

Tesis de Doctorado, opción Ciencias Fisiológicas

PEDECIBA- Biología



EXPERIENCIAS ADVERSAS PARA LA MADRE EN EL POSPARTO TEMPRANO AFECTAN EL DESARROLLO NEURAL, EMOCIONAL Y COGNITIVO DE SUS CRÍAS

Mag. María José Zuluaga

Orientadora: Dra. Annabel Ferreira

Co-Orientadora: Dra. Natalia Uriarte

Tribunal:

Dra. Ana Silva
Dra. Gabriela Bedó
Dr. Javier Nogueira

Montevideo, Mayo de 2024

ÍNDICE

Contenido

ÍNDICE	1
ABREVIATURAS	3
RESUMEN.....	3
i. ANTECEDENTES.....	5
Adversidad temprana y desarrollo del sistema nervioso.....	5
Exposición prolongada a macho intruso como modelo de estrés	6
Respuesta de miedo de las crías frente a estímulos aversivos durante la etapa postnatal temprana	8
Experiencias tempranas y procesos de aprendizaje y memoria en crías.....	10
Diferencias sexuales en el efecto de las variaciones en el ambiente temprano	12
Planteamiento del problema e hipótesis	14
ii. METODOLOGÍA GENERAL	17
iii. CAPÍTULO I. EFECTO DE LA EXPOSICIÓN TEMPRANA A UN MACHO INTRUSO SOBRE LA ACTIVACIÓN DE ÁREAS DEL SN EN UNA PRUEBA DE MIEDO DURANTE EL PERÍODO DE HRE.....	25
HIPÓTESIS	25
OBJETIVO GENERAL.....	25
OBJETIVO ESPECÍFICO	25
PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	26
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	28
RESULTADOS	28
DISCUSIÓN.....	45
La exposición temprana a un macho intruso y la activación del circuito neural de miedo.....	45
¿Qué rol juegan las áreas del circuito de miedo en las respuestas de miedo de las crías?.....	47
Patrón de activación del circuito de miedo: influencia de la condición experimental y el sexo de los individuos	51
iii. CAPÍTULO II. EFECTO DE LA EXPOSICIÓN TEMPRANA A UN MACHO INTRUSO SOBRE EL COMPORTAMIENTO DE LA MADRE Y LA MEMORIA OLFATIVA DE LAS CRÍAS.....	54
HIPÓTESIS	54
OBJETIVO GENERAL.....	54
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	54

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	55
RESULTADOS	56
DISCUSIÓN.....	60
La experiencia macho y el reconocimiento del olor a nido de las crías.....	60
iv. CAPÍTULO III. RESPUESTA DE MIEDO DE CRÍAS A UN ESTÍMULO SOCIAL NO INNATO DE MIEDO: EVIDENCIA DE LA PARTICIPACIÓN DE PROCESOS DE MEMORIA.....	63
HIPÓTESIS	64
OBJETIVO GENERAL.....	64
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	64
PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	65
RESULTADOS	68
DISCUSIÓN.....	72
La hembra lactante como mediadora en la adquisición de memorias de miedo en las crías.....	72
¿La respuesta de miedo de las crías hacia una hembra adulta es consecuencia de un proceso de memoria?	73
Diferencias de sexo en el proceso de memoria las respuestas de miedo de las crías.....	75
v. DISCUSIÓN GENERAL	78
¿Cómo influye la madre sobre la respuesta de miedo de las crías hacia machos o hembras intrusas?	78
La respuesta precoz de miedo como conducta adaptativa	81
El macho adulto: ¿un potencial depredador o un co-específico dominante? ...	82
Consideraciones finales	84
vi. PERSPECTIVAS Y CONTRIBUCIONES	85
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
ANEXO I. EFECTO DE LA EXPOSICIÓN TEMPRANA A UN MACHO INTRUSO SOBRE EL COMPORTAMIENTO DE LA MADRE.....	110
ANEXO II: ARTÍCULO PUBLICADO	124

ABREVIATURAS

ABM: amígdala basomedial

ABL: amígdala basolateral

AC: amígdala central

ACo: amígdala cortical

ACTH: adrenocorticotrofina (ACTH)

AMe: amígdala medial

AVP: vasopresina

ce: cápsula externa

CORT: corticosterona (CORT)

CA: cruces abiertos

CC: cruces cerrados

CN: construcción del nido

CPu: caudado-putamen

CRH: hormona liberadora de corticotropina

DPN: día postnatal

EBA: entradas a brazos abiertos

EBC: entradas a brazos cerrados

HRE: período de hiporrespuesta al estrés

HCDa: hipocampo dorsal anterior

HCDp: hipocampo dorsal posterior

HCVa: hipocampo ventral anterior

HCVp: hipocampo ventral posterior

HDM: hipotálamo dorsomedial

HHA: eje hipotálamo-hipófisis-adrenal

HKP: postura de amamantamiento high-kyphosis

H-O: hover-over

HVM: hipotálamo ventromedial

I: ínsula

LA: lamido anogenital

LC: lamido corporal

LKP: postura de amamantamiento low-kyphosis

NPV: núcleo paraventricular

Opt: nervio óptico

SCh: núcleo supraquiasmático.

SN: sistema nervioso

SUP: sistema ubiquitina-proteosoma

TTI: tiempo en inmovilidad

TTA: tiempo total de permanencia en los brazos abiertos

USV: ultravocalizaciones

RESUMEN

Las experiencias durante las primeras etapas en la vida de los mamíferos son claves para el desarrollo adecuado del sistema nervioso y la organización de las respuestas comportamentales a largo de su vida. Entre estas experiencias, el estrés temprano y la calidad de los cuidados recibidos tienen un impacto significativo, afectando la ontogenia de las respuestas de estrés y miedo. En mi tesis de maestría demostré que la exposición de la madre y sus crías a individuos intrusos durante el posparto acelera las respuestas de miedo hacia un macho intruso en las crías, expresándose en el período de hiporrespuesta al estrés (HRE). Este período se caracteriza por la ausencia de respuestas comportamentales y endócrinas de miedo, así como por una falta de activación de áreas cerebrales relacionadas a su control. Sobre esta base, en esta tesis me propuse explorar si la respuesta de miedo de crías expuestas a machos intrusos se debe a una activación temprana de áreas neurales involucradas en el control del miedo. Para ello determiné la expresión de c-Fos en áreas implicadas con la regulación del miedo de crías previamente expuestas a machos intrusos, y de crías dentro y fuera del período HRE en una prueba de miedo. Observamos que la convivencia con un macho intruso, durante el período de HRE, indujo las respuestas de miedo y la activación temprana de áreas como el núcleo paraventricular (NPV), los subnúcleos de la amígdala y el hipotálamo ventromedial, con un patrón de activación que difirió entre sexos. En este sentido, las crías hembras expuestas a machos intrusos presentaron un patrón menor de activación, pero semejante al observado en crías hembras fuera del período de HRE. En tanto, las crías machos expuestas a machos intrusos presentaron niveles de activación similares a las crías de 14 días de edad a nivel del NPV pero no así en el resto de las áreas analizadas. Estos resultados sugieren que la activación temprana del circuito que habilita a la respuesta comportamental varía con la edad y el sexo de las crías.

En estudios previos observamos que la emisión de ultravocalizaciones por parte de las crías, conducta que promueve el acercamiento de la madre cuando están aisladas o alejadas del nido, no se ve afectada por la exposición adversa. Sin embargo, desconocemos si otros comportamientos relevantes para la supervivencia de las crías, como el reconocimiento del nido materno, podrían estar afectados por esta experiencia. Por lo tanto, examiné si la exposición a macho intruso afecta la capacidad de reconocimiento del nido de las crías. Las crías no alteraron su capacidad de reconocer el nido materno pero las crías hembras

redujeron su permanencia en el área con viruta de nido en relación a la de los machos, sugiriendo que son más sensibles a los efectos de esta experiencia.

