencia no mostraron diferencias significativas, sí encontramos una reducción en el porcentaje de hembras con lesiones del NA que construyeron nido en presencia de las crías. Quizás las lesiones favorecieron comportamientos pasivos sobre los activos. Si bien el acarreo no fue diferente, la construcción de nido es un comportamiento activo que podría haber sido afectado por estas lesiones, mientras que la postura de amamantamiento (conducta pasiva) no fue afectada. Los animales lesionados pueden haber tendido a adoptar preferentemente postura de amamantamiento, en lugar de construir un nido.

Por tanto, las lesiones de la CPFm y del NA, afectan diferencialmente al rápido proceso de establecimiento maternal en las hembras de ratón, teniendo la CPFm, pero no el NA, un rol esencial en dicho proceso.

Efectos de las lesiones neurotóxicas sobre el infanticidio

En el caso de los machos, esta tesis muestra que la respuesta infanticida, no estaría asociada a la CPFm ya que lesiones de ésta área no afectaron al comportamiento infanticida. Por tanto, el infanticidio sería una respuesta conductual probablemente más impulsiva, que requeriría menor planificación y/o coordinación cortical. Sin embargo, el NA estaría asociado a la respuesta infanticida y/o el procesamiento de las crías en los machos, dado a que lesiones de esta área indujeron un retraso del ataque a las crías en los machos infanticidas, sugiriendo que el NA jugaría un papel importante en los procesos de integración que determinan el ataque en los machos de ratón, y probablemente la saliencia aversiva del estímulo.

Existe mucha evidencia sobre las bases neurales de la conducta parental en diferentes especies y contextos reproductivos (Numan & Insel, 2003; Olazábal et al., 2013a). Sin embargo, mucho menos se sabe acerca de las bases neurales de la respuesta infanticida. En conjunto, la bibliografía sugiere que la conducta infanticida está regulada principalmente a nivel subcortical (Tachikawa et al., 2013; Tsuneoka et al., 2015).

El infanticidio, es generalmente considerado una respuesta agresiva, sin embargo, no está claro aún si las bases neurales del infanticidio y la agresión son las mismas. La agresión por su parte es una conducta social compleja que se expresa en el contexto de la defensa u obtención de recursos (Ferris et al., 2008; Nelson & Trainor, 2007). Sin embargo, los neonatos no representarían una real amenaza para los individuos. El circuito neural de la agresión en roedores recae principalmente sobre varias áreas subcorticales como el sistema olfativo, la amígdala y áreas hipotalámicas (Ferris et al., 2008; Gammie & Nelson, 2001; Ko, 2017; Nelson & Trainor, 2007), pero también sobre algunas áreas corticales (Muroi & Ishii, 2019; Takahashi et al., 2014). En humanos, por su parte, se proponen dos componentes de la agresión, uno más reactivo-impulsivo y otro más controlado e instrumentado (Nelson & Trainor, 2007). Este último está representado por comportamientos orientados hacia un objetivo que estarían regulados por sistemas corticales superiores (Nelson & Trainor, 2007). Interesantemente, algunos autores encontraron que la CPFm se activaba (muestra mayor expresión de c-Fos) durante encuentros agresivos en ratas y ratones (Halasz et al., 2006; Haller et al., 2006; Muroi & Ishii, 2019). En este sentido, nosotros no encontramos en el capítulo anterior ninguna asociación entre el infanticidio y la expresión de c-Fos en la CPFm (Alsina-Llanes & Olazábal, 2020). Asimismo, en el estudio actual, tampoco encontramos ningún cambio en el comportamiento infanticida luego de lesionar a la CPFm.

Por otra parte, esta tesis muestra también que en los machos la respuesta infanticida y/o el procesamiento de las crías estaría asociada al NA. El hecho del que el NA reciba información tanto de las estructuras límbicas, críticas para procesamiento afectivo, así como estructuras implicadas en la coordinación motora, le permite integrar estos procesos frente, tanto a estímulos apetitivos como aversivos (Berridge, 2009; Heimer, et al., 1991; Reynolds & Berridge, 2008; Robbins & Everitt, 1996; Robinson et al., 2011; Salamone, 1992; Záborszky et al., 1985). Se propone que el NA sería una interface entre el sistema límbico y el sistema motor (Mogenson et al., 1980). Es interesante destacar que el valor asignado (atractivo o aversivo) a las crías en la respuesta infanticida no está del todo claro aún. Todos los machos del grupo control que atacaron a las crías, lo hicieron dentro de los primeros 3 min de exposición. Sin embargo, los machos lesionados tuvieron latencias mayores de ataque e incluso de aproximación a las crías. Por ejemplo, uno de los machos lesionados no se acercó a las crías durante los primeros 15 min de exposición, siendo infanticida en la segunda exposición luego de ~6 min. Por lo tanto, estos resultados sugieren que el infanticidio podría representar una respuesta comportamental la cual requeriría una rápida integración motivacional-motora, en la que la salida del NA, o al menos de alguna subpoblación de neuronas, desencadenaría el ataque en los machos. La respuesta infanticida entonces, puede ser una respuesta conductual impulsiva que no requeriría una participación significativa de la CPFm, pero aparentemente sí del NA.

La impulsividad, por su parte, es un fenómeno que ha resultado difícil de definir, parte por su complejidad y parte porque tiene un amplio rango de connotaciones (Basar et al., 2010). El circuito que subyace a la impulsividad, está representado por proyecciones paralelas desde la corteza prefrontal hasta el estriado ventral (incluido el NAc), el tálamo y nuevamente a la corteza (Basar et al., 2010). Estudios de lesiones en ratas principalmente, proponen un rol diferencial del shell y core en las distintas fases o componentes de la impulsividad (Basar et al., 2010; Galtress & Kirkpatrick, 2010). Por tanto, creemos que quizás el NA esté más activo y/o "desconectado" de la CPFm en los animales infanticidas. Por lo tanto, el infanticidio sería consecuencia de un rápido procesamiento neural en el cual la información olfativa es transmitida a la amígdala y al NA, y también otras áreas límbicas como núcleos del BNST, hipotálamo lateral, y subregiones del VMH, desencadenando rápidamente el ataque. Es interesante notar que, en algunas circunstancias, se ha observado que machos y hembras de varias especies pueden matar a una o dos crías, pero luego cuidar al resto de la camada (observaciones no publicadas de los autores y diversos estudios en hámster, Lévy & Keller, 2009; Richards, 1966). Ese comportamiento aparentemente paradójico podría ser el resultado de una respuesta conductual inicial impulsiva menos controlada que

bloquea el complejo procesamiento cortical requerido para mostrar el comportamiento parental, y un cambio posterior (luego de unos minutos) de ese ataque impulsivo al despliegue de una conducta más compleja y regulada corticalmente como el comportamiento parental.

Cabe mencionar que la extensión de la lesión en la CPFm, indujo lesiones de mayor tamaño en comparación a las inducidas por la misma cantidad de NMDA en hembras. Estas diferencias podrían deberse a diferencias sexuales en la sensibilidad del tejido a la neurotoxina NMDA. En este sentido, varios estudios sugieren que el perfil hormonal en las hembras podría tener un efecto protector (Simpkins et al., 2012), algo que ha sido particularmente evidenciado para las lesiones excitotóxicas en la corteza (Mendelowitsch et al., 2001; Smith, et al., 1999). Asimismo, el tiempo entre la cirugía y el sacrificio de los animales pos-test comportamental, también fue diferentes entre machos (2 días) y hembras sensibilizadas (4 días), algo que podría haber alterado el proceso de recuperación del tejido lesionado. A pesar de sufrir una mayor lesión, los machos no sufrieron ningún déficit comportamental. Sin embargo, esto no se observó en el NA, área en la cual las lesiones fueron similares o mayores en las hembras. En este caso, los machos mostraron mayor déficit, incluso cuando el tamaño de la lesión fue menor.

Efectos de las lesiones neurotóxicas sobre la ansiedad

En la primera parte del presente capítulo, encontramos que todos los grupos de animales (hembras y machos) que recibieron inyecciones de NMDA en la CPFm, mostraron una reducción en la exploración del área central en el test de open field, lo cual sugiere un aumento en la ansiedad o aversión a la novedad en ambos sexos. Estudios previos en ratas han encontrado una reducción en el tiempo de permanencia en el área central de un campo abierto después de lesiones de la PL o IL (Jinks & McGregor, 1997). De acuerdo con nuestros resultados, lesiones de la CPFm por aspiración en ratones también aumentaron la ansiedad, pero en dicho caso reduciendo la distancia recorrida en campo abierto (McAllister et al., 2015). Además, Pati y cols. (2018) encontraron que la activación farmacogenética de las neuronas excitadoras de la CPFm reducían los comportamientos del tipo ansiosos en ratones. En contraste, Deacon y cols (2003), mostraron una reducción de la ansiedad en el plus maze y en open field, luego de lesiones excitotóxicas de la CPFm en hembras de ratón. Es importante mencionar que, a diferencia de las ratas, las hembras de ratón normalmente no muestran respuesta de evitación hacia las crías o de tipo ansiosa cuando se exponen a las crías por primera vez. Entonces, si las lesiones de las CPFm aumentan la ansiedad

o la aversión a la novedad, es esperable que el inicio del comportamiento maternal se retrase. No obstante, el aumento de la ansiedad o el miedo a explorar la novedad no afectó el comportamiento infanticida en los machos. Una mayor ansiedad podría aumentar la agresividad en los machos, pero el miedo a explorar nuevos estímulos debería retrasar el ataque en los machos. Sin embargo, la latencia a atacar a las crías no se vio alternada en términos de aceleración o retraso, lo que apoya la hipótesis de que la respuesta infanticida es un comportamiento impulsivo con un control mínimo de la CPFm.

En el segundo set de experimentos, cuando analizamos los efectos de lesionar el NA sobre la ansiedad, la actividad locomotora y exploratoria en hembras y machos en el test de open field, no encontramos ninguna diferencia. Estudios en ratas, han reportado que las lesiones excitotóxicas del NA inducen un aumento de la actividad locomotora en el test de open field (Burns et al., 1996; Jongen-Rêlo et al., 2002; Maldonado-Irizarry & Kelley, 1995). Sin embargo, de acuerdo con nuestro estudio, otros autores utilizando dos cepas (C57BL/6 y DBA/2) de ratón, tampoco encontraron diferencias en la actividad locomotora y exploratoria en un test de open field con objetos novedosos (Rouillet et al., 1997).

Por tanto, las lesiones neurotóxicas de la CPFm y el NA tuvieron el efecto diferencial sobre la ansiedad y actividad locomotora en hembras y machos de ratón. Estos resultados sugieren que el retraso del establecimiento de la conducta maternal en el grupo de hembras con lesiones de la CPFm puede deberse en parte, a un aumento de la ansiedad.

ANEXO CAPITULO III

Diseño experimental

Se utilizaron 16 hembras ciclantes adultas inexperimentadas las cuáles fueron asignadas a los siguientes grupos: a) inyección de 2,5 µg de NMDA (ácido N-metil-D-aspartico, Sigma-Aldrich) en el NA (n=10) o inyección de vehículo (PBS) en el NA (n=6).

Además, utilizamos 11 machos adultos (60-100 días de edad) inexperimentados a los cuales se les inyectó 2,5 µg de NMDA en el NA (n=5) o vehículo en el NA (n=6).

Cirugía estereotáxica

El día de la cirugía, los animales fueron anestesiados con una mezcla de Ketamina/Xilacina (100/20 mg/kg i.p.) y se colocaron en un estereotáxico para la inyección de la neurotoxina NMDA o PBS (25mM). Los animales recibieron inyecciones bilaterales de 2,5 µg de NMDA disuelto en 0,1 µl de PBS o 0,1 µl de PBS. Las soluciones fueron inyectadas con una jeringa Hamilton de 1 µl a una velocidad de 0,1 µl/min. Las coordenadas, tomadas del atlas de cerebro de ratón Franklin y Paxinos (2008), fueron las siguientes: AP 1,7 mm; L 0,8 mm; DV 4,8 mm.

Luego de la cirugía, los animales fueron individualmente alojados en una caja limpia (27 x 21 x 14 cm, 370 cm² de área) y se les permitió recuperarse durante 3-5 días hasta el día del test comportamentales.

Test comportamentales

El despliegue de comportamiento parental o infanticida en hembras y machos respectivamente fue determinado a partir de un test comportamental durante 15 min. Los animales fueron expuestos a dos crías recién nacidas (de 1-3 días de edad) por primera vez (provenientes de madres donadoras) las cuales fueron colocadas en la caja en el lado opuesto adónde el animal tenía el nido y se encuentre al momento de abrirla.

Se registró detalladamente todos los parámetros comportamentales del repertorio de la conducta parental utilizando el programa Stopwatch <http://www.cbn-atl.org/research/stopwatch.shtml>. La categorización conductual de los animales fue de acuerdo con criterios previamente establecido por nosotros (Alsina-Llanes et al., 2015; Olazábal & Alsina-Llanes, 2016). El criterio de inclusión para considerar un animal completamente parental (PC) consiste 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 parentales incompletos (PI) fueron aquellos

que solo desplegaron 2 de las conductas mencionadas anteriormente, los no parentales (NP) fueron aquellos que sólo realicen 1 o ninguna de las conductas, e infanticida (I) aquellos que atacaron a las crías. En caso de ataque, el test fue inmediatamente interrumpido y las crías fueron sacrificadas inmediatamente de modo de evitar su sufrimiento.

En la tarde del mismo día, se evaluó la actividad locomotora y el comportamiento exploratorio mediante tests de open field de modo de identificar comportamientos no específicos efecto inducido por la lesión. Luego de 5 min de habituación al open field, se registró durante 10 min: número de rearings, número de cruces centrales y periféricos, tiempo de inmovilidad, tiempo en la zona central y tiempo de realización del autogrooming.

En los tres días siguientes, las hembras que no fueron completamente parentales, fueron expuestas dos veces diarias a 2 crías durante 60 min de modo de evaluar la capacidad de ser sensibilizados a mostrar comportamiento parental.

Análisis histológico

Una vez finalizados todos los protocolos comportamentales, los animales fueron profundamente anestesiados con una mezcla de Ketamina/Xilacina (100/20 mg/Kg) y perfundidos intracardialmente con 50 ml de PBS (25 mM, pH= 7.4) y 100 ml de paraformaldehído en PBS al 4%. Los cerebros fueron extraídos, almacenados en paraformaldheído durante 24hr y posteriormente transferidos a sacarosa (15%) durante 24-48 hrs.

Los cerebros fueron congelados y seccionados utilizando un criostato. Se realizaron 3 series de secciones de 30 μ m del NA, estas fueron montadas y se realizó la tinción con la Técnica de Nissl (violeta de cresilo) e inmunohistoquímica para NeuN para el posterior análisis de la localización y extensión de lesión.

Análisis estadístico

Los datos comportamentales fueron analizados usando el paquete estadístico IBM SPSS statistics 22. Los datos fueron chequeados para la normalidad (Shapiro-Wilk test) y homogeneidad de varianza (Levene's test) y analizados usando t-test. El test de Chi-cuadrado fue utilizado para analizar la frecuencia de los comportamientos entre los grupos. Cuando los datos no cumplieron con los requerimientos para usar test paramétricos, se aplicaron test no-paramétricos (Man-Whitney). La significancia estadística se establecerá en $p < 0.05$.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

A partir de los experimentos realizados en la presente tesis podemos concluir que:

i. En el ratón CB57/Bl6, los padres son capaces de mostrar comportamiento paternal hacia sus propias crías y también hacia crías ajenas, sin interferir con la conducta maternal.

ii. La contribución de la conducta paternal en el ratón, una especie no considerada biparental, está representada por una reducción del tiempo que las crías permanecen solas en el nido, lo que beneficiaría a las crías en términos de termorregulación, contacto físico y por tanto en el desarrollo de las mismas.

iii. Los machos juveniles que provienen de un contexto de camada superpuesta, no son inducidos a mostrar comportamiento parental, lo que sugiere que estarían adaptados a dispersarse del nido sin contribuir en el cuidado de sus hermanos.

iv. La respuesta comportamental parental inmediata en hembras inexperimentadas se asocia a una mayor expresión de c-Fos en la PL durante los primeros minutos (15 min) de exposición a las crías.

v. No encontramos una expresión diferencial y específica de c-Fos en el MPOA, un área clásicamente asociada a la conducta parental. La ausencia de resultados en el MPOA podrían deberse a que el tiempo empleado (60 min) entre el inicio de la exposición y la perfusión no fue suficiente para detectar las diferencias en esta área. Por tanto, nuestros resultados sugieren que el inicio de la conducta parental, recae sobre la corteza prefrontal, donde se seleccionaría la respuesta comportamental a desplegar, mientras que el MPOA mostraría una activación o expresión de c-Fos más tardía.

vi. El NA, VMH y la amígdala mostraron una activación (mayor expresión de c-Fos) inespecífica en la conducta parental, no parental e infanticida.

vii. No encontramos ninguna asociación específica entre la respuesta infanticida y la expresión de c-Fos.

viii. La CPFm, pero no el NA, es fundamental para que las hembras de ratón muestren comportamiento maternal rápidamente.

ix. La respuesta infanticida sería una acción más impulsiva que requeriría menos control cortical y recaería más en áreas subcorticales como la salida del NA.

x. El efecto diferencial de las lesiones en la CPFm y el NA sobre el comportamiento maternal e infanticida, sugiere que estos dos comportamientos son controlados de manera diferente por estas regiones cerebrales, posiblemente cambiando su interacción y conexión durante el procesamiento de las crías en machos y hembras.

Esta tesis constituye una primera aproximación en la determinación de las bases neurales que subyacen a dos respuestas adaptativas diferentes como son la conducta maternal e infanticida en ratones inexperimentados.

Nuestros hallazgos sugieren que la CPFm aceleraría el inicio del comportamiento maternal promoviendo la flexibilidad comportamental, planificación y/o coordinación de una respuesta adaptativa frente a un estímulo novedoso, como las crías, o quizás reduciendo la ansiedad. Sin embargo, la CPFm no sería necesaria para la respuesta infanticida que, por ser una respuesta comportamental más impulsiva, requeriría menor control cortical y estaría controlada por regiones subcorticales como el NA. Creemos que el NA forma parte del circuito donde se integraría la información sensoriomotora que determina rápidamente la salida comportamental infanticida. Sería necesaria la entrada desde la CPFm para disminuir la impulsividad, agresión y/o ansiedad, lo que en conjunto inhibirían el infanticidio y facilitarían la respuesta parental. Por tanto, es probable que durante la respuesta maternal la CPFm y el NA estén más “conectados” mientras que en la respuesta infanticida, estas regiones estén “desconectadas”. A continuación se exponen las diferentes líneas de trabajo que surgen como perspectivas a nuestra hipótesis actual.

En una primera instancia, nos proponemos realizar los estudios que estaban programados para este año como parte de una pasantía, que por causa de del COVID-19 tuvo que ser postergada. En dicho estudio proponemos utilizar resonancia magnética funcional (fMRI), una técnica no invasiva que tiene una alta resolución tanto temporal como espacial. Este abordaje nos permitirá tanto aportar más evidencias sobre las áreas cerebrales implicadas en el procesamiento neural inmediato de las crías en tiempo real, en animales parentales, no parentales o infanticidas, así como corroborar los resultados obtenido hasta el momento, pero con una resolución temporal más precisa. Además, considerando que la motivación de cuidar a las crías debe preceder al acto motor que lo ejecuta, junto con el hecho de que los animales permanecen restringidos en el resonador, nos proponemos determinar la activación de la CPFm (y otras áreas de interés) en hembras maternas vs. no maternas o machos infanticidas vs. no

parentales utilizando fMRI. Hipotetizamos que cuando los animales son expuestos a crías en condiciones de restricción motora, el animal parental presentará un patrón de activación de la CPFm específica a la planificación y motivación parental, pudiéndose anticipar dicha conducta con alta probabilidad. Este diseño nos permitirá disecar el componente motivacional anticipatorio del comportamiento (cuidarlas/atacarlas), del de la ejecución del acto motor, así como anticipar el comportamiento más probable a partir del conocer previamente el patrón de activación neural con fMRI.

Por otra parte, existe mucha evidencia de que el sistema serotoninérgico inerva a la CPFm y es fundamental en la modulación de procesos emocionales/cognitivos, como la respuesta a la novedad, ansiedad, agresividad y control de la impulsividad (Celada et al., 2013; Clarke et al., 2004), particularmente a través de los receptores del tipo 1A (5-HT1A). En una segunda instancia, nos proponemos determinar si lesiones de las aferencias serotoninérgicas a la CPFm aumentan la ansiedad, agresividad y la respuesta a la novedad retrasando la conducta parental y facilitando el infanticidio. Asimismo, utilizando un abordaje farmacológico, nos proponemos determinar si el bloqueo (con antagonistas) de los receptores 5-HT1A retrasan el inicio de la conducta maternal y estimulan el infanticidio; o si su estimulación (con agonistas) aceleran la conducta maternal en las hembras, mientras inhiben la respuesta infanticida en machos.

Finalmente, planeamos registrar los potenciales de campo locales simultáneamente en ambas regiones, para determinar si la conectividad y sincronía entre la CPFm y el NA es mayor en los ratones que muestran conducta parental en comparación a los no parentales o infanticidas.

BIBLIOGRAFÍA

Afonso, V.M., Sison, M., Lovic, V., Fleming, A.S. (2007). Medial prefrontal cortex lesions in the female rat affect sexual and maternal behavior and their sequential organization. *Behavioral Neuroscience*, 121, 515-526.

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.E. (2015). Development and expression of maternal behavior in naïve female C57BL/6 mice. *Developmental Psychobiology*, 57, 189-200.

Alsina-Llanes, M., Olazábal, D.E. (2018). Do sires and juvenile male mice (C57BL/6) contribute to the rearing of the offspring? *Acta ethologica*, 21, 185-193.

Alsina-Llanes, M., Olazábal, D.E. (2020a). Prefrontal cortex is associated with the rapid onset of parental behavior in inexperienced adult mice (C57BL/6). *Behavioural Brain Research*, 385, 112556.

Alsina-Llanes, M., Olazábal, D.E. (2020b). NMDA-lesions in the prefrontal cortex delays the onset of maternal, but not infanticidal behavior in pup-naïve adult mice (C57BL/6). *Behavioral neuroscience*.

Bacon, S.J., Headlam, A. J., Gabbott, P.L., Smith, A.D. (1996). Amygdala input to medial prefrontal cortex (mPFC) in the rat: a light and electron microscope study. *Brain Research*, 720, 211-219.

Bales, K.L., Saltzman, W. (2016). Fathering in rodents: Neurobiological substrates and consequences for offspring. *Hormones and Behavior*, 77, 249-59.

Basar, K., Sesia, T., Groenewegen, H., Steinbusch, H.W.M., Visser-Vandewalle, V., Temel, Y. (2010). Nucleus accumbens and impulsivity. *Progress in Neurobiology*, 92, 533-557.

Berridge, K.C. (2009). 'Liking' and 'wanting' food rewards: brain substrates and roles in eating disorders. *Physiology & Behavior*, 97, 537-550.

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, 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.

Burns, L.H., Annett, L., Kelley, A.E., Everitt, B.J., Robbins, T.W. (1996). Effects of lesions to amygdala, ventral subiculum, medial prefrontal cortex, and nucleus accumbens on the reaction to novelty: implication for limbic-striatal interactions. Behavioral Neuroscience, 110 (1), 60-73.

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.

Cantoni, D., Brown, R.E. (1997). Paternal investment and reproductive success in the California mouse, *Peromyscus californicus*. Animal Behavior, 54, 377-386.

Celada, P., Puig, M.V., Artigas, F. (2013). Serotonin modulation of cortical neurons and networks. Frontiers in integrative neuroscience, 7, 25.

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.

Cheetham, S.A., Thom, M.D., Jury, F., Ollier, W.E.R., Beynon, R.J., Hurst, J.L. (2007). The genetic basis of individual recognition signals in the mouse. Current Biology, 17, 1771-1777.

Cholvin, T., Giorgi, L., Baril, N., Brezun, J.M., Poucet, B., Chaillan, F.A. (2018). Using MRI to predict the fate of excitotoxic lesions in rats. PloS One, 13(7): e0200659.

Corodimas, K.P., Rosenblatt, J.S., Canfield, M.E., Morrell, J.I. (1993). Neurons in the lateral subdivision of the habenular complex mediate the hormonal onset of maternal behavior in rats. Behavioral Neuroscience, 107, 827-843.

Clarke, H.F., Dalley, J.W., Crofts, H.S., Robbins, T.W., Roberts, A.C. (2004). Cognitive inflexibility after prefrontal serotonin depletion. Science, 304 878-880.

Cullinan, W.E., Herman, J.P., Battaglia, D.F., Akil, H., Watson, S.J. (1995). Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. Neuroscience, 64, 477-505.

Deacon, R.M., Penny, C., Rawlins, J.N. (2003). Effects of medial prefrontal cortex cytotoxic lesions in mice. Behavioural Brain Research, 139, 139-155.

Dewsbury, D. A. (1985). Paternal Behavior in Rodents. American Zoologist, 25, 3, 841-852.

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.

De Jong, T.R., Measor, K.R., Chauke, M., Harris, B.N., Saltzman, W. (2010). Brief pup exposure induces Fos expression in the lateral habenula and serotonergic caudal

dorsal raphe nucleus of paternally experienced male California mice (*Peromyscus californicus*). *Neuroscience*, 169, 1094-104.

Elwood, R.W. (1985). Inhibition of infanticide and onset of paternal care in male mice (*Mus musculus*). *Journal of Comparative Psychology*, 99(4), 457-467.

Elwood, R. W. (1986). What Makes Male Mice Paternal? *Behavioral & Neural Biology*, 46, 54-63.

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. (2012). Firing patterns of maternal rat prelimbic neurons during spontaneous contact with pups. *Brain Research Bulletin*, 88, 534-542.

Febo, M., Felix-Ortiz, A.C., Johnson, T.R. (2010). Inactivation or inhibition of neuronal activity in the medial prefrontal cortex largely reduces pup retrieval and grouping in maternal rats. *Brain Research*, 1325, 77-88.

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 and Behavior*, 54(2), 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.

Ferris, C.F., Stolberg, T., Kulkarni, P., Murugavel, M., Blanchard, R., Blanchard, D.C., Febo, M., Brevard, M., Simon, N.G. (2008). Imaging the neural circuitry and chemical control of aggressive motivation. *BMC Neuroscience*, 9, 111.

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 and Behavior*, 25, 731-743.

Frankling, K.B.J, Paxinos, G. (2008). *The mouse brain*, 3th edition.

Gabbott P.L., Warner, T. A., Jays, P. R., Salway, P., Busby, S. J. (2005). Prefrontal cortex in the rat: projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. *The Journal of Comparative Neurology*, 492, 145-77.

Galtress, T., Kirkpatrick, K. (2010). The role of the nucleus accumbens core in impulsive choice, timing, and reward processing. *Behavioral Neuroscience*, 124 (1), 26-43.

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

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

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

Gandelman, R., Paschke, R.E., Zarrow, M. X., Denenberg, V.H. (1970). Care of young under communal conditions in the mouse (*Mus musculus*). *Developmental Psychobiology*, 3(4), 245-250.

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

Gerlach, G. (1990). Dispersal mechanisms in a captive wild house mouse population (*Mus domesticus* Ruddy). *Biological Journal of the Linnean Society*, 41, 271-277.

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.

Granon, S., Changeux, J.P. (2012). Deciding between conflicting motivations: what mice make of their prefrontal cortex. *Behavioural Brain Research*, 229, 419-26.

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(3), 225-231.

Groenewegen, H.J., Uylings, H.B.M. (2000). The prefrontal cortex and the integration of sensory, limbic and autonomic information. *Progress Brain Research*, 126, 3-28.

Gryksa, K., Mittmann, L., Bauer, A., Peterlik, D., Flor, P.J., Uschold-Schmidt, N., Bosch, O.J. (2019). Metabotropic glutamate receptor subtype 7 controls maternal care, maternal motivation and maternal aggression in mice. *Genes Brain and Behavior*, 19(1), e12627.

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

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., Alberts, J.R. (1987). The Biparental Care System of the California Mouse, *Peromyscus californicus*. *Journal of Comparative Psychology*, 101, 169-177.

Gutman, D.A., Keifer, O.P., Magnuson, M.E., Choi, D.C., Majeed, W., Keilholz, S., Ressler, K.J. (2012). A DTI tractography analysis of infralimbic and prelimbic connectivity in the mouse using high-throughput MRI. *NeuroImage*, 63, 800-811.

Halasz, J., Toth, M., Kallo, I., Liposits, Z., Haller J. (2006). The activation of prefrontal cortical neurons in aggression - A double labeling study. *Behavioural Brain Research*, 175, 166-175.

Haller, J., Tóth, M., Halasz, J., De Boer, S.F. (2006). Patterns of violent aggression-induced brain c-fos expression in male mice selected for aggressiveness. *Physiology & Behavior*, 88, 173-182.

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.

Horrell, N.D., Perea-Rodriguez, J.P., Harris, B.N., Saltzman, W. Effects of repeated pup exposure on behavioral, neural, and adrenocortical responses to pups in male California mice (*Peromyscus californicus*). *Hormones and Behavior*, 90, 56-63.

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.

Jinks, A.L., McGregor, I.S. (1997). Modulation of anxiety-related behaviours following lesions of the prelimbic or infralimbic cortex in the rat. *Brain Research*, 772, 181-90.

Jongen-Rêlo, A.L., Kaufmann, S., Feldon, J. (2002). A differential involvement of the shell and core subterritories of the nucleus accumbens of rats in attentional processes. *Neuroscience*, 111, 95-109.

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 immunoreactivity reveals forebrain neuronal populations involved differentially in pup-mediated maternal behavior in juvenile and adult rats. *Journal of Comparative Neurology*, 416(1), 45-78.

