



Tesis de Doctorado, Opción Neurociencias
PEDECIBA-Biología

**Cambios en la respuesta a estímulos aversivos y
atractivos durante la maternidad en la rata**

El mundo a los ojos de una madre...

MSc. Daniella Agrati

Orientadora: Dra. Annabel Ferreira

Co-orientador: Dr. Alonso Fernández-Guasti

Tribunal:

Dr. Federico Dajas

Dr. Aldo Lucion

Dra. Cecilia Scorza

Montevideo, Junio de 2009

Agradecimientos...

A mi familia y amigos por apoyar y respetar mis caminos y por estar siempre ahí...

A Franco, por construir una vida conmigo y por ser incondicional...

A la gente de *La Torre* desde el piso 11 hasta la pecera y cruzando hasta el taller, obviamente parando en lo de Héctor: por hacer este lugar más divertido y por dar una mano cuando la he necesitado, entre otras...

A Héctor, por respetar y cuidar muy bien de mis amigas *ratas*...

A Ana Meikle, por la realización del RIA de CORT y a Ali, Denise, Ana y Gabriela por la mano con el material y la teoría de esta técnica....

A Bettina por prestarnos el laberinto inter-específico de preferencia (un aparato claramente versátil)...

A los miembros del tribunal: Federico Dajas, Aldo Lucion y Cecilia Scorza por los aportes al trabajo y por su disposición...

A mis compañeras de trabajo y amigas alucinantes: Nati, Mary y Majito, por compartir su experiencia y conocimiento conmigo y por dedicarle tiempo a este trabajo (y tenerme paciencia). Esta tesis tiene un poquito de todas Ustedes... Abro un paréntesis para Majito (por ser parte de todos los pasos de este trabajo + 7: gracias por las discusiones, las extracciones y el aguante colosal)...

A Alonso, por abrirme las puertas de su laboratorio y de su casa, por enseñarme mucho, por estar siempre cerca...

At last, but not least a Annabel, por formarme como investigadora, enseñarme a cuestionar y a volar, des-estructurar mi pensamiento (o intentarlo) y estructurar mi trabajo y por creer en mí. Gracias por compartir, ésta, tu pasión conmigo, y por dejarme formar parte de la misma...

A las diversas contribuciones financieras que hicieron posible este trabajo: PEDECIBA-Biología, Proyectos Jóvenes Investigadores Fondo Clemente Estable-MEC (convocatoria 2005) y -ANII (convocatoria 2007), PDT-MEC (convocatoria 2006), CSIC, IBRO-LARC, CINVESTAV-México, Facultad de Ciencias, *personal funding* de los miembros del autonominado Laboratorio de Fisiología del Comportamiento y *parent's house*...



Índice de contenidos

Resumen	iii
Abstract	v
Abreviaturas	vii
Antecedentes	1
Comportamiento maternal.....	1
Respuesta de las hembras lactantes a estímulos aversivos	4
Respuesta de las hembras lactantes a estímulos reforzadores positivos	7
Agresión maternal	8
Objetivo general e hipótesis.....	11
Capítulo I: Influencia de la condición maternal en las respuestas comportamental y endócrina de las hembras frente a un estímulo aversivo complejo.....	12
Agrati et al., 2008a.....	20
Capítulo II: Influencia del estado endócrino y de la experiencia reproductiva previa de ratas sexualmente activas y maternas en el valor de incentivo relativo de un macho y de las crías.....	29
Agrati et al., 2008b.....	45
Capítulo III: Expresión de dos motivaciones antagónicas en hembras durante el estro posparto: comportamiento sexual y agresión maternal hacia un macho intruso.....	52
Anexo	65
Conclusiones.....	68
Perspectivas.....	70
Referencias bibliográficas.....	72

Resumen

Durante la lactancia, las ratas no sólo desarrollan comportamiento maternal hacia las crías sino que modifica su respuesta frente a diversos estímulos del medio. En la presente tesis, profundizamos en el estudio de los factores biológicos y contextuales que determinan la respuesta de las madres frente a estímulos aversivos y atractivos.

En primer lugar estudiamos la influencia de la condición maternal en las respuestas comportamental y endócrina de las hembras frente a un estímulo aversivo. La inducción del comportamiento maternal en hembras vírgenes provocó una reducción de la respuesta comportamental de temor de igual magnitud a la observada en las lactantes, sin atenuar la respuesta endócrina de estrés. Este resultado sugiere que durante la lactancia existe una disociación de los mecanismos fisiológicos que controlan ambas respuestas.

En una segunda instancia exploramos cómo la maternidad modifica el valor de incentivo de estímulos atractivos y la respuesta de las hembras ante a los mismos. Con este fin nos centramos en el estro posparto, periodo único del ciclo reproductivo de la hembra en el cual los machos y las crías adquieren simultáneamente valor reforzador positivo. Utilizando un modelo de preferencia por macho vs. crías determinamos que la condición maternal no es suficiente para disminuir el fuerte valor de incentivo que posee el macho para una hembra en proestro tardío, mientras que la experiencia reproductiva previa aumenta el valor de incentivo de las crías para las hembras en el contexto endócrino de un segundo parto. Estas diferencias motivacionales no se manifestaron en la expresión de los comportamientos sexual y maternal cuando las ratas fueron expuestas a un solo estímulo reforzador, indicando que el valor de incentivo de un estímulo es fuertemente modulado por el valor del otro, así como por el contexto.

Durante la lactancia, un macho adulto adquiere valor aversivo para las madres cuando es introducido en la caja materna, provocando el despliegue de conductas agresivas. Por este motivo, en una última etapa evaluamos las respuestas de las madres en estro posparto frente un macho intruso en la caja materna. Las hembras posparturientas exhibieron simultáneamente comportamiento sexual y agresión maternal en un patrón comportamental entremezclado, indicando que el macho se torna un estímulo ambivalente para las madres. Este resultado refuta dos ideas predominantes en el estudio del

comportamiento: 1. la ejecución de un comportamiento motivado requiere la inhibición de motivaciones competitivas y 2. el comportamiento implica secuencias de componentes que deben ser completadas o consumadas antes de cambiar de comportamiento.

En la presente tesis mostramos que durante la lactancia la respuesta de las hembras a estímulos aversivos y atractivos del medio es determinada, en parte, por el valor de incentivo que las crías tienen para las madres. Esto no implica que la maternidad torne a las hembras ignorantes a otras motivaciones, como la sexual, sino que su respuesta ante otros estímulos es modulada por la presencia de la cría y el contexto en el cual se encuentren.

Palabras clave: Comportamiento maternal; Comportamiento de miedo; Respuesta de Estrés; Comportamiento sexual; Agresión Maternal; Motivación

Abstract

Lactating dams not only display direct care-giving behaviours towards pups but also exhibit dramatic changes in their response to other environmental stimuli. The present thesis aimed to explore biological and contextual factors that determine the response of mother rats to aversive and attractive stimuli.

Firstly, we examined if the maternal condition, independently of the endocrine profile of lactation, promotes a reduction in the behavioural as well as in the endocrine response to an emotional stressor. The induction of maternal behaviour in virgin females reduced fear-related behaviours to levels similar to those observed in lactating dams, without affecting the endocrine stress response. This result points towards a clear dissociation in the mechanisms regulating behavioural and endocrine responses to emotional stressors during lactation.

Secondly, we explored if motherhood modifies the incentive value of attractive stimuli as well as female's response to them. With this aim, we focus on the postpartum estrus, a unique period in female's reproductive cycle when males and pups acquire positive incentive value simultaneously. Employing a male vs. pups preference model we determined that maternal condition is not sufficient to diminish the strong incentive value that a male possesses for late proestrous cycling females, while the reproductive experience enhances the incentive value of the pups only under the endocrine background of parturition. These motivational differences were not reflected in the expression of either sexual or maternal behaviours when the females were exposed to only one of the stimuli, indicating that the incentive value of one stimulus is strongly modulated by the value of the other and the context.

During lactation adult males acquire an aversive value for the mother when introduced in the home cage, evoking the expression of aggressive responses. On these bases, we determined the response of postpartum estrous dams confronted to a male intruder in the home cage. Postpartum estrous females exhibited sexual behaviour and maternal aggression simultaneously, in a mix behavioural pattern, indicating that the male possesses an ambivalente value for the mothers. This result refutes two dominant ideas in behavioural study: 1. the execution of a motivated behaviour requires the inhibition of competing motivations, and 2. the behaviour is composed by a sequence of

components that must be completed or consumed in order to change the behaviour expressed.

The present thesis shows that during lactation, the female's responses to aversive and attractive stimuli are determined by the incentive value of the pups. However, this affirmation does not imply an inhibition of other motivations, like sexual, rather females responses to other stimuli are modulated by the pups presence and the environment.

Key words: Maternal behaviour; Fear-related behaviour; Stress response; Sexual behaviour; Maternal aggression; Motivation

Abreviaturas

APOM-área preóptica media

ARNm-ácido ribonucleico mensajero

ATCH- adrenocorticotropina

CORT- corticosterona

HPA- hipotálamo-hipofisario-adrenal

NPV- núcelo paraventricular

PAG- área periacueductal gris

RSIQ- rango semi-intercuartil

SNC- sistema nervioso central

Antecedentes

Prácticamente todas las hembras de mamíferos, de la rata a la mujer, atraviesan cambios dramáticos en su comportamiento durante la maternidad. En la rata, junto con el desarrollo del comportamiento maternal hacia las crías, la hembra modifica su forma de reaccionar frente a diversos estímulos del medio. Así, durante la lactancia, la rata aumenta su agresividad hacia individuos intrusos en el nido (Erskine et al., 1980) y muestra menos temor (Hård & Hansen, 1985) y ansiedad (Ferreira et al., 1989; Ferreira et al., 2002) frente a estímulos aversivos. Esta reducción de la respuesta comportamental frente a potenciales peligros, se acompaña de una disminución de la respuesta endócrina y autónoma de estrés frente a los mismos (Lightman, et al., 2001). Estos cambios fisiológicos y comportamentales permiten a la madre cuidar efectivamente a sus crías bajo diversas condiciones ambientales. En este sentido, la rata es altricial y durante los primeros días de vida, las crías están desprovistas de pelo, carecen de mecanismos de control de la temperatura corporal y son incapaces de ver y oír (Fleming & Rosenblatt, 1974; Rosenblatt, 1975) por lo que dependen totalmente de la madre para su supervivencia.

Comportamiento maternal

Cuando una hembra virgen se enfrenta por primera vez a crías, las ignora e incluso las evita y rechaza, dependiendo del contexto. Sin embargo, durante el parto las crías se vuelven estímulos atractivos y fuertes reforzadores positivos, que promueven comportamientos de búsqueda y aproximación por parte de las madres¹ (Kinsley & Bridges, 1990; Rosenblatt, 1967, 1975; Figura 1).

¹ El valor afectivo o hedónico de un estímulo puede definirse como el impacto emocional, negativo o positivo, que tiene sobre el individuo; el mismo permite señalar el significado biológico de estímulos o situaciones del entorno (Berridge, 2004; Cabanac et al., 2009). Nos referiremos a **estímulos aversivos** como aquellos que poseen un valor afectivo negativo y que suelen asociarse a comportamientos de evitación y a condicionamientos negativos (Cardinal et al., 2002; Louilot & Besson, 2000). De forma inversa, nos referiremos a **estímulos atractivos** como aquellos que poseen un valor afectivo positivo y suelen asociarse a comportamientos de aproximación y a condicionamientos positivos (Cardinal et al., 2002; Louilot & Besson, 2000).

Este cambio drástico en la respuesta hacia las crías por parte de las madres, implica un cambio del valor afectivo de las mismas (Kinsley & Bridges, 1990; Rosenblatt, 1967, 1975), así como el desarrollo de una motivación selectiva para interactuar con ellas² (Pereira et al., 2008; Pereira & Ferreira, 2006).

Bases hormonales y no hormonales

El desarrollo del comportamiento maternal depende, en gran medida, de los cambios endócrinos de la gestación y el parto. En particular, el aumento de los niveles de estrógenos y la disminución de los de progestágenos son críticos para su rápido desencadenamiento (Bridges 1977, 1984, Bridges et al., 1997; Doerr et al., 1981). Estas hormonas, en conjunto con las hormonas hipofisarias oxitocina y prolactina, actúan en áreas discretas del sistema nervioso central (SNC) implicadas en el control del comportamiento maternal, como el área preóptica media del hipotálamo (APOM) y sus eferencias (Bridges et al., 1997; Fahrbach & Pfaff, 1986; Matthews-Felton et al., 1995; Numan, 1994; Numan et al., 1977). También se ha sugerido que estas hormonas actúan a nivel central (órgano vomeronasal, sistema olfatorio accesorio y amígdala) cambiando el valor afectivo del estímulo cría (Fleming et al. 1989), o periférico, aumentando la sensibilidad de ciertas regiones (perioral y ventral torácica) a estímulos provenientes de las mismas (Bereiter & Barker, 1975; Kow et al. 1979; Rose & Bieber, 1984). Una vez establecido, el mantenimiento del comportamiento maternal en el posparto depende de la estimulación sensorial brindada por las crías (Bridges, 1975; Rosenblatt, 1967), particularmente de la estimulación somatosensorial de la región perioral y de la ventral del tórax de las madres (Stern & Jonson, 1990; Stern & Kolunie, 1989).

A pesar de la fuerte influencia de las hormonas reproductivas en el desarrollo del comportamiento maternal, es posible provocarlo en hembras vírgenes e incluso en machos, únicamente mediante una convivencia continua con crías (Cosnier & Couturier, 1966; Rosenblatt, 1967).

2 En la presente tesis la **motivación** es entendida como el conjunto de procesos que permiten a un organismo regular la probabilidad, disponibilidad o proximidad de un estímulo, interno o externo (Salamone, 1991). Implica aspectos direccionales, es decir, el animal se dirige hacia un estímulo o se aleja del mismo. También involucra aspectos activacionales, que refieren a la energía y tiempo que invierte un individuo en un determinado estímulo (Salamone & Correa, 2002).

Este proceso se conoce con el nombre de *sensibilización* (Cosnier & Couturier, 1966; Rosenblatt, 1967). El modelo de ratas sensibilizadas permite determinar la influencia de la condición maternal, independientemente del perfil endócrino particular del parto y la lactancia, en las respuestas fisiológicas y comportamentales de los animales.

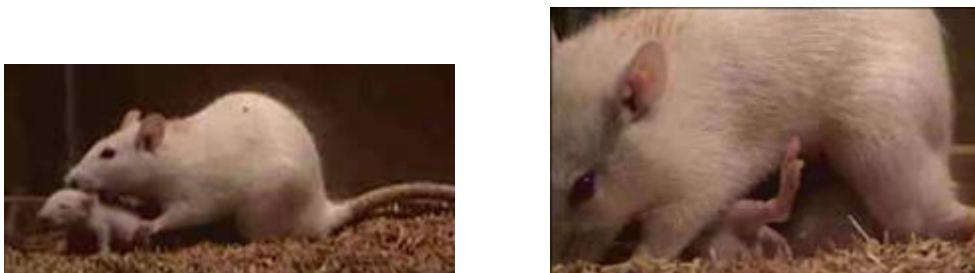


Figura 1. Comportamiento maternal. Hembra lactante acarreado a una cría (cuadro izquierda) y en postura de amamantamiento con crías mamando (cuadro derecha).

Motivación maternal

El comportamiento maternal es fuertemente motivado, es decir, las madres invierten tiempo y esfuerzo en buscar proximidad con sus crías. En este sentido, el fuerte valor de incentivo³ que poseen las crías para las hembras posparturientas ha sido documentado en modelos motivacionales de condicionamiento de preferencia de lugar y de respuestas operantes. Así, las madres prefieren un ambiente previamente asociado con crías frente a un ambiente neutro (Fleming et al., 1994) y aprenden a apretar una palanca para obtener acceso a las mismas (Lee et al., 2000). A su vez, las hembras lactantes superan obstáculos potencialmente peligrosos para ir en búsqueda de sus crías (Fahrbach & Pfaff, 1982).

3 El **valor de incentivo** de un estímulo se asocia al concepto de motivación. Es entendido como la propiedad de un estímulo de promover la aproximación e interacción o el alejamiento del mismo (Berridge, 2004; Bindra, 1972; Cardinal et al., 2002). El valor de incentivo y el valor afectivo (*video supra*) de los estímulos con significado biológico suelen ir juntos en condiciones normales y ambos son necesarios para una respuesta correcta frente a los mismos. Los definimos de forma independiente ya que a nivel del SNC son regulados por circuitos diferentes y en algunas circunstancias, como es la adicción a drogas, el valor de incentivo puede disociarse del valor afectivo (Berridge, 2004).

La motivación maternal es modulada tanto por el perfil endócrino del periparto, como por la experiencia maternal previa. En este sentido, el comportamiento maternal exhibido por hembras sensibilizadas, que no transitaban por los cambios endócrinos de la gestación tardía y del parto, es deficiente en comparación con el presentado por hembras lactantes (Fleming & Rosenblatt 1974; Lonstein et al. 1999; Pereira et al., 2005). A su vez, las hembras sensibilizadas exhiben una menor preferencia por un ambiente previamente asociado a las crías (Fleming et al. 1994) y aprietan menos veces una palanca para tener acceso a las mismas (Lee et al. 2000), respecto a las hembras lactantes. En este sentido, un tratamiento hormonal que simula el perfil endócrino de la gestación tardía y del parto (Bridges, 1984; Krehbiel & LeRoy, 1979; Orpen et al., 1987) así como la administración de estradiol en el APOM (Fahrbach & Pfaff, 1986; Numan et al., 1977), facilitan la expresión y mejoran la calidad del comportamiento maternal de las hembras vírgenes expuestas a una convivencia con crías.

A su vez, la experiencia maternal reciente y aquella asociada a partos previos fortalece el valor de incentivo de las crías y mantiene el comportamiento maternal. Lee y colaboradores (2000) demostraron que el número de veces que las madres presionan una palanca para obtener acceso a las crías aumenta diariamente durante la primera semana de lactancia y este aumento depende, a su vez, de que las hembras interactúen con las crías luego de tener acceso a las mismas. Por otra parte, la experiencia maternal de partos previos facilita la expresión y mejora la calidad del comportamiento maternal de las ratas (Bridges, 1975; 1977; Fleming & Sarker, 1990; Orpen et al., 1987; Orpen & Fleming, 1987; Pereira, 2005). Se ha sugerido que este efecto se debe a que la memoria maternal previa potencia el valor de incentivo de las crías en las futuras experiencias maternas (Fleming et al., 1994).

Respuesta de las hembras lactantes a estímulos aversivos

Respuesta comportamental de temor y de ansiedad

Las ratas lactantes presentan una reducción de la respuesta comportamental de miedo frente a un sonido fuerte e inesperado (Ferreira et al., 2002; Hård & Hansen, 1985) y de la ansiedad en el campo abierto (Fleming & Luebke, 1981), en pruebas de conflicto (Ferreira et al., 1989) y en el laberinto elevado en

forma de cruz (Bitran et al., 1991; Lonstein et al., 1998; Lonstein et al., 2005; Pereira et al., 2005) en comparación a otras fases del ciclo reproductivo. Esta reducción generalizada del temor, que sugiere una disminución del valor afectivo que las madres le asignan a estímulos aversivos, parece estar íntimamente relacionado al cuidado de las crías. Así, las hembras lactantes entran en un ambiente novedoso para ir en búsqueda de las mismas (Stern & Mackinnon, 1976) y permanecen más tiempo en los brazos abiertos del laberinto cuando las crías se encuentran en ellos (Pereira et al., 2005).

La estrecha relación entre la maternidad y la reducción del temor se manifiesta en el hecho de que la inducción de comportamiento maternal en ratas vírgenes se asocia a una disminución de la reacción de inmovilidad frente a un estímulo auditivo inesperado (Ferreira et al., 2002) y de los niveles de ansiedad evaluados en el laberinto elevado en cruz (Pereira et al., 2005), en comparación a hembras vírgenes no-maternales. A su vez, el bloqueo del aprendizaje asociativo inducido por estrés no se observa en hembras maternales, tanto en lactantes como en sensibilizadas (Leuner & Shors, 2006). Estos resultados, en conjunto, indican que el desarrollo del comportamiento maternal, independientemente de los cambios endócrinos propios del parto y la lactancia, promueve la reducción del valor afectivo negativo de estímulos amenazantes.

Respuesta endócrina de estrés

Durante la lactancia no sólo se modifica la respuesta comportamental frente a estímulos potencialmente nocivos, sino también la respuesta endócrina de estrés ante los mismos. Así, las ratas lactantes presentan una disminución de la activación del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HPA), caracterizada por una menor liberación de adrenocorticotropina (ACTH) y de corticosterona (CORT) frente a estresores físicos (como exposición a vapores de éter e inyección de solución salina hipertónica) y emocionales (como el campo abierto, la restricción de movimiento por contención y un sonido fuerte e inesperado) respecto a otras fases de su ciclo reproductivo (Lightman et al., 2001; Neumann et al., 1998; Stern et al., 1973). El hecho de que los estresores físicos desencadenen una respuesta endócrina de estrés a través de impactar directamente en el hipotálamo (Herman & Cullinan, 1997), indica que existen adaptaciones a lo largo del eje HPA que subyacen la hipo-respuesta de estrés

durante la lactancia (Neumann et al., 1998; Stern et al., 1973; Toufexis et al., 1999; Windle et al., 1997a). Estos cambios han sido principalmente relacionados al perfil endócrino de la gestación, el parto y la lactancia, en particular a la oxitocina y la prolactina (Lightman et al., 2001; Neumann et al., 2000; Torner et al., 2002; Windle et al., 1997b).

Las hembras lactantes, sin embargo, también exhiben una disminución de la respuesta del eje HPA frente a estresores emocionales (Neumann et al., 1998; Windle et al., 1997c). Éstos representan estímulos complejos, cuyo significado fisiológico depende de su procesamiento sensorial y afectivo en estructuras del SNC de alto orden, que proyectan a su vez, al núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV) (Herman & Cullinan, 1997). Estos circuitos límbicos (como la amígdala, corteza prefrontal e hipocampo) que señalizan el valor afectivo de los estímulos emocionales al NPV, son capaces de aumentar o disminuir la salida del eje HPA dependiendo del nivel de activación de los mismos (Herman & Cullinan, 1997). Por lo tanto, una reducción de la actividad de las aferencias límbicas hacia el NPV (da Costa et al., 1996, 1997; Wartella et al., 2003) podría jugar un papel importante en la hipo-respuesta endócrina de las madres ante estresores emocionales, como consecuencia de la disminución del valor aversivo de los mismos (da Costa et al., 1996, 1997; Lightman et al., 2001).

Al igual que en el caso del comportamiento, las crías modulan la respuesta endócrina del eje HPA frente a potenciales peligros. Así, las hembras lactantes presentan respuesta endócrina de estrés frente al olor de un predador cuando las crías están presentes (Deschamps et al., 2003) o frente a cambios en el estado de las mismas, como la reunión con crías previamente sometidas a *shocks* eléctricos (Smotherman et al., 1977). Por otra parte, las madres no exhiben respuesta de ACTH o de CORT frente a un sonido fuerte e inesperado cuando se encuentran en la caja nido con sus crías (Windle et al., 1997c).

Respuesta de las hembras lactantes a estímulos reforzadores positivos

La reacción de las ratas madres ante estímulos aversivos ha sido ampliamente estudiada, sin embargo su respuesta frente a estímulos atractivos con valor reforzador positivo, exceptuando a las crías, ha sido pobremente explorada.

Los trabajos que abordan esta temática sugieren que durante el posparto las crías son reforzadores positivos más potentes que otros estímulos con valor de incentivo. Así, Fleming y colaboradores (1994) demostraron que las ratas lactantes se condicionan a un ambiente previamente asociado con crías vs. un ambiente neutro, sin embargo no presentan condicionamiento de lugar por un espacio previamente asociado a comida, a pesar de estar hambrientas. A su vez, cuando se les da a elegir entre un ambiente asociado con crías y uno asociado con cocaína durante el posparto temprano, la mayoría de las madres presentan preferencia por el compartimiento asociado a las crías (Mattson et al., 2001). Durante la maternidad, a su vez, las actividades de cuidado directo de las crías prevalecen sobre la expresión de otros comportamientos motivados, probablemente como consecuencia del fuerte valor de incentivo de las crías. En este sentido, hembras lactantes en una caja con crías y presas, optan por cuidar de sus crías la mayor parte del tiempo de la prueba y solo ocasionalmente cazan a las presas. Bajo estas condiciones, la administración de fármacos que reducen la expresión del comportamiento maternal, como la morfina, estimulan la caza a expensas de una reducción de los cuidados maternos (Sukikara et al., 2006).

Un modelo interesante para explorar la respuesta de las hembras lactantes frente a reforzadores sociales positivos es el estro pos-parto. La rata, al igual que otros roedores, exhibe un estro posparto fértil generalmente la noche del parto. Durante este período único de su ciclo reproductivo, la hembra es capaz de exhibir comportamientos de solicitud sexual y lordosis en presencia de un macho y actividades de cuidado de las crías (Connor & Davis, 1980a; Gilbert et al., 1980, 1984), indicando que se encuentra sexual- y maternalmente motivada.

El comportamiento sexual, al igual que el maternal, es fuertemente motivado para las hembras (Agmo, 1999; Beach, 1976; Pfaus et al., 2001). Así, ratas sexualmente activas⁴ prefieren un ambiente previamente asociado con un macho con el cual copularon a uno neutro (Paredes & Alonso, 1997) y aprenden a apretar una palanca para tener acceso a un macho (Bermant & Westbrook, 1988), mostrando que el mismo posee un fuerte valor de incentivo sexual para ellas.

A pesar de que numerosas especies de mamíferos exhiben estro posparto fértil (Asdell, 1964), quizás por tabúes sociales o por la complejidad que representa su abordaje, la co-ocurrencia de la motivación sexual y maternal durante este período ha sido escasamente estudiada.

Agresión maternal

Durante la lactancia, las hembras despliegan respuestas agresivas intensas hacia individuos adultos intrusos en la caja materna. Esta conducta agonística de las madres, que contrasta con el comportamiento no-agresivo de las hembras en otras fases de su ciclo reproductivo, fue denominada por Moyer (1968) *agresión maternal*. La misma consiste en una serie de patrones de lucha por parte de las hembras que provocan en el intruso respuestas de sumisión, como forma de reducir la agresividad materna, o de escape (Moyer, 1968; Olivier & Mos, 1986; Ostermeyer, 1983; Svare 1981).



Figura 2. Agresión maternal. Hembra lactante atacando y mordiendo a un macho intruso en la caja materna.

4 La literatura refiere a las ratas hembras en la fase de proestro tardío del ciclo estral o tratadas con estradiol y progesterona, que exhiben comportamiento sexual, como hembras *sexualmente receptivas*. Esta designación de la condición sexual de la hembra se asocia a un papel pasivo de la misma durante la cópula, sin embargo el comportamiento sexual de las hembras es fuertemente motivado y ellas buscan de forma activa la cópula (Agmo, 1999; McClintock & Anisko, 1982; Pfaus et al., 1999). Por este motivo, nos referimos a lo largo del presente trabajo a las hembras en proestro tardío o estro posparto como ***sexualmente activas***.

El comportamiento ofensivo de las madres aparece algunos días antes del parto (*agresión de caja nido*, Mayer & Rosenblatt, 1987), es máximo inmediatamente después del mismo y continúa siendo elevado durante las primeras dos semanas posparto (Erskine et al., 1978; Flannelly & Flannelly, 1987; Mayer et al., 1987). Se ha propuesto que las hormonas de la gestación tardía son responsables del desarrollo de la agresión maternal previo al parto y que luego del mismo es la exposición continua a las crías la que mantiene esta conducta (Mayer et al., 1987). En este sentido, la ovariectomía o hipofisectomía no interrumpen la agresión maternal durante el posparto (Erskine et al., 1980; Mayer et al., 1990a,b).

La presencia de las crías y del nido materno⁵ son indispensables para la exhibición de agresión maternal por parte de las hembras lactantes (Erskine et al., 1980; Mayer et al., 1990b; Stern & Kolunie, 1993). Así, la separación de las crías por un período de 4 h provoca una reducción de la agresión maternal (Erskine et al., 1978; Ferreira & Hansen, 1986) y una separación de 24 h la inhibe completamente (Gandelman, 1972). En particular, los estímulos olfativos (Ferreira et al. 1987; Ferreira & Hansen 1986; Kolunie & Stern 1995) y táctiles de las crías (estimulación de la región ventral, Stern & Kolunie, 1993) y del macho (estimulación de la región perioral, Kolunie & Stern, 1990; Stern & Kolunie, 1991) son determinantes para el despliegue de este comportamiento ofensivo.

La agresión maternal no sólo acompaña el curso temporal de las respuestas maternas (Mayer et al., 1987, Mayer & Rosemblatt, 1984), sino que es fuertemente dependiente de la motivación maternal. En este sentido, hembras ovariectomizadas sensibilizadas exhiben agresión maternal frente a un macho intruso en el nido, aunque la misma es deficiente en comparación a la presentada por las hembras lactantes (Ferreira et al., 2002). Sin embargo, la

⁵ Podemos definir al **nido** como la región de la caja materna en la cual la hembra duerme, cuida y amamanta a su camada. Durante la lactancia, las ratas acumulan material de cama en esta región, formando paredes alrededor de las crías, que mantienen la temperatura de nido relativamente estable.

presencia de crías demandantes⁶, que poseen un valor de incentivo mayor que las crías no-demandantes, aumenta la agresión maternal de las ratas sensibilizadas (Pereira, 2005).

Los intensos despliegues agresivos que exhiben las hembras lactantes frente a un macho intruso junto con la respuesta de sumisión y/o escape que generan en este último (Moyer, 1968; Olivier & Mos, 1986), contrastan con la solicitud sexual que exhiben las hembras sexualmente activas, la cual incita al macho a aproximarse y montarla (McClinkton & Anisko, 1982; Pfaus et al., 1999). El claro antagonismo de ambas respuestas, condujo a la idea de que el comportamiento sexual y la agresión maternal eran mutuamente excluyentes (Connors & Davis, 1980; Flannelly & Flannelly, 1987). Esta idea refuerza la teoría de que la expresión óptima de un comportamiento requiere la inhibición de motivaciones competitivas (Afonso et al., 2007; Dellu-Hagedorn, 2006; Numan & Insel, 2003). Curiosamente, la rata es maternal y sexualmente activa durante el estro posparto aunque la posibilidad de que ambos comportamientos se expresen simultáneamente no ha sido explorada aún.

6 Las **crías demandantes** son crías que permanecen separadas de sus madres durante 12 h, por lo que presentan un aumento en sus demandas fisiológicas. Las hembras lactantes prefieren a las crías demandantes frente a las no-demandantes en un modelo de preferencia, indicando que valor de incentivo maternal de las primeras es mayor (Pereira & Ferreira, 2006).

Objetivo General e Hipótesis

Pretendemos profundizar en la comprensión de los factores internos y contextuales implicados en los cambios en el valor afectivo y, como consecuencia, en la respuesta de los individuos a estímulos con significado biológico. Por este motivo, en esta tesis nos centramos en el estudio de la maternidad, un período en el cual la rata modifica su respuesta no solo frente a las crías sino ante otros estímulos del medio. De acuerdo a este objetivo nos planteamos las siguientes hipótesis de trabajo:

H1. La condición maternal y la presencia de las crías, independientemente del perfil endócrino de la lactancia, están asociadas a una reducción del valor afectivo negativo de estímulos potencialmente nocivos, disminuyendo la respuesta comportamental y endócrina de las hembras ante los mismos.