Las crías pueden aprender y retener memorias tempranas, pero no se sabe si la madre puede influir en el aprendizaje de eventos adversos por parte de las crías. La exposición prolongada a una hembra adulta desconocida durante la lactancia nos brinda la oportunidad de explorar este problema. Aunque esta exposición altera el comportamiento de la madre y la hace más agresiva, no genera respuestas de miedo en las crías, incluso si están fuera del período HRE. Dado el fuerte impacto que la madre tiene en el desarrollo cognitivo y emocional de las crías, nos preguntamos si la exposición prolongada de la diada a una hembra adulta en proestro, que no es un estímulo innato de miedo, pero es aversivo para la madre, resulta en que las crías desarrollen una respuesta de miedo a través de un proceso de aprendizaje mediado por la madre. Para investigar esto, examiné si la exposición a hembras intrusas en proestro induce el miedo en las crías, y si administrar agentes amnésicos revierte esta respuesta en las crías expuestas a la hembra en proestro. Observamos que la exposición a hembra intrusa habilitó procesos de aprendizaje aversivo en las crías hembras, pero no en los machos y que la administración de un inhibidor de la síntesis proteica bloquea dichas respuestas, sugiriendo que la madre, a través de su comportamiento, es clave para inducir comportamientos de miedo frente a potenciales peligros, incluso en el período de HRE.

En conclusión, esta tesis ilustra cómo el sistema nervioso de individuos neonatos es sensible variaciones en el ambiente, intermediadas por la madre, que modulan su desarrollo de forma compleja y específica de acuerdo a factores externos -como la naturaleza del intruso- e internos -como el sexo y la edad-, abriendo un abanico de preguntas, desde cuáles son los mecanismos específicos que subyacen la influencia del ambiente hasta el posible significado biológico de los cambios en el desarrollo observados.

i. ANTECEDENTES

Adversidad temprana y desarrollo del sistema nervioso

En mamíferos, los períodos tempranos de la vida, los primeros días, meses o años, según cada especie, constituyen momentos críticos para el desarrollo del sistema nervioso (SN) (Avishai-Eliner et al., 2002). Es durante estos períodos donde ocurre una maduración de los sistemas sensoriales y motores, que se asocia a procesos de organización y diferenciación neuronal así como a eventos de remodelación topográfica de las conexiones neuronales, tanto a nivel cortical como subcortical (Coggeshall et al., 1994; Plenderleith et al., 1992).

Numerosos estudios han demostrado que durante esta etapa, el ambiente en el que se desarrollan los individuos ejerce un impacto crucial en la maduración de la estructura y la función del SN (Korosi et al., 2012; Korosi & Baram, 2009; Loman et al., 2010; Lucassen et al., 2013). Por ejemplo, muchos de los cambios estructurales y funcionales mencionados están modulados por la experiencia, demostrando que durante el período perinatal el SN es altamente susceptible a la “programación” del medio (Meaney & Szyf, 2005). Entre las influencias ambientales que programan al organismo en desarrollo se encuentran el ambiente uterino, el estrés temprano, la disponibilidad de recursos, los cuidados recibidos, entre otros (Avishai-Eliner et al., 2002; Breton et al., 2024; Ivy et al., 2008; Levine, 1994; Uriarte et al., 2008). Precisamente estas características llevan a que experiencias adversas durante etapas tempranas de la vida, provoquen cambios en la fisiología y organización de las respuestas comportamentales, que pueden perdurar en el tiempo y ser observadas incluso en individuos adolescentes y adultos (Agrati & Lonstein, 2016; do Prado et al., 2016; Russell et al., 2018).

En nuestra especie, evidencia creciente muestra que experiencias tempranas de estrés tienen como consecuencia un aumento de la vulnerabilidad a enfermedades psiquiátricas y trastornos cognitivos (Heim & Nemeroff, 2001; Korosi et al., 2012; Lupien et al., 2009). Por ejemplo, niños víctimas de abuso físico o de abandono emocional presentan un mayor riesgo de trastornos de depresión o ansiedad cuando adultos (Agrati et al., 2015; Agrati & Lonstein, 2016). Por otro lado, variaciones en los comportamientos de cuidado recibidos modulan el impacto de un ambiente aversivo sobre el desarrollo emocional y cognitivo de los niños (McLloyd, 1998). Por ejemplo, individuos provenientes de familias con altos puntajes en

escalas de vínculo parento-filial presentan una mayor resiliencia frente a situaciones de estrés crónico (Gunnar et al., 2015; J. Smith & Prior, 1995).

En otras especies, incluyendo animales de laboratorio, también se ha observado que situaciones de estrés durante el período postnatal temprano contribuyen a la etiología de una gran variedad de alteraciones del neurodesarrollo, comportamentales y cognitivas (van Winkel et al., 2013; Zuluaga et al., 2014).

En conjunto, resultados de estudios clínicos y una gran cantidad de evidencia experimental proveniente de modelos animales, apoyan la hipótesis de que el estrés temprano puede provocar "cicatrices" funcionales en las áreas prefrontales y límbicas del cerebro, regiones esenciales para el control emocional y los procesos de aprendizaje y memorias (Bock et al., 2014).

Exposición prolongada a macho intruso como modelo de estrés

Desde hace varias décadas se han validado modelos experimentales utilizando ratas de laboratorio para el estudio de las variaciones en el ambiente postnatal temprano y sus efectos en el desarrollo (Levine, 1956, 1957, 1962). En esta especie altricial, las crías nacen con un escaso grado de desarrollo y limitadas capacidades sensoriales, motoras y de termorregulación, por lo que dependen exclusiva y necesariamente de los cuidados y la alimentación brindada por la madre. Durante los primeros días de vida, las crías permanecen con los ojos y pabellones auriculares cerrados, por lo que el olfato es el sistema sensorial fundamental para su orientación y la búsqueda de su madre (Leon & Moltz, 1972; Rincón-Cortés & Grace, 2022; Schwob & Price, 1984). Así, el repertorio comportamental de las crías durante este período se centra en mantener el contacto físico con su madre (Jans & Leon, 1983; Noiro, 1972), guiadas por los olores maternos, especialmente aquellos originados en el nido (Tong et al., 2014; Varendi et al., 1996).

Además de proveer de estos cuidados imprescindibles para la supervivencia de las crías, la madre es su principal fuente de estimulación sensorial y proveedora de información del ambiente, modulando su desarrollo cognitivo y emocional a través su comportamiento maternal (Champagne et al., 2003; Cirulli et al., 2003; Coutellier et al., 2008; Levine, 1994; Mashoodh et al., 2009; McLeod et al., 2007; Uriarte et al., 2007; C.-D. Walker et al., 2004).

Debido a estas características, varios modelos experimentales se basan en la disrupción de la interacción madre-crías para estudiar las consecuencias de cambios en el ambiente postnatal temprano sobre el desarrollo emocional y cognitivo en la etapa adulta. Estas intervenciones incluyen separaciones por períodos cortos o prolongados, entre los que se encuentran los modelos de separación maternal (Liu et al., 2000; Plotsky & Meaney, 1993) y la manipulación postnatal o *handling* (Meaney et al., 1989; Rainekei et al., 2014; Viau et al., 1993).

Aunque los resultados obtenidos por los numerosos grupos que implementaron estos modelos son consistentes y fundacionales (Levine, 1957; Rainekei et al., 2014), recientemente han sido cuestionados por su escasa validez etológica, ya que constituyen intervenciones experimentales alejadas de lo que ocurriría en el ambiente natural de estos animales (Alberts, 1994; Molet et al., 2014). En respuesta a estas inquietudes han surgido modelos más etológicos de adversidad temprana, como la escasez de recursos, la exposición al olor de depredadores, la exposición a estresores sociales y a ambientes inestables (Adamec & Shallow, 1993; Ivy et al., 2008; Lau & Simpson, 2004; Moles et al., 2004; Moriceau et al., 2009; Nephew & Bridges, 2011).