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 and Behavior*, 67, 659-669.

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.

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.

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 & Cellular Neuroscience*, 36, 121-131.

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 and Biological Psychiatry*, 35, 1205-1231.

Ko, J. (2017). Neuroanatomical Substrates of Rodent Social Behavior: The medial prefrontal cortex and its projection patterns. *Frontiers in Neural Circuits*, 11, 41.

- Labov, J.B. (1980). Factors influencing infanticidal behavior in wild male house mice (*Mus musculus*). *Behavioral Ecology & Sociobiology*, 6, 297-303.
- Leblond, C.P. (1938). Extra hormonal factors in maternal behavior. *Proceeding 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 and Behavior*, 92, 617-628.
- 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. *Behavioural Brain Research*, 10, 15-31.
- 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, 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.
- Lovic, V., Palombo, D.J., Fleming A.S. (2011). Impulsive rats are less maternal. *Developmental Psychobiology*, 53(1):13-22.
- 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*.
- Maldonado-Irizarry, C.S., Kelley, A.E. (1995). Excitotoxic lesions of the core and shell subregions of the nucleus accumbens differentially disrupt body weight regulation and motor activity in rat. *Brain Research Bulletin*, 38, 551-559.
- Marques, D.M. (1979). Roles of the main olfactory and vomeronasal systems in the response of the female hamster to young. *Behavioral and Neural Biology*, 26, 311-29.

- Matsumoto, F., Kimura, T. (1995). 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.
- McAllister, B.B., Spanswick, S.C., Patel, P.P., Barneto, A.A., Dyck R.H. (2015). The effects of chronic fluoxetine treatment following injury of medial frontal cortex in mice. *Behavioural Brain Research*, 290, 102-216.
- McCarthy, M.M. (2010). Father and child reunion. *Nature Neuroscience*, 13(6), 652-653.
- 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(3), 279-290.
- Mendelowitsch, A., Ritz, M.F., Ros, J., Langemann, H., Gratzl, O. (2001). 17beta-Estradiol reduces cortical lesion size in the glutamate excitotoxicity model by enhancing extracellular lactate: a new neuroprotective pathway. *Brain Research*, 901(1-2):230-6.
- 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.
- 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.
- Muroi, Y., Ishii, T. (2019). Glutamatergic signals in the dorsal raphe nucleus regulate maternal aggression and care in an opposing manner in mice. *Neuroscience*, 400, 33-47.
- Nakamichi, M., Yanada, K. (2009). Distribution of dorsal carriage among simians. *Primates*, 50, 153-168.
- Nelson, R.J., Trainor, B.C. (2007). Neural mechanisms of aggression. *Nature Reviews Neuroscience*, 8, 536-546.
- Nephew, B.C., Caffrey, M.K., Felix-Ortiz, A.C., Ferris, C.F., Febo, M. (2009). Blood oxygen level-dependent signal responses in corticolimbic 'emotions' circuitry of lactating rats facing intruder threat to pups. *The European Journal of Neuroscience*, 30, 934-45.
- Nishitani, S., Kuwamoto, S., Takahira, A., Miyamura, T., Shinohara, K. (2014). Maternal prefrontal cortex activation by newborn infant odors. *Chemical Senses* 39, 195-202.
- Noirot, E. (1969). Serial order of maternal responses in mice. *Animal Behaviour*, 547-550.
- 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. (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., 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. Behavioural Brain Research, 158, 53-68.

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.

Ohrnberger, S.A., Monclús, R., Rödel, H., Valencak, T.G. (2016). Ambient temperature affects postnatal litter size reduction in golden hamsters. Frontiers in Zoology, 13:51.

Olazábal, D.E., Alsina-Llanes, M. (2016). Are age and sex differences in brain oxytocin receptors related to maternal and infanticidal behavior in naïve mice?. Hormones and Behavior, 77, 132-140.

Olazábal, D.E., Kalinichev, M., Morrell, J.I., Rosenblatt, J.S. (2002). MPOA cytotoxic lesions and maternal behavior in the rat: effects of midpubertal lesions on maternal behavior and the role of ovarian hormones in maturation of MPOA control of maternal behavior. Hormones and Behavior, 41, 126-138.

Olazábal, D.E., Morrell, J.I. (2005). Juvenile rats show immature neuronal patterns of c-Fos expression to first pup exposure. Behavioral Neuroscience, 119, 1097-1110.

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 and 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 and 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 and 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, M.C., Elwood, R.W. (1983). Pup recognition in *Mus musculus*: parental discrimination between their own and alien young. Developmental Psychobiology, 16(2), 75-82.

Pati, S., Sood, A., Mukhopadhyay, S., Vaidya, V.A. (2018). Acute pharmacogenetic activation of medial prefrontal cortex excitatory neurons regulates anxiety-like behavior. Journal of Bioscience, 43, 85-95.

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.

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.

Peters, Y.M., O'Donnell, P., Carelli, R.M. (2005). Prefrontal cortical cell firing during maintenance, extinction, and reinstatement of goal-directed behavior for natural reward. *Synapse*, 56, 74-83.

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(1), 23-30.

Putkonen, H., Amon, S., Eronen, M., Klier, C.M., Almiron, M.P., Cederwall, J.Y., Weizmann-Henelius, G. (2011). Gender differences in filicide offense characteristics- A comprehensive register- based study of child murder in two European countries. *Child Abuse and Neglect*, 35(5):319-28.

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

Reynolds, S.M., Berridge, K.C. (2008). Emotional environments retune the valence of appetitive versus fearful functions in nucleus accumbens. *Nature Neuroscience*. 11,423-425.

Richards, M.P.M. (1966). Maternal behaviour in the golden hamster: responsiveness to young in virgin, pregnant, and lactating females. *Animal Behaviour*, 14(2-3), 310-313.

Riga, D., Matos, M.R., Glas, A., Smit, A.B., Spijker, S., Van den Oever, M.C. (2014). Optogenetic dissection of medial prefrontal cortex circuitry. *Frontiers in systems neuroscience*, 8:230.

Riley, L. (2006). Neonaticide: A grounded theory study. *Journal of Human Behavior in the Social Environment*, 12(4):1-42.

Robbins, T. W., Everitt, B. J. (1996). Neurobehavioural mechanisms of reward and motivation. *Current opinion in Neurobiology*, 6, 228-236.

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.

Robinson, D. L., Zitzman, D. L., Williams, S. K. (2011). Mesolimbic dopamine transients in motivated behaviors: focus on maternal behavior. *Frontiers Psychiatry*, 2, 23.

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

- Rougé-Maillart, C., Jousset, N., Gaudin, A., Bouju, B., Penneau, M. (2005). Women who kill their children. *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, 26(4):320-6.
- Roulet, P., Mele, A., Ammassari-Teule, M. (1997). Ibotenic lesions of the nucleus accumbens promote reactivity to spatial novelty in nonreactive DBA mice: implications for neural mechanisms subserving spatial information encoding. *Behavioral Neuroscience*, 111, 976-984.
- Salamone, J.D. (1992). Complex motor and sensorimotor functions of striatal and accumbens dopamine: involvement in instrumental behavior processes. *Psychopharmacology*, 107, 160-174.
- Sheehan, T.P., Cirrito, J., Numan, M.J., Numan, M. (2000). Using c-fos immunocytochemistry 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.
- Simpkins, J.W., Singh, M., Brock, C., Etgen, A.M. (2012). Neuroprotection and Estrogen Receptors. *Neuroendocrinology*, 96(2): 119-130.
- Slotnick, B.M. (1967). Disturbances of maternal behavior in the rat following lesions of the cingulate cortex. *Behaviour*, 29, 204-236.
- 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.
- Smith, M.J., Keel, J.C., Greenberg, B.D., Adams, L.F., Schmidt, P.J., Rubinow, D.A., Wassermann, E.M., (1999). Menstrual cycle effects on cortical excitability. *Neurology*, 53(9):2069-72.
- Song, Z., Tai, F., Yu, C., Wu, R., Zhang, X., Broders, H., He, F., Guo, R. (2010). Sexual or paternal experiences alter alloparental behavior and the central expression of ERalpha and OT in male mandarin voles (*Microtus mandarinus*). *Behavioural Brain Research*, 214, 290-300.
- 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., 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.
- Stolzenberg, D.S., McKenna, J.B., Keough, S., Hancock, R., Numan, M.J., Numan, M. (2007). Dopamine D1 receptor stimulation of the nucleus accumbens or the medial preoptic area promotes the onset of maternal behavior in pregnancy-terminated rats. *Behavioral Neuroscience*. 121 (5), 907–919.
- Stern, J. M., Rogers, L. (1988). Experience with younger siblings facilitates maternal responsiveness in pubertal Norway rats. *Developmental Psychobiology*, 21, 575-89.
- Svare, B., Broida, J. (1982). Genotypic Influences on Infanticide in Mice: Environmental, Situational and Experiential Determinants. *Physiology & Behavior*, 28, 171-175.
- Svare, B., Mann, M. (1981). Infanticide: Genetic, Developmental and Hormonal Influences in Mice. *Physiology & Behavior*, 27, 921-927.

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(12), 5120-5126.

Takahashi, A., Nagayasu, K., Nishitani, N., Kaneko, S., Koide, T. (2014). Control of intermale aggression by medial prefrontal cortex activation in the mouse. *PLoS One*, 9, 4:e94657.

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.

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.

Tsuneoka, Y., Tokita, K., Yoshihara, C., Amano, T., Esposito, G., Huang, A.J., Yu, L.M., Odaka, Y., Shinozuka, K., McHugh, T.J., Kuroda, K.O. (2015). Distinct preoptic-BST nuclei dissociate paternal and infanticidal behavior in mice. *The EMBO Journal*, 34, 2652-70.

Vertes, R.P. (2004). Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse*, 51, 32-58.

Vom Saal, F.S., Howard, L.S. (1982). The Regulation of Infanticide and Parental Behavior: Implications for Reproductive Success in Male Mice. *Science*, 215(4537), 1270-1272.

Waring, A., Perper, T. (1979). Parental behaviour in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). I. Retrieval. *Animal Behaviour*, 27, 1091-1097.

Waring, A., Perper, T. (1980). Parental behaviour in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). II. Parental interactions. *Animal Behaviour*, 28, 331-340.

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(2), 183-192.

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.



Do sires and juvenile male mice (C57BL/6) contribute to the rearing of the offspring?

M Alsina-Llanes¹ · DE Olazábal¹

Received: 25 May 2018 / Revised: 30 July 2018 / Accepted: 20 August 2018
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature and ISPA 2018

Abstract

Copulation and/or cohabitation with a pregnant female facilitate paternal behavior in male mice. However, their contribution to the rearing of the offspring is still not well understood. Our aims were to investigate the behavior of sires toward own or alien pups; the immediate consequences of the presence of fathers on the offspring and the behavior of the mother; and whether the exposure of juvenile males to newborn siblings, in an overlapping litters context, facilitates paternal behavior in C57BL/6 mice. We found that sires behaved paternally toward alien pups at both postpartum days 3 and 7; did not affect the behavior of the mother (e.g., licking and grooming, retrieval behavior, time in the nest, and crouching postures); and reduced the time offspring stayed alone in the nest. The exposure to newborn siblings did not promote paternal behavior in juvenile males. Therefore, sires are more paternal than usually described in the literature for laboratory mice, suggesting a facultative role in the rearing of the offspring. However, juvenile male mice, in contrast to juvenile females, could be adapted to leave the nest earlier without major contribution to the offspring.

Keywords C57BL/6 · Development · Contribution · Paternal · Infanticidal · Recognition · Juveniles · Overlapping litters

Introduction

Males from several species of rodents, including laboratory mice (*Mus musculus*), display parental behavior (i.e., crouching postures, licking and grooming, retrieval, and nest building, Brown 1993; Dewsbury 1985; Elwood 1986; Gubernick et al. 1994; Leblond 1938; Lonstein and De 2000; Noirot 1969; Roberts et al. 1998; Waring and Perper 1979, 1980). However, naïve (no sexual or paternal experience) adult males from most laboratory mouse strains (129S, Balb, C57BL/6, CBA, DBA) are generally described as infanticidal. Recently, we also found that the behavioral response of virgin inexperienced male mice (C57BL/6) exposed to donor pups was mostly infanticidal or non-parental (Olazábal and Alsina-Llanes 2016). However, a few studies have found that a small percentage of inexperienced adult males displayed

paternal behavior immediately after the first exposure to pups (Kennedy and Elwood 1988 in CBA strain; McCarthy and vom Saal 1986 in CF-1 strain; Kuroda et al. 2007 in C57BL/6 strain; Gandelman 1973 in Rockland-Swiss strain).

Several ultimate and proximal mechanisms have been proposed to explain cessation of infanticidal behavior and induction of paternal behavior in the mouse (Cicirello and Wolff 1990; Ebensperger 1998; Wynne-Edwards and Timonin 2007; Bales and Saltzman 2007). The hypothesis of individual recognition proposes a genetic label among individuals (Cheetham et al. 2007). Males would recognize in that way their own pups and inhibit infanticidal behavior. Indeed, several studies found that males laboratory mice would kill alien, but not their pups at the early postpartum period (Brooks and Schwarzkopf 1983; Huck et al. 1982). In our laboratory, we also observed that adding an alien pup to complete a litter, or partially replacing a few own by alien pups at the early postpartum period (postpartum day 0 or 1), induced pup killing in males (unpublished). Others proposed that an association between the odor of pups and the previous sexual partner could also inhibit the attacks (Elwood 1985; Huck et al. 1982; Labov 1980). However, an alternative hypothesis proposed that long-lasting physiological and behavioral changes, not related to recognition, could inhibit infanticidal and promote parental

✉ DE Olazábal
dolazabal@fimed.edu.uy

M Alsina-Llanes
marcelalsina@hotmail.com

¹ Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UdelaR, Av. Gral. Flores 2125, 11800 Montevideo, Uruguay

behavior in males (Brooks and Schwarzkopf 1983; Elwood 1985; Gubernick et al. 1994; Huck et al. 1982; Kennedy and Elwood 1988; Matsumoto and Kimura 1995; Soroker and Terkel 1988; Tachikawa et al. 2013). Several authors suggested that once paternal behavior was established, males could tolerate or/and take care of alien pups (Brooks and Schwarzkopf 1983; Brown 1993; Huck et al. 1982; Labov 1980; Ostermeyer and Elwood 1983; Tachikawa et al. 2013). Additionally, subordination of males to the lactating female has also been proposed as a mechanism to inhibit infanticidal behavior at the early postpartum period. Nevertheless, inhibition of infanticidal behavior is not sufficient to trigger parental behavior. Males must also show paternal motivation and be attracted to pups to become fully parental. Therefore, long-term neural changes must occur in males after copulation, or around female pregnancy/parturition, to motivate paternal behavior, rather than indifference. Generally, *Mus musculus* mice are considered “promiscuous” and “uniparental” species where females would be adapted to rear their offspring without significant paternal investment. However, several studies have found significant paternal contribution to the rearing of the offspring in promiscuous species (Schradin and Pillay, 2003). In the first experiment, we tested the hypothesis that once the behavior was established, male mice behaved paternally toward own or alien pups, did not affect the behavior of the lactating mother, and could eventually contribute to the rearing of the offspring.

Juvenile naïve (no sexual or pup exposure) males from various species can also take care of pups (Gubernick and Laskin 1994; Olazábal and Young 2006; Roberts et al. 1998; Stern and Rogers 1988). For example, some studies showed the occurrence of paternal care in juvenile male mice (Gandelman 1973; Leblond 1938). However, in the study of Leblond (1938), it is unclear if animals were naïve because they mentioned that juveniles required about 4 days of exposure to pups (sensitization) to display parental behavior. Moreover, in the study of Gandelman (1973), the subjects were considered paternal when only one of the behavioral components of parental behavior was observed (retrieval, licking or crouching). Recent results from our laboratory showed that even though most juvenile males did not attack the pups, they mostly ignored them (Olazábal and Alsina-Llanes 2016). Therefore, if naïve juvenile males contribute to the rearing of their newborn siblings before leaving the nest is also still unclear. We previously found that juvenile female mice were more prone to display parental behavior if previously exposed to their parturient mother and newborn siblings for 12–24 h (Alsina-Llanes et al. 2015). In the present study, we tested the hypothesis that cohabitation with their parturient mother and newborn siblings induced parental behavior in weanling males, as it did in weanling females (Alsina-Llanes et al. 2015). Although parental behavior in the context of overlapping litters have been somewhat studied in rats (Harding and

Lonstein 2016; Uriarte et al. 2008), to our knowledge, parental behavior in juvenile male laboratory mice has not been studied in the context of overlapping litters.

In summary, in the present work, we used one of the most common strains of laboratory mice (CB57BL/6) to investigate: first, the contribution of sires to the rearing of the offspring; second, the impact of the presence of sires in the nest on the behavior of the lactating mother (e.g., licking and grooming, retrieval behavior, nest building and time in the nest, crouching postures); third, the behavioral response of those males toward alien pups at postpartum days 3 and 7; fourth, the effect of cohabitation of juvenile males with their pregnant/parturient mothers and newborn siblings on their behavioral response toward pups. We predicted that sires would contribute to the rearing of the offspring (including alien pups), would not negatively affect maternal behavior, and cohabitation of juveniles with their pregnant/parturient mothers and newborn siblings would facilitate the induction of juvenile paternal behavior.

Materials and methods

Subjects

We used C57BL/6 mice originally obtained from Jackson Laboratory and inbred at the animal facility of the Facultad de Medicina (UdelaR, Montevideo, Uruguay). All animals were weaned at age 20–21 days and maintained in same-sex groups of 6–7 individuals per cage. Cages were 45 cm × 25 cm × 15 cm, with transparent Plexiglas walls and wood shaving as bedding. Animals were kept under a 13:11 h light-dark cycle (light on from 6:00 am), at 22 °C, with ad libitum access to food (PMI nutrition international LabDiet®, Shoreview, Minnesota, USA) and water. Cages were regularly changed once a week. All procedures carried out in this study were approved by the local committee of ethics in animal research (CHEA, N° 071140, December 26th, 2011) and followed the recommendations of the “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” of the National Institutes of Health (2011), the “Guidelines for Ethical Conduct in the Care and Use of Animals” (APA, Board of Scientific Affairs, Committee on Animal Research and Ethics, 2012).

Experiment I: Parental behavior during the postpartum period

Thirty-six females were mated with males. Date of birth was registered, and all litters were culled to five pups per dam on postpartum day 1 to reduce variability among groups (Agnish and Keller 1997). In the first group ($n = 17$), males were removed from the cage of the females 5 days after mating. In the second group ($n = 19$), males cohabitated with females from

the first day of mating until postpartum day 24. Lactating females and their partners (if it was present) were tested for parental behavior in their homecage at postpartum days 7 and 14. On each of these days, parental behavior was assessed in two different ways. First, we removed the pups for 5 min and later returned them to the cage to record the behavior of the parents for 15 min. Second, we also recorded the behavior of parents in three 1-h daily behavioral observations without disturbing the cage.

Parental behavior during a 15-min test

On the morning (10:00 a.m.–12:00 a.m.) of the day of the test, the complete litter was taken out of the cage during 5 min and later placed again in the corner of the cage opposite to where parents had their nest. Maternal behavior test was carried out during the light phase because previous studies (also confirmed in our laboratory) showed no difference in the incidence of maternal or non-maternal animals during the light-dark cycle (Kuroda et al. 2011; Lucas et al. 1998). The behavior displayed by the mother and the father was simultaneously recorded during 15 min. We recorded latency to approach to the pups, duration of sniffing, frequency and duration of licking and grooming, nest building, and crouching postures, and frequency of retrieval or pup transport. The male was considered paternal if he retrieved the pups or licked them (≥ 30 s) and crouched over the pups (≥ 30 s). This minimal criterion for parental behavior was chosen considering the presence of the lactating female that might interfere with the performance of the male. Data did not pass normality and homogeneity of variance tests and were analyzed by non-parametric statistics. Data are expressed as median (semi-interquartile range, SIQR). All behavioral observations were recorded using the free software StopWatch <http://www.cbn-atl.org/research/stopwatch.shtml>.

Parental behavior during three 1-h observational sessions

In a different set of animals, we performed behavioral observations during three 60-min sessions at postpartum days 7 and 14 (two different developmental stages of pups). The observations were performed during the light phase (10:00 a.m., 14:00 p.m., 18:00 p.m.). In each session of 60 min, the behavior was scored every 3 min. Therefore, 21 observations were registered during three daily sessions for each animal resulting in a total of 63 instantaneous observations. Data are shown as means \pm SE of the frequency from a total of 63 observations for each animal.

In each session, we registered the behavior displayed by both parents, or just the mother when the male was not present: retrieving or transport of the pups to the nest, licking of the pups (anogenital region or body surface), nest building

(gathering of nest material that consisted of paper towels cut in small pieces), high crouching posture (the mother adopts an arched-back position), flat crouching posture (the mother lies over the pups), supine posture (the female nurse the pups lying on her back), mother/father off (mother/father away [> 10 cm] from the pups), attack (pups are bitten). In addition, we recorded when fathers remained in the nest in contact with the pups but did not display crouching posture or other paternal behaviors.

Experiment II. Male behavioral response toward alien pups at postpartum days 3 and 7 in the presence of their paired lactating female

We used 6 pairs of males and females that cohabitated from mating to postpartum day 3. The dates of delivery were recorded, and all litters were culled to 5 pups on postpartum day 1. On the morning (10:00 a.m.–12:00 p.m.) of postpartum day 3, the complete litter was taken out of the cage. Five minutes later, two alien pups (same age as those removed previously) from donor mothers (paired with a different male) were placed in the corner of the cage opposite to where parents had their nest. The behavior of the father ($n = 6$) and the mother ($n = 6$) was simultaneously recorded during 15 min using the variables described before.

In a second instance, we used 18 pairs of males and females that cohabitated from mating to postpartum day 7. On the morning (10:00 a.m.–12:00 p.m.) of postpartum day 7, nine pairs were tested in their homecages for paternal behavior toward alien pups, as described in the previous paragraph, but in this case, we considered also interesting to compare their paternal behavior with nine pairs tested in the same conditions with their own pups. The litter was taken out of the cage and two of their own pups or alien newborns (same age) taken from a donor lactating female were placed in the cage. The behavior of the parents was simultaneously recorded during 15 min as described above in Exp I.

Experiment III. Behavioral response toward pups by juvenile males from single or overlapping litters

Twelve females were mated with males. Five males remained with females during all the gestational period, and beyond parturition and postpartum estrous (Overlapping litters group, OvL), while the other males ($n = 7$) were removed 7 days after mating (Single litter group, SL). Date of the first delivery was recorded and all litters were culled to five pups per mother.

We used 17 juvenile males that were reared with both parents (father was removed 1–2 days before delivery of second litter) and cohabitated continuously only with their mothers until shortly after (12–24 h) the second litter was born (OvL), and 20 juvenile males from SL. Animals were weaned at 25–30 days, individually housed, and habituated to the cage (27 cm \times 21 cm \times 14 cm, floor area of 370 cm²) during 45–

60 min before testing. After that, two pups (1–3 days of age) were added to the cage and the subject's behavioral response toward the pups recorded during 15 min. Juvenile males from OvL were tested with their sibling pups, while those from SL (no second delivery) with alien pups from donor mothers.

The parental test consisted in placing two newborns and nest material scattered in the side opposite to where the subject was located before opening the cage. We recorded the latency to approach to the pups; duration and frequency of sniffing, licking, grooming, nest building, and crouching postures; and frequency of retrieval or pup transport. In case that the subject attacked the pups, the test was immediately stopped and pups sacrificed. Animals were then included in one of four categories: full parental behavior (FPB) if they displayed all components of parental behavior: pup retrieval, licking (≥ 60 s), and crouching over at least one pup (≥ 30 s); partial parental behavior (PPB) if they showed two of the three main components of parental behavior; non-parental (NP) if they showed only one or none of the main components of parental behavior; infanticidal (I) if they attacked the pups. All behavioral observations were recorded using the free software StopWatch.

Statistical analysis

Behavioral data was analyzed using the statistical package StatView (SAS Institute Inc., Cary, NC). All experimental data was tested for normality (Kolmogorov-Smirnov test) and homogeneity of variance (Bartlett test). In case data did not pass the requirements of normal distribution and homogeneity of variance, they were analyzed by non-parametric Kruskal-Wallis test followed by Mann-Whitney *U* for independent data, or Friedman one-way analysis of variance followed by Wilcoxon's matched-pair test for dependent data. Parametric tests (*T* test) were applied if data passed those criteria. Chi-square test was applied to analyze the frequency of behaviors between groups. Statistical significance level was $p < .05$ (two-tailed). Data are expressed as mean \pm SE if analyzed by parametric tests, or median (SIQR) if analyzed by non-parametric tests.

Results

Experiment I: parental behavior during the postpartum period

Parental behavior during a 15-min test

None of the males attacked their own pups and 66.6 and 16.7% of them reached the criterion for paternal behavior at postpartum days 7 and 14, respectively. Higher percentage of fathers retrieved ($\chi^2 = 4.8$, $p < .05$) and reached the parental

criteria for crouching posture ($\chi^2 = 3.8$, $p < .05$) at postpartum day 7 (33 and 58.3% respectively) than at day 14 (0 and 18.1% respectively). Behavioral data for the 15-min test did not pass the test for normality and were analyzed using non-parametric statistic. At postpartum day 7, the father also adopted crouching posture ($Z = 1.95$, $p = 0.05$) and licked and groomed the pups ($Z = 1.95$, $p = 0.05$) for longer period of time with respect to postpartum day 14 (Table 1). No difference was observed in frequency (2.0(2) vs 3.5(2)) or duration (3.5(3.6) vs 3.25(3.5) s) of sniffing behavior, respectively, for postpartum days 7 and 14. Crouching was always active during this 15-min behavioral test; therefore, no distinction was made between flat and high crouching.

There was no major change in maternal behavior when lactating females were tested in the presence or absence of the father in her homecage, either at postpartum day 7 or 14 (Table 2). The only exception was lower nest building found in lactating females without the father at postpartum day 7 ($U = 20.5$, $p < .05$, Table 2).

Parental behavior during three 1-h observational sessions

Behavioral data for these repeated 1-h observations passed the requirements for normality and homogeneity of variance and were analyzed using parametric tests. No significant differences in paternal behavior were found among the three daily observations (data not shown), or at postpartum day 7 or 14. Therefore, the total frequency of the behavior observed for each animal and day was averaged and used to analyze the data. Sires displayed low frequency of licking (0.3 ± 0.2 ; 1.0 ± 0.4 in a total of 63 observations), high crouching posture (3.4 ± 1.8 ; 1.7 ± 1.4), flat crouching posture (10.7 ± 3.6 ; 11.0 ± 4.0), and nest building (1.0 ± 0.8 ; 0.4 ± 0.3) at postpartum day 7 or 14, respectively. Most high crouching posture in sires occurred when females were away from the nest (92.4% of the time females were off the nest at postpartum day 7, and 83.3% at postpartum day 14), while flat crouching posture was rather similar when the females were in or off the nest (34.7% at postpartum day 7 and 59.7% at postpartum day 14). The frequency that fathers stayed away from the pups (16.1 ± 3.8 ; 14.3 ± 2.4 in a total of 63 observations), or in the nest in contact with them, but not performing any paternal behavioral components (31.9 ± 3.2 ; 35.3 ± 4.4), was not different at postpartum day 7 or 14 respectively.

As in the 15-min test, the presence of the father did not affect the behavior of the mothers at postpartum day 7 or 14 (Fig. 1). Licking and grooming and nest building did not differ between the groups and were almost absent in this test (data not shown). However, mothers stayed off of the nest more often than did their partners at postpartum days 7 ($t = 2.0$, $DF = 12$, $p = 0.05$) and 14 ($t = 2.9$, $DF = 12$, $p < 0.05$). The frequency that pups stayed alone in the nest was lower ($t = 4.6$, $DF = 12$, $p < .05$) when both parents remained in the

Table 1 Exp I: Paternal behavior at postpartum days 7 and 14 in presence of the mother (15 min test)

		Postpartum day (n = 12)	Postpartum day (n = 12)
Percentage	Retrieval	33.3%*	0.0%
Frequency	Licking and grooming bouts	4.0 (2.0)	1.5 (2.0)
	Crouching postures	2.5 (2.5)	.5 (1.3)
	Nest building	5.0 (2.0)	4.0 (2.0)
Time (s)	Licking and grooming	13.4 (17.3)#	2.9 (4.1)
	Crouching postures	27.9 (27.2)#	.9 (12.3)
	Nest building	353.7 (174.9)	259.1 (226.3)

Data are expressed as median (SIQR), Wilcoxon’s matched-pair test

* $p < .05$, # $p = .05$, postpartum day 7 vs. 14

homeage (5.8 ± 2.3) than when only the mother stayed (30.1 ± 5.8) at postpartum day 14, but not at postpartum day 7 (11.2 ± 2.0 , 21.0 ± 6.5 , $p = 0.08$; respectively).

Experiment II. Male behavioral response toward alien pups at postpartum days 3 and 7 in the presence of their paired lactating female

Replacing the litter with two alien pups at postpartum day 3 or 7 did not inhibit paternal behavior (Table 3). None of the males exposed to alien or their own pups attacked them. Paternal behavior was observed in 60.0% (4/6) and 66.7% (6/9) of males exposed to alien pups at postpartum days 3 and 7, respectively. There was no major behavioral difference when the behavior of the fathers toward alien or own pups was compared at postpartum day 7 (no data for day 3). Fathers tested with alien pups only showed shorter latency ($U = 64.5$, $p < .05$) to crouch over them [135.6 (49.6)] than fathers tested with their own pups [561.8 (236.6)]. No difference was found in the behavior of mothers tested with alien or own pups in the presence of the males (data not shown).