H2. El valor de incentivo relativo de un macho adulto y de las crías para hembras sexualmente activas y maternas varía de acuerdo al perfil endócrino y a la experiencia reproductiva previa.

H3. El macho en el contexto de la caja materna se torna un estímulo ambivalente para las hembras en estro posparto, generando tanto respuestas de solicitud sexual como de agresión maternal.

Los experimentos realizados para evaluar las tres hipótesis planteadas, así como los resultados obtenidos en los mismos, se encuentran organizados a continuación en tres capítulos. Estos resultados dieron lugar a dos publicaciones en revistas internacionales arbitradas y a un manuscrito en preparación.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Experimentación Animal de la Facultad de Ciencias utilizando ratas (*Rattus norvegicus*) de la cepa Wistar, en concordancia con la Ordenanza de la Universidad de la República para el uso y cuidado de animales de laboratorio. La misma contó con el financiamiento del PEDECIBA-Biología, del programa Proyectos para Jóvenes Investigadores Fondo Clemente Estable (convocatorias 2005 y 2007) y del Programa de Desarrollo Tecnológico convocatoria 2006, así como con apoyo de la CSIC, la International Brain Research Organization (IBRO-LARC) y del CINVESTAV, México.

Capítulo I

Influencia de la condición maternal en la respuesta comportamental y endócrina de las hembras frente a un estímulo aversivo complejo.

El experimento que se describe a continuación dio lugar a la siguiente publicación: **Agrati D.**, Zuluaga M.J., Fernández-Guasti A., Meikle A. & Ferreira, A. Maternal condition reduces fear behaviors but not the endocrine response to an emotional threat in virgin female rats. *Hormones and Behavior*, 2008, 53: 232-240.

Sobre la base de que la hipo-respuesta endócrina frente a estresores emocionales de las hembras lactantes depende de la reducción del valor aversivo asignado a los mismos (da Costa et al., 1996, 1997; Wartella et al., 2003) y de que la disminución de la respuesta comportamental de temor está determinada por la condición maternal, independientemente del perfil endócrino de la lactancia (Ferreira et al., 2002), nos preguntamos si la condición maternal *per se* era capaz de reducir la respuesta endócrina de las hembras frente a estresores emocionales (**a partir de la hipótesis 1**).

Objetivo

Evaluar las respuestas comportamental y endócrina de hembras vírgenes maternas y no-maternas y de hembras lactantes frente a un estresor emocional complejo.

Abordaje experimental

Se describe en detalle en el artículo Agrati et al., 2008a adjunto al final del capítulo. Brevemente, utilizamos 3 grupos principales de hembras: vírgenes maternas (a través del proceso de sensibilización) y no-maternas y hembras lactantes. Evaluamos el comportamiento maternal de ambos grupos de ratas maternas -sensibilizadas y lactantes- en el día 5 de exhibición de cuidados maternos y al día siguiente las enfrentamos al estresor emocional (Figura 3).

En el caso de las hembras vírgenes, maternales y no-maternales, éstas fueron probadas en la fase de diestro de su ciclo estral, para disminuir la influencia de la actividad del eje hipotalámico-hipofisario-ovárico sobre el eje HPA (Seal et al., 2004; Viau & Meaney, 1991).

Como estresor emocional seleccionamos el modelo de inmovilidad por la activación de un sonido fuerte e inesperado en un campo abierto iluminado (Hård et al., 1985). Este modelo nos permite evaluar las respuestas comportamentales de ansiedad en un ambiente aversivo y novedoso (campo abierto) y de miedo en respuesta a la amenaza repentina y sin escape de un sonido fuerte, así como la respuesta endócrina frente a esta situación (Fahlke et al., 1993; Hård et al., 1985). Asimismo, dado que la reducción de la respuesta de inmovilidad de hembras lactantes depende de la presencia de las crías (Hård & Hansen, 1985), tanto las hembras maternales como las no-maternales fueron probadas en presencia de cuatro crías (Figura 3). Quince minutos luego del inicio de la prueba de estrés, las hembras fueron sacrificadas y a partir de la sangre colectada se determinaron los niveles plasmáticos de CORT (vírgenes no-maternales n=8 y maternales n=10 y lactantes n=10). A su vez, se midieron los niveles de CORT de grupos independientes de hembras no estresadas (vírgenes no-maternales n=10 y maternales n=8 y lactantes n=10).

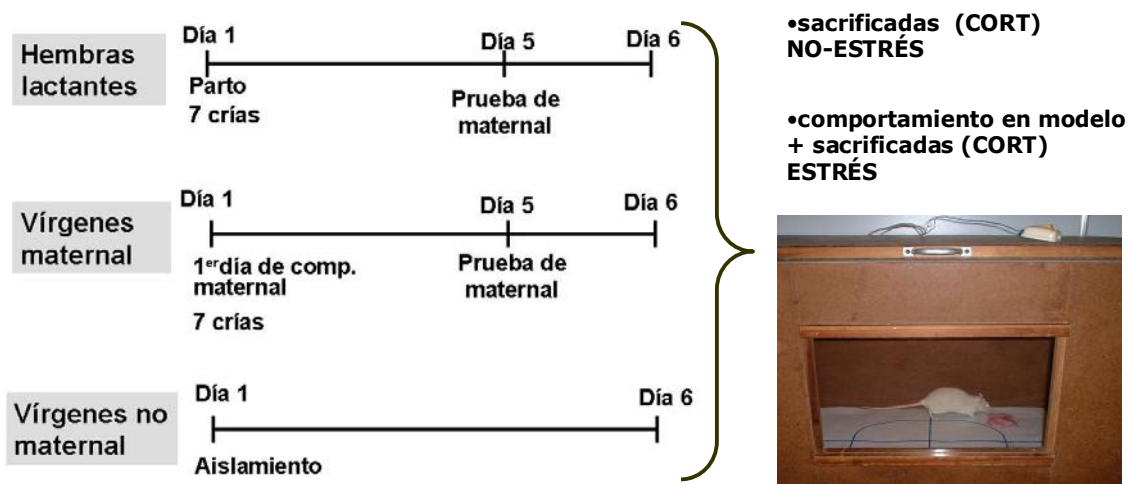


Figura 3. Protocolo experimental y modelo de estrés utilizados (en detalle en Agrati et al., 2008a).

Resultados

Comportamiento maternal

Sesenta y siete por ciento (12/18) de las hembras vírgenes sensibilizadas, exhibieron comportamiento maternal en el día correspondiente a la fase de proestro de su ciclo estral y el 72% (13/18) perdió la ciclicidad ovárica y entró en un diestro prolongado (estado de pseudo-gestación), probablemente como consecuencia de la estimulación ventral proporcionada por las crías (Jakubowski & Terkel, 1980, 1986).

El comportamiento maternal de las hembras vírgenes sensibilizadas, evaluado el día 5 de expresión de cuidados de las crías, no difirió significativamente del presentado por las hembras lactantes, ni en los componentes activos ni en los pasivos (Tabla 1). De igual forma, dentro del modelo de estrés, todas las hembras maternas desplegaron comportamiento maternal durante los 5 min de exposición al campo abierto iluminado y este comportamiento no difirió entre madres vírgenes y lactantes (suma de acarreos/re-arreglos y lamidos: 13.0 (6.4) y 16.0 (2.0), respectivamente; $U=35.0$, $p=NS$, prueba U de Mann-Whitney).

Tabla 1. Comportamiento maternal de hembras vírgenes maternas y lactantes el día 5 de expresión de cuidados maternos.

	número de respuestas activas					
	acarreos	re-arreglos	lamidos corp	lamidos gen	const nido	acicalamiento
virgen	5.0 (0.0)	4.0 (2.0)	25.0 (7.0)	14.0 (2.5)	10.5 (6.8)	9.0 (3.5)
lactante	5.0 (0.0)	6.5 (3.4)	25.5 (4.4)	11.5 (4.3)	13.5 (8.6)	10.0 (3.8)
U	117.5	76.0	118.0	103.5	84.5	93.0
p	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	duración de respuestas pasivas			latencia		
	hover over	amamantamiento	fuera del nido	reunión camada	hover over	amamantamiento
virgen	1292.0 (360.5)	35.0 (77.0)	180.0 (127.5)	50.0 (20.8)	103.0 (76.0)	1650.0 (300.0)
lactante	1482.5 (78.6)	92.5 (82.5)	212.5 (67.8)	57.5 (21.3)	176.0 (88.6)	1707.5 (82.5)
U	87.0	114.0	118.0	94.0	102.5	107.0
p	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Los datos se expresan como medianas (rango semi-intercuartil, RSIQ). Lamidos corporales (lamidos corp) y anogenitales (lamidos gen), construcción de nido (const nido), y reunión de toda la camada en el nido (reunión camada). Los resultados de las hembras vírgenes (virgen) y lactantes (lactante) fueron comparados con la prueba U de Mann-Whitney (**de Agrati et al., 2008a**).

Respuesta comportamental de estrés

En el modelo empleado, evaluamos el comportamiento de las hembras asociado a la ansiedad experimental, la exploración y el temor. Respecto a la ansiedad experimental, la figura 4 muestra que ni el número de cruces ni la latencia a entrar a la zona central del campo abierto difirieron entre los grupos de hembras. Sin embargo, las ratas maternas, tanto lactantes como vírgenes, presentaron un aumento significativo de la exploración de este ambiente aversivo y novedoso, reflejado en un mayor número de cruces totales (periféricos más centrales) respecto a las vírgenes no-maternales (Figura 4).

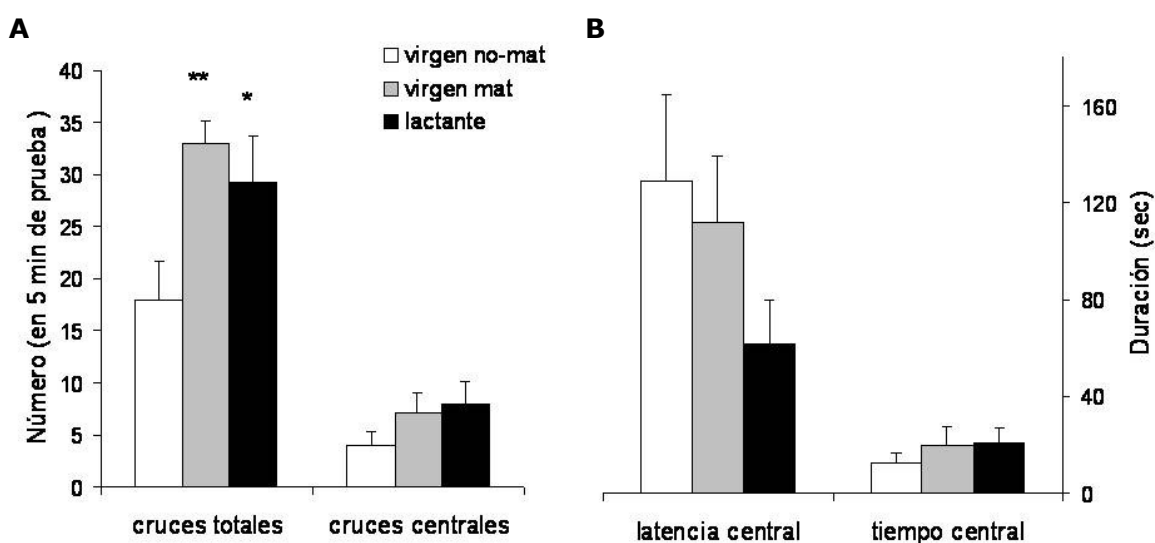


Figura 4. Número de cruces totales y centrales (Panel A) y latencia a entrar y tiempo de permanencia en el área central (Panel B) del campo abierto de vírgenes no-maternales (virgen no-mat) y maternas (virgen mat) y hembras lactantes (lactante). Los datos se expresan como medianas (RSIQ). * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ vs. virgen no-mat, Prueba U de Mann-Whitney (**de Agrati et al., 2008a**).

A su vez, las hembras vírgenes maternas y lactantes exhibieron una reducción de los comportamientos de temor en respuesta a la activación del sonido: escape y duración de la reacción de inmovilidad, en comparación a las ratas vírgenes no-maternales (Figura 5).

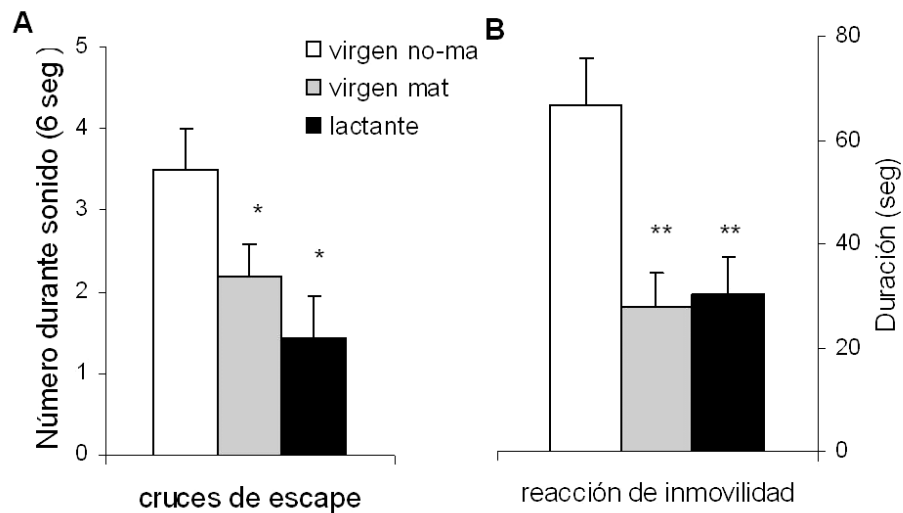
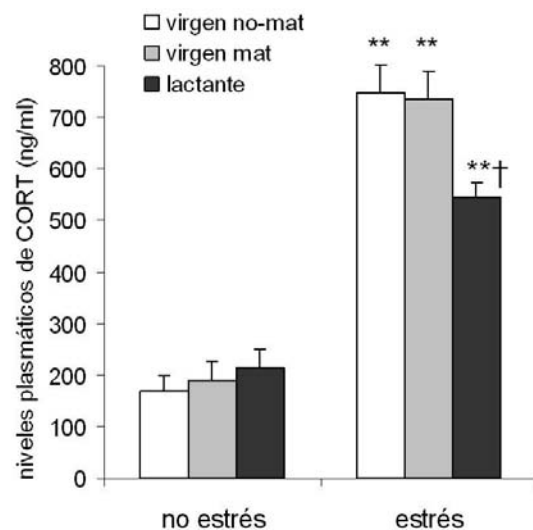


Figura 5. Escape (presentada como número de cruces) (Panel A) y duración de la reacción de inmovilidad (Panel B) de hembras virgen no-mat, virgen mat y lactante en respuesta a la activación del sonido. Los datos se expresan como medianas (RSIQ). * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ vs. virgen no-mat, Prueba U de Mann-Whitney (*de Agrati et al., 2008a*).

Respuesta endócrina de estrés

El análisis de varianza (factores: estado y condición de estrés) reveló un efecto significativo del estrés ($F(1, 49) = 210.2$, $p < 0.01$) y de la interacción del estado de las hembras y la condición de estrés ($F(2, 49) = 5.5$, $p < 0.01$) en los niveles plasmáticos de CORT de las hembras (Figura 6). Así, los niveles de CORT no difirieron entre los tres grupos de hembras en reposo y se elevaron en todos los grupos luego de la exposición al estresor (Figura 6). Sin embargo, la respuesta de las vírgenes, independientemente de su condición -maternal o no-maternal- fue mayor que la de las hembras lactantes (Figura 6).

Figura 6. Niveles plasmáticos de CORT (ng/ml) de hembras 2 hs luego de ser trasladadas al cuarto experimental (condición no estrés) o 15 min luego de comenzar la exposición al estresor (condición estrés) de hembras virgen no-mat y mat y lactante. Datos expresados como medias $\pm$ error estándar (SE). ** $p < 0.01$ vs no estrés y † $p < 0.05$ vs virgen no-mat y mat, prueba post-hoc de Tukey (*de Agrati et al., 2008a*).



Conclusiones y discusión

El resultado principal de este capítulo es que la condición maternal *per se* se asocia a una reducción de la respuesta comportamental de temor, pero no a la atenuación de la respuesta endócrina frente a un estresor emocional. Este resultado sugiere a su vez, que durante la lactancia existiría una disociación de los mecanismos fisiológicos que regulan ambas respuestas.

La disminución de la respuesta de temor como consecuencia del estado maternal, concuerda con estudios previos que muestran que las hembras sensibilizadas reducen su miedo y ansiedad en diferentes modelos (Ferreira et al., 2002; Hansen & Ferreira, 1986; Pereira et al., 2005; Stern & Mackinnon, 1976). A su vez, tanto las hembras sensibilizadas como las lactantes exhibieron una mayor exploración del ambiente novedoso y aversivo que las hembras no-maternales, a pesar de dedicar tiempo al cuidado de las crías en un cuadrante en particular. Este resultado apunta a una disminución de la inhibición conductual de las ratas maternales en el campo abierto, si bien no observamos un efecto ansiolítico de la condición maternal en la zona central del mismo. La marcada similitud del comportamiento afectivo en esta situación adversa entre ambos grupos de hembras maternales concuerda con las semejanzas observadas en los cuidados dirigidos a las crías por parte de las mismas. No obstante, a pesar de que el comportamiento maternal de las hembras vírgenes y lactantes fue similar, no podemos descartar la existencia de diferencias en la motivación maternal, que pueden emerger en modelos específicos (Stern & Mackinnon, 1976) o situaciones más desafiantes (Agrati et al., 2008b, *vide infra*).

La alta respuesta endócrina junto con la baja respuesta comportamental de temor exhibida por las vírgenes maternales indica que este estímulo aversivo es procesado de forma paralela en el SNC, originando dos respuestas fisiológicas opuestas ante el mismo. En este sentido, varios autores encuentran diferencias en las áreas (por ejemplo subnúcleos de la amígdala) o en los sistemas de neurotransmisión implicados en el control de la respuesta comportamental y endócrina frente a estímulos aversivos (File et al., 1993; McGregor & Herbert, 1992; Rittenhouse et al., 1992).

A su vez, nuestros resultados mostrando una fuerte respuesta adrenocortical de las hembras vírgenes maternas frente a un estresor emocional, junto con evidencia previa de que hembras sensibilizadas no disminuyen su respuesta de CORT frente a un estresor físico (Scheiln et al., 1974), enfatizan la importancia del perfil endócrino del parto y la lactancia en la regulación a la baja de la actividad del eje HPA. En particular, la prolactina parece tener un papel central en el control de la respuesta neuroendócrina de estrés durante la lactancia, ya que la infusión de ARNm antisentido de prolactina en el ventrículo lateral de hembras lactantes aumenta tanto la ansiedad experimental en el laberinto elevado en cruz como la respuesta de ACTH y oxitocina frente a la prueba de nado forzado (Torner et al., 2001).

La diferencia en la respuesta endócrina de vírgenes maternas y lactantes puede deberse a cambios en diversas regiones del SNC y del eje HPA. No obstante, la semejanza comportamental entre hembras lactantes y sensibilizadas, sugiere que el valor afectivo que las ratas maternas le asignan al estímulo aversivo es similar, por lo que el procesamiento de este estresor en áreas del sistema límbico, como la amígdala, parecería ser similar también. Es probable, entonces, que las hormonas de la lactancia alteren áreas de relevo que conectan el sistema límbico con el NPV, como el APOM y los núcleos de la estria terminal (Herman & Culligan, 1997) y/o distintos niveles del eje HPA.

Por otra parte, la alta respuesta de CORT de las hembras sensibilizadas cuestiona la concepción de que la reducción de la respuesta comportamental de temor se debe a una disminución del valor aversivo del estímulo. Este resultado abre la posibilidad de que no sea el valor afectivo el que está alterado por la condición maternal, sino la estrategia utilizada por las hembras para confrontarlo, que pasa de defensiva a ofensiva. Esta idea es difícil de explorar, ya que el comportamiento de un individuo frente a un estímulo, es determinado tanto por el valor afectivo del mismo como por otros procesos, como los motivacionales (Berridge, 2004; Panksepp, 2005). El empleo de otros parámetros, como las expresiones faciales (Berridge & Robinson, 2003) o la frecuencia de emisión de ultravocalizaciones (Burgdorf et al., 2008) pueden ser útiles para explorar diferencias en el valor afectivo asignado a ciertos estímulos o situaciones.

En resumen, el estado maternal independientemente del perfil endócrino del periparto, le permite a la hembra cuidar de sus crías aun en situaciones desafiantes, modificando la forma en la cual confronta un potencial peligro, una estrategia comportamental que parece independiente de la respuesta del eje HPA. Para profundizar en la comprensión de la relación entre la condición maternal y la respuesta endócrina de estrés sería necesario analizar las respuestas de madres -vírgenes y lactantes- ante diferentes estresores emocionales con significado biológico para las hembras y para las crías.

Maternal condition reduces fear behaviors but not the endocrine response to an emotional threat in virgin female rats

D. Agrati^{a,b,*}, M.J. Zuluaga^a, A. Fernández-Guasti^c, A. Meikle^d, A. Ferreira^a

^a Sección Fisiología y Nutrición, Facultad de Ciencias, Iguá 4225, Montevideo, Uruguay

^b Laboratorio de Neurociencias, Facultad de Ciencias, Iguá 4225, Montevideo, Uruguay

^c Departamento de Farmacobiología, CINVESTAV, Calzada de los Tenorios 235, México D.F., México

^d Departamento de Biología Molecular y Celular, Facultad de Veterinaria, Lasplacetas 1550, Montevideo, Uruguay

Received 19 May 2007; revised 20 September 2007; accepted 1 October 2007

Available online 12 October 2007

Abstract

Lactating dams and maternal virgin females are less fearful in behavioral tests compared with non-maternal animals, suggesting that maternal condition *per se* reduces the negative value of threatening stimuli. In addition, lactating females exhibit a diminished hypothalamic–pituitary–adrenal response to potential environmental threats. Can the maternal condition, independently of the endocrine profile of lactation, promote a reduction in the behavioral as well as in the endocrine response to an emotional stressor? To answer this question, anxiety-related and fear behaviors as well as the levels of corticosterone were evaluated in response to a bright-lit open field-loud noise model in maternal and non-maternal non-ovariectomized virgin females and lactating dams in the presence of the pups. Maternal animals, both lactating and virgin, presented an increased exploration of the bright-lit open field and a significant reduction of fear behaviors, indicated by the decreased flight and immobility responses to the subsequent activation of a loud noise, in comparison to non-maternal virgins. Interestingly, maternal virgin females, as non-maternal rats, showed high corticosterone plasma levels, in contrast to the lower endocrine response exhibited by lactating dams when confronted to this threat. Present results suggest that maternal condition allows females to take risks when caring for their young, a behavioral strategy that is independent of the reduced hypothalamic–pituitary–adrenal axis response characteristic of lactation. This evidence points towards a clear dissociation in the mechanisms regulating behavioral and endocrine responses to emotional stressors during motherhood.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Maternal behavior; Sensitization; Stress; Anxiety-related behaviors; Fear behavior; Corticosterone

Introduction

Motherhood implies a shift in the mother's perception of the pups (Kinsley and Bridges, 1990; Rosenblatt, 1975), which not only assures the attachment between mother and young, but also brings about dramatic changes in their response to other environmental stimuli. Thus, concomitant with the display of maternal behavior, lactating rats exhibit less fear towards a sudden auditory stimulus (Ferreira et al., 2002; Hård and Hansen, 1985) and show a reduction in anxiety in the open field (Fleming and Luebke, 1981), conflict tests (Ferreira et al., 1989) and the plus maze test (Bitran et al., 1991; Lonstein et al., 1998; Pereira et al., 2005) compared with other stages of the female's reproductive cycle.

This reduction in general fearfulness observed during postpartum seems to be related to the care taking of the offspring, as lactating females retrieve pups in a strange novel environment attached to their home cage (Stern and Mackinnon, 1976), spend more time in the open arms of the plus maze when the pups are placed in these arms (Pereira et al., 2005) and exhibit a reduced immobility reaction in response to a sound activation when the pups are present (Hård and Hansen, 1985).

Although it is generally considered that the mothers' reduced fearfulness depends upon the hormonal profile that characterizes gestation, parturition and lactation (Numan and Insel, 2003), the induction of maternal behavior in ovariectomized virgin females without hormonal treatment, through a sensitization procedure (Cosnier and Couturier, 1966; Fleming and Rosenblatt, 1974; Rosenblatt, 1975), has been associated with a decreased freezing response to a sudden noise (Ferreira et al., 2002) and reduced

* Corresponding author. Iguá 4225, Montevideo, Uruguay. Fax: +598 2 525 86 17.
E-mail address: dagrati@fcien.edu.uy (D. Agrati).

anxiety levels in the plus maze test (Pereira et al., 2005) when compared to non-maternal ovariectomized females. Additionally, recent evidence shows that during motherhood, the impairment of associative learning induced by stress is abolished in lactating and sensitized females (Leuner and Shors, 2006). These results, taken together, strongly suggest that the development of maternal behavior, independently of the endocrine profile that characterizes parturition and lactation, promotes a reduction in the negative affective value of environmental threats.

In lactating dams both behavioral and endocrine responses to threatening stimuli are altered. Thus, lactating rats present a decreased responsiveness of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis (HPA), characterized by blunted adrenocorticotropin (ACTH) and corticosterone (CORT) responses, to a huge variety of physical and emotional stressful stimuli (Lightman et al., 2001; Neumann et al., 1998; Stern et al., 1973; Windle et al., 1997c). The fact that physical stressors do not require integration of high-order brain structures to trigger a stress response (Herman and Cullinan, 1997) suggests that the adaptations behind the stress hypo-responsiveness of lactating dams imply adjustments down stream of the hypothalamus, along the HPA axis (Neumann et al., 1998; Stern et al., 1973; Toufexis et al., 1999; Windle et al., 1997a). These adaptations have been primarily related to the endocrine profile of gestation, parturition and lactation, in particular to the lactogenic hormones, oxytocin and prolactin (Lightman et al., 2001; Neumann et al., 2000; Torner et al., 2002; Windle et al., 1997b). In this sense, sensitized virgin rats (Schlein et al., 1974) and the ovariectomized postpartum females (Stern and Levine, 1972) respond with a robust CORT secretion to the physical stressor, ether.

Lactating dams also exhibit a diminished HPA axis response to emotional stressors, like a novel environment or a loud noise (Neumann et al., 1998; Windle et al., 1997c), that are complex stimuli, which physiological meaning depends on high-order sensory- and emotional-processing brain areas that project to the paraventricular nucleus (PVN) (Herman and Cullinan, 1997). These limbic circuits, that channel the impact of complex stimuli to the PVN, are capable of augmenting or diminishing HPA outcome depending on their ongoing levels of activation (Herman and Cullinan, 1997). A reduction in the activity of PVN afferents from limbic circuits (da Costa et al., 1996, 1997; Wartella et al., 2003) may play a major role in the mother's hypo-responsiveness to emotional stressors, probably as a consequence of a diminished negative value attributed to aversive stimuli (da Costa et al., 1996, 1997; Lightman et al., 2001).

If the maternal condition *per se* involves a reduction in the negative affective value given by rats to environmental threats, then maternal females, independently of the lactating endocrine profile, might exhibit a diminished HPA axis response to emotional stressors. Therefore, considering the stress reaction as the integrative response of the individual to a potential threat (Herman and Cullinan, 1997; Jensen and Toates, 1997; Millan, 2003) we evaluated the behavioral and endocrine stress response of maternal and non-maternal virgin females and lactating dams to a bright-lit open field-loud noise model (Hård et al., 1985). This model allows the assessment of the anxiety-related behaviors in an aversive novel environment and the fear behaviors in response to a sudden and inescapable threat, a loud

noise, as well as the endocrine response to this stressful situation (Fahlke et al., 1993; Hård et al., 1985). The reduction of the immobility response to this audiogenic stimulus in both lactating (Ferreira et al., 2002; Hård and Hansen, 1985) and sensitized females (Ferreira et al., 2002; Hansen and Ferreira, 1986) depends on the presence of the pups. In addition, few studies assessed the endocrine stress response of mothers with their litter (Deschamps et al., 2003; Windle et al., 1997c). Thus, in the present study lactating and sensitized as well as non-maternal females were tested in the presence of the pups.

Materials and methods

Animals

Female Wistar rats, about 3 months of age, weighing 220 to 250 g, and pups ranging from 1 to 8 days of age were used in this study. All animals were housed in a temperature and humidity-controlled environment (22 ± 1 °C and 65%, respectively), under 12-h light–dark cycle conditions (lights on at 0500 h) with *ad libitum* access to water and rat chow. The animals were divided into three main groups: maternal (sensitized) and non-maternal non-ovariectomized (NONOVX) virgin females and primiparous lactating dams. An extra group of donor lactating rats with their pups were maintained to provide supply of foster pups for the sensitization procedure and behavioral testing.

Non-maternal virgin females were kept in groups of four until the experimental procedure began; then they were isolated in individual cages. Maternal females were maintained in individual cages with seven pups (four females and three males); from the delivery day onwards in the case of lactating dams and from the first day of maternal responsiveness onwards in the case of sensitized females.

During the experiment, daily vaginal smears were taken of all the females, including lactating dams. Only those virgin females that showed two regular consecutive estrous cycles (4 days) were used in the experiment. According to Montes and Luque (1983) the following estrous cycle stages were determined: estrus (predominance of cornified cells), metestrus (presence of cornified cells and leukocytes), diestrus (predominance of leukocytes) and proestrus (presence of round nucleated cells and cornified cells).

All animal care and experimental procedures were in accordance with the guide for the care and use of laboratory animals of the NIH and the Universidad de la República norm for the use and care of laboratory animals (Diario Oficial No. 25467, Feb 21/00). The present experimental protocol was approved by the local Ethical Committee on Animal Care and Protocols.

Induction of maternal behavior (sensitization procedure)

Proestrous virgin females were housed in individual cages and on the following day (estrous stage) five freshly fed pups (1 to 8 days old) were scattered in the corner of the home cage opposite to the female's sleeping area. The pups were removed every 12 h and replaced 15 min later with five new freshly fed pups after which a 15-min maternal behavior observation was performed (Pereira et al., 2005). Based on previous studies (Fleming and Rosenblatt, 1974; Pereira et al., 2005), retrieval of all five pups into the nest and a hover over or nursing posture over the pups on two successive observations, were considered as markers of maternal responsiveness. Females were assigned a sensitization latency corresponding to the first day of the two consecutive maternal displays, and from this day onwards each maternal rat received seven pups. If a female injured or killed a pup during an observation all pups were removed. In the following test, 12 h later, only one pup was introduced into the cage; if it was not harmed during the 15-min observation period, two pups were added and the observation was extended another 15 min. On subsequent tests five pups were given. Animals that cannibalized pups on two consecutive observations and those that did not display maternal behavior after 15 days of pup exposure were excluded from the experiment.