Entre ellos, se destaca el modelo de exposición a un adulto intruso, originalmente creado por Lau & Simpson (2004), que ha sido la base del modelo que validamos y empleamos en nuestro laboratorio desde mi trabajo de tesis de maestría (Zuluaga et al., 2014). Este modelo consiste en introducir un co-específico adulto intruso en la caja materna en el postparto temprano, durante el ciclo de luz, por un período de 8 horas durante cuatro días consecutivos. Durante la exposición, el individuo intruso permanece en una jaula de malla de alambre para evitar el contacto físico con la madre o las crías.

Esta exposición prolongada de la díada madre-crías reduce la eyección de leche materna luego de la exposición (Lau & Simpson, 2004), disminuye la frecuencia en que la hembra amamanta y promueve la expresión de agresión maternal hacia el intruso (Nephew & Bridges, 2011; Zuluaga et al., 2014). A su vez, se ha reportado que tanto una exposición única a un macho intruso durante la fase de luz, como una exposición repetida a viruta sucia proveniente de cajas de machos adultos, provocan una respuesta de corticosterona (CORT) en las hembras lactantes (Deschamps et al., 2003; Moles et al., 2004).

Tanto la intensidad de la agresión maternal como de la respuesta endocrina de estrés de la madre varían dependiendo del tipo de intruso al cual es expuesta. Así, mientras un macho adulto intruso provoca agresión maternal (Ferreira & Hansen, 1986) y respuesta endócrina de estrés en las madres (Deschamps et al., 2003), las hembras intrusas inducen respuestas agresivas sin alterar la hiporrespuesta del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) propia de las hembras lactantes (Neumann, 2001).

Respuesta de miedo de las crías frente a estímulos aversivos durante la etapa postnatal temprana

Desde el día 4 al día 12 de edad, las crías de rata presentan un período de hiporrespuesta al estrés (HRE) (Levine, 2001; Moriceau et al., 2004; Suchecki et al., 1995; Takahashi, 1992b). Durante este período, las respuestas comportamentales de miedo y endócrinas de estrés varían dependiendo de la situación aversiva a la que se exponga a la cría (Moriceau et al., 2004; Suchecki et al., 1995; Takahashi, 1992b; C. D. Walker et al., 1991; C.-D. Walker et al., 2004). Así, en crías de 8 días de edad, estresores emocionales, como una breve y única exposición a un macho adulto, no provocan una respuesta comportamental de miedo (Moriceau et al., 2004; Takahashi, 1992b; C. Wiedenmayer, 2001), ni la activación del eje HHA (Takahashi, 1992a, 1992b) o de áreas del SN involucradas en el control del miedo (Moriceau et al., 2004; Takahashi et al., 2005; C. Wiedenmayer, 2001). Sin embargo, algunos estresores físicos, como la inyección de histamina o la exposición a éter, provocan una respuesta del eje HHA (Suchecki et al., 1995; C. D. Walker et al., 1991) durante el período de HRE.

Una vez finalizado este período, las crías presentan las respuestas de miedo características de esta especie frente a estímulos aversivos emocionales, como el olor de zorro o de rata macho adulta, exhibiendo una disminución de la emisión de ultravocalizaciones (USV) y un aumento del tiempo en inmovilidad (TTI), que se acompañan de la activación del eje HHA (Takahashi, 1992a, 1992b). Ambos comportamientos reducen la probabilidad de que la cría sea detectada por depredadores en un período en el cual aumenta su actividad locomotora, por lo que la probabilidad de encontrarse con un depredador sin la protección materna se incrementa (Mennella & Moltz, 1988). Esta respuesta de miedo se define como una respuesta innata ya que surge de manera natural frente a situaciones o estímulos específicos que representan un peligro potencial para la supervivencia del animal, como depredadores o situaciones de peligro, sin necesidad de experiencias previas que los desencadenen y son

parte crucial de los mecanismos de supervivencia de la especie (Takahashi, 1992a, 1992b). De forma interesante, esta reacción de miedo es específica hacia los machos adultos desconocidos (Takahashi, 1992a, 1992b), ya que no se observa una reducción de la emisión de USV ni un aumento en el TTI cuando crías de 14 días se exponen a hembras adultas en la fase de proestro de su ciclo estral (Zuluaga et al., 2014).

La respuesta de miedo frente a estímulos aversivos emocionales se asocia con la activación del circuito neural de miedo en adultos (Charney et al., 1998a, 1998b; Takahashi, 2014). Tanto estudios con lesiones o estimulación de áreas, como otros que analizaron la activación de áreas neurales frente a situaciones aversivas, indican que el núcleo paraventricular del hipotálamo (Canteras et al., 1997; Dent et al., 2000), el hipotálamo ventromedial (Esteban Masferrer et al., 2020; Silva et al., 2013), la amígdala (Chen et al., 2006; LeDoux, 2000; Moriceau et al., 2004) y el hipocampo (D. C. Blanchard et al., 2005; R. J. Blanchard & Blanchard, 1972) estarían implicados en el control del miedo. En crías de 14 días de edad, se ha asociado la expresión de c-Fos, a nivel del núcleo paraventricular del hipotálamo y la amígdala a la expresión de respuestas de miedo (Takahashi et al., 2005; C. Wiedenmayer, 2001). Sin embargo, aún resta por determinar si otras áreas vinculadas a la respuesta de miedo en individuos adultos también están involucradas en el control de la respuesta de miedo en crías.

La actividad del circuito neural y la respuesta comportamental de miedo dependen de la actividad del eje HHA, incluso en crías neonatas. Así, la administración exógena de CORT provoca la activación temprana de la amígdala en las crías (Moriceau et al., 2004), mientras que la adrenalectomía impide su activación fuera del período de HRE y por ende la expresión de miedo (Takahashi et al., 2005). La estimulación táctil que reciben las crías durante los cuidados maternos es la principal responsable de mantener los niveles de CORT bajos en las crías durante el período de HRE (M. Schmidt et al., 2004; Suchecki et al., 1993, 1995; van Oers et al., 1998). A su vez, si crías de 9 días de edad son separadas de su madre durante 24 h, se potencia la respuesta de adrenocorticotrofina (ACTH) y de CORT frente a un estresor físico, tal como la inyección de solución salina hipertónica (Suchecki et al., 1995).

Es posible inducir respuestas precoces de miedo en las crías de forma más ecológica, sin utilizar procedimientos farmacológicos, a través de manipular el ambiente temprano. En este sentido, en mi tesis de maestría, demostré que la exposición temprana de la díada madre-crías a individuos intrusos, como machos y hembras en proestro, altera el comportamiento

maternal y provoca el despliegue de agresión maternal en las ratas madres. El comportamiento alterado de la madre promueve, a su vez, la expresión temprana de respuestas de miedo en crías de 8 días de edad (Zuluaga et al., 2014). En tanto, aquellas condiciones experimentales que no alteran el comportamiento maternal, como la exposición a machos conocidos y al olor a macho, no afectan las respuestas de miedo de las crías. A partir de estos resultados postulé que las alteraciones en el comportamiento de la madre podrían estar en la base de la expresión temprana del miedo en las crías (Zuluaga et al., 2014). Esta respuesta prematura de miedo estaría mediada por las mismas áreas neurales que regulan la respuesta de miedo en individuos de mayor edad. Hasta el momento, sin embargo, desconocemos si ocurre una activación temprana de estas áreas.

Experiencias tempranas y procesos de aprendizaje y memoria en crías

Desde hace varias décadas se ha determinado que, aún antes del nacimiento, las crías son capaces de detectar diferentes olores, de aprender por asociación y de adquirir y retener memorias tempranas a largo plazo (Gruest et al., 2004; Hoffmann et al., 1987; Kehoe & Blass, 1986; Mouly & Sullivan, 2010). Esta capacidad les permite adquirir una preferencia por el olor de la madre y el nido (Caza & Spear, 1984; Kojima & Alberts, 2009), así como distinguir a su madre de otras hembras lactantes (Leon, 1975). En particular, en las especies altriciales de roedores, aprender y reconocer el olor del nido materno permite las interacciones de las crías con su madre, incluyendo las respuestas de acercamiento y la sujeción del pezón para permitir el amamantamiento (Pedersen et al., 1982; Sullivan & Leon, 1986), una capacidad fundamental para asegurar su supervivencia y desarrollo.