Table 2 Exp I: Maternal behavior at postpartum days 7 and 14 in presence or not of the father (15 min test)

		Postpartum day 7		Postpartum day 14	
		♀ + ♂ (n = 12)	♀ (n = 10)	♀ + ♂ (n = 12)	♀ (n = 10)
Percentage	Retrieval	100.0%	100.0%	58.3%	46.2%
Frequency	Licking and grooming bouts	4.0 (3.0)	4.0 (3.0)	4.0 (2.5)	4.0 (1.0)
	Crouching postures	6.5 (2.5)	6.5 (3.5)	3.5 (3.2)	3.0 (1.0)
	Nest building	7.0 (1.3)*	4.5 (1.0)	7.0 (1.7)	5.5 (1.0)
Time (s)	Licking and grooming	20.0 (39.1)	31.8 (23.9)	14.7 (18.7)	13.0 (11.3)
	Crouching postures	116.9 (49.8)	51.0 (78.5)	17.2 (50.0)	16.9 (23.0)
	Nest building	511.4 (72.5)	393.7 (233.8)	356.3 (117.8)	503.7 (86.7)

Data are expressed as median (SIQR), Mann-Whitney U test

* $p < .01$ vs. female without male

Experiment III. Behavioral response toward pups by juvenile males from single or overlapping litters

The percentage of males from OvL or SL that displayed FPB (5.8, 5.0%), PPB (29.4, 25.0%), NPB (64.7, 65.0%), or IB (0.0, 5.0%), respectively, was not significantly different ($\chi^2 = .93$, $p = .8$, Fig. 2). The percentage of subjects that retrieved (11.7, 10.5%, $\chi^2 = .01$, $p = 0.9$), licked (17.6, 40.0%, $\chi^2 = 2.1$, $p = 0.1$), or adopted crouching posture (29.4, 25.0%, $\chi^2 = .09$, $p = 0.7$) did not show significant differences between juvenile males from OvL and SL respectively. Parental (FPB and PPB) males from OvL ($n = 6$) licked the pups less often [$U = 31.5$, $p < .05$; OvL 8.0 (1.0) vs. SL 13.5 (1.5)] and for less time [$U = 30.0$, $p = .054$; OvL 46.2 (28.9) vs. SL 123.6 (35.9)] than parental males from SL ($n = 6$).

Discussion

The present study made a detailed analysis of the paternal behavior of laboratory mice (CB57Bl/6) at different contexts. First, we showed that sire mice displayed paternal behavior

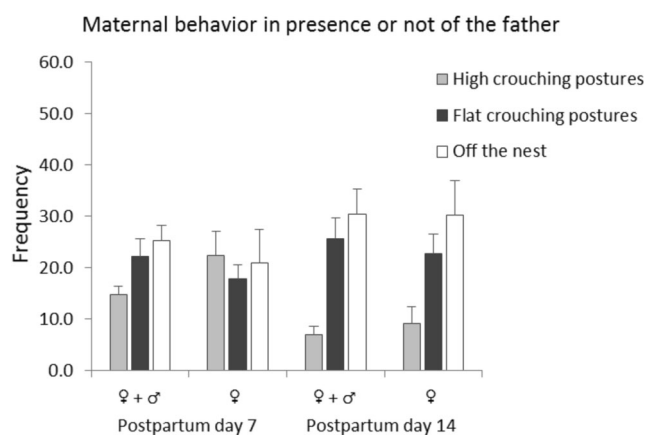


Fig. 1 Maternal behavior at postpartum day 7 and 14 in presence or not of the father (three 60-min observation sessions). Data are expressed as mean \pm SE of frequencies from a total of 63 observations. Behaviors were scored every 3 min, during three 60-min periods = 63 observations/subject/day. N of each group = 7

toward either own or alien pups without disturbing or affecting the behavior of the mother. Although this species is not considered biparental, males are able to show parental behavior, and their presence can benefit the offspring reducing the time pups stay alone in the nest. Second, in contrast to other species (e.g., rats and prairie voles), and to juvenile female mice, juvenile males (25–30 days of age) participated minimally in the caring activities of newborns and their behavioral response did not improve after a short exposure to a parturient mother and newborn siblings. This last finding suggested that in contrast to female CB57BL/6 mice (Olazábal and Alsina-Llanes 2016), juvenile males could be adapted to disperse from their natal nest without major contributions to the rearing of their younger siblings.

The lower frequency of crouching displayed by fathers compared with mothers, agreed with a previous study in the same strain of mice (Gandelman et al. 1970). However, other studies in albino mice (Ostermeyer and Elwood 1983; Priestnall and Young 1978; Wright and Brown 2000) found no difference in parental behavior in mothers and fathers. We must note that all those early studies grouped all behavioral

components in a parental score or averaged them throughout the whole postpartum period. In the case of Ostermeyer and Elwood (1983), our results partially agreed with their findings because they only showed the results of sniffing and licking behavior, two behavioral components that, in our study, did not differ between males and females. Given that previous studies did not provide detailed information on the different behavioral components or their changes in the different postpartum days, many differences could have remained undetected.

The present study also suggests that when males are challenged to retrieve the pups previously removed from the nest, as in our 15-min test on postpartum day 7, most of them behave parentally even though the mother is also present. However, when animals are left undisturbed, the males show minimal parental behavioral components, as also shown by Wright and Brown (2000), except for crouching or thermoregulation at the nest. In the present study, we did not find any negative effect of the presence of the fathers on the behavior of the mothers. Previous studies in albino mice (Priestnall and Young 1978; Wright and Brown 2000) also showed that the presence of the males had no negative effect on the development or survival of the offspring. Although several studies in the laboratory using laboratory, house mice, and *Peromyscus californicus* have failed to show any effect of the presence of the father on the survival of the offspring (Brown 1993; Cantoni and Brown 1997; Gerlach 1990; Wright and Brown 2000; Priestnall and Young 1978), we cannot exclude the possibility that males play an important role in natural and more challenging conditions (Brown et al. 1999; Gubernick et al. 1993). For example, the contribution of males could be revealed more clearly as part of a strategy to defend the nest. Some authors have previously proposed that, in the wild, fathers could mainly engage in defending the female/harem and pups against danger (McCarthy 2010). In our study, the presence of the male resulted in a reduction of the time pups were left alone, what can be considered an advantage in terms of thermoregulation, contact, or/and defense of the newborns. Previous studies in *Peromyscus californicus* showed that the

Table 3 Exp II: Paternal behavior toward alien or own pups during postpartum day 3 or 7 (15 min test)

		Postpartum day 3 (alien pups) $n = 6$	Postpartum day 7 (alien pups) $n = 9$	Postpartum day 7 (own pups) $n = 9$
Percentage	Retrieval	33.3%	22.2%	33.3%
Frequency	Licking and grooming bouts	7.0 (1.5)	4.0 (2.1)	3.0 (2.0)
	Crouching postures	4.5 (1.5)	4.0 (1.2)	2.0 (1.7)
	Nest building	7.5 (3.0)	5.0 (1.3)	5.0 (2.3)
Time (s)	Licking and grooming bouts	67.2 (47.4)	29.3 (16.0)	4.6 (13.0)
	Crouching postures	66.1 (54.8)	46.0 (28.7)	23.5 (19.6)
	Nest building	202.1 (77.8)	255.4 (192.8)	399.8 (196.7)

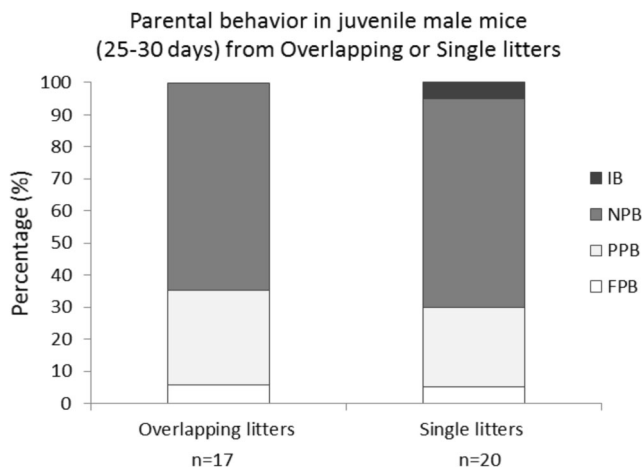


Fig. 2 Percentage of juvenile males 25–30 days old that displayed infanticidal behavior (IB), non-parental behavior (NPB), partial parental behavior (PPB), or full parental behavior (FPB) when tested (15 min test) in a novel cage. Groups: OvL ($n = 17$), juveniles from overlapping litters exposed to their pregnant/parturient mother and newborn siblings during ~12–24 h; SL ($n = 20$), juveniles from single litters with no previous exposure to pups

physical contact between siblings was also greater if the father was present (Vieira and Brown 2003).

The absence of male aggressiveness toward alien pups suggested that either males were already subordinated to the mothers at postpartum days 3 and 7 or they underwent long-term changes after the induction of paternal behavior that resulted in a non-selective parental behavioral response. Gandelman et al. (1970) also found that male mice (C57BL/6 and Rockland-Albino Swiss) that had cohabited (but not copulated) with a pregnant/lactating female and her litter were capable to display parental behavior when tested with those alien pups in isolation. However, they did not test the males with pups from a different female to those they cohabitated with, as in the current study. Also, in agreement with the current study, Brooks and Schwarzkopf (1983) found that males (C57BL/6 and DBA) that copulated and cohabitated only 1 week with a pregnant female and were placed (14–21 days later) in the cage of an unknown lactating female (same or different strain) and their litters on postpartum day 1 did not attack alien pups. Besides, those males did not attack when tested isolated in a new cage. Besides, other authors found that adult virgin males introduced to lactating females at postpartum day 7 rarely killed the pups (McCarthy and vom Saal 1986). These authors, who tested the CF-1 albino strain and the wild house mouse, proposed that females inhibited infanticidal behavior in males by attacking and subordinating them (see also Elwood 1986). For example, at postpartum day 2, males killed the pups (2 or 7 days of age) if the lactating female did not show maternal aggression toward them (Vom Saal and Howard 1982; McCarthy and vom Saal 1986). We have also observed males attacking pups when we tried to complete a litter adding alien

pups to the cage on postpartum day 1. However, in the present work, males were capable to tolerate and take care of alien pups as early as postpartum day 3. The current findings cannot be explained by the hypothesis that males recognize some genetic label that avoids infanticidal behavior because males had copulated with the females and had already been exposed to their own pups. An alternative explanation might be related to the presence of the postpartum estrous on the first 2 days after parturition that might also contribute, in some way, to pup-killing (Mennella and Moltz 1988a, 1988b). Therefore, our results agreed with the hypothesis that once paternal behavior was well established and/or males subordinated to females, something that might consolidate during the first two postpartum days, the strange odor of alien pups did not necessarily trigger infanticidal behavior. In fact, our results suggest that males initially inhibit infanticidal behavior likely by chemical and behavioral factors associated with the female and the territory they share, but later the continuous exposure to the multiple sensory stimulation emitted by pups stimulate attraction to the pups and high motivation to take care of them.

Finally, our results indicated that unlike juvenile females, juvenile males did not improve their behavioral response toward pups after the exposure, in their homecage, to their pregnant/parturient mother, birth fluids, and newborn sibling for 12–24 h. This agrees with the fact that while most male mice disperse from the nest, most females remain for longer period of time (Gerlach 1990). Thus, although variability in nature exists and either some females might disperse early and males stay near the nest for longer period of time, males could be better adapted to disperse without major or any contribution to the rearing of their newborn siblings. As males grow, most of them will develop aggressiveness toward pups (Olazábal and Alsina-Llanes 2016) that will be overcome by copulation and/or cohabitation with a pregnant female. However, it is still interesting to explore why a few naïve virgin, in particular young, males (in the current study 30% of juveniles in both groups) show some behavioral components of parental behavior (Olazábal and Alsina-Llanes 2016). Previous studies (Leblond 1938) found high levels (50%) of paternal behavior in males 22–28 days of age. However, in that classic study, it is unclear if males were naïve because the authors also reported that juveniles required about 4 days of exposure to pups (sensitization) to display parental behavior. Gandelman (1973) also reported that around half of Rockland-Swiss juvenile mice (22 days of age) displayed some components of parental behavior (retrieval and licking or crouching posture). Similarly, Svare and Mann (1981) reported that 15 and 20% of 25-day-old male mice (C57BL/6 and DBA strain respectively) retrieved a pup. Finally, McCarthy and vom Saal (1986) also found that 20% of adolescent males hovered over the pups in the nest during a test of 30 min. The variability in the incidence of parental behavior observed in juveniles might then be consequence of strain differences (McCarthy and vom

Saal 1986; Svare and Mann 1981) or different criteria to consider an animal as parental, among other minor methodological differences (Alsina-Llanes et al. 2015; Priestnall and Young 1978; Svare and Broida 1982). For example, licking is usually a behavior used to consider an animal as parental. However, in our results, juvenile parental males exposed to alien pups licked them for longer period of time and more often than juveniles tested with their newborn siblings, supporting the idea that, in this context, licking plays an important role in pup recognition rather than in pup stimulation. We have also previously shown that lactating and juvenile females showed higher licking behavior toward alien compared to their own pups (Alsina-Llanes et al. 2015).

We want to note that we cannot exclude the possibility that longer exposure to pups (3–4 days compared to 24 h) could have facilitated the onset of parental behavior in juvenile CB57Bl/6 males. For example, in the classic study of Gubernick and Laskin (1994) in *Peromyscus californicus* (considered a biparental and socially monogamous species), ~70% of 35–40-day-old mice (males and females pooled together) that had been housed with their parents, and cohabitated with younger siblings during 3 days, were induced to show parental behavior. However, when they cohabitated with younger siblings by shorter period of time (4 h) only 40% displayed paternal behavior (licking or crouching posture in 10 min). Therefore, the duration of the period of cohabitation with pups in an overlapping litter context impacted in the incidence of parental behavior in that species. However, as we already mentioned, *Peromyscus californicus* shows a different reproductive strategy and, unlike naïve adult male CB57BL/6 mice, *Peromyscus californicus* males can be rapidly induced to display paternal behavior (Horrell et al. 2017).

In summary, despite the enormous variability reported in the literature, generally attributed to strain differences, handling, or housing conditions, a careful analysis of behavioral data showed some clear pattern of behavioral performance in laboratory male mice. Although most naïve males are not parental, they show a rather flexible behavioral response toward pups suggesting that under certain conditions, paternal behavior in virgin males could gain biological significance. For example, the so called promiscuous or polygamous species are generally associated with lower levels of paternal behavior than those called socially monogamous species. However, sires from promiscuous species generally take care of pups and are capable to contribute to the rearing of the offspring resulting in a reduction in the time pups remain alone. Besides, in other non-monogamous rodents (i.e., *Rhabdomys pumilio*, Schradin and Pillay, 2003) is not uncommon to find high levels of paternal behavior, suggesting that the identification of species as biparental could be in some cases underestimated and biased by their reproductive strategy (monogamous or non-monogamous) rather by the actual behavior observed in

the sires. Although the benefit of paternal care in laboratory mice is not clear, we cannot rule out the possibility that under certain ecological or stressful conditions, the presence of the father in the nest will be favored resulting in long-lasting effects on the offspring. Thus, the presence of male mice in the nest and its contribution to pups will likely be context specific. Future field and laboratory studies in non-traditional rodent species with different social and reproductive strategies, or at different ecological conditions, might contribute to further advance our understanding of the biological function of paternal behavior.

Acknowledgments We thank the staff of the Animal Facility of the Facultad de Medicina for providing care to our animals and the appropriate conditions to carry out these experiments.

Funding information The present study was supported by PEDECIBA and research grants to D.E.O. and M.A (1452) by the Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC), UdelaR.

Compliance with ethical standards

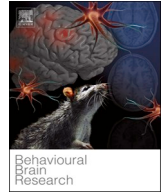
All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Agnish ND, Keller KA (1997) The rationale for culling of rodent litters. *Fund Appl Psychol* 38:2–6
- Alsina-Llanes M, De Brun V, Olazábal DE (2015) Development and expression of maternal behavior in naïve female C57BL/6 mice. *Dev Psychobiol* 57:189–200
- APA Board of Scientific Affairs, Committee on Animal Research and Ethics (2012) Guidelines for Ethical Conduct in the Care and Use of Nonhuman Animals in Research. <https://www.apa.org/science/leadership/care/guidelines.aspx>. Accessed 10 March 2018
- Bales KL, Saltzman W (2007) Fathering in rodents: neurobiological substrates and consequences for offspring. *Horm Behav* 77:249–259
- Brooks RJ, Schwarzkopf L (1983) Factors affecting incidence of infanticide and discrimination of related and unrelated neonates in male *Mus musculus*. *Behav Neural Biol* 37:149–161
- Brown RE (1993) Hormonal and experiential factors influencing parental behaviour in male rodents: an integrative approach. *Behav Process* 30:1–28
- Brown RE, Mathieson WB, Stapleton J, Neumann PE (1999) Maternal behavior in female C57BL/6J and DBA/2J inbred mice. *Physiol Behav* 67:599–605
- Cantoni D, Brown RE (1997) Paternal investment and reproductive success in the California mouse, *Peromyscus californicus*. *Anim Behav* 54:377–386
- Cheatham SA, Thom MD, Jury F, Ollier WER, Beynon RJ, Hurst JL (2007) The genetic basis of individual recognition signals in the mouse. *Curr Biol* 17:1771–1777
- Cicirello DM, Wolff JO (1990) The effects on mating on infanticide and pup discrimination in white-footed mice. *Behav Ecol Sociobiol* 26: 275–279

- Dewsbury DA (1985) Paternal behavior in rodents. *Am Zool* 25(3):841–852
- Ebensperger LA (1998) Strategies and counterstrategies to infanticide in mammals. *Biol Rev* 73:321–346
- Elwood RW (1985) Inhibition of infanticide and onset of paternal care in male mice (*Mus musculus*). *J Comp Psychol* 99(4):457–467
- Elwood RW (1986) What makes male mice paternal? *Behav Neural Biol* 46:54–63
- Gandelman R (1973) The development of cannibalism in male Rockland-Swiss mice and the influence of olfactory bulb removal. *Dev Psychobiol* 6:159–164
- Gandelman R, Paschke RE, Zarrow MX, Denenberg VH (1970) Care of young under communal conditions in the mouse (*Mus musculus*). *Dev Psychobiol* 3(4):245–250
- Gerlach G (1990) Dispersal mechanisms in a captive wild house mouse population (*Mus domesticus* Ruddy). *Biol J Linn Soc* 41:271–277
- Gubernick DJ, Laskin B (1994) Mechanisms influencing sibling care in the monogamous biparental California mouse, *Peromyscus californicus*. *Anim Behav* 48:1235–1237
- Gubernick DJ, Wright SL, Brown RE (1993) The significance of father's presence for offspring survival in the monogamous California mouse, *Peromyscus californicus*. *Anim Behav* 46:539–546
- Gubernick DJ, Schneider KA, Jeannotte LA (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*. *Behav Ecol Sociobiol* 34(3):225–231
- Harding KM, Lonstein JS (2016) Extensive juvenile baby-sitting facilitates later adult maternal responsiveness, decrease anxiety, and increases dorsal raphe tryptophan hydroxylase-2 expression in female laboratory rats. *Dev Psychobiol* 58:492–508
- Horrell ND, Perea-Rodriguez JP, Harris BN, Saltzman W (2017) Effects of repeated pup exposure on behavioral, neural, and adrenocortical responses to pups in male California mice (*Peromyscus californicus*). *Horm Behav* 90:56–63
- Huck UW, Soltis RL, Coopersmith CB (1982) Infanticide in male laboratory mice: effects of social status, prior sexual experience, and basis for discrimination between related and unrelated young. *Anim Behav* 30:1158–1165
- Kennedy HF, Elwood RW (1988) Strain differences in the inhibition of infanticide in male mice (*Mus musculus*). *Behav Neural Biol* 50:349–353
- Kuroda KO, Meaney MJ, 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. *Mol Cel Neurosci* 36:121–131
- Kuroda KO, 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. *Prog Neuro-Psychoph* 35:1205–1231
- Labov JB (1980) Factors influencing infanticidal behavior in wild male house mice (*Mus musculus*). *Behav Ecol Sociobiol* 6:297–303
- Leblond CP (1938) Extra hormonal factors in maternal behavior. *P Soc Exp Biol Med* 38:66–70
- Lonstein JS, De V (2000) Sex differences in the parental behavior of rodents. *Neurosci Biobehav Rev* 24:669–686
- Lucas BK, Ormandy CJ, Binart N, Bridges RS, Kelly PA (1998) Null mutation of the prolactin receptor gene produces a defect in maternal behavior. *Endocrinology* 139:4102–4107
- Matsumoto F, Kimura T (1995) 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. *J Ethol* 13:23–30
- McCarthy MM (2010) Father and child reunion. *Nat Neurosci* 13(6):652–653
- McCarthy MM, vom Saal FS (1986) Infanticide by virgin CF-1 and wild male house mice (*Mus musculus*): effects of age, prolonged isolation, and testing procedure. *Dev Psychobiol* 19(3):279–290
- Mennella JA, Moltz H (1988a) Infanticide in rats: male strategy and female counter-strategy. *Physiol Behav* 42(1):19–28
- Mennella JA, Moltz H (1988b) Infanticide in the male rat: the role of the vomeronasal organ. *Physiol Behav* 42(3):303–306
- Noiroi E (1969) Serial order of maternal responses in mice. *Anim Behav* 17:547–550
- Olazábal DE, Alsina-Llanes M (2016) Are age and sex differences in brain oxytocin receptors related to maternal and infanticidal behavior in naïve mice? *Horm Behav* 77:132–140
- Olazábal DE, Young LJ (2006) Species and individual differences in juvenile female alloparental care are associated with oxytocin receptor density in the striatum and the lateral septum. *Horm Behav* 49:681–687
- Ostermeyer MC, Elwood RW (1983) Pup recognition in *Mus musculus*: parental discrimination between their own and alien young. *Dev Psychobiol* 16(2):75–82
- Priestnall R, Young S (1978) An observational study of caretaking behavior of male and female mice housed together. *Dev Psychobiol* 11(1):23–30
- Roberts RL, Williams JR, Wang AK, Carter CS (1998) Cooperative breeding and monogamy in prairie voles: influence of the sire and geographical variation. *Anim Behav* 55:1131–1140
- Schradin C, Pillay N (2003) Paternal care in the social and diurnal striped mouse (*Rhabdomys pumilio*): laboratory and field evidence. *J Comp Psychol* 117(3):317–24
- 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*. *Anim Behav* 36:1275–1281
- Stern JM, Rogers L (1988) Experience with younger siblings facilitates maternal responsiveness in pubertal Norway rats. *Dev Psychobiol* 21:575–589
- Svare B, Broida J (1982) Genotypic influences on infanticide in mice: environmental, situational and experiential determinants. *Physiol Behav* 28:171–175
- Svare B, Mann M (1981) Infanticide: genetic, developmental and hormonal influences in mice. *Physiol Behav* 27:921–927
- Tachikawa KS, Yoshihara Y, Kuroda KO (2013) Behavioral transition from attack to parenting in male mice: a crucial role of the vomeronasal system. *J Neurosci* 33(12):5120–5126
- Uriarte N, Ferreira A, Rosa XF, Sebben V, Lucion AB (2008) Overlapping litters in rats: effects on maternal behavior and offspring emotionality. *Physiol Behav* 93(4–5):1061–1070
- Vieira ML, Brown RE (2003) Effects of the presence of the father on pup development in California mice (*Peromyscus californicus*). *Dev Psychobiol* 42:246–251
- Vom Saal FS, Howard LS (1982) The regulation of infanticide and parental behavior: implications for reproductive success in male mice. *Science* 215(4537):1270–1272
- Waring A, Perper T (1979) Parental behaviour in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). I. Retrieval. *Anim Behav* 27:1091–1097
- Waring A, Perper T (1980) Parental behaviour in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). II. Parental interactions. *Anim Behav* 28:331–340
- Wright SL, Brown RE (2000) Maternal behavior, paternal behavior, and pup survival in CD-1 albino mice (*Mus musculus*) in three different housing conditions. *J Comp Psychol* 114(2):183–192
- Wynne-Edwards KE, Timonin ME (2007) Paternal care in rodents: weakening support for hormonal regulation of the transition to behavioral fatherhood in rodent animal models of biparental care. *Horm Behav* 52:114–121



Research report

Prefrontal cortex is associated with the rapid onset of parental behavior in inexperienced adult mice (C57BL/6)

M. Alsina-Llanes, D.E. Olazábal*

Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UdelaR, Uruguay

ARTICLE INFO

Keywords:

c-Fos
Infanticidal
MPOA
Parental
Prelimbic cortex

ABSTRACT

There is significant variability in the immediate behavioral response displayed by inexperienced adult mice when exposed to pups for the first time. The aim of this study was to determine which brain regions were engaged (higher c-Fos-immunoreactivity, c-Fos-ir) when virgin females, that were exposed to pups for 15 or 60 min, displayed full parental behavior (FPB), partial parental behavior (PPB), or non-parental behavior (NPB), or virgin males displayed PPB or infanticidal behavior (IB). The number of c-Fos-ir neurons in the prefrontal cortex (PL) was higher in parental females than in the NPB group (after a 15-min exposure), and the group not exposed to pups (NE). C-Fos expression in the nucleus accumbens (NA) was increased in most groups of females exposed to pups compared to NE. Higher c-Fos-ir was also found in the shell subregion of the NA in infanticidal males, compared to males NE. The cortical (CoA) and medial (MA) amygdala also showed higher c-Fos-ir in parental females compared to NE animals. However, PPB and IB male groups also exhibited higher c-Fos-ir in the CoA and MA compared to the NE group. The expression of c-Fos in the different subregions of medial preoptic area and the ventromedial nucleus of the hypothalamus was not specifically associated with either parental or infanticidal behavior. No brain activation in males was specifically associated with infanticidal behavior. Our results suggest that 15 min of exposure to pups is enough to detect brain regions associated with parental behavior (PL) or pups processing (NA, MA, CoA) in mice. The PL might participate in the immediate onset of parental behavior in virgin females, coordinating and planning its rapid execution.

1. Introduction

Parental behavior in rodents involves several behavioral components such as pup retrieval, crouching postures, nest building and licking/grooming [38,51,52], which contribute to the survival of the offspring [41,45,46]. Although mothers are commonly responsible for taking care of the young, both males and females express parental behavior in different social contexts and hormonal/physiological states. In some species, pup-naive virgin females and males can display parental behavior in non-reproductive contexts [39,51,52]. The induction of parental behavior by continuous exposure to pups is commonly called *pup-induced* parental behavior or *sensitization* [40,52]. However, there are inter and intraspecific differences in the latency to display parental behavior among the different rodent species [1,19,33,47,52]. For example, while most C57BL/6 female mice can display parental behavior almost immediately or sensitize rapidly after 30 min to 3 h of exposure to pups, males from most mouse strains are generally infanticidal or non-parental (ignore or neglect the pups) [1,16,17,25,31,38,43].

Thus, the immediate behavioral response toward pups is extremely variable in mice, and can be either completely parental (all behavioral components of parental behavior are displayed), partially parental (only some of the behavioral components of parental behavior are displayed), non-parental (only one or none of the behavioral components of parental behavior are displayed) or infanticidal (animals attack or hurt pups). Therefore, mice provide a good opportunity to discriminate brain regions that might be specifically engaged in parental or infanticidal behavior from those engaged in just the processing of pup-related stimuli and other social or non-social stimuli. Previous studies [7,58] investigated the expression of c-Fos only in female mice that showed full parental behavior and after 30 min of exposure to pups. Some of these studies also did not find behavioral variability in the immediate behavioral response to pups [7], something that differed from other studies, including ours [1,25,33]. Besides, all those previous studies [7,24,57–59] compared c-Fos expression between groups of parental/infanticidal mice and groups of mice not exposed to pups, or in different reproductive contexts. A control group of non-parental virgin mice exposed to pups was never

* Corresponding author at: Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UdelaR. Av. Gral. Flores 2125, Montevideo, 11800, Uruguay.

E-mail addresses: malsina@fmed.edu.uy (M. Alsina-Llanes), dolazabal@fmed.edu.uy (D.E. Olazábal).

<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112556>

Received 15 November 2019; Received in revised form 10 February 2020; Accepted 11 February 2020

Available online 19 February 2020

0166-4328/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

used. Therefore, the expression of c-Fos found in those studies might not be specifically associated with parental or infanticidal behavior, but just with the exposure to pups or the presence of a different physiological state. Investigating the specificity of previous findings is one of the goals of the current study.

Mice also offer an opportunity to explore rapid neural changes that occur when animals are responding differently toward the same stimulus. The process of rapid sensitization gives us also the opportunity to compare brain regions engaged in the initial stages of the interaction with pups (first 15 min) from those engaged after longer interaction with them (60 min or several days). The immediate early gene *c-fos* is rapidly and transiently expressed in neurons in response to a variety of extracellular stimuli. Transcriptional activation of the gene occurs within minutes of stimulation, with levels of the nuclear protein c-Fos increasing 30–40 min later [4,9,20,35,36,54]. However, the temporal changes and maintenance of c-Fos expression depend on the areas of the brain studied [11,36,42,60]. For example, c-Fos mRNA expression was maximal in the dentate gyrus, cortical regions, accumbens, amygdala, septum, and lateral habenula before or at 60 min of an acute stress [9], morphine and convulsant administration [36,60]. Besides, other authors, that used similar time of sacrifice and procedures to us, found increased c-Fos in lateral habenula and raphe, but not in the medial preoptic nucleus, at 70 min after the beginning of the exposure to pups [11]. The expression of the c-Fos mRNA decline after that to low or basal levels at 1.5 or 2 h post stimulus [9]. The protein c-Fos was also observed to be maximal around 1 h in several brain regions [10,11]. Thus, the time of sacrifice and perfusion after stimulus presentation can differently affect the observed c-Fos expression in the different brain regions [11,60]. In the current study we decided to sacrifice animals after 1 h of the presentation of the stimuli (pups, object, or pups inside object) to detect brain regions rapidly, and perhaps transiently, engaged in the onset of parental behavior. Besides, we investigated for the first time if 15 min of exposure to pups was enough to increase c-Fos in neurons in the brain.