Maternal behavior test

On the fifth day of maternal responsiveness, five foster pups of 5 days of age were scattered in the home cage opposite to the female's nest and the number of the

following maternal behavior components continuously recorded for 30 min: retrieval of the pups into the nest, mouthings (short distanced oral repositioning of the pups), full body and anogenital lickings and nest building (Pereira and Ferreira, 2006). In addition, it was also registered the total duration of the hovering over the pups in the nest while actively performing other behaviors (i.e., licking of pups or self grooming) and the nursing postures. The total time out of the nest was calculated as 1800 s (total time of the test) minus the total time in contact with pups (summed durations of hover over plus nursing behavior). Also, the latencies to the complete retrieval (reunion of the whole litter into the nest) as well as to begin hovering over and nursing posture were registered. The latency to begin hovering over or nursing posture the pups was the first occurrence of a bout of each behavior lasting more than 2 min of duration. A latency of 1800 s was given for any category of behavior that was not initiated within the 30-min observation period.

Stress procedure

The model employed was adapted from Hård and Hansen (1985) and includes a circular Plexiglass arena (50-cm diameter), with its floor divided by two perpendicular radial lines that form four sectors and by a circular line parallel to the arena edge that separates a central and a peripheral zone (8 total quadrants). Thus, the model includes a central, more aversive area, which allows the assessment of anxiety-related behaviors (Campbell et al., 2003; Ennaceur et al., 2006; Hall et al., 2000). The circular arena is enclosed in a sound proof chamber, which is illuminated by a 25-W white light bulb suspended together with a door bell (110 dB) on the ceiling of the test chamber. The behavior of the rat was observed through a Plexiglass window on the front wall.

Each female was placed in the test chamber together with four foster pups and during a 5-min period the following behaviors were recorded:

- number of peripheral crosses and rearings, as indices of exploration (Hård et al., 1985);
- number of central crosses and latency to enter and time spent in the central area of the open field, as indices of anxiety (Hall et al., 2000);
- number of retrievings/mouthings and lickings of the pups, as measurements of maternal care performed during the stress procedure.

The doorbell was subsequently activated for 6 s. During this period the rats first rushed around the chamber and immobilized concurrently with or slightly after the termination of the bell signal. Flight and immobility reactions are components of the rat defensive repertoire and are considered as fear behaviors (Fahlke et al., 1993; Hård et al., 1985; Millan, 2003). Therefore, in response to the sound's activation the following fear behaviors were measured (Hård et al., 1985):

- number of lines crossed by the rat during the signal, as an index of flight distance;
- freezing duration, defined as the time (seconds) of immobility shown by the rat from the cessation of the signal to the first distinct body movement excluding eye blinks and respiratory or vibrissae movements.

Corticosterone assay

Plasma CORT levels of stressed and non-stressed females were measured. Blood samples, obtained by decapitation around noon, were centrifuged during 10 min at 4,000 rpm and the resulting plasmas stored at -20°C until the hormonal determination. CORT plasma levels were measured by a solid radioimmunoassay performed with a commercial kit (coat-A-count rat corticosterone kit, DPC) employing ^{125}I as the radioactive trace. The detection limit of the assay was 11.6 ng/ml. All samples were analyzed in the same assay and the intra-assay coefficient of variance for low, medium and high controls were 15.5% (20.0 ng/ml), 1.0% (200.0 ng/ml) and 5.4% (500.0 ng/ml), respectively.

Experimental procedure

Animals were gently manipulated during 2 weeks to eliminate putative unspecific stress effects of handling. Before proceeding with any experimental manipulation, females were carried to the experimental room in their home cage and left undisturbed for 2 h. Maternal females remained with the pups until testing. The behavioral tests were performed between 1000 and 1100 and the behavior of a single rat recorded at a time by the same observer located 1 m apart from the testing model with the aid of simultaneous video recording.

Non-maternal virgin females were tested on the day corresponding to the diestrous stage of their estrous cycle, 6 days after isolation. A putative effect of isolation on virgin female's behavior on this model was discarded in a previous study (Ferreira et al., 2002). The maternal behavior of lactating and maternal virgin rats was tested on the 5th day of expression of this behavior. The following day (6th day of expression of maternal behavior) at the same hour, lactating and maternal virgin females were tested in the stress model. If a sensitized female was not in diestrus on the 6th day of expression of maternal care, the stress test was moved forward to the next diestrous day. As most sensitized females were in diestrus on the 6th day of maternal behavior expression (see Results section), only two females of the stressed group were tested 1 day later (7th day of expression of maternal behavior) and three females of the non-stressed group were sacrificed on days 7 and 8 of maternal behavior expression.

Diestrus was selected as the stage of the estrous cycle when the stress procedure should be performed, as estrogen levels are very low in this phase (Savoy-Moore et al., 1980), and therefore any effect of the changes in hypothalamic–pituitary–ovarian axis function over anxiety-related behaviors and HPA axis activity were minimized (Fernández-Guasti and Picazo, 1992; Seale et al., 2004; Viau and Meaney, 1991; Zuluaga et al., 2005).

CORT plasma levels were determined from blood samples of independent non-stressed and stressed female's groups (maternal and non-maternal virgins and lactating dams). Therefore, non-stressed females were left undisturbed for 2 h in the experimental room before being sacrificed; whereas stressed females were sacrificed 15 min after the beginning of the stress procedure.

Table 1
Maternal behavior performed by sensitized and lactating females during a 30-min test on the fifth day of expression of this behavior

	Number					
	Retrivings	Mouthings	Corporal lick	Anogenital lick	Nest building	Grooming
sens	5.0 (0.0)	4.0 (2.0)	25.0 (7.0)	14.0 (2.5)	10.5 (6.8)	9.0 (3.5)
lac	5.0 (0.0)	6.5 (3.4)	25.0 (4.4)	11.5 (4.3)	13.5 (8.6)	10.0 (3.8)
U	117.5	76.0	118.0	103.5	84.5	93.0
P	NS	NS	NS	NS	NS	NS
	Duration			Latency		
	Hover over	Nursing posture	Out of the nest	Complete retrieval	Hover over	Nursing posture
sens	1292.0 (360.5)	35.0 (77.0)	180.0 (127.5)	50.0 (20.8)	103.0 (76.0)	1650.0 (300.0)
lac	1482.5 (78.6)	92.5 (82.5)	212.5 (67.8)	57.5 (21.3)	176.0 (88.6)	1707.5 (82.5)
U	87.0	114.0	118.0	94.0	102.5	107.0
P	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Data are expressed as medians (SIQR). Sensitized (sens, $n=17$) and lactating (lac, $n=14$) females were compared by the Mann–Whitney U test.

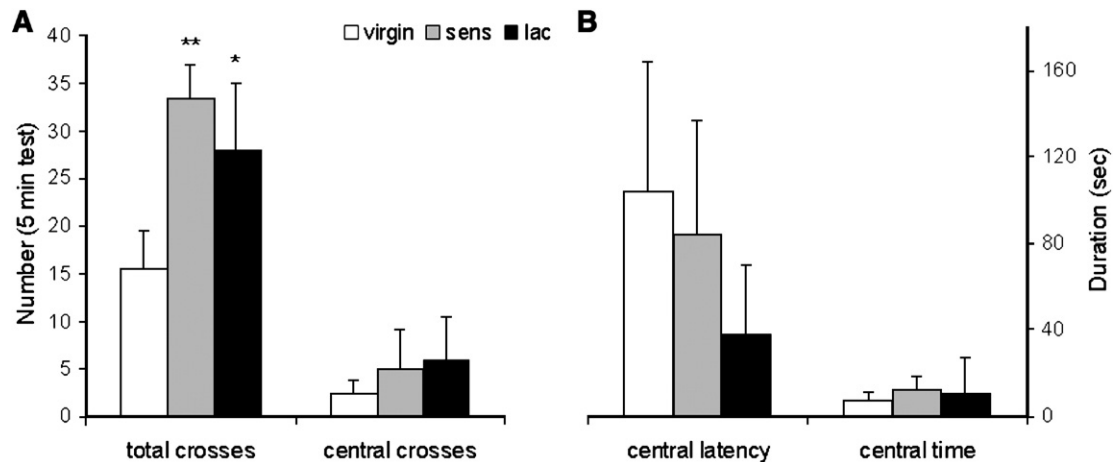


Fig. 1. Number of total and central crosses (panel A) and latency to enter and time spent in the central area (panel B) of the open field performed by non-maternal virgin (virgin, $n=8$), sensitized (sens, $n=10$) and lactating (lac, $n=9$) females. Data are expressed as medians (SIQR). * $p<0.05$ and ** $p<0.01$ vs. virgin, Mann–Whitney U test.

Statistical analysis

Since most of the behavioral data did not show a normal distribution (Kolmogorov–Smirnov test), they were analyzed by the Kruskal–Wallis one-way analysis of variances followed by the Mann–Whitney U test. Additionally, freezing (Hansen and Hård, 1980) and exploratory behavior (Johansson and Hansen, 2001) distributions are too skewed to justify statistical testing with parametric tests. Therefore, the behavioral data are expressed as medians (semi-interquartile ranges, SIQR) (Siegel and Castellan, 1988). This representation of the present data resembles its expression as means $\pm$ standard error (SE). CORT plasma levels fit parametric testing assumptions (Kolmogorov–Smirnov and Cochran C test) and therefore were analyzed by a two-way analysis of variance followed by Tukey's post hoc comparisons and are expressed as means $\pm$ SE (Sokal and Rohlf, 1969). Statistical significance in all cases was $p<0.05$.

Results

Sensitized females

Ninety percent of the NONOVX virgin females (18/20) submitted to the sensitization procedure showed maternal behavior after 4.0 (1.0) days of continuous exposure to pups. Interestingly, 67% (12/18) of these females exhibited maternal

behavior on the day corresponding to the proestrous stage of their estrous cycle and 72% (13/18) lost their ovarian cycle and entered in a prolonged diestrus. From these 13 rats, 10 expressed maternal behavior in proestrus (77%), and four of this last subgroup presented partial development of their nipples.

Maternal behavior of sensitized and lactating females

Maternal behavior assessed in a 30-min test on day 5 of maternal responsiveness did not differ between sensitized virgin females and lactating dams, either in its active or in its passive components (see Table 1). However, we cannot rule out differences in the nursing posture's expression between the two groups displaying maternal behavior since, nursing posture was expressed during the final testing minutes and therefore its duration was very short (medians around 30–90 s). One sensitized female and five lactating dams were excluded from this analysis because of technical problems with their videotapes.

Inside the stress model, all maternal females displayed maternal care during the 5-min exposure to the bright-lit open-field and this behavior did not differ between sensitized and

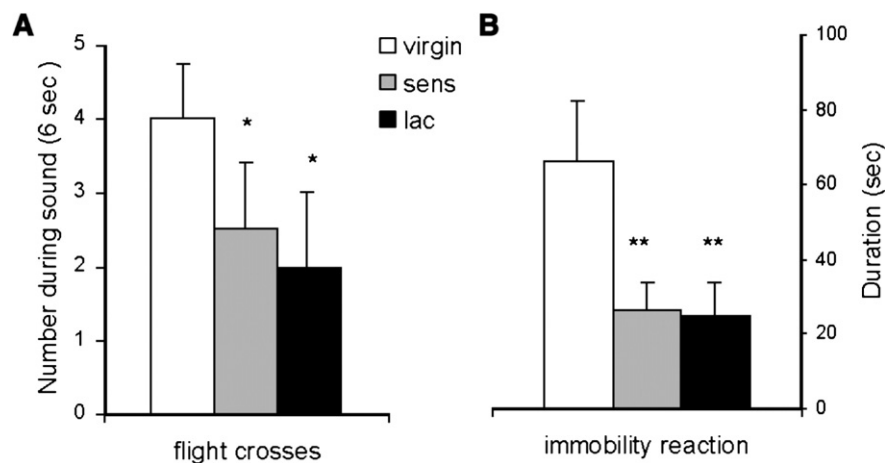


Fig. 2. Flight distance (presented as number of crosses) (panel A) and duration of the immobility reaction (panel B) of virgin, sens and lac in response to the sound activation. Data are expressed as medians (SIQR). * $p<0.05$ and ** $p<0.01$ vs. virgin, Mann–Whitney U test.

lactating rats (sum of retrievals/mouthings and lickings: 13.0 (6.4) and 16.0 (2.0), respectively; $U=35.0$, $p=NS$, Mann–Whitney U test). A non-maternal virgin female retrieved the pups during this period and was discarded from the experiment.

Behavioral stress responses

In the stress model employed, the anxiety-related, exploratory and fear behaviors of non-maternal and maternal virgin females and of lactating dams were evaluated. Regarding anxiety-related behaviors, Fig. 1 shows that the number of central crosses, as well as the latency to enter and the time spent in the central area of the open field did not significantly differ between the non-maternal virgin, sensitized and lactating groups ($H_{(2, N=27)}=2.1$, $p=NS$, $H_{(2, N=27)}=3.2$, $p=NS$ and $H_{(2, N=27)}=1.1$, $p=NS$, respectively, Kruskal–Wallis analysis of variances). However, maternal females, both lactating and virgin, presented an enhanced exploration of the novel environment reflected as a greater number of total crosses (central plus peripheral) in comparison with non-maternal virgin rats (Fig. 1; virgin vs. sens: $U=9.5$, $p<0.01$ and vs. lac: $U=15.0$, $p<0.05$). The number of rearings did not differ between groups (12.0 (4.8) for virgin, 18.5 (3.1) for sensitized and 14.0 (3.5) for lactating rats, $H_{(2, N=27)}=3.6$, $p=NS$).

As shown in Fig. 2, lactating and maternal virgin females also exhibited diminished fear behaviors in response to the auditory stimulus activation, as indicated by a reduced flight distance and immobility reaction when compared to non-maternal virgin rats ($H_{(2, N=27)}=7.2$, $p<0.05$ and $H_{(2, N=27)}=9.1$, $p<0.05$, respectively).

Endocrine stress response

The two-way analysis of variance (factors: state and stress condition) revealed an effect of stress ($F_{(1, 49)}=210.2$, $p<0.01$) and an interaction between female's state and stress ($F_{(2, 49)}=$

5.5, $p<0.01$) on CORT plasma levels among the different groups (Fig. 3). Thus, under resting conditions no significant differences in CORT plasma levels were found between groups (all post hoc tests, $p=NS$). After exposure to stress, CORT levels increased in all groups (post hoc test for all groups, $p<0.01$), however, the response of virgins, independently of their maternal- or non-maternal state, was greater than that observed in lactating dams ($p<0.05$ vs. lactating, for both virgin groups).

Discussion

The main result of this study is that maternal condition *per se* is associated with fear reduction but not with an attenuation of the endocrine response elicited by an emotional stressor. This result indicates dissociation in the mechanisms that regulate both responses. Thus, sensitized females confronted to a bright-lit open field-loud noise stressor, resemble lactating dams in their reduced fearfulness and non-maternal virgins in their high endocrine stress response. This evidence strongly suggests that maternal state, by modifying the behavioral way to confront risks, allows the care of the young in aversive situations independently of the HPA axis response.

Influence of the maternal condition on females' affective behaviors

As aforementioned, in the present study, the maternal state was associated with decreased fearfulness, independently of the endocrine profile that characterizes gestation, parturition and lactation. This result agrees with previous studies showing that lactating dams are less fearful and anxious than virgin females (Bitran et al., 1991; Ferreira et al., 1989, 2002; Fleming and Luebke, 1981; Hansen and Ferreira, 1986; Hård and Hansen, 1985; Lonstein et al., 1998; Pereira et al., 2005; Stern and Mackinnon, 1976) and that sensitized ovariectomized females with (Hansen and Ferreira, 1986) or without (Ferreira et al., 2002) hormonal treatment have decreased immobility reaction, similar to that exhibited by lactating dams. Sensitized ovariectomized females without hormonal treatment also show lower anxiety-like behaviors in comparison with non-maternal rats, even though they are more anxious than postpartum dams (Pereira et al., 2005; Stern and Mackinnon, 1976). Interestingly, in the present study, both sensitized and lactating females exhibited high exploration levels of the novel environment when compared with non-maternal rats, even though they spent time caring for the pups in a particular quadrant of the testing chamber. This result suggests that maternal rats present less behavioral inhibition than non-maternal females in this open field.

The remarkable similarity in the affective behavior of both maternal groups parallels the maternal responses displayed by these animals. Thus, the active components of the maternal care of NONOVX-sensitized females did not differ from those displayed by lactating dams, in contrast to other studies (LeRoy and Krehbiel, 1978; Lonstein et al., 1999; Rosenblatt, 1975). This discrepancy could be due to the increased quality and quantity of pup's stimulation received by the females in the present study. Thus, five foster pups were exchanged twice a day, in contrast to most of the sensitization procedures where

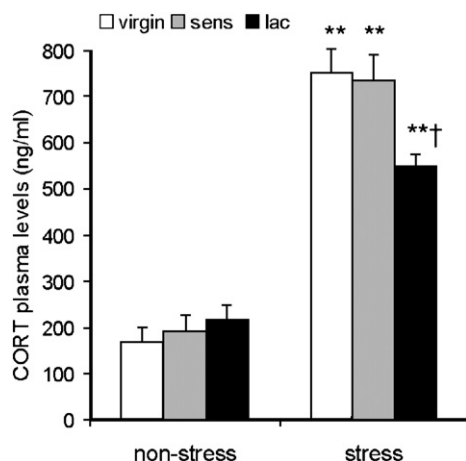


Fig. 3. CORT plasma levels (ng/ml) of females 2 h after being moved to the experimental room (non-stress condition: virgin, $n=10$, sens, $n=8$ and lac, $n=10$) or 15 min after the beginning of the stress exposure (stress condition: virgin, $n=8$, sens, $n=10$ and lac, $n=9$). Data are expressed as means $\pm$ SE. ** $p<0.01$ vs. non-stress and † $p<0.05$ vs. virgin and sens, Tukey's post hoc test.

subjects are exposed to three foster pups that are exchanged once a day (Ferreira et al., 2002; Fleming and Rosenblatt, 1974; LeRoy and Krehbiel, 1978; Lonstein et al., 1999; Stern and Mackinnon, 1976). However, although maternal behavior was similar between NONOVX-sensitized and postpartum dams, we cannot rule out putative differences in maternal motivation that may rise from more specific and sensitive tests (Stern and Mackinnon, 1976).

The fact that most of the NONOVX females sensitized in the proestrous day of their estrous cycle, when the preovulatory peaks of estrogen, progesterone and prolactin occur (Savoy-Moore et al., 1980), highlight the importance of reproductive hormones in facilitating the induction and improving the quality of maternal behavior in virgin rats (Bridges, 1984; Bridges et al., 1997; Krehbiel and LeRoy, 1979; LeRoy and Krehbiel, 1978; Numan et al., 1977; Stern and McDonald, 1989). Besides, most of the sensitized rats lost their vaginal cyclicity and entered a prolonged diestrus, probably as a consequence of pup's ventral stimulation (Jakubowski and Terkel, 1980, 1986; Samuels and Bridges, 1983). Therefore, despite the absence of the hormonal changes of gestation, parturition and lactation in sensitized females, other alterations in their reproductive hormonal profile, either in plasma or in brain, as a consequence of pup stimulation and caretaking cannot be excluded. This narrow and reciprocal relationship between reproductive hormones and maternal condition makes it difficult to completely discriminate their relative contribution to the adaptive changes that occur during motherhood, such as affective responses to emotional threats.

Despite the reduction in fear behaviors and the enhancement of exploration, no differences were found between maternal and non-maternal animals' activity in the central area of the open field. Although this result contrasts with previous studies showing that postpartum dams behave less anxious than non-maternal females in various anxiety tests (Bitran et al., 1991; Ferreira et al., 1989, 2002; Lonstein et al., 1998; Pereira et al., 2005; Stern and Mackinnon, 1976), others show that maternal females do not reduced their anxiety-like behaviors (Fernández-Guasti and Picazo, 1993; Ferreira et al., 1989; Zuluaga et al., 2005). The cause underlying this discrepancy is unknown but several factors may contribute, like the presence of the pups within the model, the nature and intensity of the aversive stimulus, the age of the litter and the internal hormonal milieu, among others. Regarding present results showing that maternal rats exhibited reduced fear behaviors, but did not show differences in the open field central exploration compared to non-maternal females, it could be speculated that in order to protect the pups, a maternal rat must quickly shift the behavioral way to confront an imminent threat, like the loud noise, while in a context where the threat is uncertain or potential, like the open field, a better assessment of the situation may be required before acting.

Influence of maternal condition on females' CORT stress response

The reduction in fear behaviors and CORT response of lactating dams agrees with previous data pointing towards an attenuation of the whole integrative response of postpartum fe-

males when facing a potential threat (Sibolboro Mezzacappa et al., 2003). However, the mechanisms regulating both physiological responses seem to be dissociated, since the CORT response of sensitized rats was as high as that shown by non-maternal virgins, while the behavioral reaction of these rats was similar to that displayed by lactating dams. In agreement with these findings, thelectomized postpartum dams enter a strange novel environment to retrieve pups (Stern and Mackinnon, 1976), but present a robust CORT response to a physical stressor (Stern and Levine, 1972). Additionally, late pregnant females show a blunted HPA axis response, but a high behavioral reaction to the elevated plus maze (Neumann et al., 1998) and lactating dams exhibit reduced endocrine response, but a similar immobility reaction in the forced swimming test (Walker et al., 1995) when compared to virgin females.

In the present study, a slight non-significant increase in basal levels of CORT was observed in lactating females as compared to virgins. Interestingly, controversial results were obtained regarding the basal levels of CORT between lactating and virgins females. Thus, while some studies (Stern et al., 1973; Walker et al., 1992, 1995) report higher CORT levels in lactating rats during the morning hours, others (Neumann et al., 1998, 2000; Windle et al., 1997c) fail to find this divergence. This discrepancy could be due, among others, to the timing of blood sampling. In the present study, blood was collected around noon when the CORT plasma levels of the virgin rats begin to rise (Seale et al., 2004), possibly veiling differences between both groups.

Present results, together with the previous findings showing that virgin sensitized females do not exhibit a decreased CORT response to a physical stressor (Schlein et al., 1974), emphasize the importance of the hormonal profile of parturition and lactation in the down-regulation of the HPA axis function. Thus, a clear attenuating effect of oxytocin administration on neuroendocrine stress response has been found in virgin females (Windle et al., 1997b, 2004). However, the intracerebroventricular infusion of an oxytocin receptor antagonist to lactating dams does not alter the reduced ACTH and CORT response to an emotional stressor (Neumann et al., 2000). On the other hand, the infusion of prolactin antisense mRNA into the lateral ventricle of lactating rats has been shown to increase anxiety-related behaviors in the plus maze test and ACTH and oxytocin responses to the forced swimming test (Torner et al., 2002). Besides, prolactin's administration to intact or ovariectomized estrogen-primed virgins attenuates both, the behavioral and the neuroendocrine responses to stressors (Donner et al., 2007; Schlein et al., 1974; Torner et al., 2001, 2002). This evidence points towards a major role of prolactin in the regulation of the behavioral and the endocrine stress hypo-responsiveness. In the present study, 72% of sensitized rats developed a prolonged diestrus, indicating that these females presented nocturnal surges of pituitary prolactin sufficient to inhibit the hypothalamic–pituitary–ovarian axis (Jakubowski and Terkel, 1980, 1986). In spite of the presumed prolactin augment, these females exhibited a high endocrine stress reaction, suggesting that such increase is insufficient to blunt the CORT stress response. Also, it seems unlikely that this increase mediates their reduced fearfulness, since postpartum rats treated with ergocryptine, a drug that blocks prolactin release, are still

capable of retrieving pups from a T-maze extension attached to the home cage (Stern, 1977).

The behavioral similarities between lactating and sensitized females suggest that the affective value that maternal rats give to this potential threat is similar, and therefore, the stimulus' processing that occurs in limbic areas, such as the amygdala, is also expected to be similar. Therefore, differences in the endocrine response between lactating and sensitized females could be due to variations, either in the relay areas that connect limbic circuits to the PVN, like the preoptic area and the bed nucleus of the stria terminalis (Herman and Cullinan, 1997), or along the HPA axis. In this sense, these relay areas exhibit changes during lactation, which have been attributed to the endocrine profile of parturition and lactation (da Costa et al., 1997; Hammer et al., 1992; Mann and Bridges, 2002; Pedersen et al., 1994). For instance, a reduction of corticotropin-releasing hormone (CRH) mRNA's expression in the medial preoptic area in response to stress occurs in virgin females and is absent in lactating dams (da Costa et al., 2001). Besides, the CRH brain system response to stressors or to CRH infusion is attenuated during postpartum as reflected by the blunted c-fos mRNA expression in the PVN and limbic areas when compared to virgin females (da Costa et al., 1996, 1997). In addition, postpartum dams exhibit a down-regulation in α 1-mediated increase in CRH mRNA in the PVN (Windle et al., 1997a), as well as a decreased activation of corticothrups in response to CRH secretion in the adenohypophysis (Neumann et al., 1998; Toufexis et al., 1999). Unfortunately, to our knowledge, no study has explored the involvement of the CRH brain system in the behavioral or the endocrine stress responses in maternal virgin females.

The reduced fear behaviors exhibited by lactating dams in this model could be due to a diminished aversiveness to the emotional threat (for a review, see Numan and Insel, 2003), thus explaining the blunted CORT release. However the fact that sensitized females did not show an attenuated CORT response facing the same stimulus shed doubt over this idea. Thus, it could be proposed that it is not the aversive value of the threat what it is altered in maternal rats, but rather the behavioral strategy employed to confront it. Future experiments, analyzing the behavioral and the endocrine responses, as well as the limbic neural activity induced by emotional stressors should be done to further explore this idea.

In summary, the present study shows that maternal state involves profound changes in the behavioral strategy followed by females to confront threats, however maternal condition *per se* is not enough to produce the stress-induced endocrine hypo-responsiveness observed during lactation. It is clear that a female's response to environmental stimuli changes during motherhood, probably in order to protect the offspring. However, the contribution of the affective value attributed to the stimuli and the relevance of pups in this neural process needs to be further clarified.

Acknowledgments

Authors wish to thank Paula Altesor for the excellent care of the animals and Mariana Pereira, PhD, and Natalia Uriarte, MSc,

for the constructive comments on the manuscript. PEDECIBA, Fondo Clemente Estable (M.E.C.), CSIC and FNI supported this study.

References

- Bitran, D., Hilvers, R.J., Kellogg, C.K., 1991. Ovarian endocrine status modulates the anxiolytic potency of diazepam and the efficacy of aminobutyric acid-benzodiazepine receptor-mediated chloride ion transport. *Behav. Neurosci.* 105, 653–662.
- 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, 930–940.
- Bridges, R.S., Robertson, M.C., Shiu, R.P., Sturgis, J.D., Henriquez, B.M., Mann, P.E., 1997. Central lactogenic regulation of maternal behavior in rats: steroid dependence, hormone specificity, and behavioral potencies of rat prolactin and rat placental lactogen I. *Endocrinology* 138, 756–763.
- Campbell, T., Lin, S., DeVries, C., Lambert, K., 2003. Coping strategies in male and female rats exposed to multiple stressors. *Physiol. Behav.* 78, 495–504.
- Cosnier, J., Couturier, C., 1966. Comportement maternal provoqué chez les rattees adultes castrées. *C. R. Seances Soc. Biol. Ses. Fil.* 160, 789–791.
- da Costa, A.P.C., Wood, S., Ingram, C.D., Lightman, S.L., 1996. Region-specific reduction in stress-induced c-fos mRNA expression during pregnancy and lactation. *Brain Res.* 742, 177–184.
- da Costa, A.P., Kampa, R.J., Windle, R.J., Ingram, C.D., Lightman, S.L., 1997. Region-specific immediate-early gene expression following the administration of corticotropin-releasing hormone in virgin and lactating rats. *Brain Res.* 770, 151–162.
- da Costa, A.P., Ma, X., Ingram, C.D., Lightman, S.L., Aguilera, G., 2001. Hypothalamic and amygdaloid corticotropin-releasing hormone (CRH) and CRH receptor-1 mRNA expression in the stress-hyporesponsive late pregnant and early lactating rat. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 91, 119–130.
- Deschamps, S., Woodside, B., Walker, C.D., 2003. Pups presence eliminates the stress hyporesponsiveness of early lactating females to a psychological stress representing a threat to the pups. *J. Neuroendocrinol.* 15, 486–497.
- Donner, N., Bredewold, R., Maloumy, R., Neumann, I.D., 2007. Chronic intracerebral prolactin attenuates neuronal stress circuitries in virgin rats. *Eur. J. Neurosci.* 25, 1804–1814.
- Ennaceur, A., Michalikova, S., Chazot, P.L., 2006. Models of anxiety: responses of rats to novelty in an open space and an enclosed space. *Behav. Brain Res.* 171, 26–49.
- Fahlke, C., Eriksson, C.J., Hard, E., 1993. Audiogenic immobility reaction and open-field behavior in AA and ANA rat lines. *Alcohol* 10, 311–315.
- Fernández-Guasti, A., Picazo, O., 1992. Changes in burying behavior during the estrous cycle: effect of estrogen and progesterone. *Psychoneuroendocrinology* 17, 681–689.
- Fernández-Guasti, A., Picazo, O., 1993. Changes in experimental anxiety during pregnancy and lactation. *Physiol. Behav.* 54, 295–299.
- Ferreira, A., Hansen, S., Nielsen, M., Archer, T., Minor, B.G., 1989. Behavior of mother rats in conflict tests sensitive to antianxiety agents. *Behav. Neurosci.* 103, 193–201.
- Ferreira, A., Pereira, M., Agrati, D., Uriarte, N., Fernández-Guasti, A., 2002. Role of maternal behavior on aggression, fear and anxiety. *Physiol. Behav.* 77, 197–204.
- Fleming, A.S., Luebke, C., 1981. Timidity prevents the virgin female rat from being a good mother: emotionality differences between nulliparous and parturient females. *Physiol. Behav.* 27, 863–868.
- Fleming, A.S., Rosenblatt, J., 1974. Maternal behavior in the virgin and lactating rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 86, 957–972.
- Hall, F.S., Huang, S., Fong, G.W., Sundstrom, J.M., Pert, A., 2000. Differential basis of strain and rearing effects on open-field behavior in Fawn Hooded and Wistar rats. *Physiol. Behav.* 71, 525–532.
- Hammer, R.P., Mateo, A.R., Bridges, R.S., 1992. Hormonal regulation of medial preoptic mu-opiate receptor density before and after parturition. *Neuroendocrinology* 56, 38–45.