La estimulación materna, fuente principal de estimulación y de información del medio durante el período postnatal temprano, modula el aprendizaje de las crías. Por ejemplo, el lamido de las crías durante el proceso de nacimiento refuerza el aprendizaje del olor del líquido amniótico y condiciona a las crías a nuevos olores maternos postnatales (Raineke et al., 2010). En este sentido, la exposición de las crías a un olor nuevo mientras reciben una estimulación táctil artificial, que imita el lamido materno, provoca una fuerte preferencia por este olor (Raineke et al., 2010; Sullivan & Wilson, 1991).

Consecuentemente, cambios en el comportamiento maternal como los asociados a la interrupción de la interacción madre-crías, ya sea por períodos cortos o prolongados, tienen consecuencias negativas sobre los procesos de aprendizaje y memoria olfativas (do Prado

et al., 2016; Garcia et al., 2013; McEwen, 2000). En este sentido, se ha reportado que la separación maternal provoca déficits en la memoria (do Prado et al., 2016; Garcia et al., 2013), así como alteraciones en los procesos moleculares implicados en la plasticidad neural de áreas cerebrales involucradas en los procesos de aprendizaje y memoria (McEwen, 2000). Hasta el momento se desconoce si la exposición a macho intruso, situación que también altera la interacción madre-crías, afecta la memoria olfativa de crías, en particular, el reconocimiento del olor al nido materno.

Por otra parte, dada la importancia del comportamiento de la madre como fuente de estimulación e información del medio (Champagne et al., 2003; Cirulli et al., 2003; Coutellier et al., 2008; Levine, 1994; Mashoodh et al., 2009; McLeod et al., 2007; Uriarte et al., 2007) y la capacidad de aprender de las crías neonatas (Gruest et al., 2004; Hoffmann et al., 1987; Kehoe & Blass, 1986; Mouly & Sullivan, 2010), es posible que la madre pueda mediar procesos de aprendizaje vinculados a evitar estímulos o situaciones adversas. En humanos, los bebés son capaces de regular su comportamiento en situaciones nuevas utilizando la expresión emocional del cuidador, proceso que se conoce como referencia social (Murray et al., 2008). Los bebés son especialmente receptivos a la comunicación del cuidador durante las amenazas (Boyer & Bergstrom, 2011; Carver & Vaccaro, 2007; Vaish et al., 2008). Esta capacidad permite desarrollar estrategias de supervivencia eficientes, ya que los individuos en desarrollo deben aprender las amenazas ambientales específicas que desencadenan el miedo de los padres (Dias & Ressler, 2014).

Las crías de rata también aprenden a evitar situaciones negativas en fases tempranas de su desarrollo. Por ejemplo, a los 3 días de edad aprenden a evitar el consumo de leche de un pezón artificial asociado con el malestar inducido por litio (Gruest et al., 2004; Languille et al., 2008, 2009). Sin embargo, se desconoce si las madres son capaces de promover un condicionamiento negativo hacia estímulos neutros en crías a temprana edad. Nos preguntamos si las crías son capaces de desarrollar una respuesta de miedo adquirida como resultado de la exposición repetida a un estímulo que se asocia con una experiencia negativa o aversiva. Este tipo de respuesta se forma a través del condicionamiento, donde un estímulo neutral llega a evocar una respuesta de miedo debido a su asociación con un estímulo aversivo. Por ejemplo, si un ratón es expuesto repetidamente a un sonido fuerte seguido de una descarga eléctrica, eventualmente asociará el sonido con el peligro y mostrará una respuesta de miedo ante ese sonido específico, como congelarse o huir. Esta respuesta de miedo adquirida es un mecanismo de supervivencia que ayuda a los animales a

evitar situaciones potencialmente peligrosas en el futuro (Rosen, 2004). La exposición prolongada a un intruso no aversivo para la cría durante el período de HRE podría constituir un buen modelo para responder esta pregunta, dada la alteración reportada en el comportamiento de la madre. Si bien un macho adulto es un estímulo social con valor aversivo para las crías luego del período de HRE, una hembra adulta no provoca respuestas de miedo en las crías incluso fuera de este período (Brunelli et al., 1998; Zuluaga et al., 2014). Por este motivo, una hembra adulta puede ser considerada un estímulo social neutro para las crías, tanto dentro como fuera del período de HRE, pero aversivo para las madres, ya que altera el comportamiento de la madre e induce agresión maternal (Zuluaga et al., 2014).

La capacidad de memorizar y de recordar eventos depende de modificaciones que esos eventos inducen en el SN. Los cambios dinámicos en el tiempo, como la transición de un recuerdo lábil a corto plazo a un recuerdo estable a largo plazo, se conoce como proceso de consolidación de la memoria (H. P. Davis & Squire, 1984; Dudai et al., 2015; Kandel et al., 2014; McGaugh, 1966). A su vez, cuando una memoria consolidada se reactiva, vuelve a ser temporalmente lábil y necesita ser reconsolidada para almacenarse como una memoria a largo plazo disponible para su posterior recuperación (Bevilaqua et al., 2008; Dudai et al., 2015; Nader, 2003; Nader et al., 2000). Ambos procesos de consolidación y reconsolidación requieren de la síntesis de proteínas *a novo* en las neuronas para estabilizar la memoria adquirida o recuperada y volverla a almacenar (H. P. Davis & Squire, 1984; Dudai et al., 2015; Nader et al., 2000). Por ejemplo, utilizando el paradigma de aversión condicionada al sabor ya mencionado, Gruet y colaboradores (2004) observaron que la administración de inhibidores de la síntesis proteica, como la anisomicina, bloquea el proceso de reestabilización de la memoria haciendo desaparecer el comportamiento de evitación cuando las crías son re-expuestas al estímulo condicionado. Este resultado evidencia que el proceso de reconsolidación de la memoria está presente en crías (Gruet et al., 2004; Languille et al., 2008, 2009). En base a estos antecedentes podemos hipotetizar que si la respuesta de miedo frente a hembras desconocidas responde a la evocación de una memoria de miedo hacia la hembra, existirá un proceso de reconsolidación de la misma sensible a manipulaciones farmacológicas.

Diferencias sexuales en el efecto de las variaciones en el ambiente temprano

Si bien inicialmente los estudios sobre los efectos de las intervenciones tempranas se llevaron a cabo principalmente en machos, en los últimos años ha surgido la necesidad de

considerar el sexo como una variable biológica en este tipo de estudios. Así, muchos investigadores coinciden en que para comprender el amplio espectro de efectos que inducen las experiencias tempranas y los ambientes adversos en los individuos es imprescindible estudiar machos y hembras (Bath, 2020).

La incorporación de esta variable al análisis se basa en los efectos dependientes del sexo en las respuestas de estrés y aprendizaje tanto en intervenciones experimentales clásicas, como la separación o manipulación neonatal (Angelucci et al., 1983; Raineke et al., 2009, 2014), como en abordajes más etológicos, como la exposición a depredadores, intrusos o modificaciones de la composición familiar temprana (D'Andrea et al., 2010; Uriarte et al., 2008, 2009; Zuluaga et al., 2014).

De acuerdo a estos antecedentes, y debido a que los procesos de maduración de circuitos de miedo varían de acuerdo al sexo de los individuos (Bock et al., 2014), es posible suponer que el patrón de activación de las áreas neurales involucradas en la organización de las respuestas de miedo difiera entre crías machos y hembras en nuestro modelo.

Siguiendo este razonamiento, y tomando en cuenta que diversos trabajos que evalúan diferentes tareas de memoria reportan resultados disímiles en el desempeño de machos y hembras expuestos a experiencias adversas (Bath et al., 2017; Biala et al., 2011; Heck & Handa, 2019; Molet et al., 2016; Winkelmann-Duarte et al., 2007; Xu et al., 2022; Zúena et al., 2008), es posible suponer que la exposición a individuos intrusos en nuestro modelo provocará efectos diferentes de acuerdo al sexo.