We analyzed several brain regions that included the prelimbic (PL) and infralimbic (IL) cortex, the medial preoptic area (MPOA), and the nucleus accumbens (NA). The PL and IL cortex might be critical for the recognition of stimulus, attentional selection, decision making, behavioral flexibility and planning of the immediate parental or infanticidal response [2,49,50]. The MPOA is critical for the expression of parental behavior in parturient females as well in sensitized females and males of several species [7,10,23,24,26,27,42,58,59]. However, the MPOA has several subareas and some of them have been associated also with infanticidal behavior or the inhibition of parental behavior [24,53]. Moreover, the NA has been involved in the processing of information related with the offspring and the facilitation of parental behavior [8,18,32,22,28,29,41,44,47,48]. However, this area has also been classically associated with the processing of novelty and the mediation of motivation to approach or avoid appetitive and aversive stimuli [5,34]. In the current study we investigated which brain regions expressed c-Fos associated with the rapid decision to take care of (parental behavior) or attack (infanticidal behavior) the pups. We expected that non-parental, parental and infanticidal animals would show different pattern of expression of c-Fos in these brain regions and those differences would be evident rapidly.

We found that 15 min of exposure to pups was enough to detect brain regions associated with parental behavior or pup processing. Besides, the PL was the only brain region specifically associated with parental behavior suggesting it plays a role in the immediate onset of parental behavior, perhaps coordinating and planning its rapid execution. Other areas of the brain, commonly associated with the stimulation (MPOA, NA), or inhibition of parental behavior (i.e. MA, CoA, and ventromedial nucleus of the hypothalamus, VMH) [6,14,37,57] were not specifically associated with parental or infanticidal behavior.

2. Experimental Procedures

2.1. Subjects

We used C57BL/6 mice originally obtained from Jackson Laboratory and inbred at the animal facility of the Facultad de Medicina (UdelaR, Montevideo, Uruguay). All animals were weaned at age 20–21 days. Subjects were housed and maintained in same-sex groups of 6–7 individuals per cage until adulthood. Cages were 45 cm x 25 cm x 15 cm, with transparent Plexiglas walls and wood shaving as bedding. Animals were kept under a 12:12 h light-dark cycle (light on from 6:00 am), at 22 °C, with ad libitum access to food (PMI nutrition international LabDiet®, Shoreview, Minnesota, USA) and water. Cages were regularly changed once a week. All procedures carried out in this study were approved by the local committee of ethics in animal research (CHEA, N° 070153-000979, May 2015) and followed the recommendations of the “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” of the National Institutes of Health and the “Guidelines for Ethical Conduct in the Care and Use of Animals” [3].

2.2. Experimental design

To determine the brain areas engaged (express increased c-Fos) when female and male mice are exposed to pups for the first time and display parental, non-parental or infanticidal behavior, the following groups of pup and sexually naive adults (60–100 days of age) were used.

- 1) Females exposed to pups (n = 44): females exposed to two newborns for the first time.
- 2) Males exposed to pups (n = 26): males exposed to two newborns for the first time.
- 3) Males exposed to wire-mesh balls (n = 12): wire-mesh tea balls were used as novelty control in males, and to protect pups from injury in the 60-min infanticidal group (two new newborns pups were placed inside it after the first attack).
- 4) Females (n = 8) and males (n = 7) without exposure: females or males exposed to neither pups nor a novel object.

Different times of exposure to pups or novel object were used (see Fig. 1).

- A.) Exposure to 15 min: pups (or the wire-mesh ball) were removed from the cage after 15 min and animals left without any disturbance until completing 60 min from the beginning of the test.
- B.) Exposure to 60 min: pups (or the wire-mesh ball with or without pups) remained 60 min in the cage and were then removed.

2.3. Behavioral screening in a 15-min observation period

In all cases, the behavior displayed by the subjects was recorded during a observation period of 15 min (see Fig. 1). On the day of the test, animals were individually housed in a Plexiglas testing cage (27 cm x 21 cm x 14 cm, 370 cm² of area) and habituated for 60 min. The test consisted in placing two newborn pups (1–3 days of age), and nest material scattered in the side opposite to where the subject was located before opening the cage. During the 15-min test we recorded latency to approach to the pups, duration and frequency of the main components of parental behavior including licking/grooming, nest building, crouching postures, frequency of retrieval or pup transport, and other behaviors such as sniffing, immobility, and time away (> 10 cm) from the pups. The test was immediately interrupted when subjects attacked and/or hurt (accidentally or not) the pups. In that case, pups were immediately sacrificed.

Animals were categorized as showing full parental behavior (FPB) if they displayed all components of parental behavior: pups retrieval (at

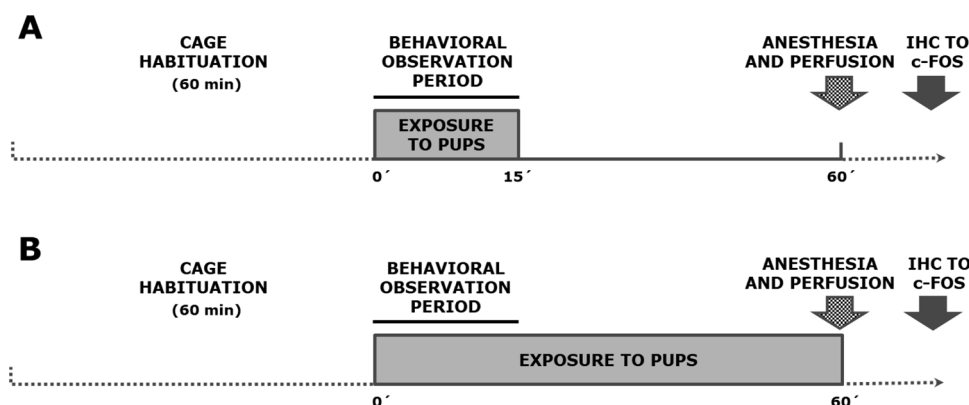


Fig. 1. Schematic representation of experimental design.

least one pup), licking (≥ 60 s), crouching over at least one pup (≥ 30 s), and nest building around or above the pups (≥ 60 s); partial parental behavior (PPB) if they showed 2 or 3 of the behavioral components of parental behavior; non-parental behavior (NPB) if they showed only one or none of the main components of parental behavior; and infanticidal behavior (IB) if they attacked the pups. The behavioral tests were carried out during the light phase. In previous studies, we showed that there was no difference in the behavior of parental and infanticidal animals when tested during the light or dark phase of the cycle [1,43]. All behavioral observations were recorded using the free software StopWatch <http://www.cbn-atl.org/research/stopwatch.shtml>.

2.4. Experimental groups

According to the different behavioral responses (FPB, PPB, NPB, IB) and duration of the exposure to pups (15- or 60-min), we created seven groups of females (Experiment I) and 7 groups of males (Experiment II).

A) Experiment I: Females exposed to pups during 15 or 60 min which had displayed FPB (15 min, $n = 7$; 60 min, $n = 8$); PPB (15 min, $n = 7$; 60 min, $n = 8$), or NPB (15 min, $n = 8$; 60 min, $n = 6$) during the behavioral screening test. We also used a group of naïve females that were not exposed to pups (non-exposure, NE, $n = 8$) as basal control. Animals in the NE group were placed in the same testing cages, habituated one hour as in the other groups, and left one additional hour there until sacrifice.

B) Experiment II: Males exposed to pups during 15 or 60 min which had displayed PPB (15 min, $n = 6$; 60 min, $n = 5$) or IB (15 min, $n = 7$; 60 min, $n = 8$) during the behavioral screening test. In the infanticidal group, males were exposed to pups until the first attack was registered (usually in few minutes). Immediately after the attack, the test was stopped and the pups removed (15-min Test). To complete the group of infanticidal animals exposed to pups for 60 min, the attacked pups were replaced by new pups, but this time they were placed inside a wire-mesh ball and put it back into the cage. Finally, we used males exposed to a wire-mesh ball (4.5 cm diameter) as novel object control (OE group; 15 min, $n = 6$; 60 min, $n = 6$), and males that were neither exposed to pups nor novel object (non-exposure, NE group, $n = 6$) as basal control. We did not find FPB animals, and the number of non-parental males ($n = 3$) was too small to make a group.

2.5. Immunohistochemistry (IHC)

Once the animals completed two hours in the cage, (one hour of habituation and one hour with or without the pups or the object) all subjects were deeply anesthetized (100 mg/Kg of ketamine with 14 mg/Kg of xylazine, i.p.) and perfused transcardially with 50 mL of cold phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4, 25 mM, followed by 100 mL of cold 4% paraformaldehyde in PBS 25 mM (see Fig. 1). Brains were removed from the skull, stored in fresh 4% paraformaldehyde for 24 h

at 4 °C, and then transferred to a 15 % sucrose-PBS solution for 24–48 hr until sectioned. Three sets of serial coronal sections (30 μ m) of the whole brain were cryo-sectioned and stored at -20 °C in an ethylene-glycol based cryoprotectant solution.

The IHC procedure started removing the sections from the freezer and leaving them floating in PBS at room temperature for 1 h. The free-floating sections were washed with five changes of PBS, bleached with 2% H_2O_2 with 10 % methanol in PBS for 15 min, rinsed with PBS, and placed in 0.3 % Triton X100-PBS and 4% normal goat (Vector laboratories, Burlingame, CA) for 1 h. Sections were then incubated in the primary antibodies against c-Fos (sc-52, a rabbit polyclonal antibody, Santa Cruz Biotechnology, CA) diluted (1:2000) in a 1% solution of normal goat serum in PBS at 4° for 40–45 hrs. Then six changes of PBS were made, and the sections were incubated in biotinylated goat anti-rabbit secondary antibody (Vector Laboratories, CA) diluted 1:200 in 1% normal goat serum-PBS for 1 h. Rinses with PBS were performed and the tissue placed for 1 h in avidin-biotin complex (ABC) reagent from an ABC Elite Kit (Vector Laboratories, CA). Then the tissue was rinsed in PBS and 100 mM sodium acetate buffer. The visualization reaction used a solution of nickel sulfate, diaminobenzidine (DAB), and hydrogen peroxide in sodium acetate buffer. After 2.5 min, the reaction was stopped by rinsing the sections in acetate buffer followed by rinses in 25 mM PBS. Sections were mounted on chrome alum-coated slides, air dried, dehydrated in graded alcohols, and coverslipped. Sections including the VMH were counterstained with neutral red to identify their different subdivisions. In order to avoid the variability among IHC assays, different behavioral groups were processed simultaneously on the same assay.

2.6. Microscopic analysis

The number of immunoreactive (ir) neurons were examined in all serial coronal sections (Fig. 2) of Prelimbic cortex (PL), Infralimbic cortex (IL), Nucleus Accumbens (NA) core and shell, medial amygdala (MA), cortical amygdala (CoA), subregions of the ventromedial nucleus of the hypothalamus (VMH) and medial preoptic area (MPOA). The MPOA was divided in seven 0.04-mm² regions, two in the dorsal region (MPOAd, medial and lateral), two in the medial preoptic nucleus (MPN, upper and lower), two in lateral region (MPOAl, upper and lower), and one in the ventrolateral MPOA (MPOAvl). Brain areas were identified according to the atlas of the mouse brain of Franklin and Paxinos [15].

The microscopic analysis for c-Fos-ir neurons was performed by applying standard methods previously published [44]. Preparations were examined under a Nikon Optiphot microscope (Nikon Corporation, Tokyo, Japan) equipped with a Nikon DS-2 M digital camera (Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA). The c-Fos-positive neurons were recognized by their nuclear dark purple stain. They were counted unilaterally within .04-mm² samples in 2–6 sections of each brain region of interest and averaged. For the VMH a smaller sample (.02-

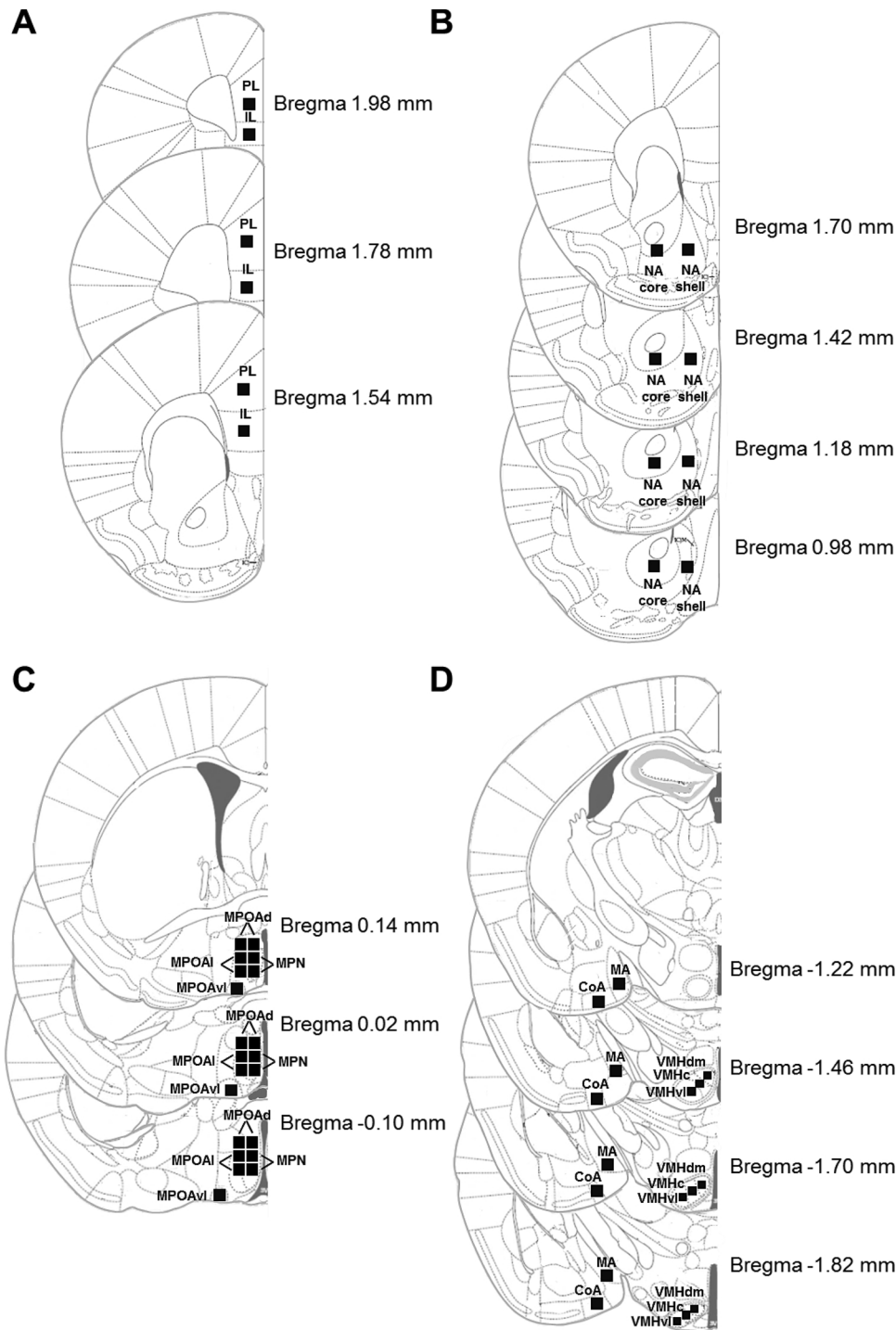


Fig. 2. Representative diagram of mice coronal sections showing the location of the samples at several level of the Prelimbic (PL) and Infralimbic (IL) cortex (A); Nucleus accumbens (NA) shell and core (B); different regions of medial preoptic area (MPOA), dorsal MPOA (MPOAd), medial preoptic nucleus (MPN) lateral MPOA (MPOAI) and ventrolateral MPOA (MPOAvI) (C); cortical amygdala (CoA), medial amygdala (MA) and ventromedial nucleus of the hypothalamus (VMH, D). The black box represents the sample of .04 mm² to PL, IL, NA, MPOA, MA, CA, or .02 mm² to VMH. Reprinted from: *The mouse brain*, 3th ed., K. Franklin and G. Paxinos, Copyright 2008.

mm²) was taken from each subregion (dorsomedial: VMHdm, central: VMHc, and ventrolateral: VMHvl). The number of c-Fos-ir neurons were automatically counted using an image analysis system NIH (National Institute of Health, USA) ImageJ 1.52a software and confirmed visually.

2.7. Statistical analysis

Data of the number of c-Fos-ir neurons in each brain area were analyzed using the statistical package IBM SPSS statistics 22. All experimental data was tested for normality (Kolmogorov-Smirnov test) and homogeneity of variance (Bartlett test). One-way analyses of variance (ANOVA; groups as factors) was performed, followed by Fisher's post hoc test for all group comparisons (2-tailed). The level of statistical

significance was $p < .05$. For Bonferroni corrections, $p < .01$ is also shown.

3. Results

EXPERIMENT I: Patterns of c-Fos immunoreactivity during immediate parental or non-parental behavioral responses in virgin female mice exposed to pups for the first time

3.1. Groups of animals exposed to pups for 15 min

By definition, all subjects in the FPB (n = 7) group licked, retrieved the pups, adopted crouching posture, and built a nest. Those

percentages were 100 %, 0%, 75 %, and 87.5 % in the PPB (n = 7) group for each behavioral variable respectively, while in the NPB (n = 8) group those percentages were 14 %, 0%, 0%, and 14 % respectively.

There was a statistically significant difference in the number of c-Fos-ir neurons in the prelimbic cortex (PL, $F = 7.8$, $df = 3$, $p < .001$), while in the infralimbic cortex the difference did not reach significance level (IL, $F = 2.6$, $df = 3$, $p = .07$). Both PPB and FPB groups showed higher level of c-Fos expression in the PL ($p < .01$, $p < .01$ vs. NE $n = 8$, $p < .04$, $p < .04$ vs. NPB, Figure 3A and 4). Moreover, when FPB and PPB were pooled in a parental group, there was a significant difference in both brain regions (PL, $F = 11.2$, $df = 2$, $p < .01$; IL, $F = 4.0$, $df = 2$, $p < .05$). C-Fos-ir neurons in the PL (32.3 ± 1.3) and IL (26.6 ± 2.1) in the parental behavior (PB) group was higher than in the NE group (PL 20.6 ± 2.9 ; IL 18.5 ± 2.6 , $p < .01$). PB group was also significantly different to NPB in the PL (24.0 ± 2.0 , $p < .01$); but did not reach significant difference in the IL (22.3 ± 1.7 , $p = .1$).

The number of c-Fos-ir neurons in the NA core ($F = 3.6$, $df = 3$, $p < .03$) and shell ($F = 3.9$, $df = 3$, $p < .02$) was statistically different among the groups. Most female groups exposed to pups for the first time (NPB, PPB, and FPB groups) showed higher number of c-Fos-ir neurons in both the NA core and NA shell compared with NE (Table 1).

Statistically significant differences among the groups were also observed in the pattern of c-Fos expression in the MA ($F = 4.1$, $df = 3$, $p < .02$) and CoA ($F = 5.8$, $df = 3$, $p < .01$). Females that displayed PPB showed significantly greater number of c-Fos-ir neurons in the MA ($p < .01$ vs. NE, Figure 3A and 5) and CoA ($p < .001$ vs. NE, $p < .01$ vs. NPB, $p < .01$ vs. FPB, Figure 3A and 5). No other difference was found among the groups Fig. 5.

The comparison of the four experimental groups by one-way analysis of variance did not show any statistically significant differences in the number of c-Fos-ir neurons in the MPOAd (medial; lateral, Table 1), MPN (upper; lower Table 1), MPOAl (upper; lower, Table 1) and MPOAvl (Table 1). There was also no difference among the groups in the total number of c-Fos-ir neurons in the MPOA (all subregions included).

No significant differences were found among the groups in the three subregions of the VMH (Table 1). No additional information was obtained from pooling PPB and FPB in the NA, MPOA, VMH, and MA.

3.2. Groups of animals exposed to pups for 60 min

By definition, all subjects in the FPB (n = 8) group licked, retrieved the pups, adopted crouching posture, and built a nest. In the PPB (n = 7) group those percentages were 100 %, 0%, 100 %, and 62.5 % for each behavioral variable respectively, while in the NPB (n = 6) group

those percentages were 16 %, 0%, 0%, and 33.3 % respectively. One female attacked the pups and was discarded from the study. At the end of the 60 min all NPB females were found away from the pups, while FPB females were in the nest crouching over the pups. None of the PPB females retrieved the pups or built a nest, but 42 % were found crouching over at least one pup.

The number of c-Fos-ir neuron was significantly different in the PL ($F = 3.3$, $df = 3$, $p < .04$, Figs. 3B and 4) and IL ($F = 4.0$, $df = 3$, $p < .02$, Figs. 3B and 4). An increase in the number of c-Fos-ir neurons was found in animals that displayed FPB ($p < .02$) and NPB ($p < .01$) compared with animals NE (n = 8). Besides, when FPB and PPB were pooled in a parental group, there was a significant difference in both brain regions (PL $F = 4.6$, $df = 2$, $p < .02$; IL $F = 5.2$, $df = 2$, $p < .01$). C-Fos-ir neurons in the PL (31.1 ± 2.7) and IL (28.6 ± 2.7) was higher in the PB group than in the NE group (PL 20.6 ± 2.9 , $p < .02$; IL 18.5 ± 2.7 , $p < .04$). NPB group was also significantly different in the PL (PL 35.9 ± 4.3 , $p < .01$) and IL (36.6 ± 5.9 , $p < .01$) compared to NE.

Significant differences were found among the groups in the number of c-Fos-ir neurons in the NA core ($F = 4.0$, $df = 3$, $p < .02$) and shell ($F = 4.7$, $df = 3$, $p < .01$). Most of the groups of females exposed to pups showed higher number of c-Fos-ir neurons in the NA core and NA shell compared with NE group (Table 2).

C-Fos expression in the MA ($F = 4.9$, $df = 3$, $p < .01$) but not in CoA ($F = 2.2$, $df = 3$, $p = .1$) showed significant differences (Fig. 3B and Fig. 5). A significant increase in the number of c-Fos-ir neurons was found in females that displayed FPB ($p < .01$ vs. NE, Figure 3B and 5) and PPB ($p < .01$ vs. NE, Figure 3B and 5) in the MA. No other difference was found among the groups.

One-way ANOVA did not reveal any significant difference in the number of c-Fos-ir neurons in MPOAd (medial; lateral, Table 2), MPN (upper; lower, Table 2), MPOAl (upper; lower, Table 2) and MPOAvl (Table 2) among the groups. There was also no difference in the total number of c-Fos-ir neurons in the MPOA (all subregions included).

ANOVA analysis of the number of c-Fos-ir neurons in the VMH (Table 2) did not reveal significant differences among the groups. However, when PPB and FPB were pooled, ANOVA analysis was significant ($p < .05$) for VMHc and VMHvl. C-Fos in VMHc and VMHvl was higher in the PB group compared to NE ($< .01$ and $< .02$ respectively), but not when compared to NPB ($p = .06$ and $p = .09$ respectively). No additional information was obtained from pooling PPB and FPB in the NA, MPOA, MA, CoA or VMHdm.

EXPERIMENT II: *Patterns of c-Fos immunoreactivity during immediate parental or infanticidal behavioral responses in virgin male mice exposed to pups for the first time*

Table 1

Number of c-Fos immunoreactive neurons in virgin adult females exposed to pups for the first time for 15 min.

Brain area	NE n = 8	NPB n = 8	PPB n = 7	FPB n = 7	F (3,26)	P
NA core	14.8 ± 1.5	22.1 ± 2.2 *	23.1 ± 3.3 **	24.5 ± 1.8 **	3,6	< .03
NA shell	18.7 ± 1.8	24.4 ± 2.1 *	25.8 ± 2.3 **	27.6 ± 1.4 **	3,9	< .02
VMHdm	15.2 ± 1.3	14.3 ± 2.2	15.8 ± 2.9	11.6 ± 1.4	0,8	ns
VMHc	14.8 ± 1.3	15.7 ± 2.0	20.5 ± 3.1	14.7 ± 2.2	1,4	ns
VMHvl	13.7 ± 1.6	13.1 ± 1.5	18.1 ± 2.4	14.6 ± 2.4	1,1	ns
MPOAd medial	23.8 ± 3.7	26.2 ± 2.7	36.9 ± 5.0	27.6 ± 3.6	2,2	ns
MPOAd lateral	21.8 ± 3.9	20.4 ± 1.4	31.5 ± 6.1	22.8 ± 2.7	1,7	ns
MPN upper	27.9 ± 5.5	25.6 ± 1.6	36.9 ± 5.8	28.6 ± 3.7	1,2	ns
MPN lower	25.0 ± 5.7	25.9 ± 2.4	35.8 ± 7.5	28.9 ± 4.0	0,9	ns
MPOA upper	18.7 ± 3.9	19.6 ± 1.2	29.6 ± 4.5	24.7 ± 2.6	2,4	ns
MPOA lower	19.1 ± 3.9	21.1 ± 1.5	30.4 ± 4.7	25.0 ± 2.9	2,1	ns
MPOAvl	27.5 ± 2.0	31.8 ± 3.0	32.5 ± 4.8	29.9 ± 2.9	0,4	ns

NE (non-exposure), NPB (non-parental behavior), PPB (partial parental behavior), FPB (full parental behavior), NA (Nucleus accumbens), VMH (ventromedial nucleus of the hypothalamus), VMHdm (dorsomedial subdivision of the VMH), VMHc (central subdivision of VMH), VMHvl (ventrolateral subdivision of VMH), MPOA (medial preoptic area), MPOAd (dorsal region of MPOA), MPN (medial preoptic nucleus), MPOAvl (ventrolateral region of MPOA), ns (nonsignificant). Data are expressed as mean ± SEM of number of c-Fos-immunoreactive neurons in 0.04 mm² (NA core, NA shell and subregions of MPOA) or 0.02 mm² (subregions of VMH) samples. F and p values for ANOVA are shown in the last two columns. * $p < .03$, ** $p < .01$ vs. NE group, Fisher's post hoc test.

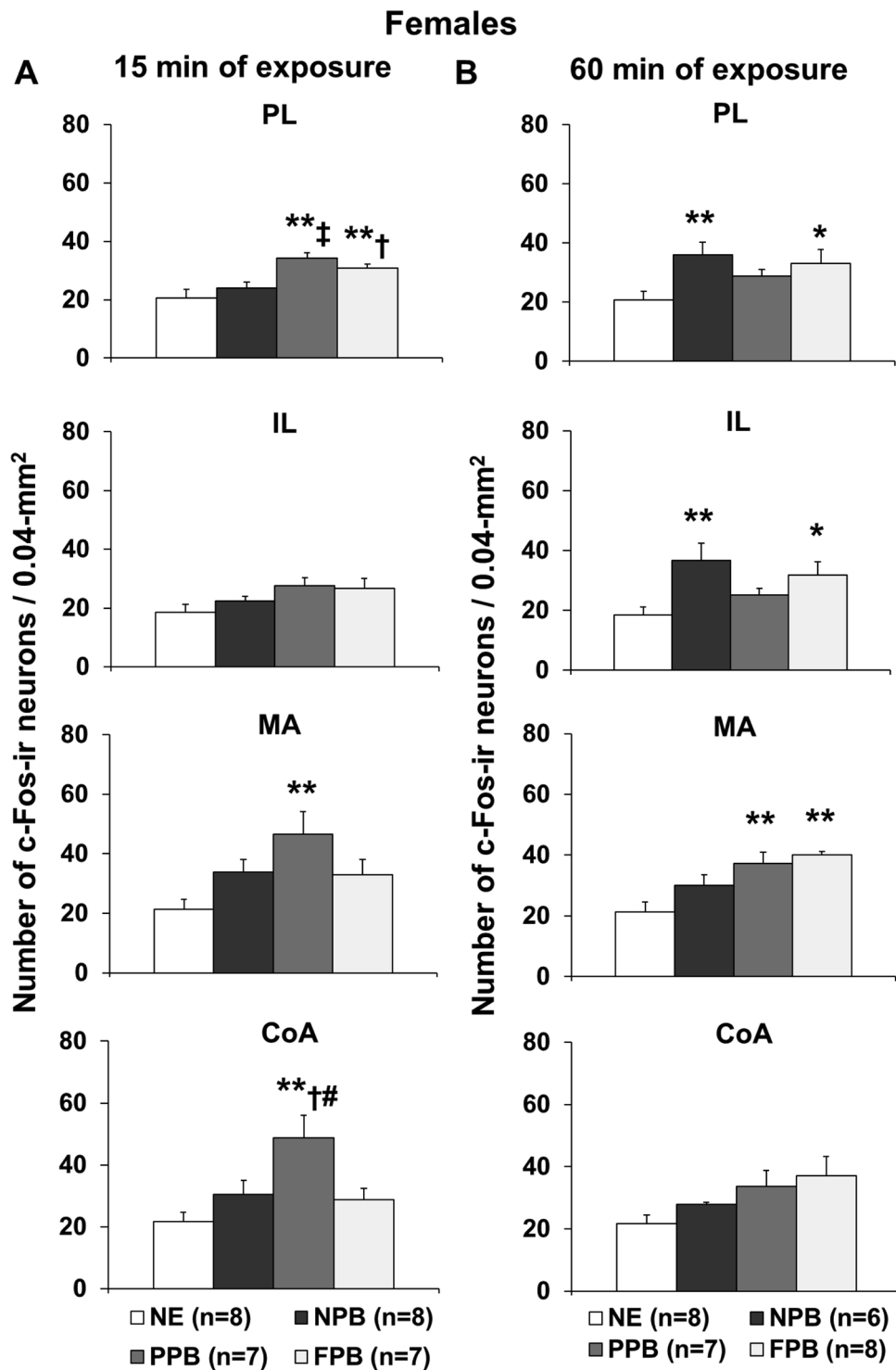


Fig. 3. Number of c-Fos immunoreactive neurons (Mean \pm SEM) in the prelimbic (PL) and infralimbic (IL) cortex, medial amygdala (MA) and cortical amygdala (CoA) of virgin adult female mice exposed to pups for 15 (A) or 60 min (B). NE (non-exposure), NPB (non-parental behavior), PPB (partial parental behavior), FPB (full parental behavior). Statistically significant differences are indicated with * $p < .05$ and ** $p < .01$ vs. NE, † $p < .05$ and ‡ $p < .01$ vs. NPB, and # $p < .01$ vs. FPB, Fisher's post hoc test.