- Hansen, S., Ferreira, A., 1986. Food intake, aggression, and fear behavior in the mother rat: control by neural systems concerned with milk ejection and maternal behavior. *Behav. Neurosci.* 100, 64–70.
- Hansen, S., Hård, E., 1980. Ontogeny of the audiogenic immobility reaction in the rat. *Biol. Behav.* 5, 163–168.
- Hård, E., Engel, J., Larsson, K., Musi, B., 1985. Effect of diazepam, apomorphine and haloperidol on the audiogenic immobility reaction and on the open field behavior. *Psychopharmacology* 85, 106–110.
- Hård, E., Hansen, S., 1985. Reduced fear behavior in the lactating rat. *Physiol. Behav.* 33, 641–643.
- Herman, J.P., Cullinan, W.E., 1997. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary–adrenocortical axis. *Trends Neurosci.* 20, 78–84.
- Jakubowski, M., Terkel, J., 1980. Induction by young of prolonged dioestrus in virgin rats behaving maternally. *J. Reprod. Fertil.* 58, 55–60.
- Jakubowski, M., Terkel, J., 1986. Nocturnal surges and reflexive release of prolactin in parentally behaving virgin female and male rats. *Horm. Behav.* 20, 270–286.
- Jensen, P., Toates, F.M., 1997. Stress as a state of motivational systems. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 53, 145–156.
- Johansson, A.K., Hansen, S., 2001. Increased novelty seeking and decreased harm avoidance in rats showing Type 2-like behaviour following basal forebrain neuronal loss. *Alcohol Alcohol.* 36, 520–524.
- Kinsley, C.H., Bridges, R.S., 1990. Morphine treatment and reproductive condition alter olfactory preferences for pup and adult odors in female rats. *Dev. Psychobiol.* 23, 331–347.
- Krehbiel, D.A., LeRoy, M.L., 1979. The quality of hormonally stimulated maternal behavior in ovariectomized rats. *Horm. Behav.* 12, 243–252.
- LeRoy, L.M., Krehbiel, D.A., 1978. Variations in maternal behavior in the rat as a function of sex and gonadal state. *Horm. Behav.* 11, 232–247.
- Leuner, B., Shors, T.J., 2006. Learning during motherhood: a resistance to stress. *Horm. Behav.* 50, 38–51.
- Lightman, S.L., Windle, R.J., Wood, S.A., Kershaw, Y.M., Shanks, N., Ingram, C.D., 2001. Peripartum plasticity within the hypothalamus–pituitary–adrenal axis. In: Russel, J.A., et al. (Eds.), *The Maternal Brain. Neurobiological and Neuroendocrine Adaptations and Disorders in Pregnancy and Post Partum*. Progress in Brain Research, vol. 133. Elsevier Science, Amsterdam, pp. 111–129.
- Lonstein, J.S., Simmons, D.A., Stern, J.M., 1998. Functions of the caudal periaqueductal gray in lactating rats: kyphosis, lordosis, maternal aggression and fearfulness. *Behav. Neurosci.* 112, 1502–1518.
- 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. *Horm. Behav.* 36, 242–251.
- Mann, P.E., Bridges, R.S., 2002. Prolactin receptor gene expression in the forebrain of pregnant and lactating rats. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 105, 136–145.
- Millan, M.J., 2003. The neurobiology and control of anxious states. *Prog. Neurobiol.* 70, 83–244.
- Montes, G.S., Luque, E.H., 1983. Effects of ovarian steroids on vaginal smears in the rat. *Acta Anat.* 133, 192–199.
- Neumann, I.D., Johnstone, H.A., Hatzinger, M., Liebsch, G., Shipston, M., Russell, J.A., Landgraf, R., Douglas, A.J., 1998. Attenuated neuroendocrine responses to emotional and physical stressors in pregnant rats involve adenohipophysial changes. *J. Physiol.* 508, 289–300.
- Neumann, I.D., Torner, L., Wigger, A., 2000. Brain oxytocin: differential inhibition of neuroendocrine stress responses and anxiety-related behavior in virgin, pregnant and lactating rats. *Neuroscience* 95, 567–575.
- Numan, M., Insel, T.R., 2003. Motivational models of the onset and maintenance of maternal behavior and maternal aggression. In: Ball, G., Balthazart, J., Hopkins, J., Nelson, R. (Eds.), *The Neurobiology of Parental Behavior*. Springer-Verlag, New York, pp. 69–106.
- Numan, M., Rosenblatt, J.S., Komisaruk, B.R., 1977. Medial preoptic area and onset of maternal behavior in the rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 91, 146–164.
- 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 and medial preoptic areas. *Behav. Neurosci.* 108, 1163–1171.
- Pereira, M., Ferreira, A., 2006. Demanding pups improve maternal behavioral impairments in sensitized and haloperidol-treated lactating female rats. *Behav. Brain Res.* 175, 139–148.
- Pereira, M., Uriarte, N., Agrati, D., Zuluaga, M.J., Ferreira, A., 2005. Motivational aspects of maternal anxiety in lactating rats. *Psychopharmacology* 180, 241–248.
- Rosenblatt, J.S., 1975. Selective retrieving by maternal and nonmaternal female rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 88, 678–686.
- Samuels, M.H., Bridges, R.S., 1983. Plasma prolactin concentrations in parental male and female rats: effects of exposure to rat young. *Endocrinology* 113, 1647–1654.
- Savoy-Moore, R., Schwartz, N.A., Duncan, J.A., Marshall, J.C., 1980. Pituitary gonadotropin-releasing hormone receptors during the rat estrous cycle. *Science* 209, 924–944.
- Schlein, P.A., Zarrow, M.X., Denenberg, V.H., 1974. The role of prolactin in the depressed or “buffered” adrenocorticosteroid response of the rat. *J. Endocrinol.* 62, 93–99.
- Seale, J.V., Wood, S.A., Atkinson, H.C., Bate, E., Lightman, S.L., Ingram, C.D., Jessop, D.S., Harbuz, M.S., 2004. Gonadectomy reverses the sexually diergic patterns of circadian and stress-induced hypothalamic–pituitary–adrenal axis activity in male and female rats. *J. Neuroendocrinol.* 16, 516–524.
- Sibolboro Mezzacappa, E., Tu, A.Y., Myers, M.M., 2003. Lactation and weaning effects on physiological and behavioral response to stressors. *Physiol. Behav.* 78, 1–9.
- Siegel, S., Castellan, N.J., 1988. *Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences*, 2 ed. McGraw-Hill, New York.
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J., 1969. *Biometría. Principios y Métodos Estadísticos en la Investigación Biológica*. Blume Madrid, España.
- Stern, J.M., 1977. Effects of ergocryptine on postpartum maternal behavior, ovarian cyclicity, and food intake in rats. *Behav. Biol.* 21, 134–140.
- Stern, J.M., Levine, S., 1972. Pituitary–adrenal activity in the postpartum rats in the absence of suckling stimulation. *Horm. Behav.* 3, 237–246.
- Stern, J.M., Mackinnon, D.A., 1976. Postpartum, hormonal, and nonhormonal induction of maternal behavior in rats: effects on T-maze retrieval of pups. *Horm. Behav.* 7, 305–316.
- Stern, J.M., McDonald, C., 1989. Ovarian hormone-induced short-latency maternal behavior in ovariectomized virgin Long Evans rats. *Horm. Behav.* 23, 157–172.
- Stern, J.M., Goldman, L., Levine, S., 1973. Pituitary–adrenal responsiveness during lactation in rats. *Neuroendocrinology* 12, 179–191.
- Torner, L., Toschi, N., Pohlner, A., Landgraf, R., Neumann, I.D., 2001. Anxiolytic and anti-stress effects of brain prolactin: improved efficacy of antisense targeting of the prolactin receptor by molecular modeling. *J. Neurosci.* 21, 3207–3214.
- Torner, L., Toschi, N., Nava, G., Clapp, C., Neumann, I.D., 2002. Increased hypothalamic expression of prolactin in lactation: involvement in behavioural and neuroendocrine stress responses. *Eur. J. Neurosci.* 15, 1381–1389.
- Toufexis, D.J., Tesolin, S., Huang, N., Walker, C., 1999. Altered pituitary sensitivity to corticotropin-releasing factor and arginine vasopressin participates in the stress hyposensitiveness of lactation in the rat. *J. Neuroendocrinol.* 11, 757–764.
- Viau, V., Meaney, M.J., 1991. Variations in the hypothalamic–pituitary–adrenal response to stress during the estrous cycle in the rat. *Endocrinology* 129, 2503–2511.
- Walker, C.D., Lightman, S.L., Steele, M.K., Dallman, M.F., 1992. Suckling is a persistent stimulus to the adrenocortical system of the rat. *Endocrinology* 130, 115–125.
- Walker, C.D., Trottier, G., Rochford, J., Lavalley, D., 1995. Dissociation between behavioral and hormonal responses to the forced swim stress in lactating rats. *J. Neuroendocrinol.* 7, 615–622.
- Wartella, J., Amory, E., Lomas, L.M., Macbeth, A., McNamara, I., Stevens, L., Lambert, K.G., Kinsley, C.H., 2003. Single or multiple reproductive experiences attenuate neurobehavioral stress and fear responses in the female rat. *Physiol. Behav.* 79, 373–381.
- Windle, R.J., Brady, M.M., Kunanandam, T., da Costa, A.P., Wilson, B.C., Harbuz, M., Lightman, S.L., Ingram, C.D., 1997a. Reduced response of the hypothalamo-pituitary–adrenal axis to alpha1-agonist stimulation during lactation. *Endocrinology* 138, 3741–3748.

- Windle, R.J., Shanks, N., Lightman, S.L., Ingram, C.D., 1997b. Central oxytocin administration reduces stress-induced corticosterone release and anxiety behavior in rats. *Endocrinology* 138, 2829–2834.
- Windle, R.J., Wood, S., Shank, N., Perks, P., Conde, G.L., da Costa, A.P.C., Ingram, C.D., Lightman, S.L., 1997c. Endocrine and behavioral responses to noise stress: comparison of virgin and lactating female rats during non-disrupted maternal activity. *J. Neuroendocrinol.* 9, 407–414.
- Windle, R.J., Kershaw, Y.M., Shanks, N., Wood, S.A., Lightman, S.L., Ingram, C.D., 2004. Oxytocin attenuates stress-induced c-fos mRNA expression in specific forebrain regions associated with modulation of hypothalamic–pituitary–adrenal activity. *J. Neurosci.* 24, 2974–2982.
- Zuluaga, M.J., Agrati, D., Pereira, M., Uriarte, N., Fernández-Guasti, A., Ferreira, A., 2005. Experimental anxiety in the black and white model in cycling, pregnant and lactating rats. *Physiol. Behav.* 84, 279–286.

Capítulo II

Influencia del estado endócrino y de la experiencia reproductiva previa de ratas sexualmente activas y maternas en el valor de incentivo relativo de un macho y de las crías.

La primera parte de los experimentos que se describen a continuación dieron lugar a la siguiente publicación: **Agrati D**, Fernández-Guasti A, Ferreira A. The reproductive stage and experience of sexually receptive mothers alter their preference for pups or males. *Behavioral Neuroscience*, **2008**, 122:998-1004.

El estro posparto es el único período en el ciclo reproductivo de las hembras, en el cual confluyen, durante tan solo algunas horas, dos fuertes motivaciones afiliativas hacia distintos individuos: el macho y las crías (Gilbert et al., 1980, 1984). Dado que durante la maternidad la respuesta de las ratas ante estímulos aversivos y reforzadores positivos es modulada por las crías (Ferreira et al., 2002; Fleming et al., 1994; Mattson et al., 2001; Pereira et al., 2005), es posible suponer que éstas modifiquen el valor de incentivo que el macho posee para madres sexualmente activas. En este sentido, el valor de incentivo que tienen las crías para las madres aumenta por efecto de las hormonas del parto y por la experiencia maternal previa (Fleming & Rosenblatt, 1974; Fleming & Sharker, 1990; Lee et al, 2000; Pereira & Ferreira, 2006). Sobre esta base nos preguntamos si el valor de incentivo relativo del macho y de las crías variaba para madres sexualmente activas con diferente perfil hormonal y experiencia reproductiva previa (**a partir de la hipótesis 2**).

Objetivo 1

Determinar el valor de incentivo relativo del macho y de las crías para hembras sexualmente activas y maternas con diferente perfil endócrino (proestro tardío vs. estro posparto) y experiencias reproductivas previas (gestación, parto y/o lactancia).

Abordaje experimental

Se describe en detalle en el artículo Agrati et al., 2008b adjunto al final del capítulo. Brevemente, evaluamos la preferencia por un macho o crías de los siguientes grupos de hembras sexualmente activas y maternas:

1. Vírgenes ciclantes maternas (a través del proceso de sensibilización) probadas en la noche del proestro (sin experiencia reproductiva previa, n=7).
2. Primíparas ciclantes (tuvieron un parto y lactancia previa) maternas probadas en la noche del proestro (n=7). Fueron sensibilizadas dos semanas luego del destete de la primera camada.
3. Lactantes primíparas en estro posparto (sin experiencia de parto o cuidado maternal previo, n=9).
4. Lactantes múltiparas con experiencia maternal previa restringida, en estro posparto (n=7). Estas hembras tuvieron un parto previo, pero sus crías fueron removidas inmediatamente luego de nacer y las madres se volvieron a preñar esa misma noche. A estas hembras se les permitió comer la placenta y lamer esporádicamente a las crías en su primer parto, pero nunca se les permitió acarrearlas o amamantarlas.
5. Lactantes múltiparas en estro posparto (con una experiencia maternal completa previa, n=7). Estas hembras tuvieron un parto y lactancia previos y fueron re-preñadas en el primer proestro luego del destete.

Como **control** se utilizaron hembras ciclantes vírgenes y primíparas no-maternas probadas en proestro tardío (n=14).

Estos grupos de madres sexualmente activas nos permiten disecar la influencia de la condición maternal *per se* sin y con experiencia maternal previa (ciclantes maternas 1 y 2) y la influencia del perfil endócrino del periparto, así como de diferentes experiencias maternas (posparturientas 3, 4 y 5) en la preferencia por macho vs. crías.

Todas las hembras fueron probadas en la prueba de preferencia por lo menos 2 hs luego de comenzada la fase de oscuridad del ciclo luz/oscuridad y, en el caso de las hembras postparturientas, 9-10 hs luego de iniciado el parto, para asegurar su actividad sexual (Connor & Davis, 1980a; Gilbert et al., 1980,

1984; Hard & DeBold, 1972). La condición sexual de las hembras se confirmó luego de la prueba, verificando la exhibición de la postura de lordosis en respuesta a la monta de un macho en una caja limpia. Posteriormente, las ratas maternas fueron devueltas a sus cajas y se confirmó la reunión de toda la camada en el nido.

Para probar la preferencia de las hembras sexualmente activas y maternas por macho o crías, utilizamos un procedimiento de elección donde la hembra se mueve libremente en un laberinto en forma de Y, con cada uno de los 3 brazos conteniendo un compartimiento con un macho sexualmente activo, 7 crías o sin estímulo (neutro) (Figura 7). Consideramos el tiempo total de permanencia en cada brazo como medida de la preferencia y por lo tanto de la fuerza del valor de incentivo de un estímulo con relación al otro. Este modelo es sensible a diferencias en el valor de incentivo sexual (ver Agrati et al., 2008b), así como maternal (Pereira & Ferreira, 2006).

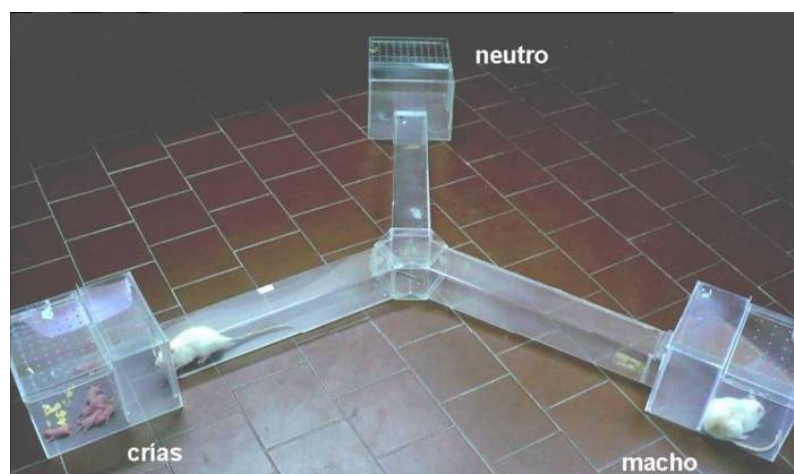


Figura 7. Modelo de preferencia macho vs. crías. La prueba consiste en 15 min de habituación de la rata al modelo sin estímulos, luego de los cuales se introducen los estímulos en los extremos de los brazos y se registra el comportamiento de la hembra durante 20 min (en detalle en Agrati et al., 2008b).

Resultados

Como se muestra en la figura 8, los grupos presentaron diferencias claras en el tiempo de permanencia en los diferentes compartimientos del modelo (macho: $H(5, 51) = 30.6$, $p < 0.01$ y crías: $H(5, 51) = 18.9$, $p < 0.01$, análisis de varianzas de una vía de Kruskal Wallis).

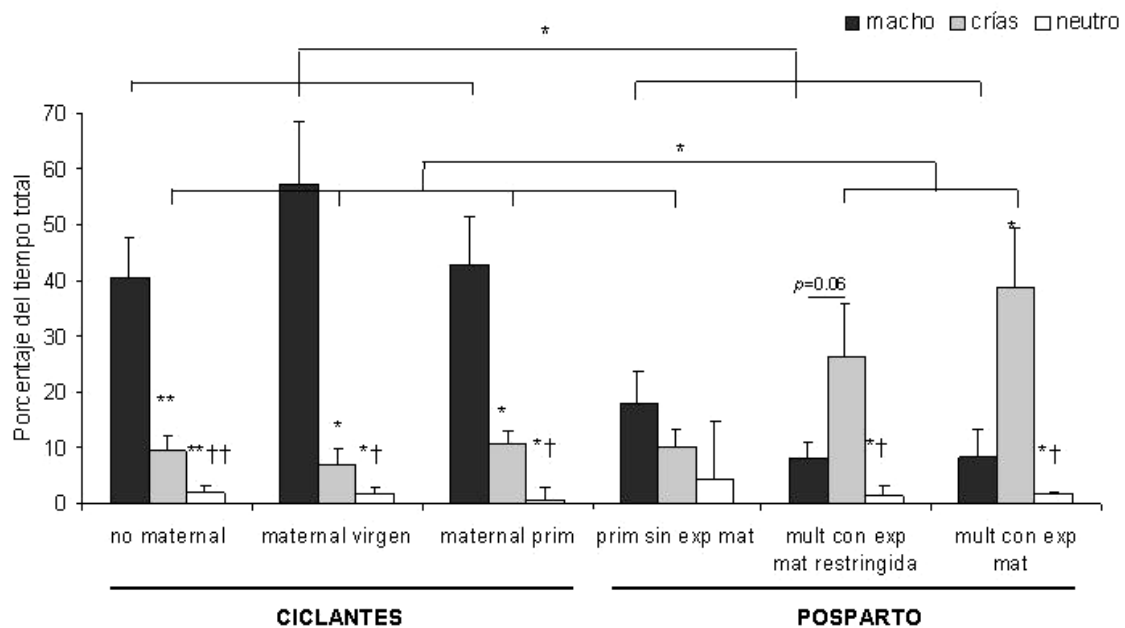


Figura 8. Porcentaje del tiempo total en el compartimiento del macho (barras negras), de las crías (barras grises) y en el neutro (barras blancas) de hembras ciclantes no-maternales (ciclantes no maternal), maternales vírgenes (ciclantes maternal virgen), y maternales primíparas (ciclantes maternal prim) y de madres posparturientas sin experiencia reproductiva (posparto prim sin exp mat), multíparas con experiencia restringida al parto (posparto mult con exp mat restringida) y multíparas con experiencia maternal completa (posparto mult con exp mat). Los datos se expresan como medianas (RSIQ). * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ vs. macho y + $p < 0.05$ y ++ $p < 0.01$ vs. crías dentro de un grupo, prueba pareada de Wilcoxon y * $p < 0.05$ entre grupos, prueba U de Mann-Whitney (*de Agrati et al., 2008b*).

Influencia de la condición maternal

Las hembras ciclantes maternales y no-maternales exhibieron una marcada preferencia por el compartimiento del macho en comparación con los otros (macho vs. crías y vs. neutro: $T=0.0$, $p < 0.05$ para los 3 grupos). Esta clara preferencia se acompañó de comportamientos activos (rasguños e intentos de levantar la barrera con las patas delanteras y los dientes) para tener acceso al macho, en comparación al comportamiento dirigido hacia las crías (Tabla 2).

Influencia de la gestación, el parto y la lactancia

Curiosamente, las hembras posparturientas primíparas exhibieron un tiempo reducido de permanencia tanto en la proximidad de las crías como del macho (Figura 8). Estas hembras, a su vez, exhibieron una disminución de la exploración del laberinto en comparación al resto de los grupos (Tabla 2).

Influencia de la experiencia reproductiva previa

Ambos grupos de hembras posparturientas multíparas mostraron preferencia por el compartimiento de las crías, reflejada en un mayor tiempo de permanencia en este compartimiento en comparación con las hembras lactantes primíparas y las ciclantes (Figura 8). Esta clara preferencia por las crías se acompañó de un mayor esfuerzo por tener acceso a ellas y de un aumento del acicalamiento, que puede reflejar una conducta desplazada, en comparación con el resto de los grupos (Tabla 2).

Tabla 2. Exploración, intentos de tener acceso a los estímulos y acicalamiento realizados por las hembras en el modelo de preferencia.

	Exploración	Intentos macho	Intentos crías	Acicalamiento
Cicl no maternal	43.0 (10.3)**	1.5 (1.4) ^{a**††}	0.0 (0.0) ^{††††}	6.0 (2.1) ^{††††}
Cicl maternal virgen	38.0 (3.3)*	1.0 (1.0) ^{a*†}	0.0 (0.3) ^{††}	8.0 (1.8) ^{††††}
Cicl maternal prim	42.0 (6.5)**	2.0 (4.0)	0.0 (0.5) ^{††}	8.0 (2.3) ^{††}
PP prim sin exp mat	28.0 (0.5)	0.0 (0.0)	0.0 (1.0) [†]	9.0 (4.5)
PP mult exp mat rest	44.0 (6.3)	0.0 (0.0) ^a	10.0 (6.0)	13.0 (4.8)
PP mult exp mat	36.0 (7.8)*	0.0 (0.0) ^a	15.0 (7.8)	17.0 (2.0)

Los datos se expresan como medianas (RSIQ). Hembras ciclantes no-maternales (cicl no-maternal), maternas vírgenes (cicl maternal virgen) y maternas primíparas (cicl maternal prim) y hembras posparturientas primíparas sin experiencia (PP prim sin exp mat), multíparas con experiencias restringida al parto (PP mult exp mat rest) y multíparas con experiencia maternal completa (PP mult exp mat). ^a $p < 0.05$ intentos de obtener crías vs. macho dentro de un grupo, prueba pareada de Wilcoxon y ^{*} $p < 0.05$ y ^{**} $p < 0.01$ vs. PP prim sin exp mat, [†] $p < 0.05$ y ^{††} $p < 0.01$ vs. PP mult exp mat rest y [‡] $p < 0.05$ and ^{‡‡} $p < 0.01$ vs. PP mult exp mat, prueba U de Mann-Whitney (**de Agrati et al., 2008b**).

Todas las hembras, sensibilizadas y lactantes, incluidas en este trabajo presentaron lordosis en respuesta a la monta del macho y acarrearón a toda la camada al nido a regresar a su caja.

Control de la posible influencia de la hora de prueba en la preferencia macho vs. crías de las hembras en estro posparto.

Si bien las hembras posparturientas se encuentran sexualmente activas a las 9 hs posparto, el *heat* sexual, período de máxima receptividad sexual (Hardy & DeBold, 1972), ocurre 12.5 hs luego del inicio del parto (Connors & Davis, 1980a,b). Por este motivo, comparamos la preferencia por macho vs. crías (como se describió anteriormente en Agrati et al., 2008b) de hembras lactantes primíparas (n=9) y multíparas (n=7) 12-13 hs luego del inicio del parto, con la de vírgenes ciclantes en proestro tardío (n= 7).

Como esperábamos, las hembras ciclantes en proestro tardío permanecieron la mayor parte de la prueba cerca del macho (más del 60 % del tiempo), a diferencia de las hembras posparturientas (vs. lac prim estro $U=0.0$ y vs. lac mult estro $U=1.0$, $p<0.01$). Sin embargo, ambos grupos de madres permanecieron un tiempo mayor en el compartimiento de las crías que en el del macho (crías vs. macho: primíparas 29.5 (5.3) vs 11.1 (3.8) $T=3.0$, $p<0.05$ y multíparas 40.8 (9.1) vs 7.5 (6.4) $T=2.0$, $p<0.05$, prueba pareada de Wilcoxon). Esta preferencia por las crías, así como el esfuerzo realizado para tener acceso a las mismas fueron, no obstante, mayores en las hembras multíparas respecto a las primíparas (preferencia: $U=14.0$, $p=0.06$ y esfuerzo: Figura 9).

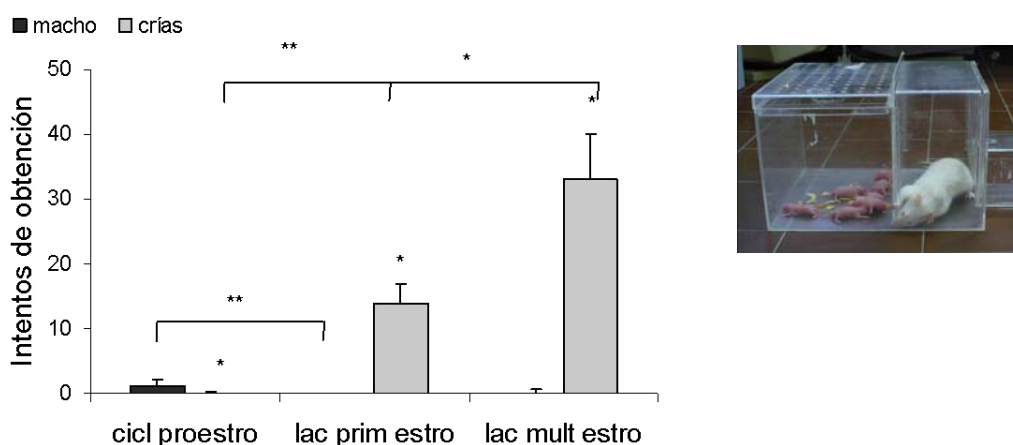


Figura 9. Número de intentos de tener acceso al macho (barras negras) y a las crías (barras grises) realizado por hembras ciclantes en proestro tardío (cicl proestro) y lactantes en estro posparto primíparas (lac prim estro) y multíparas (lac mult estro). Los datos se expresan como medianas (RSIQ). * $p<0.05$ vs. macho, prueba pareada de Wilcoxon y *sobre las barras $p<0.05$ entre grupos, Prueba U de Mann-Whitney.

A su vez, es interesante destacar que si bien las hembras en proestro tardío, que mostraron preferencia por el macho, realizaron pocos intentos por tener acceso al mismo, todas exhibieron conductas proceptivas cerca del macho, a diferencia de las hembras en estro posparto (hembras que exhibieron comportamiento proceptivo: ciclantes 7/7, lac prim 3/9 y lac mult 2/7, ciclantes vs. prim y mult $p < 0.05$, Prueba de Probabilidad Exacta de Fisher).

Conclusión

En la presente sección demostramos que durante el proestro tardío el macho posee un fuerte valor de incentivo para las hembras ciclantes, que no disminuye por la condición maternal. En cambio, durante el estro posparto, las hembras, a pesar de estar sexualmente activas, no muestran preferencia por el macho. Por otra parte, el período de interacción con las crías en el día del parto parece ser crítico para la motivación maternal de hembras sin experiencia reproductiva previa, pero no para las madres multíparas. Este efecto potenciador del valor de incentivo de las crías de la experiencia maternal sólo se observa en el contexto endócrino del periparto (y no en hembras ciclantes).

Estos resultados en conjunto muestran que el valor relativo del macho y las crías en una situación de elección para hembras sexualmente activas y maternas varía en función del perfil endócrino y de la experiencia reproductiva previa, sugiriendo diferencias en las motivaciones maternal y sexual de estas hembras. Sobre esta base nos preguntamos si las diferencias en la preferencia por macho y crías se manifestaban en la expresión de los comportamientos sexual y maternal.

Objetivo 2

2a. Comparar el comportamiento maternal de hembras primíparas y multíparas en estro posparto.

2b. Comparar el comportamiento sexual de hembras vírgenes ciclantes en proestro tardío y de primíparas y multíparas durante el estro posparto.

Abordaje experimental

Comportamiento maternal

El comportamiento maternal de hembras postparturientas primíparas (n=9) y multíparas (n=7) durante el estro posparto fue evaluado en una prueba de 30 min con toda su camada (igualada a 8 crías 1 h luego del parto) como se describió anteriormente (ver Agrati et al., 2008a).

Comportamiento sexual

El comportamiento sexual de hembras vírgenes ciclantes en proestro tardío (n=7) y de hembras en estro posparto primíparas (n=9) y multíparas (n=7) fue evaluado en una arena para observar conducta sexual (*vide infra*). La prueba se realizó por lo menos 2-3 h luego del inicio de la fase de oscuridad del ciclo luz/ oscuridad y 12-13 hs luego del parto en el caso de las hembras postparturientas (Connors & Davis, 1980a, 1980b; Hardy & DeBold, 1972). Las madres fueron separadas de sus crías 30 min previo al inicio de la prueba de comportamiento sexual con el fin de reducir los niveles de agresión maternal.

Prueba de comportamiento sexual

Se introdujo a la hembra en una arena de acrílico cilíndrica de 50 cm de diámetro para observar la conducta sexual. Luego de un período de habituación de 5 min, se colocó a un macho sexualmente activo y se registraron las siguientes respuestas de las hembras hasta la primera eyaculación del macho: comportamientos proceptivos de *hops & darts* (corridas y saltos cortos y bruscos frente al macho), posturas de lordosis (respuesta receptiva de la hembra de dorsoflexión frente a la monta del macho) y ataques, así como la latencia al primer comportamiento proceptivo (Pfaus et al., 1999). A su vez, se registró el número de montas/intromisiones (no se discriminó entre ambos patrones comportamentales) hasta la eyaculación, así como la latencia a la primer monta/intromisión y eyaculación de los machos (Fernández-Guasti, et al., 1986). El cociente de lordosis, índice de receptividad sexual de la hembra (Hardy & DeBold, 1972), se calculó como el cociente del número de lordosis entre el número total de montas/intromisiones incluyendo la eyaculación. De la misma forma, calculamos el cociente entre el número de *hops & darts* y el número total de montas/intromisiones más la eyaculación, para corregir estos comportamientos proceptivos en función de la actividad sexual del macho, ya

que su expresión se encuentra asociada a la interacción sexual con el mismo (Pfaus et al., 1999).



Figura 10. Interacción sexual. Comportamiento proceptivo de la hembra y persecución del macho (cuadro de la izquierda y central) y postura de lordosis de la hembra en respuesta a la monta del macho (cuadro de la derecha).

Resultados

Comportamiento maternal

El comportamiento maternal de hembras primíparas y multíparas durante el estro posparto no difirió entre sí, ni en los componentes activos (Figura 11), ni en los pasivos (primíparas vs multíparas en duración en segundos de *hover over*: 992.0 (163.5) vs 1404.0 (225.0), $U = 24.0$, $p = \text{NS}$ y de posturas de amamantamiento: 430.0 (171.5) vs 205.0 (282.4), $U = 28.0$, $p = \text{NS}$, prueba U de Mann Whitney).