Planteamiento del problema e hipótesis

Se ha reportado que experiencias adversas en el postparto temprano, particularmente si son persistentes, afectan no solo el funcionamiento del SN y el comportamiento de la madre, sino la capacidad de su descendencia para responder a situaciones de riesgo o estrés a lo largo del desarrollo (Baracz et al., 2020; Bölükbas et al., 2020; C. D. Smith & Lonstein, 2008). En este sentido, los resultados de mi tesis de maestría (Zuluaga et al., 2014) y otros estudios (Moles et al., 2004; Moriceau et al., 2006) muestran que la exposición repetida de la madre y su camada a un macho intruso, estímulo social aversivo para la madre, durante los primeros días del período postparto, afecta la ontogenia de las respuestas de miedo de las crías ante un macho adulto, acelerando la expresión de esas respuestas. Este fenómeno es particularmente interesante debido a que la expresión de respuestas de miedo innatas ocurre en el período de HRE, que se caracteriza por la ausencia de respuestas comportamentales y endócrinas de miedo (Moriceau et al., 2004; Takahashi, 1992b), así como por una falta de activación de áreas cerebrales relacionadas a su control (C. Wiedenmayer, 2001). Sobre esta base, en el **primer capítulo** de esta tesis me pregunté si la respuesta de miedo en crías, expuestas a machos intrusos con sus madres, induce la activación temprana de áreas neurales involucradas en el control del miedo.

Por otro lado, es sabido que experiencias adversas tempranas para las crías afectan el reconocimiento del olor a nido materno, un aprendizaje olfativo fundamental para su supervivencia (do Prado et al., 2016; Garcia et al., 2013; McEwen, 2000). Sin embargo, desconocemos si la exposición a machos intrusos, en los primeros días postnatales, altera las memorias tempranas olfativas asociadas al reconocimiento del nido materno en las crías una vez finalizada la exposición. En base a esta evidencia, en el **segundo capítulo** de la tesis exploré si la exposición repetida a machos intrusos en la jaula materna afecta el aprendizaje olfativo en las crías una vez concluida la exposición adversa.

Las crías son capaces de aprender y retener memorias tempranas (Gruest et al., 2004; Hoffmann et al., 1987; Kehoe & Blass, 1986; Languille et al., 2008, 2009). Sin embargo, aún se desconoce si la madre puede influir en el aprendizaje de eventos adversos por parte de las crías. La exposición prolongada a una hembra adulta desconocida durante la lactancia ofrece una oportunidad para investigar esta pregunta, ya que altera el comportamiento de la madre e induce agresión maternal, pero no provoca respuestas de miedo en las crías, incluso si se encuentran fuera del período HRE (Brunelli et al., 1998; Zuluaga et al., 2014). Nos

preguntamos si el comportamiento alterado de la madre, por la exposición repetida a una hembra en proestro, genera respuestas de miedo hacia hembras en las crías, como resultado de un proceso de aprendizaje. Si la respuesta de miedo de estas crías se debe a un proceso de memoria asociado al comportamiento alterado de la madre hacia el intruso, esta respuesta podría verse alterada por agentes amnésicos. De acuerdo con lo expuesto, el **tercer capítulo** de esta tesis pretende determinar si las crías son capaces de desarrollar una respuesta de miedo hacia un estímulo social aversivo para las madres, pero no aversivo para las crías, a través de un proceso de aprendizaje dependiente del comportamiento de la madre.

Dado el gran cuerpo de evidencia que muestra que los efectos de las variaciones en la experiencia temprana y el estrés pueden variar de acuerdo al sexo de los individuos (Bath et al., 2017; Biala et al., 2011; E. P. Davis et al., 2017; Heck & Handa, 2019; Molet et al., 2016; Winkelmann-Duarte et al., 2007; Xu et al., 2022; Zuna et al., 2008), en los tres capítulos de la tesis se evaluaron crías machos y hembras.

En base a lo expuesto, postulamos la siguiente hipótesis general de trabajo:

Las experiencias adversas para la madre durante el postparto temprano afectan el desarrollo neural, emocional y cognitivo de sus crías.

A partir de esta hipótesis general surgen las siguientes hipótesis específicas que serán abordadas en cada capítulo de esta tesis:

Hipótesis Capítulo I

Las respuestas de miedo de las crías durante el período de hiporrespuesta al estrés, generadas por la exposición de la diada madre-crías a un macho intruso, se asocian a la activación temprana de áreas neurales que integran el circuito relacionado al control del miedo.

Hipótesis Capítulo II

La exposición de la diada madre-crías a un macho intruso durante el período de hiporrespuesta al estrés afecta el reconocimiento del olor del nido materno por parte de las crías luego de la experiencia adversa.

Hipótesis Capítulo III

Las crías son capaces de expresar respuesta de miedo frente a un estímulo social no innato de miedo en el período del hiporrespuesta al estrés, como consecuencia de un proceso de aprendizaje mediado por la madre.

Esta tesis se organiza en 6 capítulos. En el primer capítulo **i) Antecedentes, Planteamiento del problema e hipótesis**, se introducen los antecedentes generales y específicos de este estudio, se plantea el problema de investigación a abordar y se presentan las hipótesis de trabajo. En un segundo capítulo **ii) Metodología general**, se describen los materiales y métodos generales utilizados para los distintos abordajes experimentales. A continuación, en los capítulos experimentales **iii) Capítulo experimental I**, **iv) Capítulo experimental II** y **v) Capítulo experimental III**, se desarrollan los experimentos que pretenden responder a las hipótesis planteadas y en cada uno de ellos se discuten los resultados obtenidos. El análisis y la discusión en conjunto de los tres capítulos experimentales se aborda en el capítulo **vi) Discusión general**, mientras que las perspectivas y contribuciones surgidas a partir de esta tesis se encuentran en el capítulo **vi) Perspectivas y Contribuciones**. Finalmente, se agregan dos anexos, el **ANEXO I** en donde se explora si la exposición a macho intruso modifica el comportamiento maternal, la agresión maternal y la ansiedad experimental de las madres, considerando que experiencias adversas en el posparto temprano también pueden afectar el estado emocional de la madre y en el **ANEXO II** se adjunta la publicación surgida hasta el momento de esta tesis.

ii. METODOLOGÍA GENERAL

ANIMALES

Se utilizaron ratas (*Rattus norvegicus*, cepa Wistar) adultas de 3 a 4 meses de edad y crías de 0 a 14 días de edad de ambos sexos, provenientes de camadas igualadas a 8 individuos (4 hembras y 4 machos) en el día 0 posparto. Los animales se alojaron en una habitación a temperatura ($22\pm^{\circ}\text{C}$) y humedad (65%) controlada y bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas (luces encendidas a las 06:00 horas), con libre acceso a alimento y agua. Para obtener las díadas madre-crías experimentales, hembras sexualmente receptivas se alojaron con machos sexualmente activos durante el período de oscuridad. Las hembras preñadas permanecieron en grupos de 3 o 4 por caja, alojándose en forma individual a partir del día 21 de gestación (cajas de 48 x 33 x 16 cm) y se asignaron aleatoriamente a una de las condiciones experimentales. A partir del día 22 posparto se controló diariamente la presencia de crías, estableciendo el día del parto como día 0 posparto. Los procedimientos de manejo y experimentación con animales fueron aprobados por la Comisión de Ética en el Uso de Animales de la Facultad de Ciencias de la Universidad de la República (Exp. 240012-000015-23) de acuerdo con la Ley Nacional de Experimentación Animal Nº 18611.

EXPOSICIÓN TEMPRANA DE LA DÍADA MADRE-CRÍAS A INTRUSOS

(Lau & Simpson, 2004; Zuluaga et al., 2014)

En los experimentos presentados en los Capítulos experimentales I, II y Anexo I se realizó el siguiente protocolo de exposición a intruso: desde el día 1 al 4 postparto (DPN 1-4), hembras lactantes primíparas con sus respectivas camadas, fueron expuestas durante un período de 8 horas (de 1000 a 1800 h) a un macho adulto intruso desconocido dentro de una jaula de malla de alambre (condición experiencia macho) o a una jaula similar vacía (condición control). La jaula (15 x 30 x 16 cm) se ubicó en el lado opuesto al lugar del nido de forma que el lado de la jaula de 30cm de largo se orientara en paralelo a la pared de 33 cm. En cada día de exposición, se introdujo un macho adulto no utilizado previamente para mantener el estatus de intruso. Una vez finalizado el período de exposición, se retiró la jaula, se cambió la viruta debajo de la jaula y las díadas madre-crías no se volvieron a manipular hasta la realización de las pruebas.