3.3. Groups of animals exposed to pups for 15 min

By definition, all males included in the IB ($n = 7$) group attacked the pups with a latency of 98.3 ± 1.6 s without showing any previous parental response, while in the PPB ($n = 6$) group, 100 % of males licked the pups, 0% retrieved the pups, 83.3 % crouched over the pups, and 16.6 % built a nest during the first 15-min test.

ANOVA analysis revealed no differences among the groups in the PL (Fig. 6A) and IL (Fig. 6A), in the VMHdm (Table 3), VMHc (Table 3), and VMHvl (Table 3), NA core (Table 3) and shell (Table 3); MPOAd (medial; lateral, Table 3), MPN (upper; lower, Table 3), MPOAl (upper; lower, Table 3), and MPOAvl (Table 3).

A significant difference was observed in the number of c-Fos-ir neurons in the CoA ($F = 3.1$, $df = 3$, $p < .05$), but no in the MA ($F =$

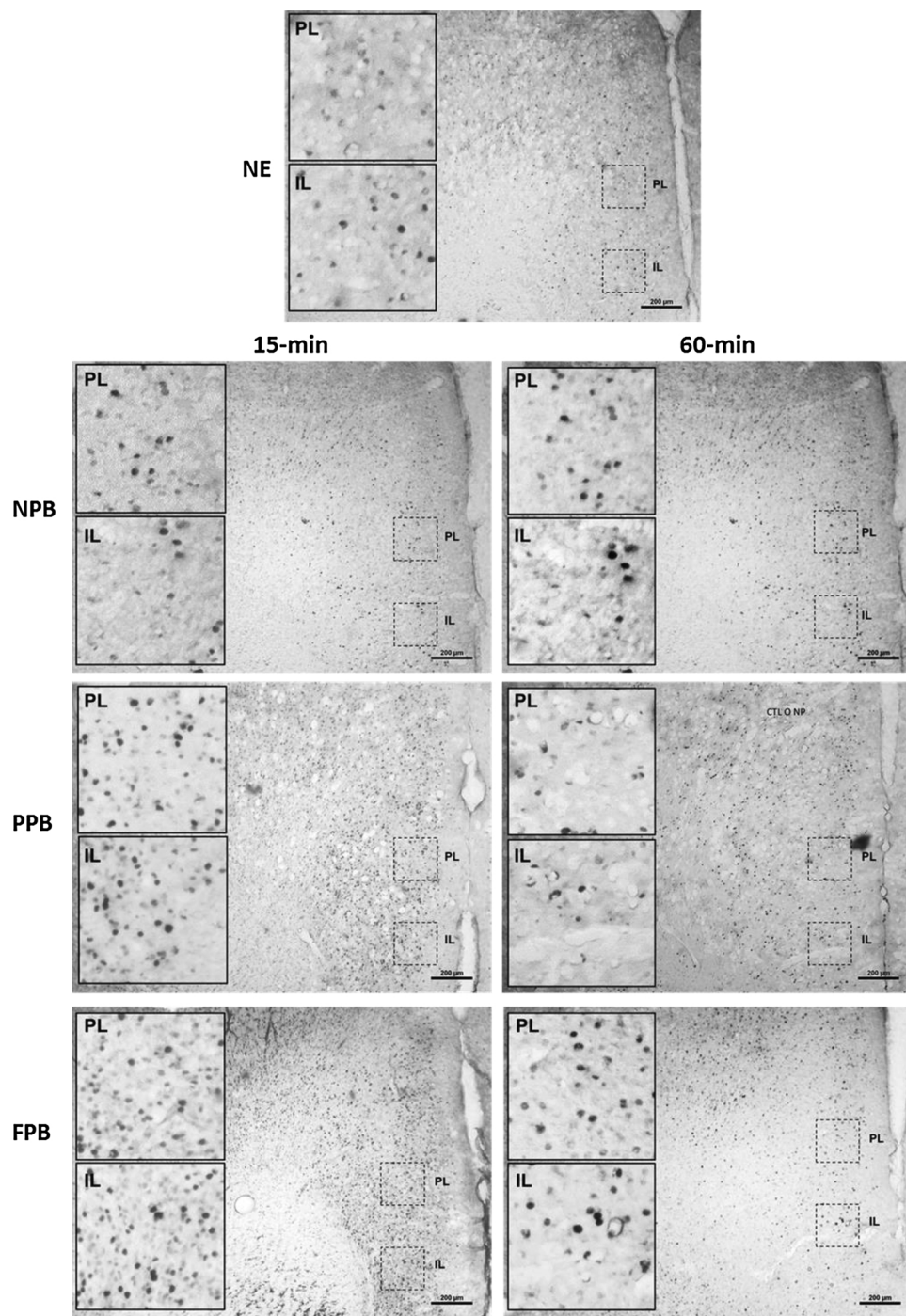


Fig. 4. Representative photomicrographs of c-Fos immunoreactive neurons in the prelimbic (PL) and infralimbic cortex (IL) in adult female mice exposed to pups during 15 (Left) or 60 min (Right). NE (non-exposure), NPB (non-parental behavior), PPB (partial parental behavior), and FPB (full parental behavior). Scale bar is 200 microns.

2.8, $df = 3$, $p = .06$). Males that displayed PPB, showed significantly greater number of c-Fos-ir neurons in the CoA ($p < .03$ vs. NE $n = 7$, $p < .03$ vs. OE $n = 6$, Fig. 6A).

3.4. Groups of animals exposed to pups for 60 min

By definition, all males included in the IB ($n = 8$) group attacked the pups with a latency of 120.9 ± 2.0 s without showing any previous parental response, while in the PPB ($n = 5$) group, 100 % of males licked the pups, 0% retrieved the pups, 80 % crouched over the pups, and 20 % built a nest during the first 15-min test. At the end of the 60-

min test, 40 % of PPB males were found crouching over at least one pup, and one male transported a pup. In the IB group, 75 % of the males were found biting the wire-mesh ball.

There were no significant differences among the groups in the PL (Fig. 6B) and IL (Fig. 6B).

There was a significant difference in the number of c-Fos-ir neurons in the NA shell ($F = 3.4$, $df = 3$, $p < .04$), but not in the core ($F = 1.2$, $df = 3$, $p = .32$) among the groups. Males that displayed IB and were exposed to pups inside the wire-mesh ball, showed higher level of c-Fos in NA shell compared with NE ($n = 7$, $p < .03$, Table 4) and OE ($n = 6$, $p < 0.2$, Table 4) groups.

Table 2
Number of c-Fos immunoreactive neurons in virgin adult females exposed to pups for the first time for 60 min.

Brain area	NE n = 8	NPB n = 6	PPB n = 7	FPB n = 8	F (3,26)	P
NA core	14.8 ± 1.5	25.1 ± 5.2	25.9 ± 3.8 *	31.5 ± 3.9 **	4,0	< .02
NA shell	18.7 ± 1.8	28.7 ± 2.6 *	28.2 ± 3.4 *	32.6 ± 3.2 **	4,7	< .01
VMHdm	15.2 ± 1.3	20.3 ± 1.7	21.1 ± 3.5	25.5 ± 3.6	2,3	ns
VMHc	14.8 ± 1.3	20.2 ± 2.6	21.7 ± 2.4	22.0 ± 2.4	2,4	ns
VMHvl	13.7 ± 1.7	20.4 ± 2.3	21.7 ± 3.0	19.8 ± 2.2	2,4	ns
MPOAd medial	23.8 ± 3.7	31.5 ± 3.7	26.6 ± 2.7	33.9 ± 2.2	2,3	ns
MPOAd lateral	21.8 ± 3.9	29.4 ± 2.8	22.6 ± 1.9	31.6 ± 3.3	2,4	ns
MPN upper	27.9 ± 5.5	30.9 ± 5.4	26.6 ± 2.6	30.9 ± 2.7	0,2	ns
MPN lower	25.0 ± 5.7	20.6 ± 5.7	31.2 ± 4.0	34.0 ± 4.2	1,4	ns
MPOA upper	18.7 ± 3.9	28.2 ± 4.6	22.1 ± 1.4	27.0 ± 3.3	1,6	ns
MPOA lower	19.1 ± 3.8	24.5 ± 3.3	23.4 ± 3.9	28.4 ± 2.2	1,4	ns
MPOAvl	27.5 ± 2.1	38.4 ± 5.3	42.4 ± 7.4	48.3 ± 7.0	2,4	ns

NE (non-exposure), NPB (non-parental behavior), PPB (partial parental behavior), FPB (full parental behavior), NA (Nucleus accumbens), VMH (ventromedial nucleus of the hypothalamus), VMHdm (dorsomedial subdivision of the VMH), VMHc (central subdivision of VMH), VMHvl (ventrolateral subdivision of VMH), MPOA (medial preoptic area), MPOAd (dorsal region of MPOA), MPN (medial preoptic nucleus), MPOAvl (ventrolateral region of MPOA), ns (nonsignificant). Data are expressed as mean ± SEM of number of c-Fos-immunoreactive neurons in 0.04 mm² (NA core, NA shell and subregions of MPOA) or 0.02 mm² (subregions of VMH) samples. F and p values for ANOVA are shown in the last two columns. *p < .04, **p < .01 vs. NE group, Fisher's post hoc test.

The expression of c-Fos in the amygdala (MA F = 3.7, df = 3, p < .03; CoA F = 8.0, df = 3, p < .01) showed significant differences (Fig. 6B) among the groups. Males that displayed PPB showed significantly greater number of c-Fos-ir neurons in the MA (p < .01 vs. NE, Fig. 6B) and CoA (p < .03 vs. NE, p < .03 vs. OE, Fig. 6B). Similarly, males that displayed infanticidal behavior, and were exposed to pups inside the wire-mesh ball, revealed significantly higher levels of c-Fos-ir neurons in the MA (p < .03 vs. NE, Fig. 6B) and CoA (p < .01 vs. NE, p < .01 vs. OE, Fig. 6B).

ANOVA did not reveal any significant difference in the number of c-Fos-ir neurons in the in the VMHdm (Table 4), VMHc (Table 4), VMHvl (Table 4), MPOAd (medial; lateral, Table 4), MPN (upper; lower, Table 4), MPOAl (upper; lower, Table 4) and MPOAvl (Table 4) among the groups.

4. Discussion

In the present study, we investigated which brain regions engaged (increased c-Fos immunoreactivity) in adult inexperienced females and males exposed to pups for the first time (15 or 60 min) when displaying different behavioral responses. Our main contributions consist in showing that a) parental behavior in females was specifically associated with c-Fos expression in the PL during the first 15 min of exposure; b) NA activated non-specifically in response to the presence of the pups; c) MA and CoA activation in females and males that displayed partial parental behavior (PPB) after 15 min of exposure to pups, but also in infanticidal (IB) males (60 min of exposure), suggested that these subregions participated in the transition from non-parental to parental and/or infanticidal behavioral responses; d) higher c-Fos-ir in some of the subregions of the VMH in parental animals compared to NE, but not to the NPB group, revealed also a non-specific activation of these subregions or a different temporal pattern of activation in this area; e) the time of perfusion after pup exposure (1 h) was not sufficient to detect engagement of the MPOA in any behavior; e) there was no activation of c-Fos specifically associated with infanticidal behavior in any of the areas investigated. In the next paragraph, we will discuss our findings for each specific brain region in the context of previous work in mice and other species.

The role of the prefrontal cortex in maternal behavior has gained importance in recent years [13,45,46,49]. The prefrontal cortex is part of the limbic system and has been associated with the processing of emotions, learning, memory and the participation in the temporal organization of the components of parental behavior [13,45,55]. The classic work of Slotnick and Nigrosh [55] showed that electrolytic lesions of the prefrontal cortex in the mouse, including cingulate cortex,

but also PL and IL, led to deficit in parental behavior, during the postpartum period. Moreover, the establishment of preference for offspring associated environments has been associated with higher levels of c-Fos expression in the prefrontal cortex [49]. Besides, inactivation of this area would affect organizational aspects of parental behavior during the postpartum period in the rat [49]. We found that activation of PL was associated with parental animals during the first 15 min of interaction with pups, whereas at 60 min, non-parental animals also showed some increase in the expression of c-Fos both in the PL and IL. Because female mice are induced to display parental behavior very quickly, one possibility is that non-parental animals at 60 min were starting to develop neural changes in the PL or IL cortex to become parental later. Therefore, PL and IL might regulate and/or coordinate temporally the different behavioral components of parental behavior and participate in the decision making or motivational processes that result in the execution of parental behavior [49,55]. These cortical subregions could be key to determine the immediate behavioral response to pups chosen by female mice. Although, c-Fos expression in the PL/IL cortical regions did not reach ANOVA significant difference in males, the PPB also showed higher c-Fos than control during the 15 min exposure. Perhaps if the PPB group were larger, the analysis would have passed the statistical requirement of ANOVA. Previous studies have found that temporal expression of c-Fos in the cortex (faster and shorter) is different from the expression in other areas of the brain [9,36,60]. This is an aspect that need to be considered when analyzing current results.

On the other hand, the NA showed consistent non-specific activation in females exposed to pups, suggesting a neural response associated with the processing of pups related information, regardless of the behavior displayed by the animal. Previous studies in rats have also associated activation of the NA with the novelty of the pups [32,44]. Infanticidal males also showed higher c-Fos in the shell subregion of the NA compared to both control groups (NE and OE). However, after 15 min of exposure to pups, c-Fos expression in the NA appeared to be lower than in females. Perhaps, different subpopulation of neurons could have been engaged in the female and male NA in response to pups. Different population of neurons in the shell has been previously associated with the processing of both rewarding and aversive responses [5]. Therefore, the NA might be involved in the processing of the incentive salience of pup-related stimulus that could result either in parental or infanticidal behavior.

The MA, CoA, and VMH are areas associated with the inhibition of parental behavior in rats. These areas are expected to activate during an aversive or neophobic response to pups. Lesions of the amygdala and the VMH facilitated the induction of parental behavior in rats

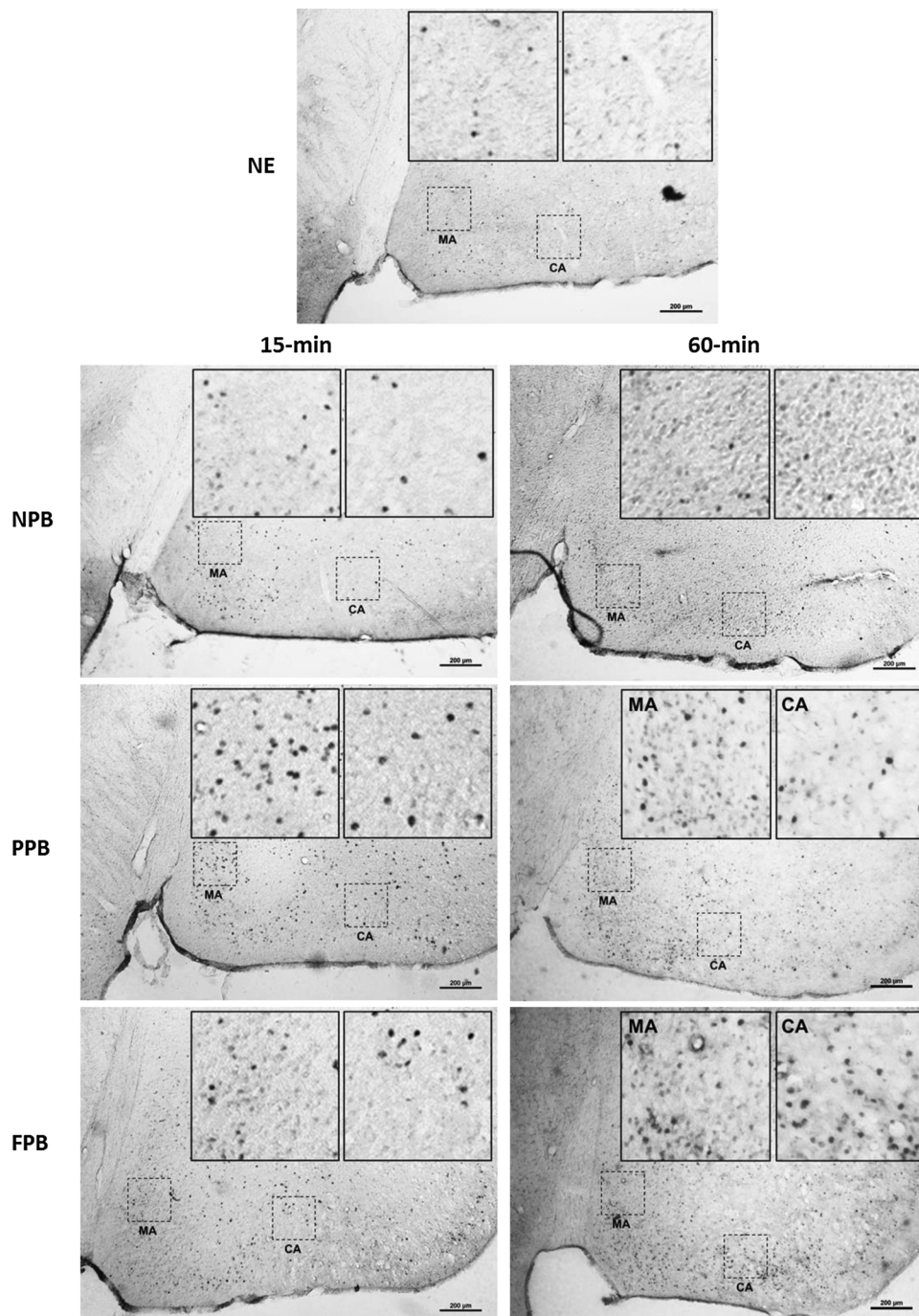


Fig. 5. Representative photomicrographs of c-Fos immunoreactive neurons in the medial (MA) and cortical amygdala (CoA) in virgin female mice exposed to pups during 15 or 60 min. NE (non-exposure), NPB (non-parental behavior), PPB (partial parental behavior), and FPB (full parental behavior). Scale bar is 200 microns.

[6,14,37]. However, the presence of offspring also induced higher c-Fos expression in the CoA/MA of parental female mice and prairie voles [7,23]. Besides, in contrast to rats, lesions of the MA and CoA in prairie voles disrupted parental behavior [23]. In our study, we found an increase in c-Fos expression in the MA and CoA in female and male animals that were partially parental during the first 15 min. However, both maternal females and infanticidal males showed increased c-Fos in these regions of the amygdala after 60 min of exposure. These findings partially agree with previous studies in rats in which non-parental and parental animals showed higher c-Fos in the MA and CoA [42,53]. However, rats and mice differ in how they respond and process pups initially. In contrast to rats, that show a typical approach/withdrawal behavioral response, mice explore pups immediately and intensively,

independent of the final behavioral output. Our findings suggest that in the laboratory mice, MA and CoA might be critical for the normal induction of parental or infanticidal behavior, likely processing critical olfactory information that will trigger one or other behavioral response. However, the activation observed in PPB animals might also represent a conflict or transition period between two potential behavioral responses.

The MPOA is known to be critical for the induction and maintenance of parental behavior in mammals [41,45]. For example, parental behavior is associated with the expression of c-Fos and fosB in the MPOA in lactating rats, prairie voles, laboratory and California mice [7,10,23,24,26,27,42,58]. Sensitized rats also show higher c-Fos expression in MPOA [42,56]. A higher c-Fos expression in the dorsal

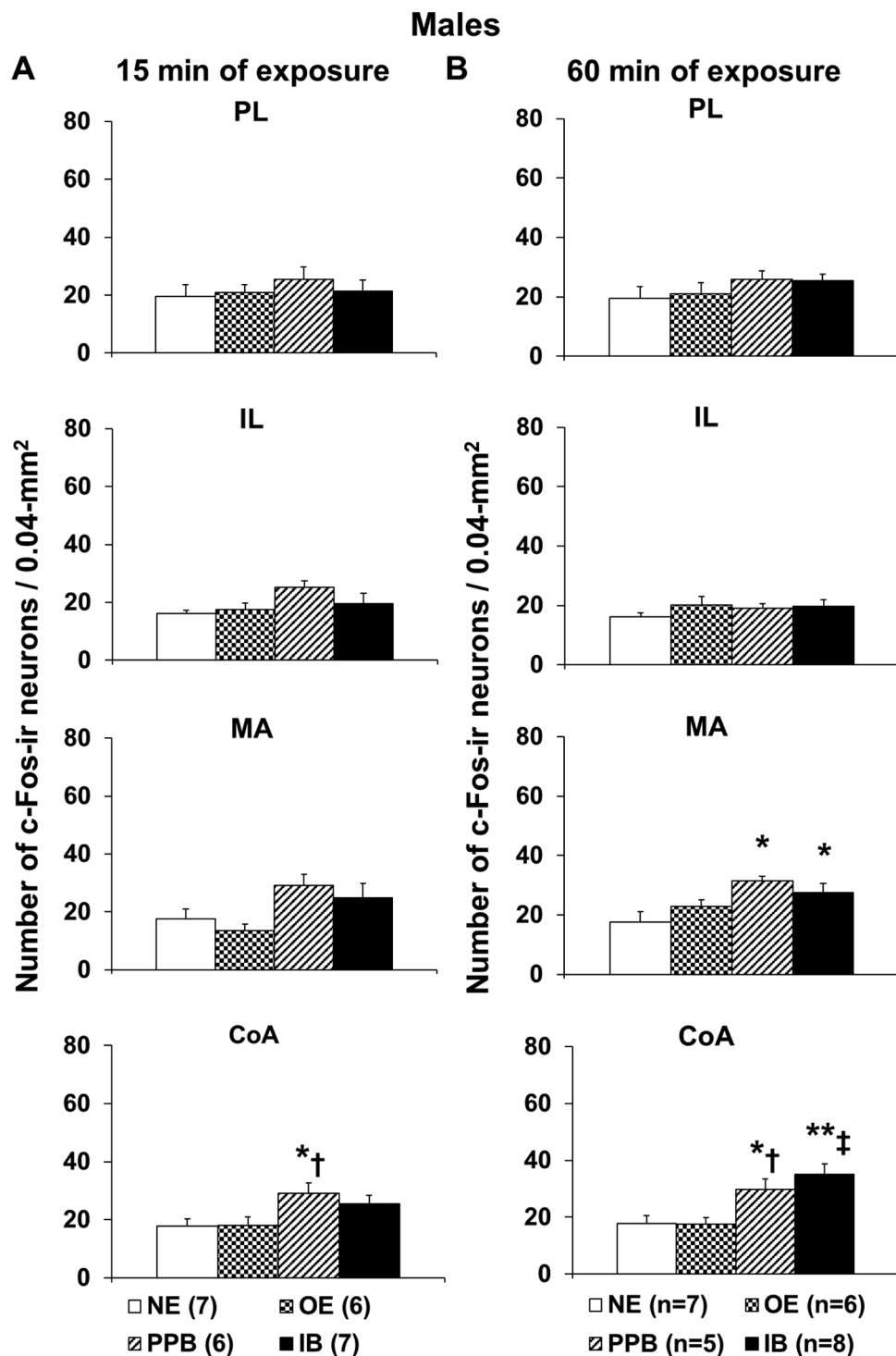


Fig. 6. Number of c-Fos immunoreactive neurons (Mean ± SEM) in the prelimbic (PL) and infralimbic (IL) cortex, medial amygdala (MA) and cortical amygdala (CoA) of virgin adult male mice exposed to pups by 15 (A) or 60 min (B). NE (non-exposure), OE (object exposure), PPB (partial parental behavior), IB (infanticidal behavior). Statistically significant differences are indicated with **p* < .05 and ***p* < .01 vs. NE, †*p* < .05 and ‡*p* < .01 vs. OE, Fisher's post hoc test.

region of the MPOA has been previously associated with parental behavior in pregnant female rats [53] and virgin male mice [24]. Lesions in this brain region also induced transient attacks to pups in maternal virgin female mice [58]. In the present work, we did not find an association between this area of the brain and parental behavior. Tsuneoka et al. [58,59] showed that the central region of the MPOA, similar to the subregion we called MPOAI, was critical to display parental behavior in virgins, mother and father mice. Lesions in that brain subregion disrupted parental behavior in inexperienced, lactating

female and father male mice [58,59], but also in postpartum mothers and fathers of California mice [26,27].

We must note that most previous works in mice did not use, as controls, animals that were exposed to pups but did not display parental behavior. Therefore, it is possible that previous findings were non-specific, something we revealed in the current study adding more groups. Besides, most previous studies sacrificed animals two hours after the exposure to pups, something that might be required to reach detectable levels in the MPOA. The MPOA has a different temporal

Table 3
Number of c-Fos immunoreactive neurons in virgin adult males exposed to pups for the first time for 15 min.

Brain area	NE n = 7	OE n = 6	PPB n = 6	IB n = 7	F (3,22)	P
NA core	12.8 ± 1.9	13.7 ± 1.6	22.0 ± 3.6	17.5 ± 4.1	1,7	ns
NA shell	17.6 ± 1.7	13.7 ± 2.6	23.3 ± 2.5	20.6 ± 4.7	1,5	ns
VMHdm	15.6 ± 2.2	16.5 ± 1.9	14.5 ± 2.0	15.8 ± 1.8	0,1	ns
VMHc	18.4 ± 2.3	17.1 ± 1.4	14.6 ± 2.2	17.0 ± 2.0	0,5	ns
VMHvl	15.7 ± 2.4	18.8 ± 1.2	14.2 ± 0.8	15.9 ± 1.6	1,2	ns
MPOAd medial	26.5 ± 2.1	31.7 ± 3.1	26.8 ± 3.6	36.9 ± 5.5	1,6	ns
MPOAd lateral	24.2 ± 2.0	23.9 ± 2.5	25.3 ± 4.3	25.1 ± 4.0	0,0	ns
MPN upper	26.9 ± 2.4	26.9 ± 3.6	28.4 ± 3.4	31.0 ± 5.6	0,2	ns
MPN lower	29.1 ± 3.5	27.5 ± 2.9	29.9 ± 4.1	29.5 ± 5.2	0,1	ns
MPOA upper	24.9 ± 2.6	23.2 ± 4.8	27.1 ± 5.0	21.6 ± 5.1	0,2	ns
MPOA lower	22.7 ± 3.4	23.0 ± 5.1	28.0 ± 4.3	22.5 ± 5.3	0,3	ns
MPOAvl	26.5 ± 3.3	38.5 ± 6.0	33.0 ± 5.9	39.5 ± 4.9	1,5	ns

NE (non-exposure), OE (object exposure), PPB (partial parental behavior), IB (infanticidal behavior), NA (Nucleus accumbens), VMH (ventromedial nucleus of the hypothalamus), VMHdm (dorsomedial subdivision of the VMH), VMHc (central subdivision of VMH), VMHvl (ventrolateral subdivision of VMH), MPOA (medial preoptic area), MPOAd (dorsal region of MPOA), MPN (medial preoptic nucleus), MPOAvl (ventrolateral region of MPOA), ns (nonsignificant). Data are expressed as mean ± SEM of number of c-Fos-immunoreactive neurons in 0.04 mm² (NA core, NA shell and subregions of MPOA) or 0.02 mm² (subregions of VMH) samples. F and p values for ANOVA are shown in the last two columns.

pattern of expression than the cortical areas [56], and the fast killing and perfusion of the animals in the current experiment (1 h) may not be sufficient to detect differences in this brain region, commonly observed after 2 h of the exposure to pups. Thus, the lack of c-Fos activation in the MPOA does not exclude the participation of this brain region in the onset of parental behavior. We think that virgin mice rely mainly in cortical regions for the selection of the immediate behavioral response and then that information is transferred to the MPOA without a rapid (1 h) or significative activation of c-Fos expression in this region.

We must also note that juvenile rats, that also show rapid induction of parental behavior, do not express c-Fos in the MPOA [21,44]. However, other rodent species that shows rapid onset of parental behavior shows, in some cases, c-Fos in the MPOA but under different experimental conditions. Kirkpatrick et al. [23] found activation in the MPOA, but after 3 h of exposure to pups. These authors also sacrificed the animals 3 h after the stimulus was first presented. In accordance with our results, De Jong et al. [9,11] found that new fathers but not virgin or paired California mouse males showed activation of the medial preoptic nucleus when exposed to pups inside a wire mesh ball compared to an empty ball. Similar to our study, De Jong et al. studies [9,11] used a period of 1 h and 10 min from the time of exposure to pups to the time of sacrifice.