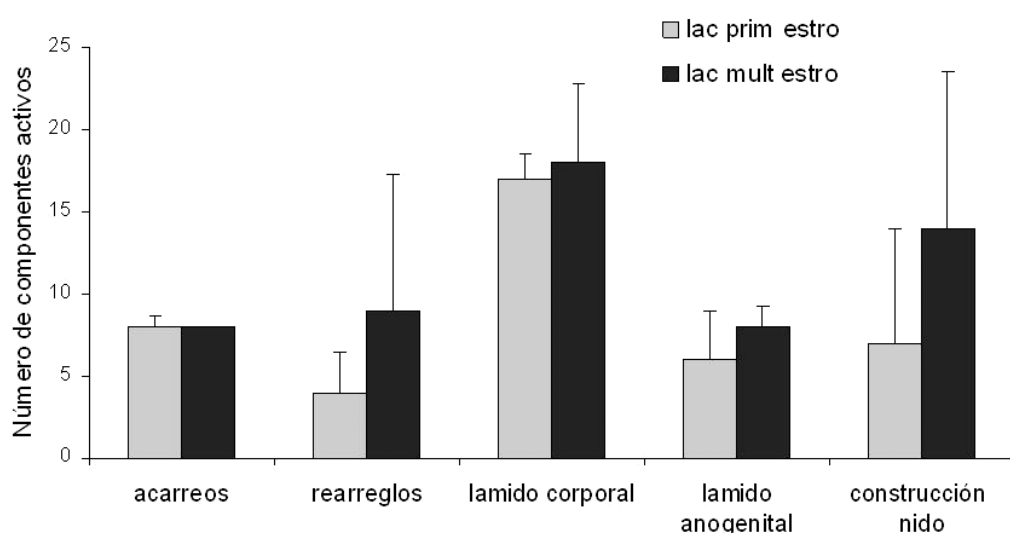


Figura 11. Componentes activos del comportamiento maternal exhibido por hembras lactantes en estro posparto primíparas (barras grises) y multíparas (barras negras). Datos expresados como medianas (RSIQ). $p = \text{NS}$, Prueba U de Mann-Whitney.

Comportamiento sexual

Las respuestas proceptivas de *hops & darts* y la receptividad sexual de las hembras en función del comportamiento sexual del macho (número de montas/intromisiones incluyendo la eyaculación) no difirió entre los grupos (Figura 12 A y B), si bien las hembras en estro posparto exhibieron latencias a la primera conducta proceptiva mayores a las de las hembras ciclantes (Tabla 3). Las hembras sexualmente activas posparturientas, al igual que las ciclantes, no atacaron de forma significativa a los machos durante la prueba (número de ataques de cicl proestro: 0.0 (0.0), lac prim estro: 0.0 (0.5) y lac mult estro: 0.0 (0.3), $H(2, 23) = 3.4$, $p = \text{NS}$).

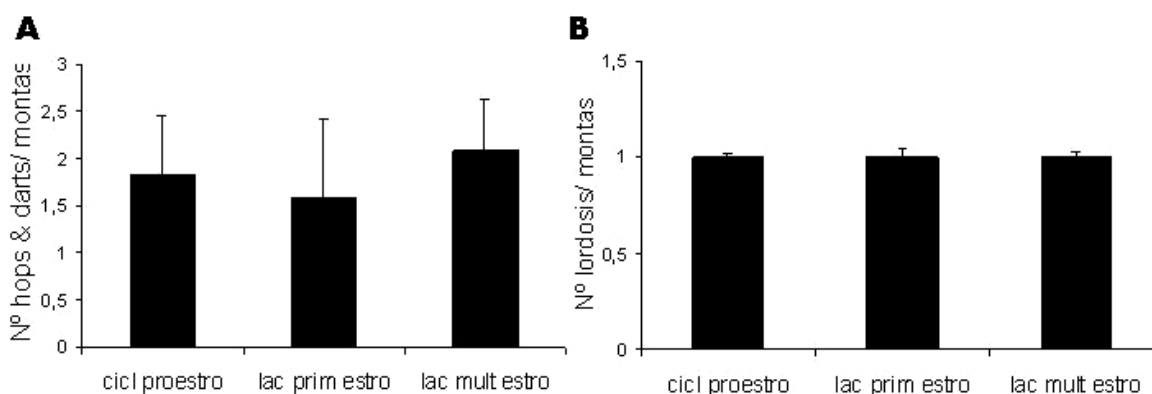


Figura 12. Cociente de comportamientos proceptivos sobre número total de montas, incluyendo la eyaculación (Panel A) y cociente de lordosis (número de lordosis sobre número total de montas incluyendo la eyaculación, Panel B) de hembras vírgenes ciclantes en proestro (cicl proestro) y lactantes en estro posparto primíparas (lac prim estro) y multíparas (lac mult estro). Los datos se expresan como mediana (RSIQ). $P = \text{NS}$, análisis de varianzas de una vía de Kruskal Wallis.

Curiosamente, los machos exhibieron un comportamiento diferente frente a las hembras en proestro tardío que frente a las lactantes en estro posparto. Así, los machos enfrentados a hembras posparturientas, presentaron latencias de monta y de eyaculación significativamente mayores a las observadas en los que copularon con hembras en proestro (Tabla 3) y presentaron un mayor número de montas/intromisión hasta la eyaculación (Tabla 3). Este aumento del umbral eyaculatorio de los machos enfrentados a hembras en estro posparto se acompañó de un mayor número de conductas proceptivas de las hembras en comparación a las exhibidas por las ciclantes en proestro (Tabla 3).

Tabla 3. Latencias a la ejecución y frecuencia de diferentes componentes del comportamiento de las hembras y de los machos durante la interacción sexual.

	<i>latencias</i>			<i>número</i>	
	<i>proceptiva</i>	<i>monta</i>	<i>eyaculación</i>	<i>proceptivas</i>	<i>montas/intro</i>
cicl proestro	12.0 (9.8)	17.0 (5.3)	188.0 (40.5)	8.0 (3.8)	8.0 (1.8)
lac prim estro	62.0 (11.5) **	74.0 (13.5) **	440.0 (134.5) **	34.0 (17.5) *	19.0 (5.5) **
lac mult estro	115.0 (32.5) **	46.0 (53.5) *	406.0 (211.3) *	27.0 (10.5) *	17.0 (5.3) **

Hembras ciclantes en proestro (cicl proestro) y madres en estro posparto primíparas (lac prim estro) y multíparas (lac mult estro). Los datos (latencias en segundos) se expresan como mediana (RSIQ). * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$, Prueba U de Mann-Whitney.

Conclusión

Las diferencias motivacionales observadas en la prueba de preferencia macho vs. crías entre hembras ciclantes y postparturientas sin y con experiencia reproductiva previa, no se manifestaron en la expresión de los comportamientos maternal y sexual cuando las mismas fueron enfrentadas únicamente a uno de los estímulos. Así, una experiencia reproductiva previa aumentó la motivación maternal de las hembras posparturientas en una situación de preferencia donde las madres no tenían acceso a las crías, pero no modificó la expresión del comportamiento maternal en la caja materna. De forma similar, a pesar de mostrar poco interés por el macho en la prueba de preferencia, las hembras en estro posparto exhibieron comportamientos proceptivos y receptivos similares a los de las hembras ciclantes en proestro tardío en la interacción sexual con un macho.

Discusión general

Preferencia macho vs. crías

Para la expresión del comportamiento sexual femenino, a diferencia del maternal, es indispensable la acción de las hormonas ováricas en áreas específicas del SNC (Beach, 1976; Edwards & Pfeifle, 1983; Kato & Sakuma, 2000; Paredes & Alonso, 1997). Así, para las hembras ciclantes el alto valor de incentivo del macho en relación a las crías probablemente se deba al aumento drástico en los niveles de progestágenos precedido por la secreción de estrógenos que caracterizan al proestro (Savoy-Moore et al., 1980). El hecho

de que la condición maternal no modifique la preferencia de las hembras ciclantes, indica que su motivación maternal es baja, a pesar de expresar cuidados maternos en la caja nido. Este resultado concuerda con trabajos previos que muestran que las hembras sensibilizadas tienen una menor motivación maternal que las hembras lactantes (Fleming et al., 1994; Lee et al., 2000; Pereira & Ferreira, 2006; Stern & Mackinnon, 1976). En esta línea, ha sido propuesto que los estímulos provenientes de las crías ejercerían un menor efecto activador o energizante del comportamiento maternal en las hembras sensibilizadas que en las lactantes (Pereira & Ferreira, 2006). Así, el aumento del valor de incentivo de las crías, mediante un incremento de sus demandas fisiológicas, mejora la expresión del comportamiento maternal de hembras ovariectomizadas sensibilizadas (Pereira & Ferreira, 2006). De igual forma, la potenciación de la neurotransmisión dopaminérgica implicada en el control de la motivación maternal (ver revisión Numan & Stolzenberg, 2009), mediante la administración sub-aguda de apomorfina, incrementa el comportamiento maternal de las vírgenes ovariectomizadas maternas a niveles similares a los exhibidos por hembras lactantes (Pereira, 2005). Por otra parte estudios de activación neuronal, a través de la cuantificación de la proteína Fos, muestran que las hembras lactantes exhiben una mayor activación de áreas del sistema olfativo accesorio y de la amígdala medial que hembras sensibilizadas, luego del despliegue de cuidados maternos (Komisaruk et al., 2000), sugiriendo un procesamiento diferencial de los estímulos olfativos de las crías en ambos tipos de madres (Walsh et al., 1996).

Curiosamente, las hembras lactantes primíparas, pasaron de una falta de preferencia por crías a las 9 hs posparto (Agrati et al, 2008b) a exhibir preferencia por las mismas a las 12 hs, apuntando a un efecto del tiempo de interacción madre-cría. En este sentido, el día del parto es un período crítico para una hembra sin experiencia maternal, ya que se consolida la memoria maternal (Fleming & Sarker, 1990; Lee et al., 1999) y comienzan a fortalecerse los procesos motivacionales relacionado con las crías (Lee et al., 2000; Orpen & Fleming, 1987). Es posible entonces, que en el día del parto, variaciones en el tiempo de interacción madre-cría modifiquen la fuerza de la motivación maternal, en este caso, promoviendo la búsqueda de las crías en el modelo de preferencia. Por otra parte, a las 12 h posparto, durante el *heat* sexual, las hembras pueden tener un aumento en la motivación general o *arousal*, que

habilite la expresión de una preferencia por las crías. Así, un tratamiento hormonal que induce máxima actividad sexual en hembras vírgenes ovariectomizadas, aumenta también su exploración (Pfaus et al., 1999).

Las hembras lactantes multíparas presentaron, en ambos períodos del posparto, una fuerte preferencia por las crías, indicando que la experiencia reproductiva previa aumentó su valor de incentivo; compensando la posible influencia del menor tiempo de interacción con las crías. Este efecto de la experiencia previa sólo se observó en el contexto endócrino del parto (y no en hembras ciclantes), revelando un efecto sinérgico de la experiencia maternal previa y del perfil endócrino del periparto sobre la motivación maternal. En este sentido, Fleming y Sarker (1990) mostraron que la reducción de la latencia de sensibilización como consecuencia de la experiencia maternal previa, es mayor en hembras en gestación tardía que en ciclantes.

Las diferencias motivacionales observadas entre madres primíparas y multíparas pueden deberse a cambios de larga duración en diferentes áreas del SNC asociadas al control del comportamiento maternal, como consecuencia de la experiencia endócrina y maternal previa. El APOM, en particular, presenta cambios estructurales en el número de astrocitos (Featherstone et al., 2000), así como funcionales en la sensibilidad a opioides (Mann & Bridges, 1992) en hembras multíparas respecto a primíparas. A su vez, ratas posparturientas con experiencia maternal previa muestran una mayor activación del APOM, así como de regiones asociadas a procesos de memoria como la amígdala basolateral y la corteza prefrontal, al ser re-expuestas a crías, en comparación a hembras sin experiencia previa (Fleming & Korsmit, 1996).

Si bien el tiempo de permanencia cerca del macho o de las crías en el modelo de preferencia refleja la motivación de las ratas, el comportamiento exhibido por las hembras cuando están en la cercanía de estos estímulos parece responder a características propias de cada comportamiento, que difieren entre sí. Así, las hembras que prefirieron a las crías realizaron un gran esfuerzo para entrar en contacto con las mismas, reflejando la necesidad de las madres de permanecer en un estrecho contacto físico con sus hijos. Es bien conocido que la estimulación de la región perioral y ventrotorácica de las madres es fundamental para la expresión del comportamiento maternal (Stern & Johnson

1989; Stern & Kolunie 1991) y la interacción física con las crías refuerza procesos de aprendizaje operante (Lee et al., 2000). Por otra parte, las hembras que prefirieron al macho, no realizaron un esfuerzo importante para tener acceso al mismo, pero exhibieron comportamiento proceptivo en su proximidad. De igual forma, las hembras sexualmente activas no inician el contacto físico con el macho durante la ejecución de la conducta sexual, sino que realizan rápidos acercamientos seguidos de cortos alejamientos, para solicitar la monta del macho.

Es interesante destacar, a su vez, que el macho tuvo un fuerte valor de incentivo en el contexto endocrino del proestro tardío, mientras que la experiencia maternal previa aumentó el valor de incentivo de las crías en el contexto endocrino del parto. Estos resultados en conjunto enfatizan la importancia de la secuencia temporal en la cual se encuentran las hormonas reproductivas en momentos puntuales del ciclo reproductivo para promover procesos de atracción a estímulos específicos con significado biológico, como el macho y las crías (Beach, 1976; Pereira et al., 2008; Pfaus et al., 1999; Rosenblatt, 1975).

Ejecución de los comportamientos maternal y sexual

La semejanza en la ejecución del comportamiento maternal en la caja nido de las madres primíparas y multíparas, que poseen diferente motivación maternal, concuerda con trabajos previos que no encuentran diferencias mayores entre el cuidado maternal de hembras primíparas y multíparas durante la primera semana de lactancia (ver revisión Numan & Insel, 2003). En esta línea, observamos que las vírgenes maternas exhiben comportamiento maternal similar al de hembras lactantes primíparas en el 5to día de despliegue de cuidados de las crías (Agrati et al., 2008a). Estos resultados resaltan la importancia de utilizar modelos específicos para evaluar una motivación (Fleming et al., 1994; Lee et al., 2000; Stern & Mackinnon, 1976) o más de una (Agrati et al., 2008a; Mattson et al., 2001), para comprender y predecir el comportamiento de un individuo en situaciones más complejas.

Curiosamente, la interacción sexual de hembras en proestro tardío difirió de la observada en hembras en estro posparto, siendo esta diferencia más marcada en el comportamiento del macho. Así, la mayor latencia de monta y el mayor

umbral de eyaculación de los machos en presencia de hembras posparturientas vs. proestro tardío, sugieren un menor interés sexual de estos machos (Clark et al, 1987). Ésto podría explicar a su vez el aumento de las conductas proceptivas de las hembras posparturientas. Durante el estro posparto, las hembras podrían ser menos atractivas para los machos que durante el proestro tardío debido a su perfil hormonal y citología vaginal particulares (observaciones propias, Connors & Davis, 1980b). Deben realizarse estudios enfocados en el comportamiento y la preferencia sexual de machos por hembras en proestro vs. en estro posparto para determinar el valor de incentivo sexual de estas hembras para los mismos.

Las ratas posparturientas presentaron una mayor latencia a la conducta proceptiva respecto a las hembras en proestro, sugiriendo una menor motivación sexual. Sin embargo, no atacaron a los machos y presentaron proceptividad en función del comportamiento del macho similar a la de las ratas en proestro tardío, indicando una ejecución semejante del comportamiento sexual. Estos resultados contrastan con los de Connors y Davis (1980a) que observaron que las madres posparturientas presentan rechazos a los intentos de monta a pesar de estar receptivas y no observan, sin embargo, diferencias en el comportamiento de los machos. Esta discrepancia puede deberse a diferencias en la manipulación de las hembras previamente a la prueba de comportamiento sexual (por ejemplo: el intervalo de separación de las madres de sus crías fue mayor en nuestro caso), así como a la experiencia sexual de los machos utilizados.

Independientemente de las semejanzas en el comportamiento maternal y sexual de las hembras, las diferencias observadas en la preferencia por el macho y las crías sugieren diferencias en ambas motivaciones. Esta preferencia de las hembras por el macho o las crías podría responder a mecanismos activos por los cuales la motivación sexual o la motivación maternal estén aumentadas de forma independiente, o alternativamente a una competencia entre ambos estímulos, que implica que cuando el valor de uno aumenta el del otro pasivamente disminuya. Para responder esta pregunta es necesario abordar el estudio de ambas motivaciones –sexual y maternal- de forma separada en ratas sexualmente activas y maternas. Sin embargo, el hecho de que los comportamientos sexual y maternal, y en particular sus componentes activos,

no variaran entre los distintos tipos de hembras en presencia de un único estímulo (macho o crías) sugiere que el valor de un estímulo es afectado por el valor del otro. Si durante el estro posparto, el comportamiento de la hembra con relación al macho y a las crías está influido por una competencia entre ambos estímulos: ¿Cómo responde una madre sexualmente activa al ser enfrentada simultáneamente a ambos?

The Reproductive Stage and Experience of Sexually Receptive Mothers Alter Their Preference for Pups or Males

Daniella Agrati
Universidad de la República

Alonso Fernández-Guasti
Centro de Investigación y de Estudios Avanzados

Annabel Ferreira
Universidad de la República

Female rats show postpartum estrus, a unique stage in their reproductive cycle in which they are able to display maternal and sexual responses at the same time. To assess the relative value of pups or males for sexually receptive mothers with different hormonal profiles and reproductive experiences, we employed a 3-point star maze with 3 choice compartments containing: pups, a sexually active male, or no stimulus (neutral). Cycling maternal and nonmaternal females in late proestrus, independently of their previous reproductive experience, strongly preferred the male to the pups, although most postpartum estrous dams did not exhibit preference for the male. The majority of the postpartum primiparous females did not prefer the litter's chamber either, but a previous reproductive experience strongly determined their preference for the pups. These results suggest that the hormonal changes of the proestrus, in contrast to those of the postpartum estrus, promote a strong preference for the male that is not diminished by the maternal condition. Conversely, the endocrine changes of the postpartum facilitate the effect of previous reproductive experience in strengthening the incentive value of the pups.

Keywords: maternal motivation, sexual motivation, pup–male preference, reproductive stage, reproductive experience

Female rats exhibit a fertile postpartum estrus, generally on the night of delivery. During this unique period of their reproductive cycle, the females show proceptive/receptive behaviors toward male and care-taking activities toward their pups (Connor & Davis, 1980a; Gilbert, Pelchat, & Adler, 1980, 1984).

The strong incentive value of the pups for lactating dams and of the males for sexually receptive virgin females has been well documented using both conditioned place preference and operant procedures. Thus, maternal or sexually receptive rats prefer an environment that was previously paired with pups (Fleming, Korsmit, & Deller, 1994) or with a male (Paredes & Alonso, 1997) to the alternative neutral environment and learn to bar press to gain access to pups (Lee, Clancy, & Fleming, 1999) or to a male (Bermant & Westbrook, 1966), respectively. In addition, when given the choice between cues associated with pups and those associated with cocaine, most early postpartum dams express preference for the pups-associated chamber (Mattson, Williams, Rosenblatt, & Morrell, 2001).

The reproductive hormones associated with proestrus or with late gestation and parturition facilitate the expression of female sexual (Clark, Kelton, Guarraci, & Clyons, 2004; Connors & Davis, 1980b; Edwards & Pfeifle, 1983; Paredes & Alonso, 1997) and maternal (Bridges, 1975, 1977; Fleming & Sarker, 1990; Orpen & Fleming, 1987; Orpen, Furman, Wong, & Fleming, 1987) behaviors, probably by enhancing their respective motivations (Fleming & Sarker, 1990; Paredes & Alonso, 1997; Pereira & Ferreira, 2006; Stern & Mackinnon, 1976). Thus, ovariectomized females only show proceptive and receptive responses if they receive an estrogen plus progesterone treatment that mimics the hormonal changes of the proestrus (Clark et al., 2004; Edwards & Pfeifle, 1983; Paredes & Alonso, 1997). In this line, a hormonal treatment that mimics the profile of late pregnancy and parturition accelerates the onset and partially overcomes the deficits in maternal behavior (Bridges, 1984; Krehbiel & LeRoy, 1979; Orpen et al., 1987) shown by sensitized females—virgin rats that develop maternal behavior by continuous exposure to pups (Cosnier & Courturier, 1966; Fleming & Rosenblatt, 1974). On the other hand, previous sexual experience slightly enhances female's sexual behavior in future encounters with males (Rajendren, Dudley, & Moss, 1990), but does not affect sexual motivation measured in a partner preference task (Clark et al., 2004). Regarding maternal care, previous reproductive experience reduces the sensitization latency and improves the maternal behavior of cycling and late pregnant rats (Bridges, 1975, 1977; Fleming & Sarker, 1990; Orpen & Fleming, 1987; Orpen et al., 1987).

In this study, it was hypothesized that the relative strength of the two stimuli, pups and male, differ for sexually receptive mothers

Daniella Agrati and Annabel Ferreira, Physiology and Nutrition Department, School of Science, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay; Alonso Fernández-Guasti, Pharmacobiology Department, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Mexico City, Mexico.

PEDECIBA, Fondo Clemente Estable (M.E.C.), CSIC, and FNI supported this study. The present results constitute part of the PhD degree of Daniella Agrati. We thank Mariana Pereira, Bryan Phillips, Natalia Uriarte, and María José Zuluaga for constructive comments on the manuscript.

Correspondence concerning this article should be addressed to Daniella Agrati, Sección Fisiología y Nutrición, Facultad de Ciencias, Iguá 4225, Montevideo, Uruguay. E-mail: dagrati@fcien.edu.uy

according to their reproductive stage (late proestrus vs. postpartum) and their previous reproductive experience (prior gestation, parturition, and lactation). To explore this idea, we assessed the preference for pups or a male in both sensitized cycling- and postpartum-estrous females, with and without previous gestation, parturition, and lactation. Earlier reports show that maternal interaction with pups following parturition improves the female's maternal responsiveness in a subsequent pregnancy (Bridges, 1977; Fleming & Sarker, 1990), but no study has assessed the sole influence of a previous gestation and delivery either on maternal behavior or motivation following a subsequent parturition. Therefore, to further discriminate the influence of a previous gestation and parturition alone from that of the maternal experience, two groups of postparturient females were included: both with a previous parturition but one with minimal maternal interaction with pups. Finally, a group of cycling nonmaternal sexually receptive females, with and without previous reproductive experience, was incorporated as a control group.

To test the preference of these sexually receptive mothers for the pups or a male, we employed a choice procedure in which the females were allowed to move freely within the three arms of a "three point star"-shaped maze, each arm having at the end a chamber containing pups, a male, or no stimulus. The total time spent in each chamber constitutes the measure of female's preference and hence the strength of the value of one stimulus relative to the other. This model is sensitive to sexual stimuli, as cycling nonmaternal sexually receptive females choose the male over the proestrous female compartment (present study, see below), and is also responsive to maternal stimuli with different incentive values, as lactating dams prefer a chamber containing demanding rather than nondemanding pups (Pereira & Ferreira, 2006).

Materials and Method

Subjects

Female and male Wistar rats and pups of 1 to 8 days old were used. All animals were housed in a temperature and humidity-controlled environment ($21 \pm 1^\circ\text{C}$ and 65%, respectively), under a 12-hr light-dark cycle (lights on at 0500). Only cycling females that showed two regular consecutive estrous cycles were used. Breeding was achieved by placing a receptive female rat with a sexually active male. In addition to the experimental female groups, an extra group of donor lactating rats supplied foster pups for the sensitization procedure and for testing. Females from all groups were 6 ± 1 month of age at the time of testing.

Animal care and experimental procedures were performed in accordance with the "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" of the National Institutes of Health (1986) and the "Guidelines for Ethical Conduct in the Care and Use of Animals" (APA, Board of Scientific Affairs, Committee on Animal Research and Ethics, 2002). The local Ethical Committee, in accordance with the Universidad de la República norm for the use and care of laboratory animals (Diario Oficial 25467, February 21, 2000), approved this study.

Induction of Maternal Behavior (Sensitization Procedure)

In a previous study, we determined that when the sensitization procedure begins on estrous stage, most virgin cycling females

sensitize on the following proestrus (Agrati, Zuluaga, Fernández-Guasti, Meikle & Ferreira, 2008). Therefore, virgin females were isolated in proestrus and on the following day (estrus) exposed to newborn pups so that their first day of maternal responsiveness coincided with the sexually receptive day of their estrous cycle. On the other hand, primiparous rats are known to exhibit shorter sensitization latencies than virgins (Bridges, 1975, 1977; Fleming & Sarker, 1990) and were therefore isolated in estrus and began the sensitization procedure on metaestrus. Proestrous virgin and estrous primiparous females were housed in individual cages and on the following day, five freshly fed pups were scattered in the corner of the home cage. The pups were replaced every 10 to 15 hr with five freshly fed pups and the maternal behavior registered for 15 min. Retrieval of all five pups into the nest and a hover-over or nursing posture on two successive observations were considered as markers of maternal responsiveness (Fleming & Rosenblatt, 1974). Sensitized females were tested for pups versus male preference in their first behavioral estrus (proestrus' night) after becoming maternal.

Pups-Male Preference Apparatus

Discrimination trials between pups and a male were performed in an acrylic transparent three point star-shaped maze, consisting of three equal-sized chambers (25 cm wide $\times$ 30 cm long $\times$ 18 cm high) at the end of each arm (10 cm wide $\times$ 60 cm long $\times$ 10 cm high; Pereira & Ferreira, 2006). Two of the chambers contained either seven pups of 1 to 3 days old (pup chamber), or a sexually active male (male chamber), whereas the third chamber remained empty (neutral chamber). Each chamber has an acrylic transparent division with air holes allowing the females to see, hear, and smell the stimuli without physical contact. The locations of the stimuli were randomly counterbalanced across females within each experimental group. The stimulus males were never used more than once in the same week.

Experimental Procedures

The behavioral sessions started at least 2 hr after the onset of darkness and the behavior of a single rat was recorded at a time. On the testing day, females were placed in the center of the maze and allowed to entirely explore the empty maze for a 15-min habituation period. Thereafter, the stimuli were placed in the chambers and the cumulative time the females spent in each chamber was recorded during a 20-min testing period. Time spent in a compartment was recorded when the female placed the whole body or the head plus the forepaws inside the chamber. In addition, other behaviors performed by the females were measured: the exploration (sum of the total number of entries to the chambers plus the total number of entries to the arms) and the number of groomings and attempts to gain access to each stimulus (biting and scratching the division). The entire maze was cleaned with a 70% ethanol/water solution and dried thoroughly between the tests. Measures of preference included (a) the percentage of animals in each group spending in a particular chamber at least 50% of the total time spent in the three compartments, with the additional caveat that this time had to be at least 25% greater than the time spent in either of the two remaining chambers (Mattson et al.,

2001; Pereira & Ferreira, 2006), and (b) the percentage of the total testing time spent in each chamber by the females.

Regular cycling females' preferences were assessed in the night of proestrus, while postpartum animals were tested 9 to 10 hr after parturition during the dark period to ensure behavioral estrus (Connor & Davis, 1980a; Gilbert et al., 1980, 1984; Matthews-Felton, Corodimas, Rosenblatt, & Morrell, 1995). For all females, sexual receptivity was confirmed immediately after the preference test by checking the lordosis behavior in response to a male's mounting in a clean cage without the pups. Thereafter, maternal females were returned to their home cages and observed until the entire litter was retrieved into the nest.

To assess the putative differences in females' preferences due to the maternal or nonmaternal condition, their reproductive stage (late proestrus vs. postpartum estrus) and their previous reproductive and maternal experiences, the following groups of females were selected:

1. Cycling nonmaternal virgin females tested in late proestrus ($n = 8$).
2. Cycling nonmaternal primiparous females tested in late proestrus, 2 weeks after weaning their litter ($n = 6$).
3. Cycling maternal (sensitized) virgin females tested in late proestrus (without a previous reproductive experience; $n = 7$).
4. Cycling maternal (sensitized) primiparous females tested in late proestrus ($n = 7$). These females had previous parturition and maternal experiences and were sensitized 2 weeks after the weaning of their litter.
5. Postpartum estrous primiparous dams (without previous parturition and maternal experiences; $n = 9$).
6. Postpartum estrous multiparous dams with previous maternal experience restricted to giving birth ($n = 7$). These females had a previous parturition but their pups were removed one by one immediately after birth and the same day were remated. These dams were allowed to eat the placentas and to sporadically lick the pups, but never showed retrieving or nursing.
7. Postpartum estrous multiparous dams (with previous maternal experience; $n = 7$). These females had a previous parturition and lactation and were remated in the first estrus after weaning.

As aforementioned, these three postpartum groups (5, 6, and 7) experienced a 9- to 10-hr period of mother-pups interaction before the test.

Validation of the Model as a Sexual Preference Test

In a previous study, Pereira and Ferreira (2006) demonstrated that this model is appropriate to discriminate the relative reinforcing salience of different kinds of pups (intact vs. demanding) to early lactating females. As in this study we aimed to determine the relative reinforcing value of pups and a male for

sexually receptive mothers, an extra group of cycling proestrous virgin females ($n = 8$) was tested in the maze employing a proestrous unfamiliar virgin female and a sexually active male as incentive stimuli to validate the model as a sexual partner preference task.

Statistical Analysis

Because most of the behavioral data did not fit a normal distribution (Kolmogorov-Smirnov test), they are expressed as medians (semi-interquartil ranges) and were analyzed by nonparametric tests (Siegel & Castellan, 1988). Within-group comparisons were performed by Friedman one-way analysis of variance followed by Wilcoxon's matched-pair test and between-groups analysis were performed by means of the Kruskal-Wallis one-way analysis of variance followed by the Mann-Whitney U test.

A 6×3 exact contingency table test (Mehta & Patel, 1983) followed by Fisher exact probability tests were employed to analyze the number of animals that preferred the pups or the male and those that did not exhibit preference between the groups. Statistical significance in all cases was $p < .05$.

Results

Validation of the Model as a Sexual Preference Test

All proestrous virgin females (8:8) preferred the male to the proestrous unfamiliar female or to the neutral chamber, validating the use of this model as a sexual partner preference task. The clear females' preference for the male was also reflected by the high percentage of time spent in the male chamber in comparison to the other compartments (percentage of total time: 53.1 [13.0] with the male, 12.1 [3.8] with the proestrous unfamiliar female, and 1.0 [1.0] in the neutral chamber; male versus proestrous female and versus neutral: $T = .0$, $p < .05$ for all comparisons, Wilcoxon's matched pair test). It is worth mentioning that sexually receptive females explore the proestrous female compartment more than the neutral chamber ($T = .0$, $p < .05$), indicating clear social interest.

Sensitization Latency

Cycling primiparous females, submitted to the sensitization procedure, showed significantly shorter sensitization latency than virgin rats (virgin vs. primiparous: 4.0 [.0] vs. 3.0 [.0] days, $U = 2.0$, $p < .01$, Mann-Whitney U test).

Pups Versus Male Preference of Nonmaternal Cycling Females: Influence of a Previous Reproductive Experience

The behavior of cycling nonmaternal virgins and cycling nonmaternal primiparous females was remarkably similar and no statistical differences were found between these two groups (the percentage of total time virgin and primiparous females spent in the different chambers was: 38.7 [4.3] vs. 43.9 [6.4], $U = 18.0$, $p = ns$, with the male; and 10.3 [4.1] versus 9.1 [2.4], $U = 23.0$, $p = ns$, with the pups). Therefore, they were joined in one group of cycling nonmaternal females ($n = 14$) for better visualization of the overall results.

Differences in the Preference for Pups Versus Male of Sexually Receptive Females According to Their Maternal Condition and Reproductive Stage and Experience

As shown in Table 1 and Figure 1, the groups showed clear differences in their preferences ($p < .01$, 6×3 exact contingency table test) and in the time spent in the different chambers (pups' chamber: $H(5, 51) = 18.9$, $p < .01$, and male's chamber: $H(5, 51) = 30.6$, $p < .01$, Kruskal Wallis one-way analysis of variance). As no animal preferred the neutral chamber, this option was eliminated from the preference data analysis.