En los experimentos presentados en el Capítulo Experimental III se utilizó el procedimiento previamente descrito (Zuluaga et al., 2014, 2023), pero esta vez el intruso al que se expuso la díada madre-crías fue una hembra adulta intrusa en proestro ubicada en la jaula (condición hembra intrusa). En cada día de exposición, se introdujo una nueva hembra en proestro para mantener el estado de proestro y de desconocido de la intrusa. La fase de proestro del ciclo estral de las hembras intrusas se determinó a partir de la observación de los tipos celulares presentes en un exudado vaginal (Marcondes et al., 2002) previo a su introducción en la caja de la madre.

PRUEBA DE MIEDO

(Takahashi, 1992b, 1992a; Zuluaga et al., 2014)

Esta prueba se realizó de 10:00 a 12:00 h en una caja (48 × 33 × 16 cm) sin viruta. Las crías de cada camada se separaron individualmente de su madre y se expusieron por 10 minutos a un macho o una hembra en proestro anestesiada en una jaula (15 × 33 × 16 cm) para evitar el contacto entre ellas. Durante la exposición se registró el número de USVs y el tiempo total en inmovilidad (TTI- definido como la ausencia de movimientos somáticos, excepto los movimientos respiratorios) de la cría. Una disminución en el número de USVs y un aumento en el TTI se consideraron como una respuesta de miedo. La prueba se llevó a cabo de 1000 a 1200 h en una caja de policarbonato (48 x 33 x 16 cm) sin viruta, ubicada sobre una fuente de calor para mantener la temperatura del nido (35-36°C). En uno de los tercios de la caja se ubicó una jaula de malla metalizada, donde se colocó al macho anestesiado con tiopental (80 mg/kg, ip.) para evitar posibles variaciones en la respuesta de la cría como producto de la interacción con el intruso. Dado que las crías emiten vocalizaciones en un rango entre los 40-70 kHz (Hofer, 1996) se utilizó un micrófono ubicado encima de la caja y conectado a un detector de USVs (Bat Detector ELV Ultraschall-NF-Konverter), que traduce las señales a un espectro audible. Las señales fueron grabadas en un aparato mp3 conectado al detector. Su posterior visualización y análisis se realizó mediante el programa de software Audacity®.

CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA C-FOS EN SN POR INMUNOHISTOQUÍMICA

(Phillips-Farfán & Fernández-Guasti, 2007)

- ***Colecta de encéfalos y preparación del tejido***

Las crías se anestesiaron con tiopental sódico (80 mg/kg) y se perfundieron de forma transcardíaca con solución salina heparinizada, seguida de solución de paraformaldehído al 4%. El cerebro se removió y sumergió para su pos-fijación en la misma solución fijadora durante 48 hs, seguido de una solución de sacarosa al 30% para criopreservar el tejido. Los encéfalos se congelaron con isopentano y se almacenaron a -80 °C hasta su procesamiento. Los cerebros se cortaron en crióstato, obteniéndose secciones de las áreas de interés de 50 µm de espesor y se conservaron a -20°C hasta su uso en una solución "antifreeze" (1% de PVP-40, 30% sacarosa, 30% etilenglicol en PBS). El grosor de los cortes se seleccionó para preservar la integridad del tejido, debido a que a esta edad la mielinización neuronal no está completa aún. Una serie de secciones por animal fueron utilizadas para la inmunohistoquímica, mientras que la serie adyacente se coloreó por la técnica de Nissl para la identificación de las áreas.

- ***Selección de las áreas a analizar***

Las áreas fueron identificadas utilizando las áreas adyacentes teñidas con Nissl y los atlas estereotáxico "Theratbrain in stereotaxiccoordinates" (Paxinos & Watson, 2013) y el "Atlas of the neonatal ratbrain" (Ramachandra & Subramanian, 2016). En primer lugar, identificamos las áreas de interés y los repere anatómicos asociados a las mismas en el atlas estereotáxico para rata adulta (Paxinos & Watson, 2013). Las áreas de interés se enmarcaron entre Bregma -1.80 mm a -2.80 mm. Dado que las secciones varían en su morfología entre crías y adultos, se tomaron en cuenta estos repere anatómicos para identificar las secciones en los cerebros de las crías. Concluimos que las figuras 57 a 59 para las secciones de cerebros de crías de 8 días de edad y las figuras 114 a 117 para las crías de 14 días de edad del "Atlas of the neonatal ratbrain" (Ramachandra & Subramanian, 2016) eran las indicadas para ubicar las áreas de interés en este trabajo.

Comenzamos ordenando las secciones en base al hipocampo, tomando en cuenta que, a medida que avanzábamos hacia secciones caudales, el giro dentado se desplaza desde una posición medial hacia una más lateral. Tanto para secciones de crías de 8 como de 14 días

edad, el límite rostral de nuestro análisis se definió por la identificación del núcleo supraquiasmático, ubicado ventralmente a los lados del tercer ventrículo ventral y bordeado ventralmente por el nervio óptico. El límite caudal de nuestro análisis fue la sección donde identificamos la figura en "forma de mariposa" que forman el núcleo dorsomedial del hipotálamo y el hipotálamo ventromedial. En la siguiente sección, donde ubicamos el núcleo supraquiasmático, identificamos el núcleo paraventricular del hipotálamo, ubicado dorsolateralmente al tercer ventrículo ventral. En las siguientes tres secciones, a nivel del lóbulo temporal y bordeado lateralmente por la cápsula externa, dorsalmente por el globo pálido y el caudado-putamen, y medialmente por el tracto óptico, identificamos la amígdala y sus diversos núcleos. Tomando como referencia la presencia de la ínsula, definimos las áreas de análisis de la amígdala basomedial y cortical por debajo de la misma. En las dos siguientes secciones, caudales al sitio donde registramos la presencia de la ínsula, definimos las áreas de la amígdala medial, la amígdala basolateral y la amígdala central. La amígdala basolateral se ubicó de manera ventromedial entre la zona de transición amigdaloesfiental y la cápsula externa. La amígdala central se ubicó en una posición medial, contigua a la amigdalabasolateral, bordeada por la zona de transición amigdaloesfiental y el caudado-putamen. En tanto, la amígdala medial se definió bordeada medialmente por el tracto óptico y lateralmente por la amígdala basolateral. El hipotálamo ventromedial se ubicó en la sección más caudal, a nivel ventral del hipotálamo bordeado medialmente por el tercer ventrículo y lateralmente por el tracto óptico. Finalmente se definió el área de análisis para el hipocampo anterodorsal y anteroventral en la misma sección del núcleo paraventricular, mientras que el área de análisis para el hipocampo posterodorsal y posteroventral se ubicó en las secciones donde identificamos el hipotálamo ventromedial y la mariposa que forman el núcleo dorsomedial del hipotálamo y el hipotálamo ventromedial (Figura 1). Por lo tanto, el número total de secciones analizadas varió según las áreas: núcleo paraventricular (NPV): 1 sección; amígdala basomedial (ABM), cortical (ACo) y central (AC): 1 sección; amígdala basolateral (ABL) y medial (AMe): 2 secciones; hipotálamo ventromedial (HVM): 1 sección; hipocampo dorsal anterior (HCDa) y ventral anterior (HCVa) 1 sección, hipocampo dorsal posterior (HCDp) y ventral posterior (HCVp): 2 secciones.