Previous studies also found greater c-Fos activation in the central subdivision of the VMH in non-parental rats compared to maternal or not exposed virgin females [53]. Greater c-Fos activation in the

ventrolateral subdivision of the VMH was also found in non-parental [44], or in both parental and non-parental rats [53], depending of the study, compared to not exposed virgin females. Those results suggested a non-specific activation of the VMH to pup exposure, but also a possible inhibitory role of some of these subregions in parental behavior [44,53]. In addition, greater c-Fos-ir in the VMHvl was found in infanticidal male mice compared to sexually naïve males, or fathers not exposed to pups [57] supporting an inhibitory role of this subregion in parental behavior. In addition, other authors reported the stimulation of the ventrolateral subdivision of the VMH in mice promoted aggression towards males, females or even objects [12,30]. However, we did not find significant differences in the number of c-Fos-ir neurons in any of the subregions of VMH when the four groups were compared. When PPB and FPB were pooled, the analysis of the 60 min exposure revealed a significant increase in c-Fos-ir in the VMHc, and the VMHvl in parental animals that differed only from the NE group. That finding does not support a role for VMHc or the VMHvl in the inhibition of parental behavior in mice, but just a non-specific activation in response to pups, as also found in the VMHvl in a previous study in rats [53]. It is also possible that the VMH, as the MPOA, has a different temporal pattern of expression of c-Fos, and different activation could be found if animals were sacrificed after two hours of testing.

The lack of appropriate control groups in previous studies in mice, the different experimental designs, and the significant behavioral differences that exists in rats, mice and other rodent species make it

Table 4
Number of c-Fos immunoreactive neurons in virgin adult males exposed to pups for the first time for 60 min.

Brain area	NE n = 7	OE n = 6	PPB n = 5	IB n = 8	F (3,22)	P
NA core	12.8 ± 1.9	14.7 ± 1.6	17.1 ± 2.7	17.4 ± 1.7	1,2	ns
NA shell	17.6 ± 1.7	16.9 ± 1.1	23.9 ± 3.0	24.6 ± 2.5 *#	3,4	< .04
VMHdm	15.6 ± 2.2	24.0 ± 2.0	19.3 ± 3.5	21.6 ± 2.0	2,3	ns
VMHc	18.4 ± 2.3	24.1 ± 1.6	22.3 ± 4.4	24.0 ± 1.6	1,3	ns
VMHvl	15.7 ± 2.4	22.8 ± 1.6	21.6 ± 4.2	21.7 ± 2.4	1,9	ns
MPOAd medial	26.5 ± 2.2	23.6 ± 2.3	30.5 ± 4.6	25.3 ± 2.5	0,9	ns
MPOAd lateral	24.2 ± 2.0	22.9 ± 1.3	29.1 ± 2.8	24.3 ± 1.9	1,5	ns
MPN upper	26.9 ± 2.4	22.4 ± 2.4	27.4 ± 4.2	26.2 ± 1.2	0,8	ns
MPN lower	29.1 ± 3.5	20.0 ± 1.4	29.1 ± 5.7	24.8 ± 2.0	1,7	ns
MPOA upper	24.9 ± 2.6	21.5 ± 2.4	27.9 ± 5.4	21.3 ± 0.9	1,2	ns
MPOA lower	22.7 ± 3.4	19.9 ± 1.9	25.0 ± 3.0	23.7 ± 1.6	0,6	ns
MPOAvl	26.5 ± 3.3	28.7 ± 2.9	36.2 ± 2.9	35.7 ± 1.7	2,5	ns

NE (non-exposure), OE (object exposure), PPB (partial parental behavior), IB (infanticidal behavior), NA (Nucleus accumbens), VMH (ventromedial nucleus of the hypothalamus), VMHdm (dorsomedial subdivision of the VMH), VMHc (central subdivision of VMH), VMHvl (ventrolateral subdivision of VMH), MPOA (medial preoptic area), MPOAd (dorsal region of MPOA), MPN (medial preoptic nucleus), MPOAvl (ventrolateral region of MPOA), ns (nonsignificant). Data are expressed as mean ± SEM of number of c-Fos-immunoreactive neurons in 0.04 mm² (NA core, NA shell and subregions of MPOA) or 0.02 mm² (subregions of VMH) samples. F and p values for ANOVA are shown in the last two columns. *p < .03 vs. NE group, #p < 0.02 vs. OE group, Fisher's post hoc test.

necessary to be cautious when translating results from one specie to another. In the current study we show for the first time that the pre-imbic cortex specifically participates in the immediate onset of parental behavior in female mice. We also show for the first time that 15 min of exposure to pups is sufficient to detect associations between c-Fos and behavioral responses to pups. We also highlight the importance of using appropriate control groups to reveal the participation of the brain in the processing of pups, and the expression of parental or infanticidal behavior. Finally, analysis of the temporal engagement of the different brain regions can also reveal new and novel insight about adaptive neural changes that occur and prepare an animal to take rapid behavioral decisions. The different time of sacrifice might differently detect the engagement of brain regions implicated in the onset of parental behavior. If the animals were killed after two hours of testing, perhaps the PL/IL engagement could not be detected due to the rapid pattern of increase and decrease of the expression of the c-Fos protein in those cortical subregions [9]. Although optogenetic approaches are now helping to reveal the neural basis of behavior in mice, classic experimental approaches need also to be considered in order to understand the particularity of mice immediate behavioral responses to pups.

Acknowledgments

The present study was supported by two research grants to D.E.O. and M.A. by the Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC), UdelaR. We thank the staff of the Animal Facility of the Facultad de Medicina for providing care to our animals and the appropriate conditions to carry out these experiments.

References

- [1] M. Alsina-Llanes, V. De Brun, D. Olazábal, Development and expression of maternal behavior in naive female C57BL/6 mice, *Dev. Psychobiol.* 57 (2015) 189–200.
- [2] L. Aquili, A.W. Liu, M. Shindou, T. Shindou, J.R. Wickens, Behavioral flexibility is increased by optogenetic inhibition of neurons in the nucleus accumbens shell during specific time segments, *Learn. Mem.* 21 (2014) 223–231.
- [3] APA Board of Scientific Affairs, Committee on Animal Research and Ethics, Guidelines for Ethical Conduct in the Care and Use of Nonhuman Animals in Research, (2012) Accessed 10 March 2018 <https://www.apa.org/science/leadership/care/guidelines.aspx>.
- [4] R. Avraham, Y. Yarden, Feedback regulation of EGFR signalling: decision making by early and delayed loops, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12 (2011) 104–117.
- [5] K.C. Berridge, 'Liking' and 'wanting' food rewards: brain substrates and roles in eating disorders, *Physiol. Behav.* 97 (2009) 537–550.
- [6] R.S. Bridges, P.E. Mann, J.S. Coppeta, Hypothalamic involvement in the regulation of maternal behavior in the rat: inhibitory roles for the ventromedial hypothalamus and the dorsal/anterior hypothalamic areas, *J. Neuroendocrinol.* 11 (1999) 259–266.
- [7] G. Calamandrei, E.B. Keverne, Differential expression of fos protein in the brain of female mice dependent on pup sensory cues and maternal experience, *Behav. Neurosci.* 108 (1994) 113–120.
- [8] F.A. Champagne, P. Chretien, C.W. Stevenson, T.Y. Zhang, A. Gratton, M.J. Meaney, Variations in nucleus accumbens dopamine associated with individual differences in maternal behavior in the rat, *J. Neurosci.* 24 (2004) 4113–4123.
- [9] W.E. Cullinan, J.P. Herman, D.F. Battaglia, H. Akil, S.J. Watson, Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress, *Neuroscience* 64 (1995) 477–505.
- [10] T.R. De Jong, M. Chauke, B.N. Harris, W. Saltzman, From here to paternity: neural correlates of the onset of paternal behavior in California mice (*Peromyscus californicus*), *Horm. Behav.* 56 (2009) 220–231.
- [11] T.R. De Jong, K.R. Measor, M. Chauke, B.N. Harris, W. Saltzman, Brief pup exposure induces Fos expression in the lateral habenula and serotonergic caudal raphe nucleus of paternally experienced male California mice (*Peromyscus californicus*), *Neuroscience* 169 (2010) 1094–1104.
- [12] A.L. Falkner, P. Dollar, P. Perona, D.J. Anderson, D. Lin, Decoding ventromedial hypothalamic neural activity during male mouse aggression, *J. Neurosci.* 34 (2014) 5971–5984.
- [13] M. Febo, T.L. Stolberg, M. Numan, R.S. Bridges, P. Kulkarni, C.F. Ferris, Nursing stimulation is more than tactile sensation: it is a multisensory experience, *Horm. Behav.* 54 (2) (2008) 330–339.
- [14] A.S. Fleming, F. Vaccarino, C. Luebeck, Amygdaloid inhibition of maternal behavior in the nulliparous female rat, *Physiol. Behav.* 25 (1980) 731–743.
- [15] K.B.J. Frankling, G. Paxinos, *The Mouse Brain*, 3th edition, (2008).
- [16] R. Gandelman, The ontogeny of maternal responsiveness in female Rockland-Swiss albino mice, *Horm. Behav.* 4 (1973) 257–268.
- [17] R. Gandelman, The development of cannibalism in male rockland-swiss mice and the influence of olfactory bulb removal, *Dev. Psychobiol.* 6 (1973) 159–164.
- [18] S. Hansen, A.H. Bergvall, S. Nyireidi, Interaction with pups enhances dopamine release in the ventral striatum of maternal rats: a microdialysis study, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 45 (1993) 673–676.
- [19] N.D. Horrell, J.P. Perea-Rodríguez, B.N. Harris, W. Saltzman, Effects of repeated pup exposure on behavioral, neural, and adrenocortical responses to pups in male California mice (*Peromyscus californicus*), *Horm. Behav.* 90 (2017) 56–63.
- [20] S.P. Hunt, A. Pini, G. Evan, Induction of c-fos like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation, *Nature* 328 (1987) 632–634.
- [21] M. Kalinichev, J.S. Rosenblatt, Y. Nakabeppu, J.I. Morrell, Induction of c-fos-like immunoreactivity reveals forebrain neuronal populations involved differentially in pup-mediated maternal behavior in juvenile and adult rats, *J. Comp. Neurol.* 416 (1) (2000) 45–78.
- [22] S.E. Keer, J.M. Stern, Dopamine receptor blockade in the nucleus accumbens inhibits maternal retrieval and licking, but enhances nursing behavior in lactating rats, *Physiol. Behav.* 67 (1999) 659–669.
- [23] B. Kirkpatrick, J.W. Kim, T.R. Insel, Limbic system fos expression associated with paternal behavior, *Brain Res.* 658 (1994) 112–118.
- [24] K.O. Kuroda, M.J. Meaney, N. Uetani, Y. Fortin, A. Ponton, T. Kato, ERK-FosB signaling in dorsal MPOA neurons plays a major role in the initiation of parental behavior in mice, *Mol. Cell. Neurosci.* 36 (2007) 121–131.
- [25] K.O. Kuroda, K. Tachikawa, S. Yoshida, Y. Tsuneoka, M. Numan, Neuromolecular basis of parental behavior in laboratory mice and rats: with special emphasis on technical issues of using mouse genetics, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 35 (2011) 1205–1231.
- [26] A.W. Lee, R.E. Brown, Medial preoptic lesions disrupt parental behavior in both male and female California mice (*Peromyscus californicus*), *Behav. Neurosci.* 116 (2002) 968–975.
- [27] A.W. Lee, R.E. Brown, Comparison of medial preoptic, amygdala, and nucleus accumbens lesions on parental behavior in California mice (*Peromyscus californicus*), *Physiol. Behav.* 92 (2007) 617–628.
- [28] M. Li, A.S. Fleming, The nucleus accumbens shell is critical for normal expression of pup-retrieval in postpartum female rats, *Behav. Brain Res.* 145 (2003) 99–111.
- [29] M. Li, A.S. Fleming, Differential involvement of nucleus accumbens shell and core subregions in maternal memory in postpartum female rats, *Behav. Neurosci.* 117 (2003) 426–445.
- [30] D. Lin, M.P. Boyle, P. Dollar, H. Lee, E.S. Lein, P. Perona, D.J. Anderson, Functional identification of an aggression locus in the mouse hypothalamus, *Nature* 470 (2011) 221–226.
- [31] J.S. Lonstein, G.J. De Vries, Sex differences in the parental behavior of rodents, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 24 (2000) 669–686.
- [32] J.S. Lonstein, D.A. Simmons, J.M. Swann, J.M. Stern, Forebrain expression of c-fos due to active maternal behaviour in lactating rats, *Neuroscience* 82 (1998) 267–281.
- [33] B.K. Lucas, C.J. Ormandy, N. Binart, R.S. Bridges, P.A. Kelly, Null mutation of the prolactin receptor gene produces a defect in maternal behavior, *Endocrinology* 139 (1998) 4102–4107.
- [34] G.J. Mogenson, D.L. Jones, C.Y. Yim, From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system, *Prog. Neurobiol.* 14 (1980) 69–97.
- [35] J.I. Morgan, T. Curran, Stimulus-transcription coupling in neurons: role of cellular immediate early genes, *Trends Neurosci.* 12 (1989) 459–491.
- [36] J.L. Morgan, D.R. Cohen, J.L. Hempstead, T. Curran, Mapping pattern of c-fos expression in the central nervous system after seizure, *Science* 237 (1987) 192–196.
- [37] H.D. Morgan, J.A. Watchouk, A.S. Fleming, The effects of electrical stimulation of the medial preoptic area and the medial amygdala on maternal responsiveness in female rats, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 807 (1997) 602–605.
- [38] E. Noirot, Changes in responsiveness to young in the adult mouse: V. Priming, *Anim. Behav.* 17 (1969) 542–546.
- [39] E. Noirot, The onset and development of maternal behavior in rat, hamster and mice, *Adv. Study Behav.* 4 (1972) 107–145.
- [40] M. Numan, A.S. Fleming, F. Lévy, Maternal behavior, in: J.D. Neill (Ed.), Ed.), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Elsevier, San Diego, 2006, pp. 1921–1993.
- [41] M. Numan, T.R. Insel, *The Neurobiology of Parental Behavior*, Springer-Verlag, New York, 2003, pp. 69–106.
- [42] M. Numan, M.J. Numan, Expression of Fos-Like Immunoreactivity in the Preoptic Area of maternally behaving virgin and postpartum rats, *Behav. Neurosci.* 108 (2) (1994) 379–394.
- [43] D.E. Olazábal, M. Alsina-Llanes, Are age and sex differences in brain oxytocin receptors related to maternal and infanticidal behavior in naive mice? *Horm. Behav.* 77 (2016) 132–140.
- [44] D.E. Olazábal, J.I. Morrell, Juvenile rats show immature neuronal patterns of c-Fos expression to first pup exposure, *Behav. Neurosci.* 119 (2005) 1097–1110.
- [45] D.E. Olazábal, M. Pereira, D. Agrati, A. Ferreira, A.S. Fleming, G. González-Mariscal, F. Levy, A.B. Lucion, J.I. Morrell, M. Numan, N. Uriarte, Flexibility and adaptation of the neural substrate that supports maternal behavior in mammals, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 37 (2013) 1875–1892.
- [46] D.E. Olazábal, M. Pereira, D. Agrati, A. Ferreira, A.S. Fleming, G. González-Mariscal, F. Lévy, A.B. Lucion, J.I. Morrell, M. Numan, N. Uriarte, New theoretical and experimental approaches on maternal motivation in mammals, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 37 (2013) 1860–1874.
- [47] D.E. Olazábal, L.J. Young, Species and individual differences in juvenile female alloparental care are associated with oxytocin receptor density in the striatum and the lateral septum, *Horm. Behav.* 49 (2006) 681–687.
- [48] D.E. Olazábal, L.J. Young, Oxytocin receptors in the nucleus accumbens facilitate

- “spontaneous” maternal behavior in adult female prairie voles, *Neuroscience* 141 (2006) 559–568.
- [49] M. Pereira, J.I. Morrell, Functional mapping of the neural circuitry of rat maternal motivation: effects of site-specific transient neural inactivation, *J. Neuroendocrinol.* 23 (2011) 1020–1035.
- [50] D. Riga, M.R. Matos, A. Glas, A.B. Smit, S. Spijker, M.C. Van den Oever, Optogenetic dissection of medial prefrontal cortex circuitry, *Front. Syst. Neurosci.* 8 (230) (2014).
- [51] R.L. Roberts, J.R. Williams, A.K. Wang, C.S. Carter, Cooperative breeding and monogamy in prairie voles: influence of the sire and geographical variation, *Anim. Behav.* 55 (1998) 1131–1140.
- [52] J.S. Rosenblatt, Nonhormonal basis of maternal behavior in the rat, *Science* 156 (1967) 1512–1514.
- [53] T.P. Sheehan, J. Cirrito, M.J. Numan, M. Numan, Using c-fos immunocytochemistry to identify forebrain regions that may inhibit maternal behavior in rats, *Behav. Neurosci.* 114 (2000) 337–352.
- [54] M. Sheng, M.E. Greenberg, The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system, *Neuron* 4 (1990) 477–485.
- [55] B.M. Slotnick, B.J. Nigrosh, Maternal behaviour of mice with cingulate cortical, amygdala, or septal lesions, *J. Comp. Physiol. Psychol.* 1 (1975) 118–127.
- [56] E.C. Stack, M. Numan, 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, *Behav. Neurosci.* 114 (2000) 609–622.
- [57] K.S. Tachikawa, Y. Yoshihara, K.O. Kuroda, Behavioral transition from attack to parenting in male mice: a crucial role of the vomeronasal system, *J. Neurosci.* 33 (2013) 5120–5126.
- [58] Y. Tsuneoka, T. Maruyama, S. Yoshida, K. Nishimori, T. Kato, M. Numan, K.O. Kuroda, Functional, anatomical, and neurochemical differentiation of medial preoptic area subregions in relation to maternal behavior in the mouse, *J. Comp. Neurol.* 521 (2013) 1633–1663.
- [59] Y. Tsuneoka, K. Tokita, C. Yoshihara, T. Amano, G. Esposito, A.J. Huang, L.M. Yu, Y. Odaka, K. Shinozuka, T.J. McHugh, K.O. Kuroda, Distinct preoptic-BST nuclei dissociate paternal and infanticidal behavior in mice, *EMBO J.* 34 (2015) 2652–2670.
- [60] B. Ziólkowska, A. Gieryk, W. Solecki, R. Przewłocki, Temporal and anatomic patterns of immediate-early gene expression in the forebrain of C57BL/6 and DBA/2 mice after morphine administration, *Neuroscience* 22 (2015) 107–124.

NMDA Lesions in the Prefrontal Cortex Delay the Onset of Maternal, but Not Infanticidal Behavior in Pup-Naïve Adult Mice (C57BL/6)

Marcela Alsina-Llanes and Daniel E. Olazábal
Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UdeLaR

While most pup-naïve adult female mice can display, or be induced (by repeated exposure to pups) to display parental behavior rapidly, adult males are infanticidal or nonparental. The medial prefrontal cortex (mPFC) participates in attentional selection, decision-making, behavioral flexibility, and planning that may be critical in the rapid display of parental or infanticidal behavior. We investigated if NMDA-induced lesions in the mPFC (targeting prelimbic cortex) inhibited maternal or infanticidal behavior in pup-naïve adult female and male mice (C57BL/6), respectively. All Control females displayed full maternal behavior at the first encounter with pups. Lesioned female groups were partially maternal (50%) or nonmaternal (50%). Five repeated exposures of 60-min to pups were needed to induce full maternal behavior in female NMDA-lesioned groups. Control and lesioned males did not show significant differences. Control males displayed nonparental (17%) or infanticidal (83%) behavior, while all lesioned males were infanticidal. There was no difference in general locomotor and exploratory activity (i.e., peripheral crosses, rearings, immobility time) in female or male groups. Nevertheless, females and males of lesioned groups showed a reduction in the number of central crosses and time in the central area of an open field respectively, suggesting an increase in anxiety. Our results show that the mPFC is engaged in the rapid onset of maternal behavior in females, contributing with the motivation and planning of its rapid execution, or reducing the anxiety to the first encounter with pups. In contrast, infanticidal behavior, likely a more impulsive behavior, might require less planning from the mPFC.

Keywords: lesions, prefrontal cortex, parental, infanticidal, mice

Pup-naïve virgin mice show significant variability in their immediate behavioral response toward pups. Most pup-naïve virgin adult female mice can display maternal behavior or sensitize (be induced to display parental behavior by repeated exposure to pups) rapidly; however, pup-naïve virgin adult males are mostly infanticidal or nonparental (Alsina-Llanes et al., 2015; Olazábal & Alsina-Llanes, 2016). This variability offers an opportunity to determine which brain areas participate in the motivation, planning, and execution of these different behaviors, triggered by the exposure to the same stimulus (i.e., pups).

The neural circuitry that supports the expression or inhibition of parental behavior has been studied in various species of mammals (Numan & Insel, 2003; Olazábal et al., 2013a, 2013b). Brain areas such as the medial preoptic area (MPOA) and the bed nucleus of stria terminalis (BNST), among other subcortical brain regions, are classically associated with the induction/maintenance of parental behavior, while some subregions of the amygdala and the hypothalamus (ventromedial nucleus of the hypothalamus) to its inhibition

(Numan & Insel, 2003; Numan et al., 1977, 2005; Olazábal et al., 2013a, 2013b). Less is known about the areas of the brain that participate in infanticidal behavior, triggered by the same stimulus as maternal behavior (Alsina-Llanes & Olazábal, 2020; Tachikawa et al., 2013; Tsuneoka et al., 2015).

The medial prefrontal cortex (mPFC) and other associated prefrontal areas have also been involved in the control of maternal behavior (Afonso et al., 2007; Febo, 2012; Febo et al., 2010; Febo et al., 2008; Pereira & Morrell, 2011; Slotnick, 1967; Slotnick & Nigrosh, 1975). These brain regions play also a range of cognitive functions, including control of other motivated behaviors, participation in attentional selection, decision-making, behavioral flexibility, and planning (Afonso et al., 2007; Berridge, 2009; Febo, 2012; Febo et al., 2008, 2010; Olazábal et al., 2013a, 2013b; Pereira & Morrell, 2011; Peters et al., 2005; Robbins & Everitt, 1996; Robinson et al., 2011). For example, excitotoxic lesions of mPFC resulted in a reduction in sexual motivation and impaired the temporal sequences of maternal behavior components in lactating rats (Afonso et al., 2007). Moreover, Pereira and Morrell (2011) suggested a specific engagement of the infralimbic (IL) and prelimbic (PL) subregions of the mPFC in the behavioral flexibility of rats during the postpartum period. Slotnick (1967) and Slotnick and Nigrosh (1975), working in lactating female rats and mice, also showed that electrolytic lesions that included the mPFC and posterior cingulate cortex, damaging fibers of passage, induced longer latency to retrieve pups without other significant effects on maternal behavior.

Recently, our laboratory found that female mice that displayed immediate maternal behavior expressed significantly higher levels of c-Fos in the PL (Alsina-Llanes & Olazábal, 2020). This increased c-Fos expression was specific to maternal females (compared with

Daniel E. Olazábal  <https://orcid.org/0000-0002-6133-9804>

This work was supported by the Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC), UdeLaR (No. 1252 to MA and DEO). We thank the staff of the Animal Facility of the Facultad de Medicina for providing care to our animals and the appropriate conditions to carry out these experiments.

Correspondence concerning this article should be addressed to Daniel E. Olazábal, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UdeLaR, Av. Gral. Flores 2125, Montevideo 11800, Uruguay. Email: dolazabal@fmed.edu.uy

nonmaternal females exposed to pups), suggesting that the PL might participate in the immediate onset of maternal behavior in pup-naïve female mice. Males that displayed infanticidal behavior did not show increased activation of c-Fos in this brain region, suggesting that the PL displayed a different role in the onset of maternal and infanticidal behavior.

In the current study, we investigated whether lesions in the mPFC affected differently the onset and expression of maternal and infanticidal behavior in pup-naïve mice exposed to pups for the first time. We hypothesized that maternal and infanticidal behavior, triggered by the same stimulus (pups) but processed differently in the brain, would be differently affected by neurotoxic lesions of the mPFC. That is, NMDA lesions of the mPFC would affect the rapid decision to display maternal, but not infanticidal behavior (likely a more impulsive behavioral response).

Materials and Methods

Subjects and Care

Animals used in this experiment, C57BL/6 mice, were originally obtained from Jackson Laboratory and were bred in the animal facility of the Facultad de Medicina (UdelaR, Montevideo, Uruguay). All animal experimentation procedures were approved by the local Committee of Ethics of Facultad de Medicina (Protocol 174, May 2015) and carried out in accordance with the “Guidelines for Ethical Conduct in the Care and Use of Nonhuman Animals” (2012). Animals were kept in our breeding colony under controlled conditions (12:12 hr light–dark cycle, light on at 6:00 a.m., at 22 °C, and ad libitum access to water and food) in standard cage of 45 cm × 25 cm × 15 cm with transparent Plexiglas walls and wood shaving. Groups of two females were mated with a male during 1 week to be used as pup donors or to provide animals for the experiments. On the week of expected delivery, females were daily observed and dates of delivery were recorded. All experimental subjects were weaned at 20–21 days of age and maintained in groups of six to eight same-sex per cage until used in the experiment at 60–120 days of age.

Experimental Design

First of all, in our first experiment, females ($n = 6$) were injected bilaterally into each hemisphere with 0.4 μL of a solution containing 10 μg of NMDA (*N*-methyl-D-aspartic acid; Sigma-Aldrich) into the mPFC or 0.4 μL of vehicle (25 mM phosphate-buffered saline [PBS] solution, sham lesion, $n = 5$). Because lesions were large and extended to other brain regions, a second group of females ($n = 6$) was injected bilaterally with 0.2 μL of a solution containing 5 μg of NMDA into the mPFC to induce a smaller lesions, and another control group of females were only submitted to anesthesia and surgery with no brain injection (control surgery, $n = 5$) to rule out a possible mechanical effect due to the lowering of the needle.

Because no significant differences were found between the sham (0.4 μL) and the control group in any of the behaviors analyzed, we pooled them into a single group. Control-lesioned females ($n = 10$), that was compared with both experimental groups (10 and 5 μg).

In addition, males were also injected with 0.2 μL of the vehicle (Control-lesioned males, $n = 6$), or 0.2 μL of the neurotoxin (NMDA-lesioned males, $n = 7$) solution containing 5 μg of

NMDA. We choose to inject only 0.2 μL to reduce the area affected by the lesion.

Stereotaxic Surgery

Mice were anesthetized with ketamine (100 mg/kg i.p.) and xylazine (20 mg/kg i.p.) mixture and securely placed in a Kopf stereotaxic instrument adjusting lambda and bregma so that they lay in the same horizontal plane. After that, we incised the skin exposing the skull and made two holes in the skull through which a Hamilton syringe of 0.5 μL (26-gauge stainless steel) was aimed at the PL subregion of the mPFC. Coordinates, taken from the mouse brain atlas (Franklin & Paxinos, 2008), were AP 2.0 mm; L 0.3 mm; and DV 2.5 mm.

After the surgery, all subjects were individually housed in Plexiglas testing cages (27 cm × 21 cm × 14 cm, 370 cm² of area) and were allowed to recover during 3–5 days without any disturbance until the behavioral test (see Figure 1).

Behavioral Test

The same cage used for the animal recovery was also used for the behavioral test. On the day of the test, two pups (1–3 days of age) were placed in the corner of the cage opposite to where the animal had the nest, and the behavior recorded during 15 min. We recorded the main components of parental behavior: latencies, frequencies and durations of sniffing, retrieval/transport, licking/grooming, crouching posture, nest building; or latency to attack the pups in the case of infanticidal behavior.

Animals were then included in one of four categories: (a) full parental behavior if they retrieved at least one pup, licked the pups (≥ 60 s), performed crouching posture (active or passive) over at least one pup (≥ 30 s), and built a nest around or above the pups (≥ 60 s); (b) partial parental behavior if displayed two or three of the behavioral components mentioned above; (c) nonparental behavior if only displayed one or none of the components of parental behavior; or (d) infanticidal behavior if they attacked the pups. In case the subject attacked the pups, the test was immediately stopped and pups were sacrificed. All behavioral test were made during light phase and using the free software <http://www.cbn-atl.org/research/stopwatch.shtml>.

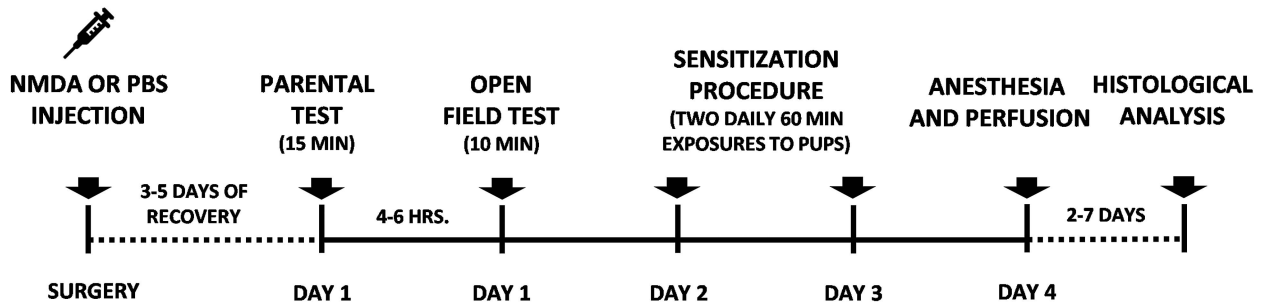
The following days, all females were again exposed to pups for 60 min twice a day (6–8 hr of interval), until they displayed full maternal behavior for two consecutive tests (sensitization procedure; see Figure 1).