Influence of the maternal condition. Cycling nonmaternal and maternal females exhibited a marked preference for the male (more than 85% of the animals per group) when compared to the parturient females ($p < .05$ for all comparisons, Fisher exact probability test) and an increased time spent in its compartment relative to that spent in the other chambers (male vs. pups and vs. neutral: $T = .0$, $p < .05$, for the three groups). This clear preference for the male was accompanied by more active behaviors attempting to gain access to it, in comparison to the behavior displayed toward pups (male vs. pups gain attempts: $T = 4.5$, $p < .05$, for cycling nonmaternal, $T = .0$, $p < .05$, for cycling maternal virgin and $T = .0$, $p = .07$ for cycling maternal primiparous). Even with very low time values, these females spent more time in the pups' compartment than in the neutral chamber ($T = 1.0$, $p < .01$ for cycling nonmaternal, $T = .0$, $p < .05$, for cycling maternal virgin, and $T = 1.0$, $p < .05$, for cycling maternal primiparous).

Influence of gestation, parturition and lactation. Surprisingly, 55.5% (5/9) of the postpartum primiparous females did not exhibit preference for the pups or the male, whereas only 33.3% (3/9) preferred the male and 11.1% (1/9) favored the pups. This preference distribution was reflected by a similarly reduced time that these females spent either in the proximity of the pups or the male (see Figure 1). These females also exhibited decreased exploration of the maze in comparison to the other groups (see Table 2). Thus, although all the postpartum primiparous dams entered at least once all three chambers and explored the whole maze, they spent most of the time resting or grooming in the central area or in the arms of the apparatus.

Influence of a previous reproductive experience. Contrasting with the behavior of the primiparous females during the postpartum estrus, both postpartum multiparous groups exhibited a strong preference for the pup chamber (71.4% of the animals per group) when compared with cycling and lactating primiparous groups ($p < .05$ for all comparisons, Fisher exact probability test) and an

increased time spent in this chamber (comparisons between groups by brackets in Figure 1). This clear preference for the pups was accompanied by a huge effort made by these females to gain access to the litter and by enhanced grooming, reflecting displaced behavior, when compared to the rest of the groups (see Table 2).

Maternal and Sexual Behavior After Preference Tests

All maternal females (sensitized and lactating) included in this study showed lordosis behavior in response to male's mountings and retrieved the entire litter into the nest in the observations performed after the preference test. Control nonmaternal females showed sexual behavior.

Discussion

In the present study, all cycling maternal females preferred the male over the pups; although the postpartum multiparous rats, independently of the type of their previous maternal experience, exhibited a strong preference for the pups. Most primiparous dams presented no preference for the pups or the male. Despite these preferences, all females exhibited maternal and sexual responses in their home cage or in a novel arena, respectively.

For cycling females, the higher reinforcing value of the male compared to that of the pups most likely is underlied by the progesterone peak preceded by estrogen secretion (Edwards & Pfeifle, 1983; Paredes, & Alonso, 1997) that characterizes proestrus (Savoy-Moore, Schwartz, Duncan, & Marshall, 1980). More interesting, in these cycling females, the induction of maternal behavior did not alter the preference for the male. Thus, all cycling maternal females spent a short time in the pups' chamber, as did nonmaternal animals; suggesting that sensitized females, even if they display maternal behavior in their home cages, have low maternal motivation. This result agrees with previous findings showing that sensitized rats exhibit impairments in their maternal motivation when compared with lactating dams (Pereira & Ferreira, 2006; Stern & Mackinnon, 1976).

For the cycling maternal primiparous females, the previous experience of parturition and lactation seemed to have reduced the sensitization latency by 1 to 2 days as compared with virgin animals. This result agrees with earlier studies showing that a previous experience with pups after parturition (Bridges, 1975; Fleming & Sarker, 1990) or caesarean delivery (Bridges, 1977; Orpen & Fleming, 1987) importantly reduces the sensitization latency. However, in the present study, this shortened latency

Table 1
Animals Per Group That Preferred the Chamber with the Male or the Pups or That Exhibited No Preference

	Male	Pups	No Preference
Cycling nonmaternal	92.9 (13/14) ^{***†††}	0.0 (0/14) ^{†††}	7.1 (1/14) [*]
Cycling maternal virgin	85.7 (6/7) ^{***††}	0.0 (0/7) ^{†††}	14.3 (1/7)
Cycling maternal primiparous	100.0 (7/7) ^{***††}	0.0 (0/7) ^{†††}	0.0 (0/7) [*]
Postpartum primiparous nonmaternal experience	33.3 (3/9)	11.1 (1/9) ^{††}	55.5 (5/9)
Postpartum multiparous restricted maternal experience	0.0 (0/7)	71.4 (5/7)	28.6 (2/7)
Postpartum multiparous maternal experience	14.3 (1/7)	71.4 (5/7)	14.3 (1/7)

Note. Data are expressed as percentage (number of animals in this condition/total number of animals).

^{*} $p < .05$ and ^{**} $p < .01$ (vs. postpartum primiparous nonmaternal experience), [†] $p < .05$ and ^{††} $p < .01$ (vs. postpartum multiparous restricted maternal experience), and [‡] $p < .05$ and ^{‡‡} $p < .01$ (vs. postpartum multiparous maternal experience) using Fisher exact probability test.

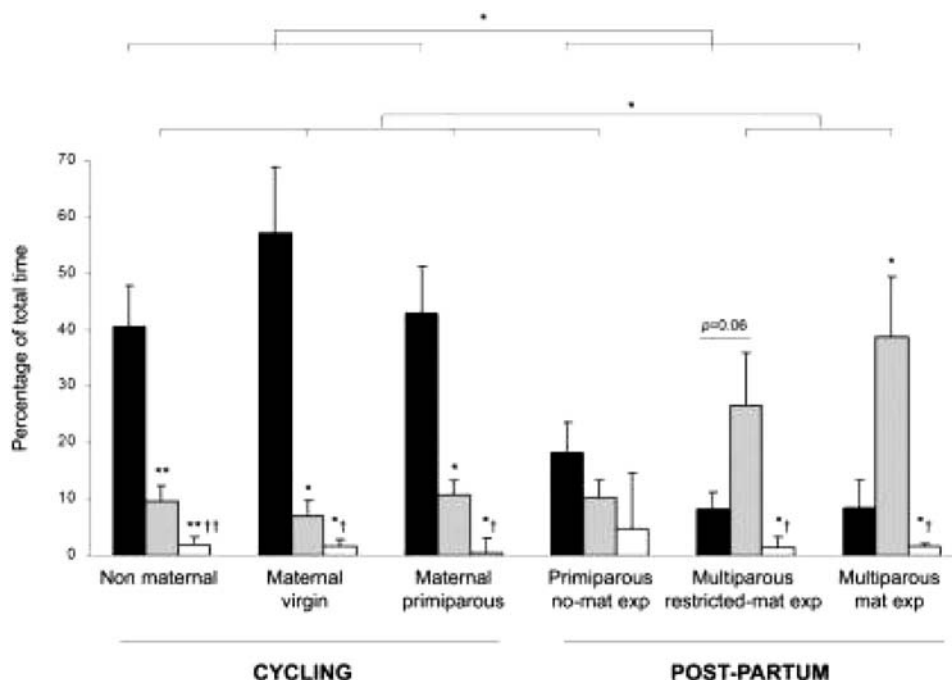


Figure 1. Percentage of the total time spent in the male (black bars), pup (gray bars) and neutral (white bars) chambers of nonmaternal ($n = 14$), maternal virgin ($n = 7$), and maternal primiparous ($n = 7$) cycling females and of primiparous without previous reproductive experience (primiparous no-mat exp, $n = 9$), multiparous with a previous maternal experience restricted to parturition (multiparous restricted-mat exp, $n = 7$) and multiparous with a previous full maternal experience (multiparous mat exp, $n = 7$) postpartum dams. Data are expressed as medians (semi-interquartile range). * $p < .05$ and ** $p < .01$ versus male and † $p < .05$ and †† $p < .01$ versus pups within a group, Wilcoxon's test and *† $p < .05$ between groups, Mann-Whitney U test.

could also be due to the fact that virgin and primiparous rats began the sensitization procedure at different estrous-cycle stages. It was formerly reported that a previous reproductive experience accelerates the onset of maternal behavior (Bridges, 1975, 1977; Fleming & Sarker, 1990) and improves it (Fleming & Sarker, 1990); these effects of experience are likely to be due to an enhanced maternal motivation (Fleming & Sarker, 1990; Pereira & Ferreira, 2006). However, previous reproductive experience did not enhance the time spent in the pup chamber in sensitized primiparous females. One putative explanation for this discrepancy could relate to the challenging nature of the present model. Thus, the high

sexual motivation of a proestrous female (Bermant & Westbrook, 1966; Paredes & Alonso, 1997) may mask the reinforcing value that pups have for sensitized primiparous rats, even though they could have a stronger maternal motivation than virgin sensitized rats.

Cycling nonmaternal females preferred to spend time in the vicinity of the pups rather than in the neutral compartment indicating that, in this context, the pups' cues are not aversive for nonmaternal rats, a finding that is consistent with other studies showing that virgin females do not express aversion to the pup's odors in preference tests (Bauer, 1983; Kinsley & Bridges, 1990).

Table 2

Exploration, Attempts to Obtain the Stimuli and Grooming Performed by the Females in the Preference Model

	Exploration	Male attempts	Pups attempts	Grooming
Cycling nonmaternal	43.0 (10.3)**	1.5 (1.4) ^{a†††}	0.0 (0.0) ^{†††}	6.0 (2.1) ^{†††}
Cycling maternal virgin	38.0 (3.3)*	1.0 (1.0) ^{a†}	0.0 (0.3) ^{††}	8.0 (1.8) ^{†††}
Cycling maternal primiparous	42.0 (6.5)**	2.0 (4.0)	0.0 (0.5) ^{††}	8.0 (2.3) ^{††}
Postpartum primiparous nonmaternal experience	28.0 (0.5)	0.0 (0.0)	0.0 (1.0) [†]	9.0 (4.5)
Postpartum multiparous restricted maternal experience	44.0 (6.3)	0.0 (0.0) ^a	10.0 (6.0)	13.0 (4.8)
Postpartum multiparous maternal experience	36.0 (7.8)*	0.0 (0.0) ^a	15.0 (7.8)	17.0 (2.0)

Note. Data are expressed as medians (semi-interquartile range).

^a $p < .05$ pup's vs. male's attempts within a group, Wilcoxon matched pair test and * $p < .05$ and ** $p < .01$ (vs. postpartum primiparous nonmaternal experience), † $p < .05$ and †† $p < .01$ (vs. postpartum multiparous restricted maternal experience), and ‡ $p < .05$ and ‡‡ $p < .01$ (vs. postpartum multiparous maternal experience), Mann-Whitney U test.

The discrepancy between these results and those showing that virgin females display aversive reactions when pups are introduced to their home cage (Fleming & Roseblat, 1974; Rosenblatt, 1967; see Numan & Insel, 2003, for review) suggests that the latter aversion may arise from contrasting olfactory cues from the home cage sleeping area and the pups.

Most lactating primiparous dams did not exhibit preference for the pups or the male, even if they had the hormonal changes proposed to enhance maternal and sexual motivation (Connor & Davis, 1980b; Fleming et al., 1994; Fleming & Sarker, 1990; Orpen et al., 1987). This result was accompanied by a reduced exploration of the entire maze, suggesting that primiparous dams display a lack of general activity a few hours after parturition. More interesting, Orpen and Fleming (1987) observed that most primiparous 22-day gestating rats that delivered through caesarean section ignored newborn pups when they were exposed to their sensory cues without physical interaction with them, indicating that the neuroendocrine changes of pregnancy were not sufficient to strength maternal motivation. Moreover, even though in the present study primiparous females experienced parturition and interacted with pups for 9 to 10 hr before the test, these experiences were not sufficient to develop a maternal motivation strong enough to promote pups' seeking in the preference model. This result contrasts with the general idea that the pups' stimuli are highly reinforcing for postpartum primiparous dams (Fleming et al., 1994; Mattson et al., 2001; Pereira & Ferreira, 2006; Stern & Mackinnon, 1976). However, in these reports, maternal motivation was evaluated 4 to 9 days after parturition suggesting that for primiparous mothers the period of interaction with pups may account for the differences in maternal motivation. Thus, the present study supports Fleming's et al. (1994) proposal that even though a basal motivational state is necessary for the display of maternal responses, maternal motivation is built and strengthened by the interaction with pups. By contrast, multiparous females had the same period of interaction with pups than primiparous dams and presented a strong preference for the newborn, indicating that previous full reproductive experience—including maternal care—is sufficient to override the deficits due to a short time of maternal interaction with pups. It is noteworthy that the effect of previous experience was only observed in postpartum dams, but not in cycling sensitized females that lack the peripartum hormonal changes. These data point toward a state-dependent motivational effect of previous reproductive experience, which only emerges under an adequate hormonal profile. Accordingly, Fleming and Sarker found that the reduction in the sensitization latency and the improvement of maternal behavior induced by a previous maternal experience is much greater in late pregnant than in cycling females.

Postpartum females that experienced a previous gestation and parturition without more interaction with the pups from that experienced during parturition preferred the newborn to the male when tested in a second delivery. This result, together with the finding that the sole interaction with the pups in a sensitization procedure improves the subsequent maternal behavior of late pregnant rats (Fleming & Sarker, 1990) suggest a hormonal (present results) and behavioral (Fleming & Sarker, 1990) sensitization of the neural circuits involved in maternal motivation. In other words, a second gestation/delivery may trigger not only the activation of a behavioral, but also of an endocrine memory. These two factors seem to contribute in an independent fashion to improve future maternal behavior through enhancing maternal motivation; how-

ever this possibility has to be explored dissecting the effect of each factor.

The reduced preference for the male displayed by postpartum dams (regardless of their previous delivery and maternal experiences) probably relies on specific endocrine factors characteristic of puerperium. This conclusion arises from the observation that sensitized females exhibited a clear preference for the male even though being maternal, and that postpartum estrous primiparous dams did not choose the male. It is noteworthy that although cycling and postpartum rats show proceptive and receptive behaviors (Connor & Davis, 1980a; Gilbert et al., 1980, 1984) and similar copulatory efficacy (Gilbert et al., 1980, 1984), lactating dams are more aggressive toward the male and show decreased copulatory time when compared to virgins (Connor & Davis, 1980a; Gilbert et al., 1980). These data suggest a reduced quality of sexual behavior that may impact the preference for the male. As females display sexual behavior and get pregnant during the postpartum estrus (Connor & Davis, 1980a; Gilbert et al., 1980), the reduced sexual motivation observed (present results) together with the increased aggression toward the male (Connor & Davis, 1980a) could represent a behavior strategy employed by mothers to protect the young in this particular reproductive situation.

The females' preference for the pups or the male in this model can be explained either by an active mechanism enhancing sexual or maternal motivation in an independent fashion or, alternatively, by a competition between both stimuli so that when the value of one increases that of the other is passively decreased. Although a specific experiment should be designed to analyze these possibilities, it could be suggested that the changes observed reflect active preference because, as mentioned above, primiparous dams did not prefer any of the stimuli. It would be interesting to analyze the absolute incentive value of the pups and the male for a receptive and maternal female. Finally, if a common neural circuitry underlies the motivational aspects of both sexual and maternal behaviors (Numan, 2007; see Numan & Insel, 2003, for review), how do hormones and previous reproductive experience determine female's preference for one or the other? Based on Numan's hypothesis (2007), these factors might be modifying distinct neural areas involved in the regulation of specific motivational states, such that when a specific area is activated, it in turn increases responsiveness to a particular group of external stimuli.

References

- Agrati, D., Zuluaga, M. J., Fernández-Guasti, A., Meikle, A., & Ferreira, A. (2008). Maternal condition reduces fear behaviors but not the endocrine response to an emotional threat in virgin female rats. *Hormones and Behavior*, 53, 232–240.
- APA, Board of Scientific Affairs, Committee on Animal Research and Ethics. (2002). *Guidelines for ethical conduct in the care and use of animals*. Available at <http://www.apa.org/science/anguide.html>
- Bauer, J. H. (1983). Effects of maternal state on the responsiveness to nest odors of hooded rats. *Physiology and Behavior*, 30, 229–232.
- Bermant, G., & Westbrook, W. H. (1966). Peripheral factors in the regulation of sexual contact by female rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 61, 244–250.
- Bridges, R. S. (1975). Long-term effects of pregnancy and parturition upon maternal responsiveness in the rat. *Physiology and Behavior*, 14, 245–249.
- Bridges, R. S. (1977). Parturition: Its role in the long-term retention of maternal behavior in the rat. *Physiology and Behavior*, 18, 487–490.

- 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, 930–940.
- Clark, A. S., Kelton, M. C., Guarraci, F. A., & Clyons, E. Q. (2004). Hormonal status and test condition, but not sexual experience, modulate partner preference in female rats. *Hormones and Behavior*, 45, 314–233.
- Connor, J. R., & Davis, H. R. (1980a). Postpartum estrus in Norway rats. I. Behavior. *Biology of Reproduction*, 23, 994–999.
- Connor, J. R., & Davis, H. N. (1980b). Postpartum estrus in Norway rats. II. Physiology. *Biology of Reproduction*, 23, 1000–1006.
- Cosnier, J., & Couturier, C. (1966). Comportement maternal provoqué chez les rattees adultes castrées [Maternal behavior provoked in adult castrated rats]. *Comptes rendus des seances de la Societe de biologie et de ses filiales*, 160, 789–791.
- Edwards, D. A., & Pfeifle, J. K. (1983). Hormonal control of receptivity, proceptivity and sexual motivation. *Physiology and Behavior*, 30, 437–443.
- Fleming, A. S., Korsmit, M., & Deller, M. (1994). Rat pups are potent incentives to the maternal animal: Effect of experience, parity, hormones, and dopamine function. *Psychobiology*, 22, 44–53.
- Fleming, A. S., & Rosenblatt, J. (1974). Maternal behavior in the virgin and lactating rat. *Journal of Comparative Physiology and Psychology*, 86, 957–972.
- Fleming, A. S., & Sarker, J. (1990). Experience-hormone interactions and maternal behavior in rats. *Physiology and Behavior*, 47, 1165–1173.
- Gilbert, A. N., Pelchat, R., & Adler, N. T. (1980). Postpartum copulatory and maternal behaviour in Norway rats under seminatural conditions. *Animal Behavior*, 28, 989–995.
- Gilbert, A. N., Pelchat, R. J., & Adler, N. T. (1984). Sexual and maternal behavior at the postpartum oestrus: The role of the experience in time-sharing. *Animal Behavior*, 32, 1045–1053.
- Kinsley, C. H., & Bridges, R. S. (1990). Morphine treatment and reproductive condition alter olfactory preferences for pup and adult male odors in female rats. *Developmental Psychobiology*, 23, 331–47.
- Krehbiel, D. A., & LeRoy, M. L. (1979). The quality of hormonally stimulated maternal behavior in ovariectomized rats. *Hormones and Behavior*, 12, 243–252.
- Lee, A., Clancy, S., & Fleming, A. S. (1999). Mother rats bar-press for pups: Effects of lesions on the mpoa and limbic sites on maternal behavior and operant responding for pup-reinforcement. *Behavioral Brain Research*, 100, 15–31.
- Matthews-Felton, T., Corodimas, K. P., Rosenblatt, J. S., & Morrell, J. I. (1995). Lateral habenula neurons are necessary for the hormonal onset of maternal behavior and for the display of postpartum estrus in naturally parturient female rats. *Behavioral Neuroscience*, 109, 1172–1188.
- Mattson, B. J., Williams, S., Rosenblatt, J. S., & Morrell, J. I. (2001). Comparison of two positive reinforcing stimuli: Pups and cocaine throughout the postpartum period. *Behavioral Neuroscience*, 115, 683–694.
- Mehta, C. R., & Patel, N. R. (1983). A network algorithm for performing Fisher exact test in R. X. C. contingency-tables. *Journal of the American Statistical Association*, 78, 427–434.
- National Institutes of Health. (1986). *Guide for the care and use of laboratory animals* (DHEW Publication No. 86–23). Washington, DC: U.S. Government Printing Office.
- Numan, M. (2007). Motivational systems and the neural circuitry of maternal behavior in the rat. *Developmental Psychobiology*, 49(1), 12–21.
- Numan, M., & Insel, T. R. (2003). Motivational models of the onset and maintenance of maternal behavior and maternal aggression. In G. Ball, J. Balthazart, J. Hopkins, & R. Nelson (Eds.), *The neurobiology of parental behavior* (pp. 69–106). New York: Springer-Verlag.
- Orpen, B. G., & Fleming, A. S. (1987). Experience with pups sustains maternal responding in postpartum rats. *Physiology and Behavior*, 40, 47–54.
- Orpen, B. G., Furman, N., Wong, P. Y., & Fleming, A. S. (1987). Hormonal influences on the duration of postpartum maternal responsiveness in the rat. *Physiology and Behavior*, 40, 307–315.
- Paredes, R. G., & Alonso, A. (1997). Sexual behavior regulated (paced) by the female induces conditioned place preference. *Behavioral Neuroscience*, 111, 123–128.
- Pereira, M., & Ferreira, A. (2006). Demanding pups improve maternal behavioral impairments in sensitized and haloperidol-treated lactating female rats. *Behavioral Brain Research*, 175, 139–148.
- Rajendren, G., Dudley, C. A., & Moss, R. L. (1990). Role of the ventromedial nucleus of hypothalamus in the male-induced enhancement of lordosis in female rats. *Physiology and Behavior*, 50, 705–710.
- Rosenblatt, J. S. (1967). Nonhormonal basis of maternal behavior in the rat. *Science*, 156, 1512–1514.
- Savoy-Moore, R., Schwartz, N. A., Duncan, J. A., & Marshall, J. C. (1980). Pituitary gonadotropin-releasing hormone receptors during the rat estrous cycle. *Science*, 209, 924–944.
- Siegel, S., & Castellan, N. J. (1988). *Nonparametric statistics for the behavioral sciences* (2nd ed.). New York: McGraw-Hill.
- Stern, J. M., & Mackinnon, D. A. (1976). Postpartum, hormonal, and nonhormonal induction of maternal behavior in rats: Effects on T-maze retrieval of pups. *Hormones and Behavior*, 7, 305–316.

Received January 25, 2008

Revision received February 25, 2008

Accepted February 26, 2008 ■

Capítulo III

Expresión de dos motivaciones antagónicas durante el estro posparto: comportamiento sexual y agresión maternal hacia un macho intruso.

Mientras que la condición sexual torna a la hembra sensible a características del macho que la incitan a solicitar la monta (Agmo, 1999; Beach, 1976; Pfaus et al., 1999), la condición maternal -en presencia de las crías y del nido- la vuelve agresiva hacia el mismo, el cual se transforma en un estímulo aversivo. Así, el comportamiento de solicitud sexual provoca respuestas de acercamiento del macho (Figura 10), mientras que las respuestas agresivas de las madres generan en el macho conductas de sumisión y evitación (Moyer 1968; Olivier & Mos 1986; Figura 14). Sobre la base de estas observaciones nos preguntamos si la hembra en estro posparto era capaz de expresar simultáneamente dos motivaciones antagónicas: comportamiento sexual y agresión maternal hacia un macho intruso en la caja materna (***a partir de hipótesis 3***).

Objetivos

1. Determinar las respuestas de hembras lactantes en el estro posparto frente a un macho intruso en la caja materna.
2. Comparar las respuestas de madres en estro posparto frente a un macho intruso en la caja materna (posible expresión de comportamiento sexual y agresivo), con las de hembras en estro posparto frente a un macho en una caja nueva (predominantemente comportamiento sexual) y frente a una hembra intrusa en la caja materna (predominantemente agresión maternal).

Abordaje experimental

El abordaje experimental y la metodología empleada se describen en detalle en el anexo adjunto al final del capítulo. Brevemente, para determinar la respuesta comportamental de las hembras durante el estro posparto ante un macho intruso (**objetivo 1**), introdujimos un macho sexualmente activo en la esquina opuesta al nido de la caja materna y durante 15 min registramos el comportamiento sexual, así como el comportamiento y la agresión maternas de las hembras. A su vez, registramos el comportamiento sexual y las respuestas de sumisión de los machos (grupo *macho caja nido*, n=9).

Figura 13. Prueba de macho intruso en caja materna. El macho es introducido en la caja de la hembra lactante con su camada, 12 hs luego del inicio del parto.



Para evaluar la posible interferencia de la motivación maternal-agresiva en la expresión del comportamiento sexual, así como la posible influencia de la motivación sexual en la expresión de la agresión maternal realizamos los siguientes grupos control (**objetivo 2**):

- a. expresión de comportamiento sexual con incentivo agresivo del macho reducido- hembras en estro posparto fueron enfrentadas a un macho sexualmente activo en una nueva caja sin crías, 2.5 hs luego de la separación madre-crías (grupo *macho caja nueva*, n=9).
- b. expresión de agresión maternal con incentivo sexual del intruso reducido- hembras en estro posparto fueron enfrentadas a una hembra intrusa primípara en proestro tardío en la caja materna (grupo *hembra caja nido*, n=9).

Debido a la disminución de la actividad sexual en el período poseyaculatorio y la variabilidad del mismo (Yang & Clemens, 1997), el comportamiento sexual de las hembras en los grupos *macho caja nido* vs. *macho caja nueva* se comparó hasta la primera eyaculación del macho (Pfaus et al., 1999) o hasta el fin de la prueba en el caso de las hembras con machos que no eyacularon. La agresión maternal hacia el intruso de los grupos *macho caja nido* vs. *hembra caja nido* se analizó durante los 15 min de prueba.



Figura 14. Agresión maternal. Hembra en postura de ataque y macho en postura de sumisión (cuadro de la izquierda) y hembra atacando al macho (cuadros central y derecho). En esta secuencia, la hembra lactante ataca al macho en la esquina opuesta al nido (ubicado en la parte posterior izquierda), denota el carácter ofensivo de la agresión maternal.

Resultados

Expresión simultánea de comportamiento sexual y de agresión maternal durante el estro posparto

Las hembras en estro posparto exhibieron respuestas sexuales, tanto proceptivas como receptivas, y respuestas ofensivas en un patrón comportamental mezclado, ante la presencia de un macho intruso en la caja materna (Figura 15). Esta estrecha relación temporal entre la expresión del comportamiento sexual y de la agresión maternal se manifestó en que el 27% de las transiciones comportamentales (en menos de 5 seg) ocurrieron entre componentes sexuales y agresivos (n° de transiciones entre dos conductas proceptivas: 7.0 (3.5), entre dos conductas agresivas: 7.0 (5.0) y de conducta agresiva a proceptiva y viceversa: 13.0 (3.5), análisis de varianza de Friedman (2, 9)= 2.9, $p=NS$).

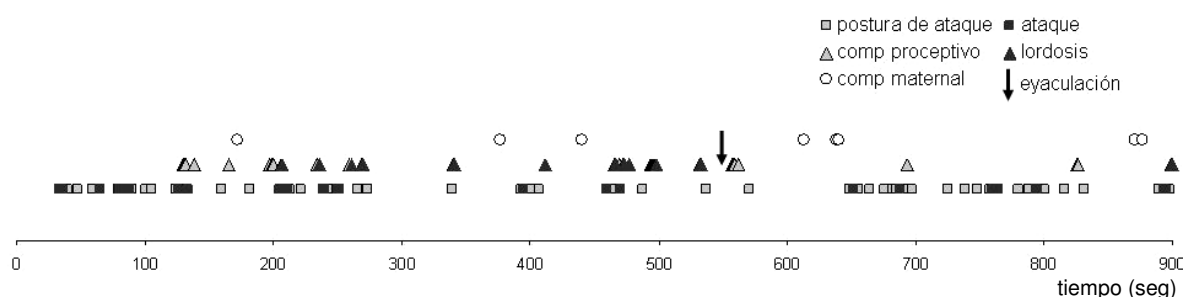


Figura 15. Respuestas agresivas (cuadrados), sexuales (triángulos) y maternales (círculos) a lo largo de la prueba de una sola hembra representativa de madres en estro posparto enfrentadas a un macho intruso en la caja materna.

La fusión de patrones comportamentales, se reflejó a su vez, en la disrupción de las secuencias del comportamiento sexual, donde las conductas proceptivas de las hembras, que incitan al macho a montarla, no fueron necesariamente seguidas de la postura consumatoria de lordosis o de otra proceptiva, sino que 14 % (6.0) fue sucedida por un componente agresivo (% de transiciones de proceptiva a lordosis 58.0 (17.0) y de proceptiva a proceptiva 27.0 (18.0)). Incluso, una hembra realizó conductas proceptivas y lordosis en respuesta a la monta mientras acarreaba a una cría (Figura 16).



Figura 16. Expresión simultánea de comportamiento sexual (postura de lordosis) y comportamiento maternal (acarreo de una cría).

Expresión individual de comportamiento sexual y agresión maternal vs su co-expresión

La figura 17A muestra que los comportamientos proceptivos de *hops & darts* y la receptividad sexual de las hembras (cociente de lordosis) que copularon y agredieron al macho de forma conjunta, no difirieron de los presentados por hembras en estro posparto enfrentadas a un macho en una caja nueva -en ausencia de agresión maternal.

Las hembras enfrentadas a un macho en la caja nido, sin embargo, exhibieron una reducción de las solicitudes en relación a las hembras en caja nueva, que

se acompañó de una disminución de las montas e intromisiones por eyaculación de los machos (Figura 17 A y B). No obstante, al corregir las solicitudes de las hembras en relación a las montas del macho, no se observan diferencias entre los grupos (nº de solicitudes/montas e intromisiones totales en caja nueva 0.5 (0.2) vs caja nido 0.1 (0.2), $U=23.5$, $p=NS$, prueba U de Mann-Whitney). A su vez, los machos enfrentados a hembras en la caja nido presentaron una mayor latencia de monta, pero no difirieron en sus latencias para alcanzar la eyaculación (Tabla 4) o en el número de machos que efectivamente eyacularon durante la prueba respecto a los machos en caja nueva (Figura 17 B), sugiriendo que los machos copulan de manera similar con las hembras en el nido o en la caja nueva.