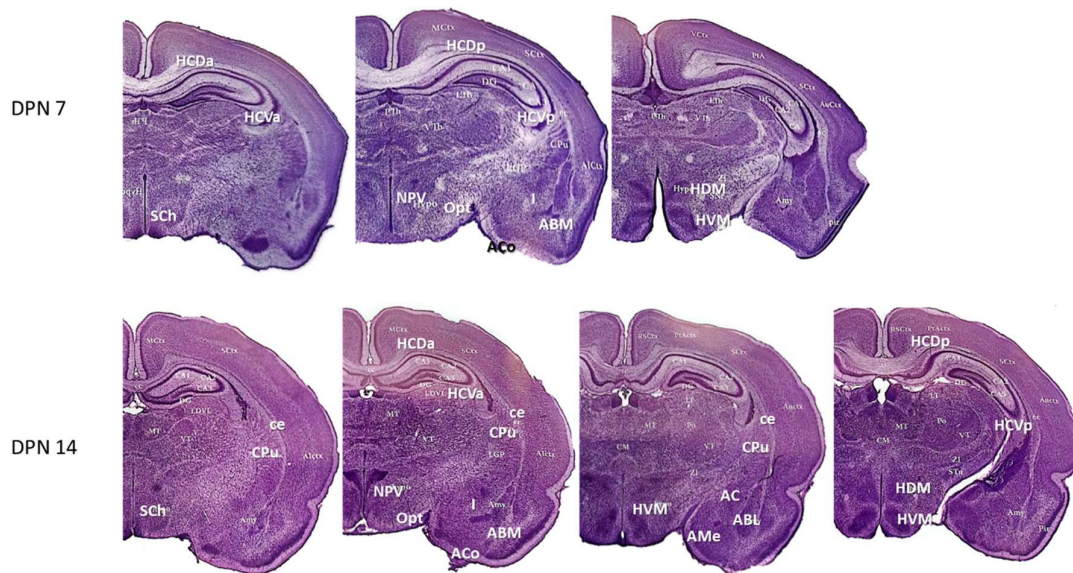


Figura 1. Imágenes de las secciones de cerebros de crías de 7 y 14 días de edad extraídas del "Atlas of the neonatal rat brain" (Ramachandra & Subramanian, 2016), las cuales se utilizaron como referencia para el reconocimiento de las áreas de interés en este trabajo. ABM: amígdala basomedial, ABL: amígdala basolateral, AC: amígdala central, ACo: amígdala cortical, AMe amígdala medial, CPU: caudado-putamen, ce: cápsula externa, HCDa: hipocampo dorsal anterior, HCVa: hipocampo ventral anterior, HCDp: hipocampo dorsal posterior, HCVp: hipocampo ventral posterior, HDM: hipotálamo dorsomedial, HVM: hipotálamo ventromedial, I: ínsula, NPV: núcleo paraventricular, Opt: nervio óptico, SCh: núcleo supraquiasmático.

Las regiones de interés (ROI) para la determinación de núcleos positivos para c-Fos en cada sección del cerebro se mantuvieron constantes para todas las edades y se definieron utilizando la sección adyacente teñida con Nissl. Las áreas de cada ROI fueron: 1) NPV ROI: 0,0035 mm²; 2) AMe ROI: 0,0102 mm², ACo ROI: 0,0088 mm², ABM ROI: 0,0072 mm², ABL ROI: 0,0045 mm², AC ROI: 0,009 mm²; 3) HVM ROI: 0,01 mm²; 4) HCVa ROI: 0,003 mm², HCVp ROI: 0,0025 mm², HCDa ROI: 0,0023 mm², HCDp ROI: 0,0019 mm² (Figura 2).

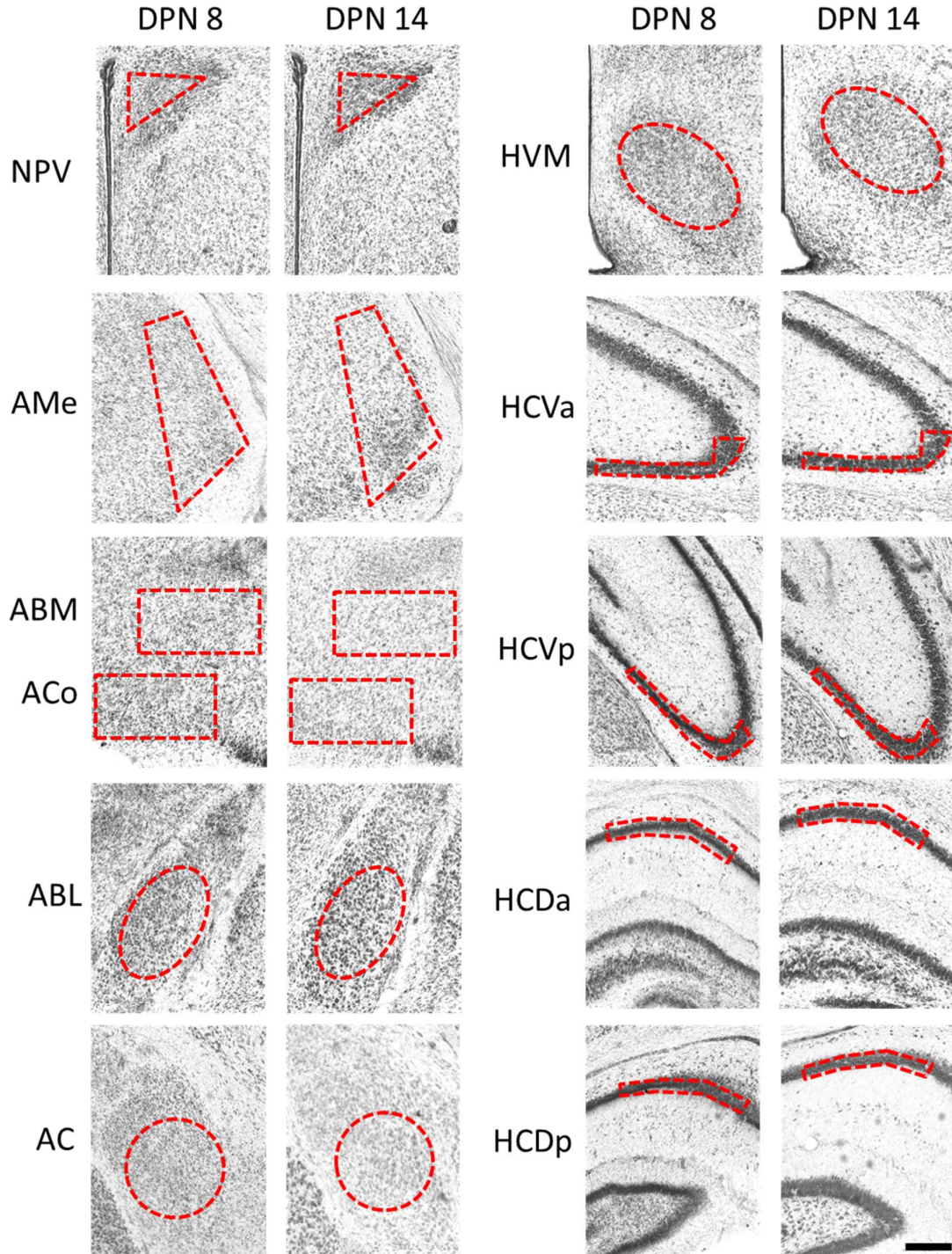


Figura 2. Fotomicrografías representativas de las áreas analizadas con sus ROIs en secciones de cerebro de crías de 8 días de edad (DPN 8) y crías de 14 días de edad (DPN 14) teñidos con Nissl. Las áreas analizadas fueron: núcleo paraventricular (NPV), amígdala medial (AMe), basomedial (ABM), cortical (ACo), basolateral (ABL), central (AC), hipocampo ventral anterior (HCVa) y posterior (HCVp) e hipocampo dorsal anterior (HCDa) y posterior (HCDp). Barra corresponde a 50 μ m. Magnificación: 10X.