Measures of Locomotor Activity and Exploratory Behavior

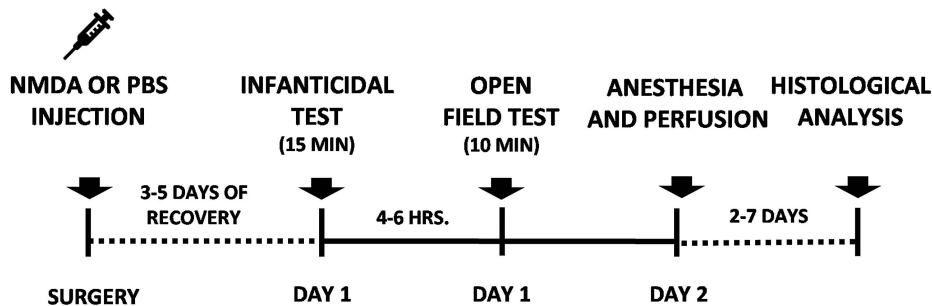
The health and general activity of subjects were investigated in order to identify nonspecific behavioral effects induced by the surgery or the lesion. An open field apparatus was constructed of transparent Plexiglas walls 40 cm × 40 cm × 40 cm. The lower edge of the walls was covered with a black strip of 10 cm wide. In order to subdivide the arena in four equal square of 20 cm × 20 cm and a central square (16 cm × 16 cm), a paper was drawn and placed under the arena floor. Thus, the arena was separated in a central and a peripheral zone.

Figure 1
Schematic Representation of Experimental Design

FEMALE GROUPS



MALE GROUPS



The behavior of the mice was recorded with a webcam (Logitech, HD Pro webcam C920) and acquired with the free software OBS studio (Open Broadcaster, 23.2.1, 2016). After 5 min of habituation to the arena, the following behaviors were recorded during 10 min (see Figure 1): number of rearings, number of central and peripheral crosses, time of immobility, time in the central area, and time performing autogrooming. The open field maze was cleaned before each test using 70% ethyl alcohol.

Histological Analysis

After all behavioral tests, subjects were deeply anesthetized with ketamine (100 mg/kg i.p.) and xylazine (20 mg/kg i.p.) mixture, injected in the left ventricle of the heart with 0.1 mL heparin (1,000 units/mL), and transcardially perfused with 50 mL of cold PBS, followed of 100 mL of cold 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS. The brains were removed, stored in fresh 4% PFA during 24 hr, and then in 15% sucrose-PBS for 24–48 hr until cryosection. Four series of thin 30 μ m sections around the area of interest were collected using a cryostat. One of the series was mounted on slides, and later stained with cresyl violet (C5042; Sigma-Aldrich) to evaluate the location and extension of the lesion. The other three series were stored at -20°C in a cryoprotectant solution for further analysis by immunohistochemistry for NeuN (PA5-37407, rabbit polyclonal antibody; Thermo Fisher Scientific).

The immunohistochemistry assay was performed according to standard procedures previously published by our laboratory

(Alsina-Llanes & Olazábal, 2020; Olazábal & Morrell, 2005) with minor modifications. Briefly, the sections were removed from the freezer and left at room temperature for 1 hr, washed with PBS, and placed in 2% H_2O_2 with 10% methanol in PBS during 15 min to block endogenous peroxidase. The slices were also blocked by incubation in 0.3% Triton X100-PBS and 4% normal goat serum (Vector Laboratory, CA) for 1 hr. Sections were then incubated with the primary antibody against NeuN diluted (1:15,000) in a 1% solution of normal goat serum in PBS at 4°C for 16–18 hr. Then rinses with PBS were made, and the sections incubated in biotinylated goat anti-rabbit secondary antibody (Vector Laboratories, CA) diluted (1:200) for 1 hr. Sections were washed with PBS and incubated in avidin-biotin complex reagent (ABC Elite Kit, Vector Laboratories, CA) for 1 hr. After washing the tissue in PBS and 100 mM sodium acetate buffer, the visualization reaction was made using a solution of nickel sulfate, diaminobenzidine (DAB), and hydrogen peroxide in sodium acetate buffer during 2.5 min. The reaction was stopped by rinsing the sections in acetate buffer followed by rinses in 25 mM PBS. Sections were mounted on chrome alum-coated slides, air dried, dehydrated in graded alcohols, and coverslipped. Different experimental groups were processed simultaneously on the same assay to count for the variability among assays.

The microscopic analysis around the area of interest was made under a Nikon Optiphot microscope (Nikon Corporation, Tokyo, Japan) equipped with a Nikon DS-2M digital camera (Nikon Instruments Inc., Melville, NY, USA). The lesion was identified

by the absence of neurons labeled with NeuN or cresyl violet staining (Cholvin et al., 2018). The placement of the needle and the rostral-to-caudal extent of each lesion were drawn on frontal plane diagrams of the brain. Area measurements for each section and brain region were calculated using the ImageJ 1.52a software (NIH, National Institute of Health, USA). The area of the lesion and the extent in rostral-to-caudal plane were used to determine the volume of the lesions for the PL, IL, and anterior cingulate cortex 1 (Cg1; see Table 1; Corodimas et al., 1993; Olazábal et al., 2002).

Statistical Analysis

Behavioral data were checked for normality (Shapiro–Wilk test) and homogeneity of variance (Levene’s test). If data passed those requirements, it was analyzed by parametric statistic (T test) and expressed as means \pm SE . In case data did not pass those requirements, we applied nonparametric Kruskal–Wallis test followed by Mann–Whitney U for independent data. Chi-square test was applied to analyze the frequency of behaviors between the groups (IBM SPSS statistics 22 package). Statistical significance level established in all cases was $p < .05$.

Results

Experiment I: Effects of NMDA Lesions in the mPFC on the Onset of Maternal Behavior in Females

Histological Analysis

Analysis of the size of the lesions in the mPFC (see Table 1) revealed that 10 μ g of NMDA damaged $75.4 \pm 5.8\%$, $86.5 \pm 8.6\%$, and $47.0 \pm 7.9\%$ of the Cg1, PL, and IL, respectively, as well as $65.0 \pm 5.7\%$ of Cingulate cortex 2 (Cg2). On the contrary, lesions in the mPFC that used 5 μ g in 0.2 μ L damaged about $20.7 \pm 2.6\%$ and $11.1 \pm 3.9\%$ of Cg1 and PL, respectively, and it did not extend to other areas of mPFC such as IL and Cg2.

In some cases (all animals of 10 μ g; four of six animals of 5 μ g), the lesioned area extended partially to orbital cortex (10 μ g $<$ 50%), frontal association cortex (10 μ g $<$ 15%; 5 μ g $<$ 5%), and secondary motor cortex (10 μ g $<$ 60%; 5 μ g $<$ 13%). In only one animal of each group, the lesion extended to primary motor cortex (less than 5% of damage). No lesion extended ventrally to corpus callosum or areas such as lateral septum. Reconstructions of the extension of the lesions are shown in the diagrams of representative brain sections (Figure 2a,b; Figure 6a,b).

Behavioral Response to Pups

The incidence of maternal behavior was significantly higher in the Control group compared with both 10 μ g and 5 μ g NMDA-lesioned groups ($\chi^2 = 16.0$, $p < .01$; Figure 3, upper a and b). All Control females displayed full maternal behavior during the 15 min test. However, females with 10 μ g or 5 μ g NMDA lesions in the mPFC exhibited partial (50%) and nonparental behavior (50%) when exposed to pups for the first time (Figure 3, upper a and b). Five 60 min repeated exposures to pups were needed to induce full maternal behavior in all females from NMDA-lesioned groups (Figure 3, down a and b). At the third exposure to pups, the percentage of females that displayed full maternal behavior was higher in the 5 μ g than in the 10 μ g NMDA-lesioned group ($\chi^2 = 4.0$, $p < .05$; Figure 3, down a and b).

The analysis of the different behavioral components of maternal behavior (licking, retrieving, crouching posture, and nest building; Table 2) revealed that licking was not different among the groups. The percentage of Control females that retrieved pups (100%) was significantly higher than the 5 μ g (0%; $\chi^2 = 16.0$, $p < .01$) or 10 μ g (0%; $\chi^2 = 16.0$, $p < .01$) NMDA-lesioned females. The Control group adopted crouching posture more often ($U = 6.5$, $p < .05$ vs. 5 μ g group) and for longer period of time ($U = 11.0$, $p < .05$ vs. 10 μ g) than NMDA-lesioned groups. Moreover, Control females also built nest more often ($U = 10.0$, $p < .05$ vs. 5 μ g group; $U = .0$, $p < .05$ vs. 10 μ g group) and for longer period of time ($U = 7.0$, $p < .05$ vs. 5 μ g group; $U = .0$, $p < .05$ vs. 10 μ g group) than NMDA-lesioned females.

We also analyzed the sequence of all behavioral components of maternal behavior (sniffing, licking, retrieval, crouching postures, and nest building) when animals exhibited all behavioral components of maternal behavior by the first time. The flow diagrams for frequencies of each behavior and its transitions did not differ when maternal control and lesioned animals were compared (data not shown).

General Exploratory Activity

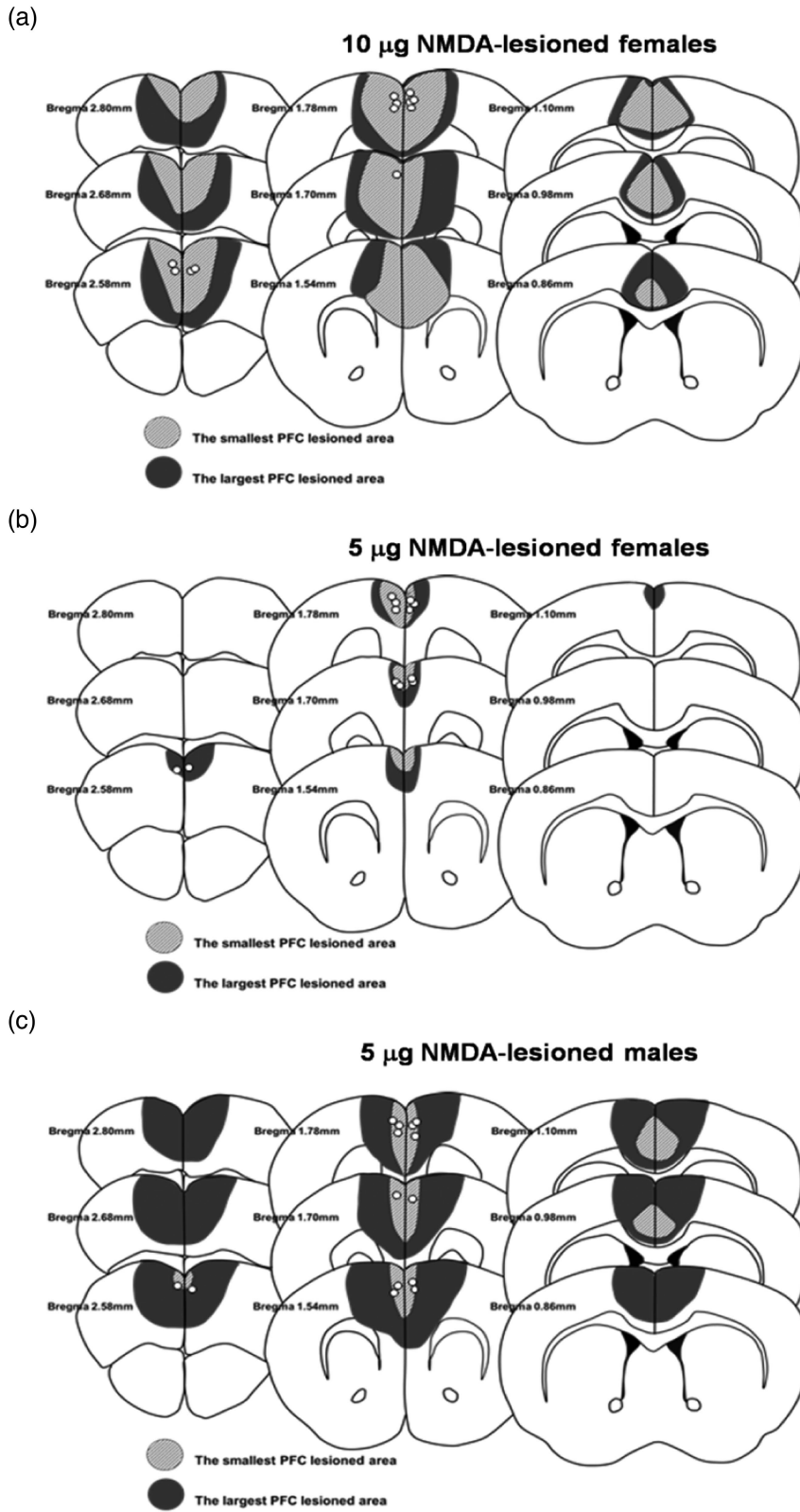
Females with NMDA lesions in the mPFC (10 or 5 μ g lesions) performed less number of central crosses (10 μ g $t = 2.3$, $p < .05$; 5 μ g $t = 3.1$, $p < .05$, respectively) than the Control females (Figure 4a,b). No significant differences were found in any of the other measured variables (Figure 4a,b).

Table 1
Volume of the Lesions and Percentage Damaged

	10 μ g NMDA-lesioned females	5 μ g NMDA-lesioned females	5 μ g NMDA-lesioned males
Total brain volume lesioned (mm ³)	7.28 \pm 0.67	0.98 \pm 0.17	4.58 \pm 1.16
Volume of the Cg1 lesioned (mm ³)	1.46 \pm 0.11	0.40 \pm 0.05	1.22 \pm 0.20
Percentage of Cg1 lesioned (%)	75.4 \pm 5.8	20.7 \pm 2.6	62.1 \pm 10.1
Volume of the PL lesioned (mm ³)	1.53 \pm 0.17	0.19 \pm 0.07	0.94 \pm 0.22
Percentage of PL lesioned (%)	86.5 \pm 8.6	11.1 \pm 3.9	54.4 \pm 12.4
Volume of the IL lesioned (mm ³)	0.27 \pm 0.04	0.00 \pm 0.00	0.08 \pm 0.04
Percentage of IL lesioned (%)	47.0 \pm 7.9	0.0 \pm 0.0	14.8 \pm 7.4

Data are expressed means \pm SE .

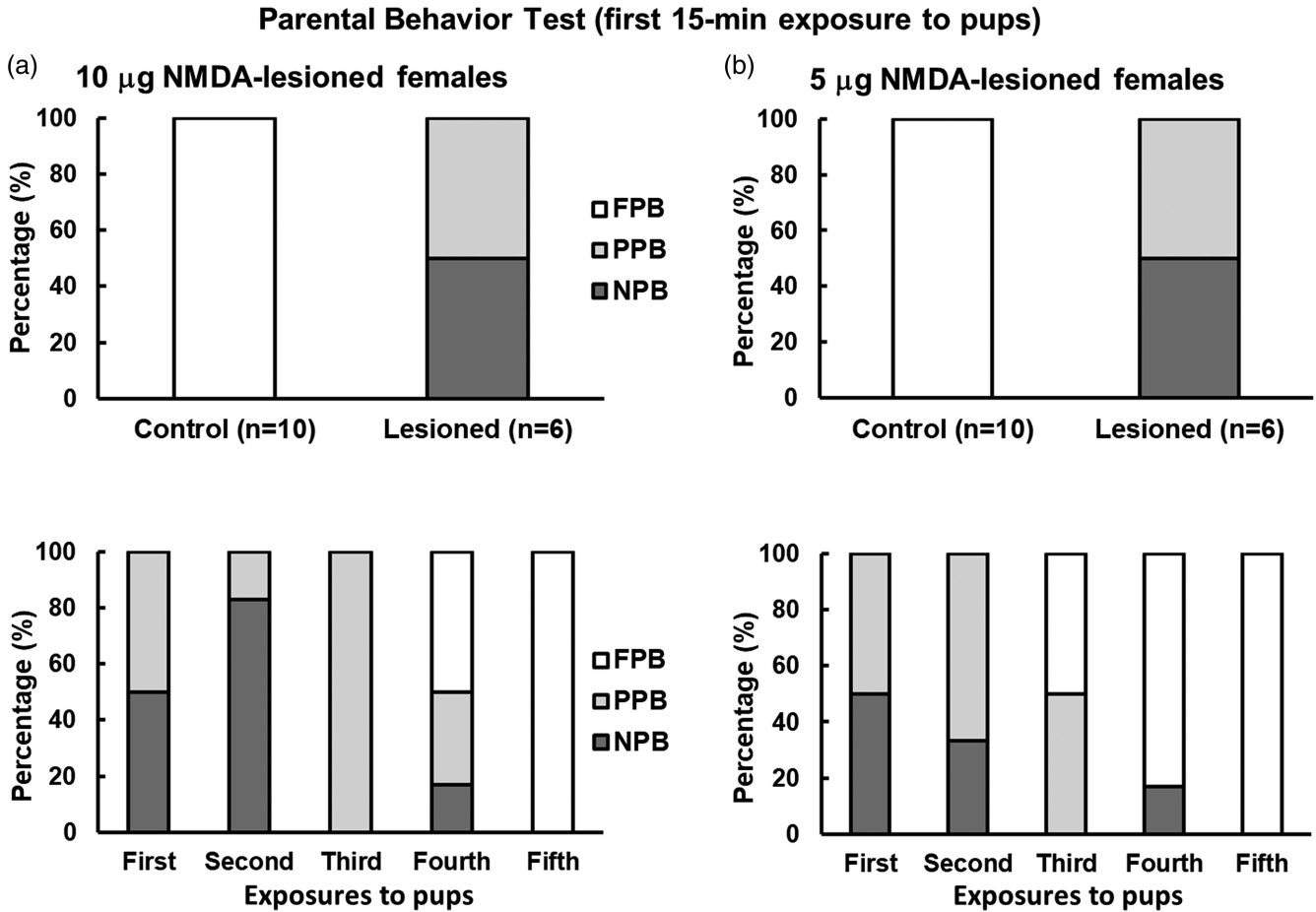
Figure 2
Reconstruction of the Area of Prefrontal Cortex Lesioned in Each Group



Note. The locations of the injections are shown as white dots. Diagrams show the largest (dark region) and the smallest (gray region) extension of the lesion.

Figure 3

Percentage of Females Displaying Parental Behavior in 10 μg (a) or 5 μg (b) NMDA-Lesioned Groups at the First Encounter With Pups (Up) or During a Series of Repeated Exposures to Pups (Down)



Note. FPB, Full parental behavior; PPB, partial parental behavior; NPB, nonparental behavior. Data are expressed as percentage, $\chi^2 = 13.0$, $p < .01$ versus Control groups (upper a and b), $\chi^2 = 4.0$, $p < .05$ 10 μg versus 5 μg lesions at the third exposure (down a and b).

Experiment II: Effects of NMDA Lesions in the mPFC on the Onset of Infanticidal Behavior in Males

Histological Analysis

The placement of the lesions in males was similar to those reported in Experiment I. Lesions affected the Cg1 (62.1 \pm 10.1%), PL

(54.4 \pm 12.4%), IL (14.8 \pm 7.4%), and Cg2 (33.3 \pm 9.9%), and did not extend to other ventral areas of the brain (Table 1). In all males ($n = 7$), the lesion also extended to orbital cortex (<20%), frontal association cortex (<20%), and secondary motor cortex (<65%). In a few animals ($n = 3$), the lesion extended to primary motor cortex (less than 5% of damage). Reconstruction of the location and size of NMDA lesions in the mPFC in males are shown in Figure 2c and Figure 6c.

Table 2

Maternal Behavior in Female Control and NMDA-Lesioned Groups (First 15 min Test)

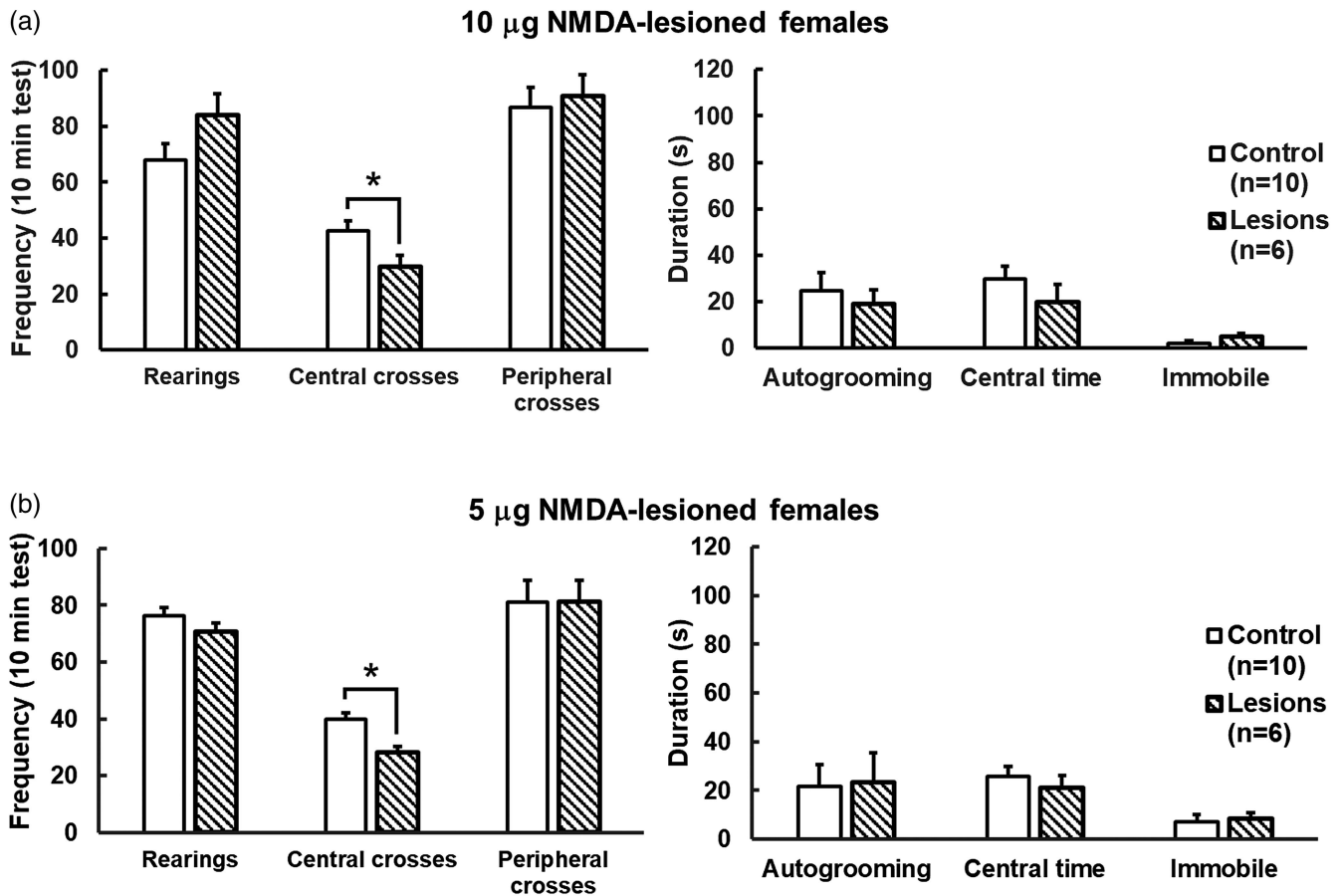
		Control (n = 10)	5 μg NMDA-lesioned (n = 6)	10 μg NMDA-lesioned (n = 6)
Percentage	Retrieval	100.0%	0.0%*	0.0%*
Frequency	Licking bouts	14.5 (3.5)	19.0 (1.5)	26.5 (7.5)
	Crouching postures	10.0 (5.5)	4.0 (3.0)*	5.0 (6.5)
	Nest building	4.0 (1.0)	0.0 (2.0)*	0.0 (0.0)*
	Licking	126.5 (133.0)	314.9 (66.5)	224.2 (122.0)
Time (s)	Crouching postures	171.7 (130.5)	68.2 (80.5)	33.5 (77.5)*
	Nest building	300.7 (69.5)	0.0 (48.5)*	0.0 (1.0)*

Data are expressed as median (SIQR), Mann-Whitney U test.

* $p < .05$ versus Control group.

Figure 4

General Exploratory and Locomotor Activity of Females With 10 μ g NMDA Lesions (a) or 5 μ g NMDA Lesions (b) in the MPFC, in the Open Field Test



Note. Data are expressed as mean \pm SEM. * $p < .05$ versus Control group, t test.

Behavioral Response to Pups

No significant differences between the groups were found in the immediate behavioral response to pups. The percentage of males from Control and NMDA-lesioned groups that displayed infanticidal behavior was 83% and 100%, respectively ($\chi^2 = 1.3$, $p = ns$; Figure 5a). In the Control group, 17% of the males (only one animal) neither attacked nor displayed parental behavior. The latency to first attack in Control and mPFC-lesioned males that displayed infanticidal behavior was no different (Control: 147.5 ± 55.6 s; NMDA: 119.0 ± 21.7 s).

General Exploratory Activity

mPFC-lesioned males spent less time in the central area ($t = 2.8$, $p < .05$) than Control males (Figure 5b). There was no difference in any of the other variables (Figure 5b).

Discussion

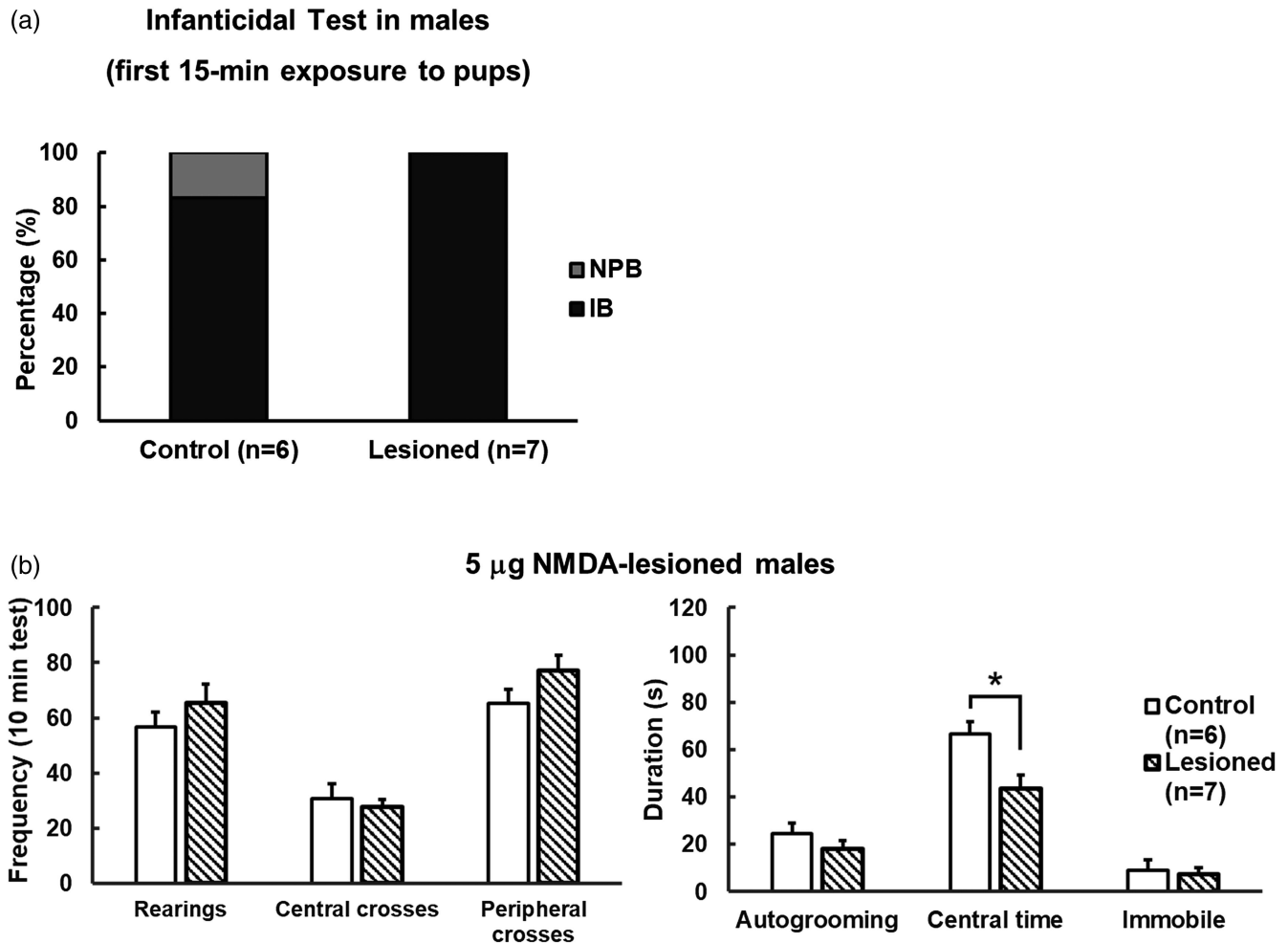
In the present study we provide evidence of the critical role played by the mPFC in the immediate onset of maternal, but not

infanticidal, behavior in pup-naïve virgin adult mice. The mPFC may engage in the planning and/or coordination required to immediately display maternal behavior upon the first encounter with pups, as well as in the motivation required to care for them. Thus, sensorimotor integration processes, that take place in the mPFC, could be critical for the animal to make the rapid decision of taking care of the offspring. However, infanticidal behavior, a likely more impulsive behavioral response, would be less affected by mPFC lesions.