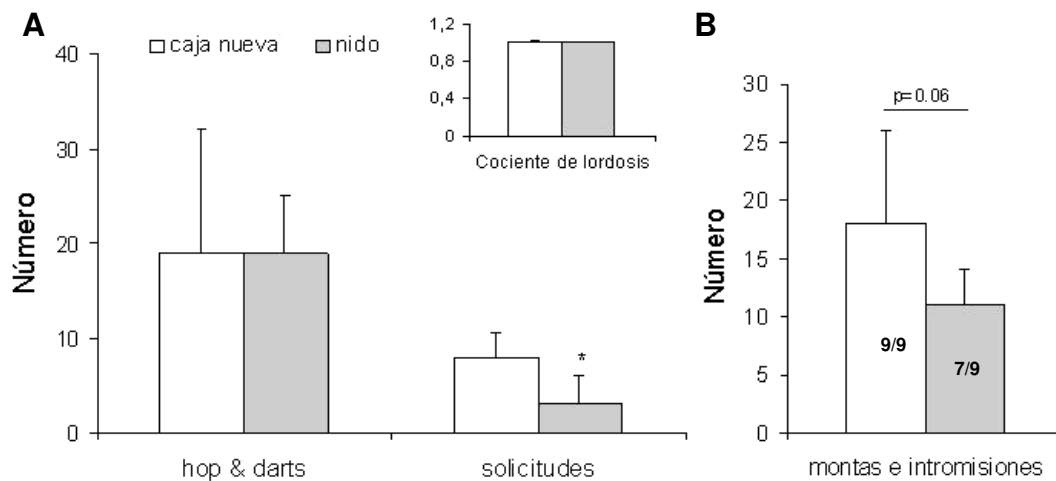


Figura 17. Número de comportamientos proceptivos (hops & darts y solicitudes) realizados por las hembras en estro posparto (Panel A) y número de montas e intromisiones realizadas por los machos que eyacularon (números dentro de las barras: nº de macho que eyacularon /nº total, Panel B), en una interacción sexual hasta la primera eyaculación, en una caja nueva (barras blancas) y en la caja nido (barras grises). El inserto en el Panel A muestra el cociente de lordosis para ambos grupos de hembras. Datos expresados como medianas (RSIQ). * $p<0.05$ y $p=0.06$ vs caja nueva, Prueba U de Mann-Whitney.

La agresión maternal de las hembras en estro posparto enfrentadas a un macho intruso con el cual copularon, no difirió de la exhibida hacia una hembra intrusa con un bajo valor de incentivo sexual (Figura 18 A). Sin embargo, los machos intrusos exhibieron un tiempo significativamente menor de postura de sumisión que las hembras intrusas (Figura 18 B), probablemente como consecuencia de la interacción sexual.

Tabla 4. Latencia a la expresión de componentes del comportamiento sexual y de la agresión maternal de hembras y de machos.

	<i>hembra</i>		<i>macho</i>		
	proceptiva	ataque	monta	eyaculación ^a	sumisión
caja nueva	79.8 (40.8)	813.6 (209.1)	83.1 (7.6)	508.8 (91.6)	541.5 (270.0)
caja nido	102.7 (73.4)	33.0 (34.8) **	216.7 (58.3) *	565.1 (115.8)	40.0 (20.7) **

Datos expresados en segundos como medianas (RSIQ). * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ vs caja nueva, prueba U de Mann Whitney. ^a analizadas a partir de las latencias de eyaculación de los 9 machos que eyacularon en caja nueva vs. los 7 que eyacularon en caja nido.

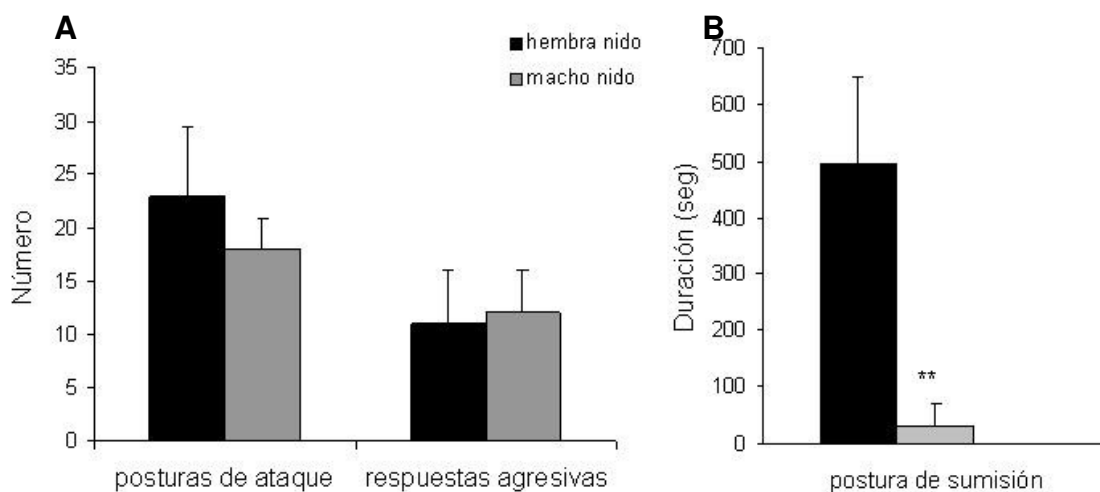


Figura 18. Número de posturas de ataque y respuestas agresivas (suma de ataques, mordeduras, posturas laterales y postura *on top*) realizadas por las madres (Panel A) y duración de las posturas de sumisión exhibidas por los intrusos (Panel B) en la interacción de hembras en estro posparto enfrentadas a una hembra (barras negras) y a un macho (barras grises) intruso en la caja nido. Datos expresados como medianas (RSIQ). ** $p < 0.01$, Prueba U de Mann-Whitney.

Control de supervivencia de la primera camada y de la concepción y nacimiento de la segunda

A pesar de que las hembras en estro posparto exhibieron comportamiento sexual y agresión maternal de forma conjunta durante la prueba, la co-expresión de ambos comportamientos podría comprometer el bienestar de las crías presentes en el momento de la interacción madre-macho (primera camada), así como el desarrollo exitoso de una segunda preñez y parto (segunda camada).

Por este motivo, sometimos a un grupo de madres ($n=8$) a convivencia con un macho intruso en la caja materna durante toda la noche del estro posparto y determinamos la supervivencia y el bienestar de la primera camada al día siguiente, así como el desarrollo de una segunda gestación y parto.

Ninguna de las primeras camadas (igualadas a 8 crías 1 h luego de parto) presentó una reducción del número de crías al día siguiente de la exposición a un macho intruso en la noche del estro posparto. A su vez, todas las madres desarrollaron una segunda gestación y siete de ocho un parto exitoso de una segunda camada (n° de crías primer del parto (10.0 ± 1.0) vs. segundo parto (9.1 ± 1.1) $t=0.6$, $p=NS$, prueba t para muestras dependientes).

Conclusiones y discusión

El presente experimento muestra que las hembras tienen la potencialidad de expresar comportamiento sexual y agresión maternal simultáneamente. Así, un macho en el contexto del nido materno, se vuelve un estímulo ambivalente para las hembras durante el estro posparto.

La expresión de dos comportamientos antagónicos -sexual y agresivo- hacia un mismo individuo en estrecha relación temporal, contrasta con la idea de que la expresión de un comportamiento motivado requiere la inhibición de motivaciones competitivas (Afonso et al., 2008; Dellu-Hagedorn, 2006; Numan, 2006; Numan & Stolzenberg, 2009). Este concepto implícitamente aceptado en la comunidad científica, proviene, en parte, de la existencia de circuitos motivacionales comunes en prácticamente todos los comportamientos motivados (Newman, 1999; Numan, 2006; Numan & Stolzenberg, 2009, *vide infra*), y del axioma que plantea que el comportamiento consiste en una secuencia de componentes que debe ser consumada para que sea posible cambiar de patrón comportamental (Afonso et al., 2008; Agmo et al., 1999; Pfaus et al., 2001; Mattson et al., 2001).

Esta visión del comportamiento como una secuencia relativamente fija de patrones, que surge como resultado de una motivación predominante, proviene en gran medida, del abordaje empleado para el estudio del comportamiento en el laboratorio. Así, el hecho de evaluar la respuesta de un individuo frente a un

único estímulo en un contexto estable, reduce el número de variables que la afectan, facilitando la disección de mecanismos de control. Sin embargo, es erróneo asumir que los individuos se comportan de igual forma en un ambiente complejo, donde se enfrentan a múltiples estímulos con significado biológico, que en uno artificialmente más simple. Por el contrario, la capacidad de los animales de adaptarse a distintos contextos, quizás radique en la flexibilidad de la aproximación y ejecución de comportamientos en presencia de más de un estímulo con valor de incentivo. En este sentido, en el presente trabajo, la expresión conjunta del comportamiento sexual y la agresión maternal, no afectó la protección de las crías de una primera camada, ni la concepción de una segunda.

A su vez, estudios en grupos sociales complejos en ambientes semi-naturales muestran que el comportamiento sexual de la rata es promiscuo y que la misma busca de forma activa a los machos, copulando con múltiples individuos durante el proestro tardío y que no es necesario finalizar una secuencia sexual con un macho para reiniciar otra con un segundo individuo (McClintock & Anisko, 1982).

Cabe resaltar, que la co-expresión de más de una motivación fue de hecho concebida por Tinbergen, ya en 1951, quien definió a los *comportamientos ambivalentes*, como patrones comportamentales que incluyen componentes motores de dos sistemas diferentes y que ocurren de forma simultánea o en sucesión rápida, como consecuencia de motivaciones opuestas subyacentes. En este sentido, las transiciones rápidas entre componentes sexuales y agresivos observados durante el estro posparto, indican que las hembras sexualmente activas y maternales se comportan de forma ambivalente hacia el macho intruso en la caja materna. El concepto de comportamiento ambivalente, sin embargo, entró en desuso, tal vez porque estas conductas fueron consideradas bizarras o como la expresión de un conflicto que eventualmente debía ser resuelto (Culter & Dixon, 1988; Hinde, 1970; Molewijk et al., 1995). El hecho de que conceptualmente los comportamientos sexual y agresivo sean concebidos como opuestos, no implica que su expresión conjunta represente un conflicto para las madres. Sería interesante evaluar si la administración de fármacos ansiolíticos a hembras en estro posparto modifica su respuesta hacia un macho intruso en la caja materna.

Los escasos estudios en los cuales se aborda el estro posparto, sistemáticamente evitan estudiar simultáneamente el comportamiento sexual y la agresión maternal. De manera interesante, Gilbert y colaboradores (1980, 1984) trabajando en un ambiente grande y complejo con hembras en estro posparto, concluyen que los comportamientos sexual y maternal son incompatibles porque las madres se alejan del nido para copular con el macho. Sin embargo, los autores reportan que las hembras realizan visitas al nido, principalmente en los intervalos inter-eyaculatorios, pero también dentro de una misma serie. En este sentido, en nuestro trabajo las madres visitaron numerosas veces el nido durante la interacción sexual/agresiva, llegando a copular dentro del mismo. En conjunto, estos resultados indican que las hembras reducen las actividades de cuidado de las crías, pero no las anulan, mientras interactúan de forma sexual y/o agresiva con el macho durante el estro posparto.

El comportamiento de las hembras sexualmente activas y maternas en presencia de un macho y de las crías no depende únicamente de las motivaciones subyacentes, sino que es fuertemente modulado por el contexto. En este sentido, las madres solicitan la monta y atacan al macho, cuando éste es introducido en el nido (resultados presentes), lo cortejan sin agredirlo, si tienen la posibilidad de desplazarse a copular lejos de las crías (Gilbert et al., 1980, 1984) o lo ignoran, en el modelo de preferencia macho vs. crías, donde no tienen acceso a ambos estímulos (Agrati et al., 2008b). Así, el valor de incentivo sexual y/o agresivo que una hembra en estro posparto le atribuye al macho depende de la cría y del contexto en el cual ésta se encuentre. Si el macho convive con la hembra en la caja materna previo al parto, no se observa agresión maternal (Uriarte, observaciones no publicadas) y se produce la cópula en el estro posparto originando la superposición de dos camadas (Uriarte et al, 2008).

Los presentes resultados (capítulo II y III) junto con estudios previos (Connors & Davis, 1980a; Gilbert et al., 1980, 1984), muestran que durante el estro posparto las hembras despliegan comportamientos proceptivos y receptividad sexual en diferentes ambientes (arena sexual, caja nido o ambiente semi-natural) de forma similar a los exhibidos por hembras ciclantes en proestro. Sin embargo, algunas diferencias se observan en la interacción sexual durante el

estro posparto en distintos ambientes y respecto a hembras ciclantes. Estas diferencias parecerían asociarse, a la exhibición de agresión ofensiva por parte de las madres (Connors & Davis, 1980a, presente capítulo), así como a cambios en el comportamiento sexual del macho (Gilbert et al., 1980, capítulos II y III), más que a variaciones en la motivación sexual de las hembras. Curiosamente, la agresión maternal característica de la lactancia, ha sido escasamente estudiada durante el estro posparto. Sin embargo, un estudio de Mayer y Rosenblatt (1987) reporta respuestas agonísticas de las madres en la fase de luz del día del parto, pero no durante la noche. Esta discrepancia con nuestros resultados podría deberse a diferencias de cepa, alojamiento o condiciones de la prueba.

Cabe destacar que el ataque del macho intruso durante la cópula en la caja materna de las hembras en estro posparto reflejó agresión maternal, de defensa de las crías y/o del nido, más que agresión defensiva asociada a un posible rechazo de las respuestas sexuales del macho. Así, las hembras atacaron a los intrusos previamente a que éstos realizaran intentos de monta y exhibieron una alta proceptividad y receptividad sexual, sin comportamientos de rechazo. A su vez, las respuestas agresivas de las madres fueron muchas veces seguidas o antecedidas por conductas de solicitud sexual de la hembra y no de una monta o intento de monta por parte del macho.

En contraste con las hembras, las respuestas de los machos enfrentados a ratas que los cortejaron y atacaron de forma conjunta difirieron de las observadas frente al despliegue de uno solo de estos comportamientos. Así, la baja respuesta de sumisión de los machos ante madres sexualmente activas en el nido, probablemente refleje la interacción sexual entre ambos, mientras que la mayor latencia de monta en comparación a los machos interactuando en caja nueva, posiblemente se deba al ataque de las madres. A su vez, la reducción del número de montas e intromisiones pre-eyaculatorias de estos machos, podría deberse a un efecto ansiogénico *per se* de la agresión maternal sobre los mismos. En este sentido, la administración de fármacos ansiogénicos o el acceso limitado a la hembra durante la cópula (intervalo inter-intromisión forzado) reducen el número de intromisiones pre-eyaculatorias (Fernández-Guasti et al., 1990, 1991).

Por otra parte, a través de la agresión maternal, las hembras pueden estar controlando la cópula⁷, y de esta forma imponiendo el largo de los intervalos inter-intromisión. Se sabe que la prolongación de estos intervalos disminuye el número de intromisiones necesarias para alcanzar la eyaculación (Larsson, 1959). Independientemente de las respuestas ofensivas de las hembras, no se modificó ni el número de machos eyaculadores ni la latencia de eyaculación de los mismos en el grupo de machos en caja nido vs. caja nueva.

La dificultad para conciliar la expresión conjunta del comportamiento sexual y de la agresión maternal surge, en parte, del hecho de que ambas conductas comparten circuitos neuronales comunes para el control de su expresión. En este sentido, tanto el comportamiento sexual (Corial-Avira & Pfaus, 2007; Kato & Sakuma, 2000; Pfaus et al., 1995) como la agresión maternal son comportamientos motivados (Ferris et al., 2008; Meisel & Joppa, 1994; Pereira, 2005). En particular, la agresión maternal está influida por la motivación maternal (Pereira, 2005). El circuito motivacional mesolímbico (proyecciones dopaminérgicas del área tegmental ventral principalmente al núcleo accumbens) ha sido implicado tanto en el control de la motivación sexual como de la maternal (Becker et al., 2001; Hansen et al., 1993; Hull et al., 1986; Numan & Insel, 2003; Numan & Stolzenberg, 2009; Pereira & Ferreira, 2006; Pfaus et al., 1995).

Sobre la base de esta superposición de áreas neuronales en el control de comportamientos sociales motivados, se ha propuesto que su expresión está regulada por circuitos motivacionales comunes, activados, a su vez, por áreas específicas para cada comportamiento (Numan, 2006).

⁷ En las condiciones habituales de laboratorio, como las presentes, la capacidad de la hembra de controlar la estimulación copulatoria recibida, frecuencia de las montas e intromisiones, es reducida por las restricciones espaciales. En ambientes semi-naturales (McClintock & Anisko, 1982) o en condiciones en las cuales el macho está confinado a un espacio del cual la hembra puede entrar y salir libremente (Erskine et al., 1989), la hembra regula los tiempos a los cuales recibe estimulación copulatoria. Bajo estas condiciones, los intervalos inter-eyaculatorios son más prolongados (Erskine et al., 1989) y la cópula es altamente reforzadora para las hembras (Paredes & Alonso, 1997) en comparación a cópulas no-controladas.

De manera importante, esta teoría propone que la activación de esas áreas supone a su vez la inhibición de regiones asociadas a la expresión de motivaciones competitivas (Numan, 2006). La expresión conjunta del comportamiento sexual y la agresión maternal durante el estro posparto, refuta la idea que plantea la necesidad de mecanismos inhibitorios de motivaciones competitivas para la expresión óptima de un determinado comportamiento (Dellu-Hagedorn, 2006; Numan, 2006).

El sistema dopaminérgico mesolímbico recibe proyecciones del APOM del hipotálamo (Numan et al. 2005a, b), área fuertemente implicada en el control de la motivación y ejecución del comportamiento sexual femenino (Corial-Avira & Pfaus, 2007; Hoshina et al., 1994; Sakuma, 2008), del comportamiento maternal (Miller & Lonstein, 2005; Numan & Insel, 2003; Lonstein & Morell, 2007) y de la agresión (Lonstein & Gammie, 2002). Curiosamente, se ha propuesto que son los estrógenos, actuando en el APOM, los que facilitan la expresión tanto del comportamiento proceptivo (ver revisión Sakuma, 2008) como del comportamiento maternal (ver revisión Numan & Insel, 2003) en la rata. A su vez, la amígdala medial, núcleos de la estria terminal, septum lateral, núcleo ventro-medial del hipotálamo, área gris periacueductal del cerebro medio (PAG), entre otras, han sido asociadas a la regulación del comportamiento sexual y de la agresión maternal (De Almeida & Lucion, 1997; Ferris et al., 2008; Hasen & Gammie, 2006; Newman, 1999; Lonstein & Gammie 2002; Pffaus & Hebb, 1997; Veening et al., 2005). Dada la fuerte interconexión entre estas áreas, Newman (1999) plantea que el comportamiento expresado (sexual, agresivo o maternal) es una propiedad emergente del patrón de actividad del conjunto de todas estas áreas. Así, diferentes combinaciones de factores endocrinos y contextuales, así como la presencia de determinados estímulos generarían patrones de actividad de este conjunto de regiones similares pero distinguibles, resultando en la expresión de un comportamiento. Este modelo teórico admite la co-expresión de diferentes motivaciones sociales, como es el presente caso.

Por otra parte, la alternancia entre componentes sexuales y agresivos puede estar relacionada a la actividad de áreas de integración sensoriomotora y selección de un determinado patrón conductual, como la corteza prefrontal medial (Dalley et al., 2004) o el PAG. En este sentido, la lesión preparto del PAG caudal disminuye la expresión de conductas proceptivas y receptivas durante el estro posparto y aumenta la agresión maternal (Lonstein et al., 1998; Lonstein & Stern, 1998). Para comenzar a elucidar los mecanismos que subyacen la co-expresión de comportamientos motivados sería interesante determinar la activación del circuito neuronal implicado en el control de la motivación sexual y maternal durante la expresión conjunta de ambas conductas.

La complejidad en la expresión de comportamientos sociales afiliativos en la rata, observada en el presente trabajo, enfatiza la idea de que el comportamiento de un individuo es más que la suma de un conjunto de patrones específicos. Este trabajo, a su vez, destaca la potencialidad del estro posparto como modelo para comprender la expresión comportamental de múltiples motivaciones.

Los experimentos que se describieron en el presente capítulo dieron lugar al siguiente manuscrito en preparación: **Agrati D**, Fernández-Guasti A, Ferreira A. The postpartum estrus rat councils two opposite motivations: sex and maternal aggression.

Materiales y métodos detallados del capítulo III

Expresión de dos motivaciones antagónicas durante el estro posparto: comportamiento sexual y agresión maternal hacia un macho intruso.

Procedimiento general

El día 20 de gestación las hembras preñadas fueron alojadas en jaulas individuales de 32 x 42 x 19 cm. Comenzando el día 22, la presencia de crías fue controlada cada hora durante el período de luz del ciclo luz-oscuridad y 2 hs luego de ser detectadas, la camada se igualó a 8 crías (4 hembras y 4 machos). Las ratas que parieron luego de las 1200 hs (-5 h del inicio de la fase de oscuridad) fueron descartadas sobre la base de que el estro posparto puede retrasarse al día siguiente (Connor & Davis, 1980a,b). Once horas luego del inicio del parto, las madres fueron trasladadas al cuarto experimental para un período de habituación de media hora. Todas las hembras fueron probadas a las 12 hs posparto para asegurar su máxima actividad sexual (Connor & Davis, 1980a; Gilbert et al., 1980, 1984, datos de la presente tesis). Los siguientes grupos de hembras fueron probados:

Macho en caja nido (n=9): introdujimos un macho sexualmente activo en la esquina opuesta al nido de la caja materna de hembras en estro posparto y durante 15 min registramos el comportamiento sexual y el comportamiento y la agresión maternales de las mismas.

Macho en caja nueva (expresión de comportamiento sexual con incentivo agresivo del macho reducido, n=9): hembras en estro posparto fueron enfrentadas a un macho sexualmente activo en una nueva caja sin crías, 2.5 hs luego de la separación madre-crías, con el fin de reducir la agresión maternal (Ferreira & Hansen, 1986). Estas hembras fueron transferidas a una caja nueva sin crías 9.5 hs luego del inicio del parto y permanecieron en esta caja los 30 min de habituación al cuarto experimental. Luego, fueron colocadas en una caja nueva y 5 min después se introdujo un macho sexualmente activo y se registró la interacción entre ambos durante 15 min.

Hembra en caja nido (expresión de agresión maternal con incentivo sexual del intruso reducido, n=9): hembras en estro posparto fueron enfrentadas a una hembra primípara en proestro en la caja materna y se registró el comportamiento de la madre y de la intrusa durante 15 min. Para aproximar las características de valor aversivo de la hembra intrusa a las del macho, empleamos hembras primíparas, ya que poseen un tamaño corporal mayor al de las ratas vírgenes. Adicionalmente, estas hembras fueron empleadas en la fase de proestro tardío del ciclo estral, sobre la base de que las hembras lactantes atacan con mayor intensidad a hembras sexualmente activas que a las que no lo son (Zuluaga et al., en preparación).

Los machos sexualmente activos fueron entrenados con hembras sexualmente activas mediante tratamiento hormonal (benzoato de estradiol 8.0 ug/rata -24 h y progesterona 2.0 mg/rata -5hs, sc). Los machos seleccionados como estímulo sexual presentaron latencias de eyaculación menores a 15 min por lo menos en las últimas cuatro sesiones de entrenamiento y fueron utilizados al menos cuatro días luego del último enterramiento.

Medidas comportamentales: sexuales, agresivas y maternales

Las pruebas fueron grabadas en video cassette y analizadas posteriormente con el software libre de registro comportamental EthoLog 2.2 (Otoni, 2000).

Se registraron las mismas respuestas sexuales de las hembras y los machos descritas en la Sección Abordaje Experimental del Capítulo II con la diferencia de que dos tipos de comportamientos proceptivos fueron determinados: *hops & darts* y solicitudes (la hembra enfrenta al macho y luego voltea y se aleja corriendo en sentido contrario, incitando al macho a seguirla, McClintock & Anisko, 1982). Ambos despliegues comportamentales de la hembra regulan la interacción sexual con el macho (Pfaus et al., 1999).

Basados en estudios previos (Ferreira et al., 2002; Mayer et al., 1990a,b) el número de los siguientes componentes agresivos fue registrado: posturas de ataque (la hembra enfrenta inmóvil al intruso, a veces vocalizando, con la cabeza cerca y orientada al mismo), ataques (la hembra se lanza repentinamente hacia el intruso, usualmente con la boca abierta), mordeduras (generalmente seguidas por un movimiento rápido y repentino del intruso y

vocalización del mismo), postura lateral (la hembra se aproxima al intruso de costado, usualmente empujándolo con la cadera), patadas (en dirección del intruso con los miembros posteriores, frecuentemente asociadas a la postura lateral) y posturas sobre el intruso, postura *on top* (la hembra se posiciona sobre el intruso, el cual queda acostado sobre su dorso). Adicionalmente, medimos la duración total de las posturas de sumisión de los intrusos (apoyado sobre los miembros posteriores con los miembros delanteros elevados en el aire). La latencia a la primera respuesta agresiva de la madre, así como la primera postura de sumisión del intruso fueron registradas.

Las actividades de cuidado materno en las madres probadas en la caja nido registradas fueron las siguientes: número de acarreos, re-arreglos, lamidos de las crías y construcción de nido, así como el número de visitas y tiempo de permanencia en el nido.

Para explorar la relación temporal en la expresión de los comportamientos sexual, agresivo y maternal determinamos el número de transiciones comportamentales, en menos de 5 seg, entre los componentes de los tres comportamientos.

Análisis de los datos

Debido a que la mayoría de las variables registradas no mostraron distribución normal, los datos se expresan como medianas (RSIQ) y fueron analizadas mediante pruebas no-paramétricas (Siegel & Castellan, 1988).

Conclusiones

A partir de los experimentos realizados en la presente tesis concluimos:

- Que la maternidad *per se* modifica la forma en la cual las hembras confrontan estímulos aversivos, independientemente de la respuesta endócrina de estrés frente a los mismos.
- Que el valor de incentivo relativo de un macho adulto es menor que el de las crías para hembras sexualmente activas y maternas únicamente en el contexto endócrino del parto, y que en este estado reproductivo particular, la experiencia maternal previa aumenta el valor de incentivo de las crías.
- Que el macho en el contexto de la caja materna, adquiere valor atractivo-sexual y aversivo-agresivo simultáneamente para las hembras en estro posparto, generando tanto solicitud sexual como agresión maternal por parte de las mismas.

En resumen, la maternidad cambia la forma en la cual las hembras responden a estímulos aversivos y atractivos del medio y este cambio parece asociarse al valor de incentivo que poseen las crías para las madres. Así, la disminución de las respuestas de temor en la prueba de inmovilidad sólo se observan en presencia de las crías (Hard & Hansen, 1985), mientras que el valor de un macho durante el estro posparto varía de neutro a aversivo-atractivo de acuerdo a la presencia o no de las crías (presentes resultados).

Los factores endócrinos y contextuales modulan la respuesta de las madres frente a estímulos de medio, en parte, a través de aumentar el valor de incentivo que las crías poseen. En este sentido, la mayoría de las hembras posparturientas, a diferencia de las ciclatas maternas, ignoran al macho en el modelo de preferencia cuando las crías están presentes (resultados de la tesis), exhiben menos ansiedad en el laberinto elevado en cruz y en un campo abierto en presencia de las crías (Pereira et al., 2005; Stern & Mackinnon, 1976) y se condicionan a un ambiente previamente asociado con las mismas (Fleming et al., 1994). No obstante, un tratamiento hormonal que simula el

periparto, reduce la ansiedad en un campo abierto y aumenta la exploración de olores de las crías (Fleming & Luebcke, 1981), sugiriendo un papel del perfil del periparto *per se* en los cambios afectivos de la lactancia. Por otra parte, el valor aversivo-agresivo del macho es dependiente de la presencia del nido y de un contacto reciente con las crías (Ferreira & Hansen, 1986; Mayer et al., 1990a, b) y es modulado por la motivación maternal (Pereira, 2005). Durante el estro posparto, el macho posee un valor atractivo-sexual en una arena nueva y un valor atractivo-sexual y aversivo-agresivo en la caja materna en presencia de las crías (resultados presentes).

Si bien la maternidad modifica la respuesta de las hembras ante estímulos del medio, no las vuelve “ciegas” a otros estímulos, ignorantes a otras motivaciones. Al contrario, las madres poseen la potencialidad de expresar múltiples motivaciones y los presentes resultados ratifican la idea de que el comportamiento de los individuos se adecua a las diferentes situaciones en función de las motivaciones y estados emocionales subyacentes, así como de las características de los estímulos.

Finalmente, la disociación de la respuesta comportamental y endocrina frente a un mismo estímulo aversivo exhibida por las hembras vírgenes maternas, junto con la co-expresión de solicitud sexual y agresión maternal hacia el macho de las madres en estro posparto, indican una representación y un procesamiento múltiple de un mismo estímulo en el SNC que conduce a diferentes salidas. En este sentido, los componentes afectivos y de incentivo de un estímulo se encuentran representados de forma independiente en diversas regiones corticales y subcorticales como la corteza orbitofrontal y cingulada, la amígdala y el núcleo accumbens (Berridges et al., 2009; Cardinal et al., 2002). Estudios recientes apuntan a que diferentes regiones y circuitos operarían en paralelo más que en serie para mediar procesos emocionales y motivacionales (Balleine & Killcross, 2006; Berridges et al., 2009; Furtak et al., 2007; Peyk et al., 2009). En concordancia con nuestra visión del comportamiento, el hecho de que regiones o circuitos discretos procesen en paralelo información similar de forma diferencial, aumenta la información que poseen disponibles los sistemas para tomar una decisión, incrementando la flexibilidad comportamental en condiciones ambientales cambiantes.

Perspectivas

Esta tesis constituye una primera etapa en la caracterización del estro posparto de la rata como modelo para el estudio de los factores biológicos y contextuales que regulan el comportamiento de los individuos en situaciones donde más de una motivación social esté presente.

Sobre esta base nos planteamos las siguientes líneas de trabajo:

1. Caracterización de la motivación sexual y maternal de forma independiente durante el estro posparto:

- Evaluaremos el valor de incentivo sexual de un macho durante el estro posparto en comparación al proestro tardío en ausencia de las crías. Asimismo, determinaremos el valor de las hembras en estro posparto vs proestro tardío para un macho sexualmente activo, ya que variaciones en la atractividad de las hembras pueden modificar el comportamiento sexual del macho.
- Compararemos el valor de incentivo que poseen las crías para madres en estro posparto, así como la intensidad de la agresión maternal que expresan, con la exhibida por hembras lactantes no-sexualmente activas.

2. Caracterización de la co-expresión del comportamiento sexual y de la agresión maternal durante el estro posparto:

- Determinaremos el efecto de factores internos –estado reproductivo y experiencia previa- y características de los estímulos que modulan la motivación sexual y maternal en la respuesta de las hembras sexualmente activas y maternas frente a un macho intruso en el nido.
- Evaluaremos si el estimular la expresión del comportamiento maternal (separando a la madre de las –crías y re-introducirlas en la caja materna) afecta el comportamiento de las madres en estro posparto hacia un macho intruso.

3. Aproximación a las bases neuronales de la co-expresión del comportamiento sexual y la agresión maternal durante el estro posparto:

- Identificaremos y compararemos el grado de activación de las áreas neuronales implicadas en el control de ambas conductas (por expresión de la proteína c-Fos).
- Determinaremos el efecto de fármacos ansiolíticos (en dosis que no afecten la ejecución del comportamiento sexual ni la agresión maternal) en la co-expresión de ambas conductas.

Parte de las perspectivas planteadas están siendo realizadas actualmente en el marco de un proyecto FCE de Jóvenes Investigadores, del cual soy responsable, y de una pasantía de grado de la Licenciatura en Ciencias Biológicas.

Referencias bibliográficas

Afonso VM, Sison M, Lovic V, Fleming AS (2007). Medial prefrontal cortex lesions in the female rat affect sexual and maternal behavior and their sequential organization. *Behav Neurosci*. 121(3):515-26.

Agmo A (1999). Sexual motivation-an inquiry into events determining the occurrence of sexual behavior. *Behav Brain Res* 105(1):129-50.

Agrati D, Fernández-Guasti A, Ferreira A (2008 b).The reproductive stage and experience of sexually receptive mothers alter their preference for pups or males. *Behav Neurosci* 122:998-1004.