Previous studies in mice, rats, and human have proposed that the mPFC played a major role in maternal behavior during the postpartum period (Afonso et al., 2007; Febo, 2012; Febo et al., 2008, 2010; Gryksa et al., 2020; Nishitani et al., 2014; Pereira & Morrell, 2011; Slotnick, 1967; Slotnick & Nigrosh, 1975). Afonso et al. (2007) found that the mPFC might be essential for the organization of the temporal sequence of the behavioral components of maternal behavior in the rat because excitotoxic lesions of the mPFC increased the latency to retrieve the last pup and reduced the number of pups retrieved during the postpartum period. Moreover, TTX inactivation of the mPFC or its GABA-mediated inhibition also affected the expression of maternal behavior in lactating rats, mainly by reducing the retrieval of pups (Febo et al., 2010). Similarly,

Figure 5

(a) Percentage of Infanticidal Males in the NMDA Lesion and Control Group at the First Encounter With Pups. NPB = Nonparental behavior; IB = infanticidal behavior. Data are expressed as percentage, $\chi^2 = 1.3$, $p = ns$. (b) General exploratory and locomotor activity of males with 5 μ g NMDA lesions in the mPFC in the open field test



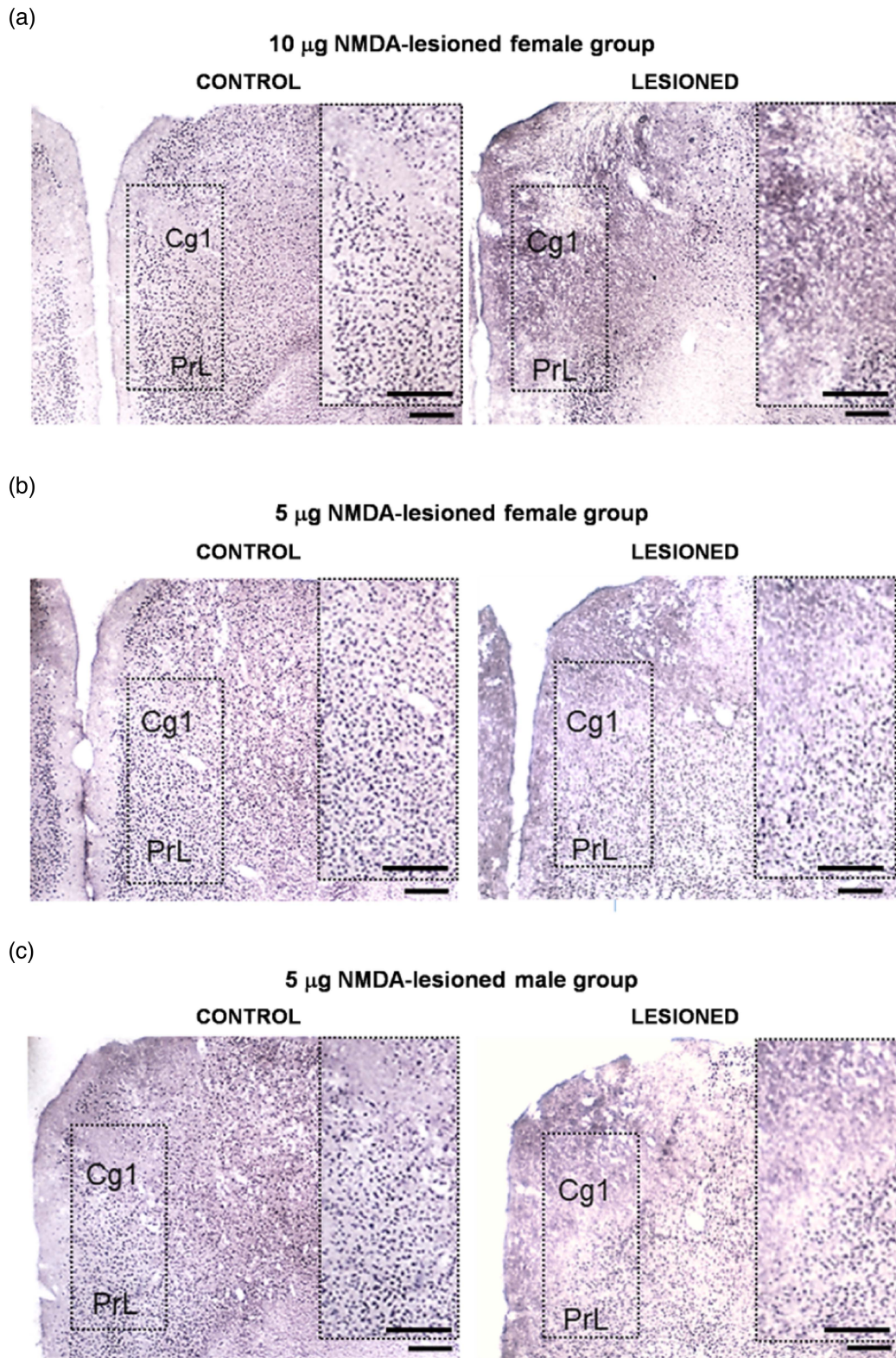
Note. Data are expressed as mean \pm SEM. * $p < .05$ versus Control group, t test.

in mice, electrolytic lesions of the mPFC and cingulate cortex slowed pup retrieval behavior in lactating animals (Slotnick & Nigrosh, 1975).

The mPFC of rodents, subdivided into Cg1, PL, and IL and their specific connections with cortical and subcortical areas, controls a range of cognitive functions and motivated behaviors (Gabbott et al., 2005; Granon & Changeux, 2012; Gutman et al., 2012; Peters et al., 2005; Vertes, 2004). Pereira and Morrell (2011) found that these subregions differently engaged in the regulation of maternal behavior in the rat during the postpartum period. Specifically, transient inactivation of the Cg1 affected the organizational aspects of maternal behavior during both the early and late postpartum period, whereas IL and PL had a specific facilitatory role during the early or late postpartum period respectively (Pereira & Morrell, 2011). We have previously found that pup-naïve virgin females exposed to pups (during 15 min) for the first time and displaying all components of maternal behavior, exhibited specifically higher

c-Fos expression in the PL compared to nonmaternal pup-exposed females (Alsina-Llanes & Olazábal, 2020). In the current study, both groups of females had significant lesions in the Cg1 and PL. Only in the group with larger lesions (10 μ g NMDA), the damage extended to the IL and/or the Cg2. Despite this difference in the volume of the lesioned tissue, there was no difference in the percentage of lesioned animals that displayed maternal behavior at the first encounter with the pups. During the third exposure to pups, more animals in the 5 μ g NMDA-lesioned group displayed maternal behavior than those in the 10 μ g NMDA-lesioned group, but at the following two exposures there was no difference between these two groups. Therefore, our results suggest that the delay in the onset of maternal behavior was mainly induced by damaging Cg1 and PL, but not IL. In contrast to previous studies, we did not detect changes in the sequence of the behavior nor in their transitions. However, in the present study, lesioned animals were exposed to pups several times until they started to display full maternal behavior. Those—three to

Figure 6
Representative Photomicrographs Showing Sections Stained With Anti-NeuN in Each Group



Note. The boxes on the right side of both images represent a higher magnification of the areas enclosed in the boxes on the left side. Scale bar is 200 microns. See the online article for the color version of this figure.

five additional exposures to pups could give time for the animal to recover. However, it is also possible that our lesions affected more PL controlled functions than those of the Cg1, more associated with the organizational aspect of the behavior (Pereira & Morrell 2011).

The neural substrate that supports maternal behavior includes brain areas such as MPOA, BNST, ventral tegmental area (VTA), nucleus accumbens (NAc), and medial and central amygdala (Numan & Insel, 2003; Numan et al., 1977, 2005; Olazábal et al., 2013a, 2013b). In the mouse, virgin females are able to show maternal behavior very rapidly after one or three exposures to pups (Alsina-Llanes et al., 2015). In the current study, we left the females alone in their home cage for several days after surgery before the exposure to pups. That methodological change in the behavioral test might have facilitated the immediate maternal response shown by the control females compared with the variability found in our previous studies (Alsina-Llanes et al., 2015). In order to get motivated, mice process critical olfactory, auditory, tactile, and visual information that is sent to amygdala nuclei and from there to the mPFC (Ko, 2017; Olazábal et al., 2013a). It is likely that there is where the immediate sensorimotor integration takes place to translate those stimuli into a motivational state, the decision to take action, plan, and coordinate several behavioral components to retrieve the pups and care for them. Then, the mPFC via their projections to the NAc and VTA may act to induce the rapid onset of parental behavior. Damaging the mPFC we might be slowing down that process. An additional observation was that lesions affected retrieval and most components of maternal behavior, except licking behavior. Lesioned animals could lick the pups while they were scattered across the cage. We (Alsina-Llanes et al., 2015) and others (Gandelman, 1973; Ostermeyer & Elwood, 1983) have found that motivational deficits in maternal behavior are more related to retrieval than licking behavior. Our findings agree with our previous studies using pup-naïve mice, in which licking was found to be not a good predictor of parental animals (Alsina-Llanes et al., 2015).

Both parental and infanticidal responses toward pups are evolutionarily conserved behaviors observed across many vertebrate species (Numan & Insel, 2003; Vom Saal & Howard, 1982). Several studies have provided evidence on the neural substrate that supports parental behavior in different species and reproductive contexts (Numan & Insel, 2003; Olazábal et al., 2013a). However, much less is known about the neural basis of infanticidal behavior. Tachikawa et al. (2013) found higher number of c-Fos immunoreactive neurons in the accessory olfactory system when males displayed infanticidal behavior. Ablation of the vomeronasal organ also impaired infanticidal behavior while facilitated parental responses in virgin males. Besides, the ventrolateral subregion of the ventromedial nucleus of the hypothalamus (VMH) showed higher c-Fos expression in sexually naïve males that displayed infanticidal behavior (Tachikawa et al., 2013). More recently, Tsuneoka et al. (2015) found similar results analyzing c-Fos expression and damaging the rhomboid nucleus of the bed nucleus of the stria terminalis. All together these studies suggest that infanticidal behavior is mostly regulated at a subcortical level.

Infanticidal behavior may be considered an aggressive response. However, whether the neural substrate that supports infanticidal and aggressive behavior is the same or not is still unknown. Infanticidal behavior in mice is characterized by approaching, sniffing, and biting the pups within a few seconds or minutes. Other behavioral

patterns are also evident, such as tail rattling and eye squinting (Brooks & Schwarzkopf, 1983; Tachikawa et al., 2013). However, newborns are not a threat for adult mice. On the contrary, aggressive behavior is a complex social behavior expressed in the context of defending or obtaining resources (Ferris et al., 2008; Nelson & Trainor, 2007). The neural substrate that supports aggressive behavior in rodents generally involves several subcortical brain areas such as the olfactory system, the amygdala, and hypothalamic areas (Ferris et al., 2008; Gammie & Nelson, 2001; Ko, 2017; Nelson & Trainor, 2007), but also some cortical areas (Muroi & Ishii, 2019; Takahashi et al., 2014). In humans, two components of aggression are proposed, one more reactive-impulsive and another more controlled and instrumented (Nelson & Trainor, 2007). The last is a goal-oriented behavior which would be regulated by higher cortical systems (Nelson & Trainor, 2007). Curiously, in female rats and female and male mice, some authors found that the mPFC was activated (higher c-Fos expression) during aggressive encounters (Halász et al., 2006; Haller et al., 2006; Muroi & Ishii, 2019). However, in our previous study, we did not find any association between infanticidal behavior and c-Fos expression in the mPFC (Alsina-Llanes & Olazábal, 2020). Besides, in the current study, we did not find any change in infanticidal behavior after lesions in the mPFC. Therefore, infanticidal behavior may be an impulsive behavioral response that would not require significant involvement of the mPFC. In fact, studies in rats showed that more impulsive rats were less maternal (Lovic, Palombo & Fleming, 2011) while human studies proposed that infanticidal or neonaticidal behavior are in many cases, and in particular in males, an impulsive not premeditated behavior (Putkonen et al., 2011; Riley, 2005; Rougé-Maillart et al., 2005).

It is worth mentioning that the analysis of the damage induced by the injection of 5 μ g of NMDA in males revealed larger lesions compared with that induced by the same amount of NMDA in females. That difference might be due to a sex difference in the sensitivity of the tissue. Several studies suggest that female hormonal profiles might be neuroprotective for excitotoxic lesions in the cortex (Mendelowitsch et al., 2001; Smith et al., 1999). The time from surgery and sacrifice used in males (2 days) and sensitized females (4 days) was also different. However, as mentioned previously, even though males could be affected by larger lesions than females, there was no effect on infanticidal behavior.

We believe that infanticidal behavior might be consequence of a rapid neural processing in which the olfactory information is transmitted to the amygdala and then to brain areas such as the nuclei of the terminal stria, lateral hypothalamus, nucleus accumbens, and subregions of the VMH, resulting in the rapid triggering of the attack. Interestingly, in some circumstances, males and females from several species (i.e., hamsters; Ohrnberger et al., 2016) have been observed to kill one or two pups, but then take care of the rest of the litter (unpublished observations from the authors). That apparent paradoxical behavior could be the results of a less controlled impulsive initial behavioral response that blocks the complex cortical processing required to display parental behavior, and a subsequent shift (after a few minutes), from that impulsive killing, to the more complex and cortically organized parental behavior.

In this study we also found that both NMDA-lesioned groups of females and lesioned males exhibited a reduction in the exploration of the central area, suggesting an increase in anxiety or aversion to novelty. Previous studies in rats have also found a reduction in the time spent in the central area of an open field after lesions in the PL or IL

(Jinks & McGregor, 1997). In accordance with our results, lesions by aspiration of the mPFC in mice also increased anxiety, but in that case reducing the distance traveled in an open field (McAllister et al., 2015). Moreover, Pati and colleagues (Pati et al., 2018) found that the pharmacogenetic activation of medial PFC excitatory neurons reduced anxiety-like behavior in mice. In contrast, Deacon and colleagues (Deacon et al., 2003) found a reduction of anxiety in a plus-maze, and increased number of crosses in the open field after mPFC cytotoxic lesions in female mice. The discrepancy might be partially due to methodological differences. Deacon et al. (2003) only recorded the number of rears and total crosses. Besides, the duration of their open field test (3 min) was shorter than that used by us (10 min). For example, in the first 3 min of our open field data, we did not find any difference in anxiety or exploration (data not shown). Then we cannot exclude the possibility that lesions in the mPFC, in fact, affected anxiety in both sexes. It is also important to note that, in contrast to rats, female mice normally do not show avoidance to pups or a stressful or anxious response when exposed to pups for the first time. If lesions in the mPFC increased anxiety or aversion to novelty, it could be expected that the onset of maternal behavior will be delayed. However, increased anxiety or fear to explore novelty did not affect infanticidal behavior in males. Higher anxiety might increase aggressiveness in males, but fear to explore novel stimuli should delay the onset of the attack. However, the latency to attack the pups did not change in any direction, suggesting that infanticidal behavior was unchanged, rather than increased or delayed. That also supports the idea that infanticidal behavior is an impulsive behavior with minimal control of the mPFC.

Moreover, the mPFC receives dopaminergic and serotonergic inputs that are involved in the modulation of reward, working memory, executive functions, modulation of motor and motivated behavior, and other cognitive functions (Berridge, 2009; Celada et al., 2013; Clarke et al., 2004; Robbins & Everitt, 1996; Robinson et al., 2011). Therefore, the impairment of the action of the input of these systems into the mPFC neurons could be key in both the delay in the onset of maternal behavior and the processing of novelty. The mPFC integrates sensory and limbic information exerting top-down control onto subcortical areas such as the NAc, amygdala, hypothalamus, and hippocampus, among other brain areas (Bacon et al., 1996; Gabbott et al., 2005; Groenewegen & Uylings, 2000; Gutman et al., 2012; Muroi & Ishii, 2019; Nephew et al., 2009; Takahashi et al., 2014). Therefore, it is possible to postulate a role of the mPFC in modulating the activity of these limbic areas, affecting sensorimotor processing, emotional or social processing, and stress response.

In summary, the different effects of lesions in the mPFC on maternal and infanticidal behavior suggest that these two behaviors are controlled differently by the mPFC. Whereas the immediate parental response requires the mPFC, the infanticidal behavioral response does not. Novel approaches provided by chemogenetic and optogenetic could target different subpopulation of neurons in the mPFC to further understand and test our hypothesis.

References

- Afonso, V. M., Sison, M., Lovic, V., & Fleming, A. S. (2007). Medial prefrontal cortex lesions in the female rat affect sexual and maternal behavior and their sequential organization. *Behavioral Neuroscience, 121*, 515–526. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.121.3.515>
- Alsina-Llanes, M., De Brun, V., & Olazábal, D. E. (2015). Development and expression of maternal behavior in naïve female C57BL/6 mice. *Developmental Psychobiology, 57*, 189–200. <https://doi.org/10.1002/dev.21276>
- Alsina-Llanes, M., & Olazábal, D. E. (2020). Prefrontal cortex is associated with the rapid onset of parental behavior in inexperienced adult mice (C57BL/6). *Behavioural Brain Research, 385*. Article 112556. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112556>
- APA Board of Scientific Affairs, Committee on Animal Research and Ethics. (2012). Guidelines for ethical conduct in the care and use of nonhuman animals in research, American Psychological Association. <https://www.apa.org/science/leadership/care/care-animal-guidelines.pdf>
- Bacon, S. J., Headlam, A. J., Gabbott, P. L., & Smith, A. D. (1996). Amygdala input to medial prefrontal cortex (mPFC) in the rat: A light and electron microscope study. *Brain Research, 720*, 211–219. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(96\)00155-2](https://doi.org/10.1016/0006-8993(96)00155-2)
- Berridge, K. C. (2009). 'Liking' and 'wanting' food rewards: Brain substrates and roles in eating disorders. *Physiology & Behavior, 97*, 537–550. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.02.044>
- Brooks, R. J., & Schwarzkopf, L. (1983). Factors affecting incidence of infanticide and discrimination of related and unrelated neonates in male *Mus musculus*. *Behavioral and Neural Biology, 37*, 149–161. [https://doi.org/10.1016/S0163-1047\(83\)91159-7](https://doi.org/10.1016/S0163-1047(83)91159-7)
- Celada, P., Puig, M. V., & Artigas, F. (2013). Serotonin modulation of cortical neurons and networks. *Frontiers in Integrative Neuroscience, 7*. Article 25. <https://doi.org/10.3389/fnint.2013.00025>
- Cholvin, T., Giorgi, L., Baril, N., Brezun, J.-M., Poucet, B., & Chaillan, F. A. (2018). Using MRI to predict the fate of excitotoxic lesions in rats. *PLOS ONE, 13*(7). Article e0200659. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200659>
- Corodimas, K. P., Rosenblatt, J. S., Canfield, M. E., & Morrell, J. I. (1993). Neurons in the lateral subdivision of the habenular complex mediate the hormonal onset of maternal behavior in rats. *Behavioral Neuroscience, 107*, 827–843. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.107.5.827>
- Clarke, H. F., Dalley, J. W., Crofts, H. S., Robbins, T. W., & Roberts, A. C. (2004). Cognitive inflexibility after prefrontal serotonin depletion. *Science, 304*, 878–880. <https://doi.org/10.1126/science.1094987>
- Deacon, R. M., Penny, C., & Rawlins, J. N. (2003). Effects of medial prefrontal cortex cytotoxic lesions in mice. *Behavioural Brain Research, 139*, 139–155. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(02\)00225-5](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(02)00225-5)
- Febo, M. (2012). Firing patterns of maternal rat prelimbic neurons during spontaneous contact with pups. *Brain Research Bulletin, 88*, 534–542. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2012.05.012>
- Febo, M., Felix-Ortiz, A. C., & Johnson, T. R. (2010). Inactivation or inhibition of neuronal activity in the medial prefrontal cortex largely reduces pup retrieval and grouping in maternal rats. *Brain Research, 1325*, 77–88. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.02.027>
- 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 and Behavior, 54*(2), 330–339. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2008.02.024>
- Ferris, C. F., Stolberg, T., Kulkarni, P., Murugavel, M., Blanchard, R., Blanchard, D. C., Febo, M., Brevard, M., & Simon, N. G. (2008). Imaging the neural circuitry and chemical control of aggressive motivation. *BMC Neuroscience, 9*. Article 111. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-9-111>
- Franklin, K. B. J., & Paxinos, G. (2008). *The mouse brain in stereotaxic coordinates*, Compact (3rd ed.). Academic Press.
- Gabbott, P. L., Warner, T. A., Jays, P. R., Salway, P., & Busby, S. J. (2005). Prefrontal cortex in the rat: Projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. *The Journal of Comparative Neurology, 492*, 145–177. <https://doi.org/10.1002/cne.20738>
- Gammie, S. C., & Nelson, R. J. (2001). cFOS and pCREB activation and maternal aggression in mice. *Brain Research, 898*, 232–241. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)02189-8](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)02189-8)

- Gandelman, R. (1973). The ontogeny of maternal responsiveness in female Rockland-Swiss albino mice. *Hormones and Behavior*, 4, 257–268. [https://doi.org/10.1016/0018-506X\(73\)90010-X](https://doi.org/10.1016/0018-506X(73)90010-X)
- Granon, S., & Changeux, J. P. (2012). Deciding between conflicting motivations: What mice make of their prefrontal cortex. *Behavioural Brain Research*, 229, 419–426. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.11.011>
- Groenewegen, H. J., & Uylings, H. B. M. (2000). The prefrontal cortex and the integration of sensory, limbic and autonomic information. *Progress in Brain Research*, 126, 3–28. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(00\)26003-2](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(00)26003-2)
- Gryksa, K., Mittmann, L., Bauer, A., Peterlik, D., Flor, P. J., Uschold-Schmidt, N., & Bosch, O. J. (2020). Metabotropic glutamate receptor subtype 7 controls maternal care, maternal motivation and maternal aggression in mice. *Genes Brain & Behavior*, 19(1). Article e12627. <https://doi.org/10.1111/gbb.12627>
- Gutman, D. A., Keifer, O. P., Jr., Magnuson, M. E., Choi, D. C., Majeed, W., Keilholz, S., & Ressler, K. J. (2012). A DTI tractography analysis of infralimbic and prelimbic connectivity in the mouse using high-throughput MRI. *NeuroImage*, 63, 800–811. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2012.07.014>
- Halász, J., Toth, M., Kallo, I., Liposits, Z., & Haller, J. (2006). The activation of prefrontal cortical neurons in aggression – A double labeling study. *Behavioural Brain Research*, 175, 166–175. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.08.019>
- Haller, J., Tóth, M., Halasz, J., & De Boer, S. F. (2006). Patterns of violent aggression-induced brain c-fos expression in male mice selected for aggressiveness. *Physiology & Behavior*, 88, 173–182. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.03.030>
- Jinks, A. L., & McGregor, I. S. (1997). Modulation of anxiety-related behaviours following lesions of the prelimbic or infralimbic cortex in the rat. *Brain Research*, 772, 181–190. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(97\)00810-X](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(97)00810-X)
- Ko, J. (2017). Neuroanatomical substrates of rodent social behavior: The medial prefrontal cortex and its projection patterns. *Frontiers in Neural Circuits*, 11. Article 41. <https://doi.org/10.3389/fncir.2017.00041>
- Lovic, V., Palombo, D. J., & Fleming, A. S. (2011). Impulsive rats are less maternal. *Developmental Psychobiology*, 53(1), 13–22. <https://doi.org/10.1002/dev.20481>
- McAllister, B. B., Spanswick, S. C., Patel, P. P., Barneto, A. A., & Dyck, R. H. (2015). The effects of chronic fluoxetine treatment following injury of medial frontal cortex in mice. *Behavioural Brain Research*, 290, 102–116. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.04.049>
- Mendelovitch, A., Ritz, M. F., Ros, J., Langemann, H., & Gratzl, O. (2001). 17beta-Estradiol reduces cortical lesion size in the glutamate excitotoxicity model by enhancing extracellular lactate: A new neuroprotective pathway. *Brain Research*, 901(1-2), 230–236. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)02359-9](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)02359-9)
- Muroi, Y., & Ishii, T. (2019). Glutamatergic signals in the dorsal raphe nucleus regulate maternal aggression and care in an opposing manner in mice. *Neuroscience*, 400, 33–47. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.12.034>
- Nelson, R. J., & Trainor, B. C. (2007). Neural mechanisms of aggression. *Nature Reviews Neuroscience*, 8, 536–546. <https://doi.org/10.1038/nrn2174>
- Nephew, B. C., Caffrey, M. K., Felix-Ortiz, A. C., Ferris, C. F., & Febo, M. (2009). Blood oxygen level-dependent signal responses in corticolimbic ‘emotions’ circuitry of lactating rats facing intruder threat to pups. *The European Journal of Neuroscience*, 30, 934–945. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06875.x>
- Nishitani, S., Kuwamoto, S., Takahira, A., Miyamura, T., & Shinohara, K. (2014). Maternal prefrontal cortex activation by newborn infant odors. *Chemical Senses*, 39, 195–202. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjt068>
- Numan, M., & Insel, T. R. (2003). *The neurobiology of parental behavior*. New York (pp. 69–106). Springer-Verlag.
- 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. *Behavioural Brain Research*, 158, 53–68. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2004.08.008>
- 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. <https://doi.org/10.1037/h0077304>
- Ohrnberger, S. A., Monclús, R., Rödel, H., & Valencak, T. G. (2016). Ambient temperature affects postnatal litter size reduction in golden hamsters. *Frontiers in Zoology*, 13, 51. <https://doi.org/10.1186/s12983-016-0183-8>
- Olazábal, D. E., & Alsina-Llanes, M. (2016). Are age and sex differences in brain oxytocin receptors related to maternal and infanticidal behavior in naïve mice? *Hormones and Behavior*, 77, 132–140. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2015.04.006>
- Olazábal, D. E., Kalinichev, M., Morrell, J. I., & Rosenblatt, J. S. (2002). MPOA cytotoxic lesions and maternal behavior in the rat: effects of midpubertal lesions on maternal behavior and the role of ovarian hormones in maturation of MPOA control of maternal behavior. *Hormones and Behavior*, 41, 126–138. <https://doi.org/10.1006/hbeh.2001.1753>
- Olazábal, D. E., & Morrell, J. I. (2005). Juvenile rats show immature neuronal patterns of c-Fos expression to first pup exposure. *Behavioral Neuroscience*, 119, 1097–1110. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.119.4.1097>
- 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. (2013a). Flexibility and adaptation of the neural substrate that supports maternal behavior in mammals. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 37, 1875–1892. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.04.004>
- 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 and Biobehavioral Reviews*, 37, 1860–1874. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.04.003>
- 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. <https://doi.org/10.1002/dev.420160202>
- Pati, S., Sood, A., Mukhopadhyay, S., & Vaidya, V. A. (2018). Acute pharmacogenetic activation of medial prefrontal cortex excitatory neurons regulates anxiety-like behavior. *Journal of Bio-Science*, 43, 85–95. <https://doi.org/10.1007/s12038-018-9732-y>
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2011.02200.x>
- Peters, Y. M., O'Donnell, P., & Carelli, R. M. (2005). Prefrontal cortical cell firing during maintenance, extinction, and reinstatement of goal-directed behavior for natural reward. *Synapse (New York, N.Y.)*, 56, 74–83. <https://doi.org/10.1002/syn.20129>
- Putkonen, H., Amon, S., Eronen, M., Klier, C. M., Almiron, M. P., Cederwall, J. Y., & Weizmann-Henelius, G. (2011). Gender differences in filicide offense characteristics—a comprehensive register-based study of child murder in two European countries. *Child Abuse & Neglect: The International Journal*, 35(5), 319–328. <https://doi.org/10.1016/j.chiabu.2011.01.007>
- Riley, L. (2005). Neonaticide: A grounded theory study. *Journal of Human Behavior in the Social Environment*, 12(4), 1–42. https://doi.org/10.1300/J137v12n04_01
- Robbins, T. W., & Everitt, B. J. (1996). Neurobehavioural mechanisms of reward and motivation. *Current Opinion in Neurobiology*, 6, 228–236. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(96\)80077-8](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(96)80077-8)

- Robinson, D. L., Zitzman, D. L., & Williams, S. K. (2011). Mesolimbic dopamine transients in motivated behaviors: Focus on maternal behavior. *Frontiers in Psychiatry*, 2, Article 23. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2011.00023>
- Rougé-Maillart, C., Jousset, N., Gaudin, A., Bouju, B., & Penneau, M. (2005). Women who kill their children. *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, 26(4), 320–326. <https://doi.org/10.1097/01.paf.0000188085.11961.b2>
- Slotnick, B. M. (1967). Disturbances of maternal behavior in the rat following lesions of the cingulate cortex. *Behaviour*, 29, 204–235. <https://doi.org/10.1163/156853967X00127>
- Slotnick, B. M., & Nigrosh, B. J. (1975). Maternal behavior of mice with cingulate cortical, amigdala, or septal lesions. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 88, 118–127. <https://doi.org/10.1037/h0076200>
- Smith, M. J., Keel, J. C., Greenberg, B. D., Adams, L. F., Schmidt, P. J., Rubinow, D. A., & Wassermann, E. M. (1999). Menstrual cycle effects on cortical excitability. *Neurology*, 53(9), 2069–2072. <https://doi.org/10.1212/WNL.53.9.2069>
- 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: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 33, 5120–5126. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2364-12.2013>
- Takahashi, A., Nagayasu, K., Nishitani, N., Kaneko, S., & Koide, T. (2014). Control of intermale aggression by medial prefrontal cortex activation in the mouse. *PLOS ONE*, 9(4), Article e94657. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094657>
- Tsuneoka, Y., Tokita, K., Yoshihara, C., Amano, T., Esposito, G., Huang, A. J., Yu, L. M. Y., Odaka, Y., Shinozuka, K., McHugh, T. J., & Kuroda, K. O. (2015). Distinct preoptic-BST nuclei dissociate paternal and infanticidal behavior in mice. *The EMBO Journal*, 34, 2652–2670. <https://doi.org/10.15252/embj.201591942>
- Vertes, R. P. (2004). Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse (New York, N.Y.)*, 51, 32–58. <https://doi.org/10.1002/syn.10279>
- 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. <https://doi.org/10.1126/science.7058349>

Received August 15, 2020

Revision received October 06, 2020

Accepted October 16, 2020 ■