Agrati D, Zuluaga MJ, Fernández-Guasti A, Meikle A, Ferreira A (2008a). Maternal condition reduces fear behaviors but not the endocrine response to an emotional threat in virgin female rats. *Hormon Behav* 53:232-240.

Asdell S (1964). Patterns of mammalian reproduction. Cornell University Press, Ithaca.

Balleine BW, Killcross S (2006). Parallel incentive processing: an integrated view of amygdala function. *Trends Neurosci* 29:272-279.

Beach F (1976). Sexual attractiveness, proceptivity and receptivity in the female mammals. *Horm Behav* 7:105-138.

Becker JB, Rudick CN, Jenkins WJ (2001). The role of dopamine in the nucleus accumbens and striatum during sexual behavior in the female rat. *J Neurosci* 21(9):3236-41.

Bereiter DA, Barker DJ (1975). Facial receptive fields of trigeminal neurons: Increased size following estrogen treatment in female rats. *Neuroendocrinology* 18: 115-124.

Bermant G, Westbrook WH (1988). Peripheral factors in the regulation of sexual contact by female rats. *Journal of Comparative Physiology and Psychology* 61: 244-250.

Berridge KC (2004). Motivation concepts in behavioral neuroscience. *Physiol Behav* 81(2):179-209.

Berridge KC (2009). Motivation concepts in behavioral neuroscience. *Physiol Behav* 81:179-209.

Berridge KC, Robinson TE (2003). Parsing reward. *Trends Neurosci* 26(9):507-513.

Bindra D (1972). Neuropsychological interpretation of the effect of drive and incentive-motivation on general and instrumental behavior. *Psychol Rev* 75: 1-22.

Bitran D, Hilvers RJ, Kellogg CK (1991). Ovarian endocrine status modulates the anxiolytic potency of diazepam and the efficacy of aminobutyric acid-benzodiazepine receptor-mediated chloride ion transport. *Behav Neurosci* 105: 653-662.

Bridges RS (1975.) Long-term effects of pregnancy and parturition upon maternal responsiveness in the rat. *Physiol Behav* 14: 245-249.

Bridges R S (1977). Parturition: its role in the long-term retention of maternal behavior in the rat. *Physiol Behav* 18: 487-490.

Bridges RS (1984). A quantitative analysis of the roles of dosage, sequence and duration of estradiol and progesterone exposure in the regulation of maternal behavior in the rat. *Endocrinology* 114: 930-940.

Bridges RS, Robertson MC, Shiu RP, Sturgis JD, Henriquez BM, Mann PE (1997). Central lactogenic regulation of maternal behavior in rats: steroid dependence, hormone specificity,

and behavioral potencies of rat prolactin and rat placental lactogen I. *Endocrinology* 138: 756-763.

Burgdorf J, Kroes RA, Moskal JR, Pfaus JG, Brudzynski SM, Panksepp J (2008). Ultrasonic vocalizations of rats (*Rattus norvegicus*) during mating, play, and aggression: Behavioral concomitants, relationship to reward, and self-administration of playback. *J Comp Psychol.* 122(4):357-367.

Cabanac M, Cabanac AJ, Parent A (2009). The emergence of consciousness in phylogeny. *Behav Brain Res* 198(2):267-272.

Cardinal RN, Parkinson JA, Hall J, Everitt BJ (2002). Emotion and motivation: the role of the amygdala, ventral striatum, and prefrontal cortex. *Neurosci Biobehav Rev* 26(3):321-352.

Clark JT, Kalra SP, Kalra PS (1987). Effects of a selective alpha 1-adrenoceptor agonist, methoxamine, on sexual behavior and penile reflexes. *Physiol Behav* 40(6):747-53.

Connor JR, Davis HR (1980a). Postpartum estrus in Norway rats. I. Behavior. *Biology of Reproduction* 23: 994-999.

Connor JR, Davis HN (1980b). Postpartum estrus in Norway rats. II. Physiology. *Biology of Reproduction* 23: 1000-1006.

Coria-Avila GA, Pfaus JG (2007). Neuronal activation by stimuli that predict sexual reward in female rats. *Neuroscience* 148(3):623-632.

Cosnier J, Couturier C (1966). Comportement maternal provoqué chez les rattes adultes castrées. *C R Seances Soc Biol Ses Fil* 160, 789-791.

Cutler MG, Dixon AK (1988). Effects of ipsapirone on the behaviour of mice during social encounters *Neuropharmacology* 27(10):1039-1044.

da Costa AP, Kampa RJ, Windle RJ, Ingram CD, Lightman SL (1997). Region-specific immediate-early gene expression following the administration of corticotropin-releasing hormone in virgin and lactating rats. *Brain Res* 770: 151-162.

da Costa AP, Wood S, Ingram CD, Lightman SL. (1996). Region-specific reduction in stress-induced c-fos mRNA expression during pregnancy and lactation. *Brain Res* 742: 177-184.

De Almeida RM, Lucion AB (1997). 8-OH-DPAT in the median raphe, dorsal periaqueductal gray and corticomedial amygdala nucleus decreases, but in the medial septal area it can increase maternal aggressive behavior in rats. *Psychopharmacol* 134(4):392-400.

Dalley JW, Cardinal RN, Robbins TW (2004). Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. *Neurosci Biobehav Rev* 28(7):771-784.

Dellu-Hagedorn F (2006). Relationship between impulsivity, hyperactivity and working memory: a differential analysis in the rat. *Behav Brain Funct* 28: 2-10.

Deschamps S, Woodside B, Walker CD (2003). Pups presence eliminates the stress hyporesponsiveness of early lactating females to a psychological stress representing a threat to the pups. *J Neuroendocrinol* 15: 486- 497.

Doerr HK, Siegel HI, Rosenblatt JS (1981). Effects of progesterone withdrawal and estrogen on maternal behavior in nulliparous rats. *Behav Neural Biol* 32: 35-44.

Edwards DA, Pfeifle JK (1983). Hormonal control of receptivity, proceptivity and sexual motivation. *Physiol Behav* 30: 437-443.

Erskine MS, Barfield RJ, Goldman BD (1978). Intraspecific fighting during late pregnancy and lactation in rats and effects of litter removal. *Behav Biol* 23: 206-213.

- Erskine MS, Barfield RJ, Goldman BD (1980). Postpartum aggression in rats: II. Dependence on maternal sensitivity to young and effects of experience with pregnancy and parturition. *J Comp Physiol Psychol* 94: 495-505.
- Erskine M, Kornberg E, Cherry J (1989). Paced copulation in rats: effects of intromission frequency and duration on luteal activation and estrus length. *Physiol Behav* 45: 33-39.
- Fahlke C, Eriksson CJ, Hard E (1993). Audiogenic immobility reaction and open-field behavior in AA and ANA rat lines. *Alcohol* 10: 311-315.
- Fahrbach SE, Pfaff DW (1982). Hormonal and neural mechanisms underlying maternal behavior in the rat. In DW Pfaff, editor. *The physiological mechanisms of motivation* (pp.253-285). New York: Springer-Verlag
- Fahrbach SE, Pfaff DW (1986). Effect of preoptic region implants of dilute estradiol on the maternal behavior of ovariectomized, nulliparous rats. *Horm Behav* 20: 354-63.
- Featherstone RE, Fleming AS, Ivy GO (2000). Plasticity in the maternal circuit: effects of experience and partum condition on brain astrocyte number in female rats. *Behav Neurosci* 114(1):158-172.
- Fernández-Guasti A, Larsson K, Beyer C (1986). GABAergic control of masculine sexual behavior. *Pharmacol Biochem Behav* 24: 1065-1070.
- Fernández-Guasti A, Roldán-Roldán G, Larsson K (1991). Anxiolytics reverse the acceleration of ejaculation resulting from enforced intercopulatory intervals in rats. *Behav Neurosci* 105(2):230-40.
- Fernández-Guasti A, Roldan-Roldan G, Saldivar A (1990). Pharmacological manipulation of anxiety and male rat sexual behavior. *Pharmacol Biochem Behav* 35: 263-267.
- Ferreira A, Dahlöf LS, Hansen S (1987). Olfactory mechanisms in the control of maternal aggression, appetite, and fearfulness: effects of lesions to olfactory receptors, mediodorsal thalamic nucleus, and insular prefrontal cortex. *Behav Neurosci* 101: 709-717.
- Ferreira A, Hansen S (1986). Sensory control of maternal aggression en *Rattus norvegicus*. *J Comp Psychol* 2: 173-177.
- Ferreira A, Hansen S, Nielsen M, Archer T, Minor BG (1989). Behavior of mother rats in conflict tests sensitive to antianxiety agents. *Behav Neurosci* 103: 193-201.
- Ferreira A, Pereira M, Agrati D, Uriarte N, Fernández-Guasti A (2002) Role of maternal behavior on aggression, fear and anxiety. *Physiol Behav* 77: 197-204.
- Ferris CF, Stolberg T, Kulkarni P, Murugavel M, Blanchard R, Blanchard DC, Febo M, Brevard M, Simon NG (2008). Imaging the neural circuitry and chemical control of aggressive motivation. *BMC Neurosci* 13:9-111.
- File S, Zangrossi H, Sanders FL, Mabbutt PS (1993). Dissociation between behavioral and corticosterone responses on repeated exposures to cat odor. *Physiol Behav* 54:1109-1111.
- Flannelly KJ, Flannelly L (1987). The course of postpartum aggression in rats (*Rattus norvegicus*). *J Comp Psychol* 101: 101-103.
- Fleming AS, Cheung US, Myhal N, Kessler Z (1989). Effects of maternal hormones on timidity and attraction to pup-related odors in females. *Physiol Behav* 46: 449-453.
- Fleming AS, Korsmit M (1996). Plasticity in the maternal circuit: effects of maternal experience on Fos-Lir in hypothalamic, limbic, and cortical structures in the postpartum rat. *Behav Neurosci* 110(3):567-582.
- Fleming AS, Korsmit M, Deller M (1994). Rat pups are potent reinforcers to the maternal animal: effect of experience, parity, hormones, and dopamine function. *Psychobiology* 22: 44-53.

Fleming AS, Luebke C (1981). Timidity prevents the nulliparous female from being a good mother. *Physiol Behav* 27: 863-868.

Fleming AS, Rosenblatt J (1974). Maternal behavior in the virgin and lactating rat. *J Comp Physiol Psychol* 86: 957-972.

Fleming AS, Sarker J (1990). Experience-hormone interactions and maternal behavior in rats. *Physiol Behav* 47: 1165-1173.

Furtak SC, Wei SM, Agster KL, Burwell RD (2007). Functional neuroanatomy of the parahippocampal region in the rat: the perirhinal and postrhinal cortices. *Hippocampus* 17:709-722.

Gandelman R (1972). Mice: Postpartum aggression elicited by the presence of an intruder. *Horm Behav* 3: 23-28.

Gilbert AN, Pelchat R, Adler NT (1980). Postpartum copulatory and maternal behaviour in Norway rats under seminatural conditions. *Animal Behav* 28: 989-995.

Gilbert AN, Pelchat RJ, Adler NT (1984). Sexual and maternal behavior at the postpartum oestrus: the role of the experience in time-sharing. *Animal Behav* 32:1045-1053.

Hansen S, Bergvall AH, Nyiredi S (1993). Interaction with pups enhances dopamine release in the ventral striatum of maternal rats: a microdialysis study. *Pharmacol Biochem Behav* 45: 673-676.

Hardy DF, DeBold JF (1972). Effects of coital stimulation upon behavior of the female rat. *J Comp Physiol Psychol*, 78(3):400-408.

Hård E, Hansen S (1985). Reduced fear behavior in the lactating rat. *Physiol Behav* 33: 641-643.

Hård E, Engel J, Larsson K, Musi B (1985). Effect of diazepam, apomorphine and haloperidol on the audiogenic immobility reaction and on the open field behavior. *Psychopharmacol* 85: 106-110.

Hasen NS, Gammie SC (2006). Maternal aggression: new insights from Egr-1. *Brain Res* 1108(1):147-156.

Herman JP, Cullinan WE (1997). Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical Axis. *Trends Neurosci* 20: 78-84.

Hinde RA (1970). Behaviour on conflict situations. In: Hinde RA (ed) *Animal behaviour, a synthesis of ethology and comparative psychology*. McGraw-Hill, New York, pp 270-290.

Hoshina Y, Takeo T, Nakano K, Sato T, Sakuma Y (1994). Axon-sparing lesion of the preoptic area enhances receptivity and diminishes proceptivity among components of female rat sexual behavior. *Behav Brain Res* 61(2):197-204.

Hull EM, Bitran D, Pehek EA, Warner RK, Band LC, Holmes GM (1986). Dopaminergic control of male sex behavior in rats: effects of an intracerebrally-infused agonist. *Brain Res* 370(1): 73-81.

Jakubowski M, Terkel J (1980). Induction by young of prolonged dioestrus in virgin rats behaving maternally. *J Reprod Fertil* 58: 55-60.

Jakubowski M, Terkel J (1986). Nocturnal surges and reflexive release of prolactin in parentally behaving virgin female and male rats. *Horm Behav* 20: 270-286.

Kato A, Sakuma Y (2000). Neuronal activity in female rat preoptic area associated with sexually motivated behavior. *Brain Res* 862(1-2):90-102.

- Kinsley CH, Bridges RS (1990). Morphine treatment and reproductive condition alter olfactory preferences for pup and adult odors in female rats. *Dev Psychobiol* 23: 331-347.
- Kolonie JM, Stern JM (1990). Maternal aggression: disruption by perioral anesthesia in lactating Long-Evans rats (*Rattus norvegicus*). *J Comp Psychol* 104: 352-360.
- Kolonie JM, Stern JM (1995). Maternal aggression in rats: effects of olfactory bulbectomy, ZnSo₄-induced anosmia, and vomeronasal organ removal. *Horm Behav* 29: 492-518.
- Komisaruk BR, Rosenblatt JS, Barona ML, Chinapen S, Nissanov J, O'Bannon RT, Johnson B, Rodriguez Del Cerro MC (2000). Combined c-fos and 14C-2-deoxyglucose method to differentiate site-specific excitation from disinhibition: analysis of maternal behavior in the rat. *Brain Research* 859: 262-272.
- Kow LM, Montgomery MD, Pfaff DW (1979). Triggering of lordosis reflex in female rats with somatosensory stimulation: Quantitative determination of stimulus parameters. *J Neurophysiol* 42: 195-202.
- Krehbiel DA, LeRoy ML (1979). The quality of hormonally stimulated maternal behavior in ovariectomized rats. *Horm Behav* 12: 243-252.
- Larsson K (1959). The effect of restraint upon copulatory behaviour in the rat. *Animal Behav* 7:23-25.
- Lee A, Clancy S, Fleming AS (1999). Neuroanatomical basis of maternal memory in postpartum rats: selective role for the nucleus accumbens. *Behav Neurosci* 113(3):523-538.
- Lee A, Clancy S, Fleming AS (2000). Mother rats bar-press for pups: effects of lesions of the mpoa and limbic sites on maternal behavior and operant responding for pup-reinforcement. *Behav Brain Res* 108(2):215-231.
- Leuner B, Shors TJ (2006). Learning during motherhood: A resistance to stress. *Horm Behav* 50: 38-51.
- Lightman SL, Windle RJ, Wood SA, Kershaw YM, Shanks N, Ingram CD (2001). Peripartum plasticity within the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. In: JA Russel et al (Eds). *The maternal brain. Neurobiological and neuroendocrinal adaptations and disorders in pregnancy and post partum*. Progress in Brain Research, vol 133, Elsevier Science, Amsterdam, pp. 111-129.
- Lonstein JS (2005). Reduced anxiety in postpartum rats requires recent physical interactions with pups, but is independent of suckling and peripheral sources of hormones. *Horm Behav* 47(3): 241-55.
- Lonstein JS, Gammie SC (2002). Sensory, hormonal, and neural control of maternal aggression in laboratory rodents. *Neurosci Biobehav Rev* 26(8):869-888.
- Lonstein JS, Morrell JI (2007). Neuropharmacology and neuroendocrinology of maternal behavior and motivation. In: Behavioral neurobiology, handbook of neurochemistry and molecular biology, Vol. 18 (Blaustein JD, ed), pp 195-245. New York: Springer Press.
- Lonstein JS, Simmons DA, Stern JM (1998). Functions of the caudal periaqueductal gray in lactating rats: kyphosis, lordosis, maternal aggression and fearfulness. *Behav Neurosci* 112: 1502-1518.
- Lonstein JS, Stern JM (1998). Site and behavioral specificity of periaqueductal grey lesions on postpartum sexual, maternal, and aggressive behaviors in rats. *Brain Res* 804: 21-35.
- Lonstein JS, Wagner CK, De Vries GJ (1999). Comparison of the "nursing" and other parental behaviors of nulliparous and lactating female rats. *Horm Behav* 36: 242-251.
- Louilot A, Besson C (2000). Specificity of amygdalostratial interactions in the involvement of mesencephalic dopaminergic neurons in affective perception. *Neuroscience* 96(1):73-82.

Mann PE, Bridges RS (1992). Neural and endocrine sensitivities to opioids decline as a function of multiparity in the rat. *Brain Res* 580(1-2):241-8.

Matthews-Felton T, Corodimas KP, Rosenblatt JS, Morrell JI (1995). Lateral habenula neurons are necessary for the hormonal onset of maternal behavior and for the display of postpartum estrus in naturally parturient female rats. *Behav Neurosci* 109: 1172-1188.

Mattson BJ, Williams S, Rosenblatt JS, Morrell J. (2001). Comparison of two positive reinforcing stimuli: pups and cocaine throughout the postpartum period. *Behav Neurosci* 115: 683-694.

Mayer AD, Ahdieh HB, Rosenblatt J (1990a) Effects of prolonged estrogen-progesterone treatment and hypophysectomy on the stimulation of short-latency maternal behavior and aggression in female rats. *Horm Behav* 24: 152-173.

Mayer AD, Monroy MA, Rosenblatt J (1990b) Prolonged estrogen-progesterone treatment of nonpregnant ovariectomized rats: Factors stimulating home-cage and maternal aggression and short-latency maternal behavior. *Horm Behav* 24: 3342-3364.

Mayer AD, Rosenblatt J (1984). Prepartum changes in maternal responsiveness and nest defense in *Rattus norvegicus*. *J Comp Psychol* 98: 177-188.

Mayer AD, Reisbick S, Segel H, Rosenblatt J (1987). Maternal aggression in rats: changes over pregnancy and lactation in a Sprague-Dawley Strain. *Aggressive Behavior* 13: 29-43.

Mayer AD, Rosenblatt J (1987). Hormonal factors influence the onset of maternal aggression in laboratory rats. *Horm Behav* 21: 253-267.

McClintock M, Anisko, J (1982). Group mating among norway rats i. sex differences in the pattern and neuroendocrine consequences of copulation. *Animal behav* 30: 398-409.

McGregor A, Herbert J (1992). Differential effects of excitotoxic basolateral and corticomedial lesions of the amygdala on the behavioural and endocrine responses to either sexual or aggression-promoting stimuli in the male rat. *Brain Research* 74:9-20.

Meisel RL, Joppa MA (1994). Conditioned place preference in female hamsters following aggressive or sexual encounters. *Physiol Behav* 56(5):1115-1118.

Miller SM, Lonstein JS (2005). Dopamine d1 and d2 receptor antagonism in the preoptic area produces different effects on maternal behavior in lactating rats. *Behav Neurosci* 119: 1072-83.

Moyer KE (1968). Kinds of aggression and their physiological basis. *Communications in Behavioral Biology* 2: 65-87.

Molewijk HE, van der Poel AM, Olivier B (1995). The ambivalent behaviour "stretched approach posture" in the rat as a paradigm to characterize anxiolytic drugs. *Psychopharmacol* 121(1):81-90.

Neumann ID, Johnstone HA, Hatzinger M, Liebsch G, Shipston M, Russell JA, Landgraf R, Douglas AJ (1998). Attenuated neuroendocrine responses to emotional and physical stressors in pregnant rats involve adeno-hypophysial changes. *J Physiol* 508: 289-300.

Neumann ID, Torner L, Wigger A (2000). Brain oxytocin: differential inhibition of neuroendocrine stress responses and anxiety-related behavior in virgin, pregnant and lactating rats. *Neuroscience* 95: 567-575.

Newman SW (1999). The medial extended amygdala in male reproductive behavior. A node in the mammalian social behavior network. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 877:242-257

Numan M (1994). A neural circuitry analysis of maternal behavior in the rat. *Acta Paediatr Suppl* 397: 19-28.

Numan M (2006). Hypothalamic neural circuits regulating maternal responsiveness toward infants. *Behav Cogn Neurosci Rev* 5(4):163-90.

Numan M, Numan MJ, Pliakou N, Stolzenberg DS, Mullins OJ, Murphy JM, Smith CD (2005a). The effects of D1 or D2 dopamine receptor antagonism in the medial preoptic area, ventral pallidum, or nucleus accumbens on the maternal retrieval response and other aspects of maternal behavior in rats. *Behav Neurosci* 119(6): 1588-604.

Numan M, Numan MJ, Schwarz JM, Neuner CM, Flood TF, Smith CD (2005b). Medial preoptic area interactions with the nucleus accumbens-ventral pallidum circuit and maternal behavior in rats. *Behav Brain Res* 158: 53-68.

Numan M, Insel TR (2003). Motivational models of the onset and maintenance of maternal behavior and maternal aggression. In: G. Ball, J. Balthazart, J. Hopkins, R. Nelson (Eds), *The neurobiology of parental behavior*. Springer-Verlag, New York, pp. 69-106.

Numan M, Rosenblatt JS, Komisaruk BR (1977). Medial preoptic area and onset of maternal behavior in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 91: 146-164.

Numan M, Stolzenberg DS (2009). Medial preoptic area interactions with dopamine neural systems in the control of the onset and maintenance of maternal behavior in rats. *Front Neuroendocrinol* 30:46-64.

Olivier B, Mos J (1986). A female agresión paradigm for use in psychopharmacology: Maternal agonistic behavior in rats. In PF Brain, JM Ramírez, editors. *Cross-disciplinary studies on aggression*, pp. 73-111. Seville, Spain: University of Seville Press.

Orpen BG, Fleming, AS (1987). Experience with pups sustains maternal responding in postpartum rats. *Physiol Behav* 40(1):47-54.

Orpen BG, Furman N, Wong PY, Fleming A S (1987). Hormonal influences on the duration of postpartum maternal responsiveness in the rat. *Physiol Behav* 40(3): 307-315.

Ostermeyer MC (1983). Maternal aggression. In RW Elwood, editor. *Parental behaviour of rodents*, pp. 151-179. New York: Wiley.

Ottoni E (2000). EthoLog 2.2: A tool for the transcription and timing of behavior observation sessions. *Behavior Research Methods, Instruments, & Computers* 32 (3): 446-449.

Panksepp J (2005). Affective consciousness: Core emotional feelings in animals and humans. *Conscious Cogn* 14(1):30-80.

Paredes RG, Alonso A (1997). Sexual behavior regulated (paced) by the female induces conditioned place preference. *Behav Neurosci* 111:123-128.

Peyk P, Schupp HT, Keil A, Elbert T, Junghöfer M (2009). Parallel processing of affective visual stimuli. *Psychophysiology* 46(1):200-208.

Pereira M (2005). Aspectos motivacionales relacionados al comportamiento maternal y afectivo en la rata: influencia de las crías en la activación del sistema dopaminérgico mesolímbico. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas, opción Ciencias Fisiológicas. PEDECIBA, Biología

Pereira M, Ferreira A (2006). Demanding pups improve maternal behavioral impairments in sensitized and haloperidol-treated lactating female rats. *Behav Brain Res* 175(1):139-148.

Pereira M, Seip K, Morre J (2008). Maternal Motivation and Its Neural Substrate Across the Postpartum Period. *Neurobiology of the Parental Brain*, pp 39-59.

Pereira M, Uriarte N, Agrati D, Zuluaga MJ, Ferreira A (2005). Motivational aspects of maternal anxiolysis in lactating rats. *Psychopharmacol* 180(2): 241-8.

Pfaus JG, Damsma G, Wenkstern D, Fibiger HC (1995). Sexual activity increases dopamine transmission in the nucleus accumbens and striatum of female rats. *Brain Re.* 693(1-2):21-30.

- Pfaus JG, Heeb MM (1997). Implications of immediate-early gene induction in the brain following sexual stimulation of female and male rodents. *Brain Res Bull* 44(4):397-407.
- Pfaus J, Kippin T, Centeno S (2001). Conditioning and Sexual Behavior: A Review. *Hormon Behav* 40: 291-321.
- Pfaus JG, Smith WJ, Coopersmith CB (1999). Appetitive and consummatory sexual behaviors of female rats in bilevel chambers. I. A correlational and factor analysis and the effects of ovarian hormones. *Horm Behav* 35(3):224-40.
- Rittenhouse PA, Bakkum EA, O'Connor PA, Carnes M, Bethea CL, van de Kar LD (1992). Comparison of neuroendocrine and behavioral effects of ipsapirone, a 5-HT_{1A} agonist, in three stress paradigms: immobilization, forced swim and conditioned fear. *Brain Res* 580:205-214.
- Rose JD, Bieber SL (1984). Joint and separate effects of estrogen and progesterone on responses of midbrain neurons to lordosis-controlling somatic stimulation in the female golden Syrian hamster. *J Neurophysiol* 51: 1040-1054.
- Rosenblatt JS (1967). Nonhormonal basis of maternal behavior in the rat. *Science* 156: 1512-1514.
- Rosenblatt JS (1975). Prepartum and postpartum regulation of maternal behaviour in the rat. *CIBA Found Symp* 33: 17-32.
- Sakuma Y (2008). Neural Substrates for Sexual Preference and Motivation in the Female and Male Rat. *Ann NY Acad Sci* 1129: 55-60.
- Salamone JD (1991). Behavioral pharmacology of dopamine systems: a new synthesis. In P Willner, J Scheel-Kruger, editors. *The mesolimbic Dopamine System: From motivation to action*, pp. 599-613. John Wiley and Sons, Chichester, England.
- Salamone JD, Correa M (2002). Motivational views of reinforcement: implications for understanding the behavioral functions of nucleus accumbens dopamine. *Behav Brain Res* 137: 3-25.
- Savoy-Moore R, Schwartz NA, Duncan JA, Marshall JC (1980). Pituitary gonadotropin-releasing hormone receptors during the rat estrous cycle. *Science* 209: 924-944.
- Schlein PA, Zarrow MX, Denenberg VH (1974). The role of prolactin in the depressed or 'buffered' adrenocorticosteroid response of the rat. *J Endocrinol* 62: 93-99.
- Seale JV, Wood SA, Atkinson HC, Bate E, Lightman SL, Ingram CD, Jessop DS, Harbuz MS (2004). Gonadectomy reverses the sexually diergic patterns of circadian and stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in male and female rats. *J Neuroendocrinol* 16: 516-524.
- Smotherman WP, Mendosa SP, Levine S (1977). Ontogenic changes in pup-elicited maternal pituitary-adrenal activity: pup age and lactation stage effects. *Dev Psychobiol* 10:365-371.
- Siegel S, Castellan NJ (1988). *Nonparametric statistics for the behavioral sciences*. 2 ed, New York: McGraw-Hill.
- Stern JM, Johnson SK (1989). Perioral somatosensory determinants of nursing behavior in Norway Rats. *J Comp Psychol* 103: 269-280.
- Stern JM, Johnson SK (1990). Ventral somatosensory determinants of nursing behaviors in Norway rats: I. Effects of variations in quality and quantity of pup stimuli. *Physiol Behav* 47: 993-1011.
- Stern JM, Goldman L, Levine S (1973). Pituitary-adrenal responsiveness during lactation in rats. *Neuroendocrinol* 12:179-191.

Stern JM, Kolunie JM (1991). Trigeminal lesions and maternal behavior in Norway rats: I. Effect of cutaneous rostral snout denervation on maintenance of nurturance and maternal aggression. *Behav Neurosci* 105: 984-997.

Stern JM, Kolunie JM (1993). Maternal aggression of rats is impaired by cutaneous anesthesia of ventral trunk but not by nipple removal. *Physiol Behav* 54: 861-868.

Stern JM, Mackinnon DA (1976). Postpartum, hormonal, and nonhormonal induction of maternal behavior in rats: effects on Tmaze retrieval of pups. *Horm Behav* 7: 305-316.

Svare BB (1981). Maternal aggression in mammals. In DJ Gubernick, PH Klopfer, editors. *Parental Care in Mammals*, pp. 179-210. Plenum Press, New York.

Sukikara MH, Mota-Ortiz SR, Baldo MV, Felício LF, Canteras NS (2006). A role for the periaqueductal gray in switching adaptive behavioral responses. *J Neurosci*. 26(9):2583-9.

Tinbergen N (1951). *The study of instinct*. London Oxford Univ. Press.

Torner L, Toschi N, Nava G, Clapp C, Neumann ID (2002). Increased hypothalamic expression of prolactin in lactation: involvement in behavioural and neuroendocrine stress responses. *Eur J Neurosci* 15: 1381-1389.

Torner L, Toschi N, Pohlinger A, Landgraf R, Neumann ID (2001). Anxiolytic and anti-stress effects of brain prolactin: improved efficacy of antisense targeting of the prolactin receptor by molecular modeling. *J Neurosci* 21: 3207-3214.

Toufexis DJ, Tesolin S, Huang N, Walker C (1999). Altered pituitary sensitivity to corticotropin-releasing factor and arginine vasopressin participates in the stress hyporesponsiveness of lactation in the rat. *J Neuroendocrinol* 11: 757-764.

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):1061-70.

Veening JG, Coolen LM, de Jong TR, Joosten HW, de Boer SF, Koolhaas JM, Olivier B (2005). Do similar neural systems subserve aggressive and sexual behaviour in male rats? Insights from c-Fos and pharmacological studies. *Eur J Pharmacol* 526(1-3):226-39.

Viau V, Meaney MJ (1991). Variations in the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress during the estrous cycle in the rat. *Endocrinol* 129: 2503-2511.

Walsh CJ, Fleming AS, Lee A, Magnusson JE (1996). The effects of olfactory and somatosensory desensitization on Fos-like immunoreactivity in the brains of pup-exposed postpartum rats. *Behav Neurosci* 110(1):134-153.

Wartella J, Amory E, Lomas LM, Macbeth A, McNamara I, Stevens L, Lambert KG, Kinsley, CH (2003). Single or multiple reproductive experiences attenuate neurobehavioral stress and fear responses in the female rat. *Physiol Behav* 79: 373-381.

Windle RJ, Brady MM, Kunanandam T, da Costa AP, Wilson BC, Harbuz M, Lightman SL, Ingram CD (1997a.) Reduced response of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis to alpha1-agonist stimulation during lactation. *Endocrinology* 138, 3741-3748.

Windle RJ, Shanks N, Lightman SL, Ingram CD (1997b). Central oxytocin administration reduces stress-induced corticosterone release and anxiety behavior in rats. *Endocrinol* 138: 2829-2834.

Windle RJ, Wood S, Shank N, Perks P, Conde GL, da Costa APC, Ingram CD, Lightman SL (1997c). Endocrine and behavioral responses to noise stress: comparison of virgin and lactating female rats during non-disrupted maternal activity. *J Neuroendocrinol* 9: 407-414.

Yang L, Clemens L (1997). Function of intromissions on intromission-return latency of female rats during paced sexual behavior. *Physiol Behav* 61 (6): 889-894.