- ***Técnica de inmunohistoquímica en "free floating"***

Esta técnica consiste en realizar la tinción inmunohistoquímica con los cortes flotando en un exceso de buffer, por lo cual es necesario montar las secciones al final del protocolo. Luego de varios lavados con solución amortiguadora, las cortes se incubaron con peróxido de hidrógeno para inactivar las peroxidasas endógenas. Posteriormente, para evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos, las secciones se bloquearon con una solución que contenía suero de caballo y albúmina bovina. Luego de varios lavados, se incubaron con el anticuerpo primario (anticuerpo policlonal de cabra contra proteína c-Fos de humanos sc-52-G, Santa Cruz Biotechnology Inc.) diluido 1:2600 durante 36 hs a 4 °C. Posteriormente, las secciones se lavaron e incubaron con el anticuerpo secundario (anticuerpo policlonal de caballo biotinizado, Vector Laboratories) dilución 1:200 por 3 hs. Finalmente, las secciones se incubaron con el complejo AB y con la solución DAB (ambos procedimientos de acuerdo a los kits comerciales Vector Laboratories) para amplificar y visibilizar la señal. En cada ensayo se incluyeron los distintos grupos experimentales a comparar y un control negativo para la técnica de inmunohistoquímica (pocillo con ausencia de anticuerpo primario).

- ***Procesamiento de las imágenes***

Para la identificación de áreas y cuantificación, las secciones se visualizaron bajo campo claro en el microscopio de epifluorescencia Eclipse Ts2R (Nikon, Tokio, Japón) con un objetivo de 10x. Las imágenes de la región cerebral seleccionada se tomaron bilateralmente con una cámara digital refrigerada DS-5Mc-U2 (Nikon) usando el software NIS elements, versión 3.1 (Nikon). Para optimizar la detección y el análisis de células positivas para c-Fos, las imágenes se convirtieron en imágenes de 8 bits usando el software FIJI (Schindelin et al., 2012). Una célula fue marcada como positiva para c-Fos cuando la inmunorreactividad era nuclear (como se confirmó visualmente) y el núcleo tenía las siguientes características (restringido con filtros de software FIJI): 70%-100% negro, 10-100 µm de tamaño y aproximadamente circular (proporción entre 0,5 y 1,0). El número de células c-Fos positivas se informa como la media de ambos lados para cada área del cerebro promediando las secciones.

PRUEBAS COMPORTAMENTALES

Prueba de preferencia a olores maternos(Sullivan et al., 1990)

La prueba de preferencia a olor a nido se basó en estudios de aprendizaje olfativo asociativo (Garcia et al., 2013; Leon, 1992; Raineke et al., 2010; Sullivan et al., 1990). La prueba

consiste en evaluar la elección entre tres áreas diferentes, una con viruta sucia proveniente del nido materno, otra con viruta limpia y un área neutral sin viruta. Se utiliza una caja de polipropileno (34 x 24 x 40 cm) dividida por una línea de 2 cm de ancho a lo largo de la base. En cada área se colocan 300 mL de viruta limpia o de nido en las esquinas adyacentes. Se coloca una cría en la línea de 2 cm en el lado opuesto a donde se encuentran los estímulos y se registra el tiempo de permanencia en cada área, el número de entradas y la latencia a entrar en las áreas con viruta con nido durante 1 min. Se considera que la cría está dentro de cada área si ubica su cabeza o todo su cuerpo sobre la misma. Los animales son evaluados en cinco ensayos con un intervalo de 1 min durante el cual la cría es colocada en una caja con viruta. El tiempo total y el número total de entradas en cada área se calculan mediante la suma de los cinco ensayos, mientras que la latencia a la primera entrada al área con viruta limpia o de nido se expresa como el promedio de los cinco ensayos. En cada ensayo se intercambian de posición las áreas entre los lados de la caja. Después de cada ensayo, la caja se limpia con etanol al 50% para eliminar rastros de olores.

iii. CAPÍTULO I. EFECTO DE LA EXPOSICIÓN TEMPRANA A UN MACHO INTRUSO SOBRE LA ACTIVACIÓN DE ÁREAS DEL SN EN UNA PRUEBA DE MIEDO DURANTE EL PERÍODO DE HRE

La exposición prolongada de la madre con sus crías a un macho intruso, durante los primeros días de la lactancia, induce la alteración del comportamiento de la madre y promueve la expresión de respuestas comportamentales de miedo en crías durante el período de HRE (Zuluaga et al., 2014). Esta respuesta prematura de miedo podría deberse a la activación temprana de áreas de los circuitos neurales involucrados en el control del miedo. Asimismo, este patrón de activación podría diferir entre crías machos y hembras, dada la influencia de factores hormonales y del sexo en los procesos de maduración de SN y la respuesta comportamental y endócrina de estrés (Bock et al., 2014; Heck & Handa, 2019).

HIPÓTESIS

Las respuestas de miedo de las crías durante el período de hiporrespuesta al estrés, generadas por la exposición de la díada madre-crías a un macho intruso, se asocian a la activación temprana de áreas neurales que integran el circuito relacionado al control del miedo.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si la expresión temprana de las respuestas de miedo en crías, expuestas con sus madres a un estímulo social aversivo durante los primeros días de vida, se asocia a la activación de áreas del circuito neural que organiza las respuestas de miedo.

OBJETIVO ESPECÍFICO

1. Determinar si la expresión de c-Fos en áreas implicadas con la regulación del miedo de crías previamente expuestas a machos intrusos es similar a la observada por crías

que están fuera del período HRE y si existen diferencias de acuerdo al sexo en respuesta a la presencia de un macho anestesiado.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Efecto de la exposición a un macho intruso sobre la respuesta comportamental de miedo y la activación de áreas del SN en crías

Para determinar si la expresión temprana de las respuestas de miedo en crías se asocia a la activación de áreas del SN relacionadas al control del miedo, del DPN 1-4 hembras primíparas lactantes junto a sus crías fueron expuestas en la caja materna a un macho intruso (situación que altera los cuidados maternos e induce agresión maternal y respuestas precoces de miedo en las crías (Zuluaga et al., 2014)) o jaula vacía de acuerdo al protocolo de exposición a intrusos descrito anteriormente. En el día 8 postnatal (DPN 8) una cría macho y una cría hembra de cada camada expuesta a intruso o jaula vacía se sometieron a la prueba de miedo frente a un macho adulto anestesiado. A su vez, una cría macho y una cría hembra de otras camadas expuestas a jaula vacía fueron sometidas a la prueba de miedo en el DPN 14. Noventa minutos después de finalizada la prueba se realizó la colecta de encéfalos y preparación del tejido para la posterior determinación de la expresión de la proteína c-Fos en SN por inmunohistoquímica. El orden de las pruebas fue contrabalanceado entre machos y hembras.

A partir de este protocolo experimental se obtuvieron tres grupos experimentales (Figura 3):

- a) ***Experiencia macho*** ($n_{\text{díadas}} = 6$): crías machos y hembras fueron expuestas a machos intrusos desde el DPN 1-4 y en el DPN 8 se realizó la prueba de miedo frente a macho adulto anestesiado y se colectó el encéfalo para la determinación de c-Fos. Dado que estas crías presentan una respuesta temprana de miedo (Zuluaga et al., 2014), esperamos que presenten una activación de c-Fos en áreas relacionadas con el control del miedo.
- b) ***Control negativo*** ($n_{\text{díadas}} = 5$): crías machos y hembras fueron expuestas a jaula vacía desde el DPN 1-4 y en el DPN 8 se determinaron las respuestas de miedo frente a macho adulto anestesiado y se colectó el encéfalo para la determinación de c-Fos. Dado que las crías están dentro del periodo HRE, esperamos que no presenten una

respuesta comportamental de miedo y tengan una activación de c-Fos casi nula en áreas relacionadas con el control de esta respuesta (C. Wiedenmayer, 2001).

- c) **Control positivo** ($n_{\text{díadas}} = 5$): crías machos y hembras fueron expuestas a jaula vacía desde el DPN 1-4 y en el DPN 14 se realizó la prueba de miedo y luego se colectó el encéfalo para la determinación de c-Fos. Debido a que las crías están fuera del periodo HRE, esperamos que presenten una respuesta comportamental de miedo y una activación de c-Fos en áreas relacionadas con esta respuesta (C. Wiedenmayer, 2001).

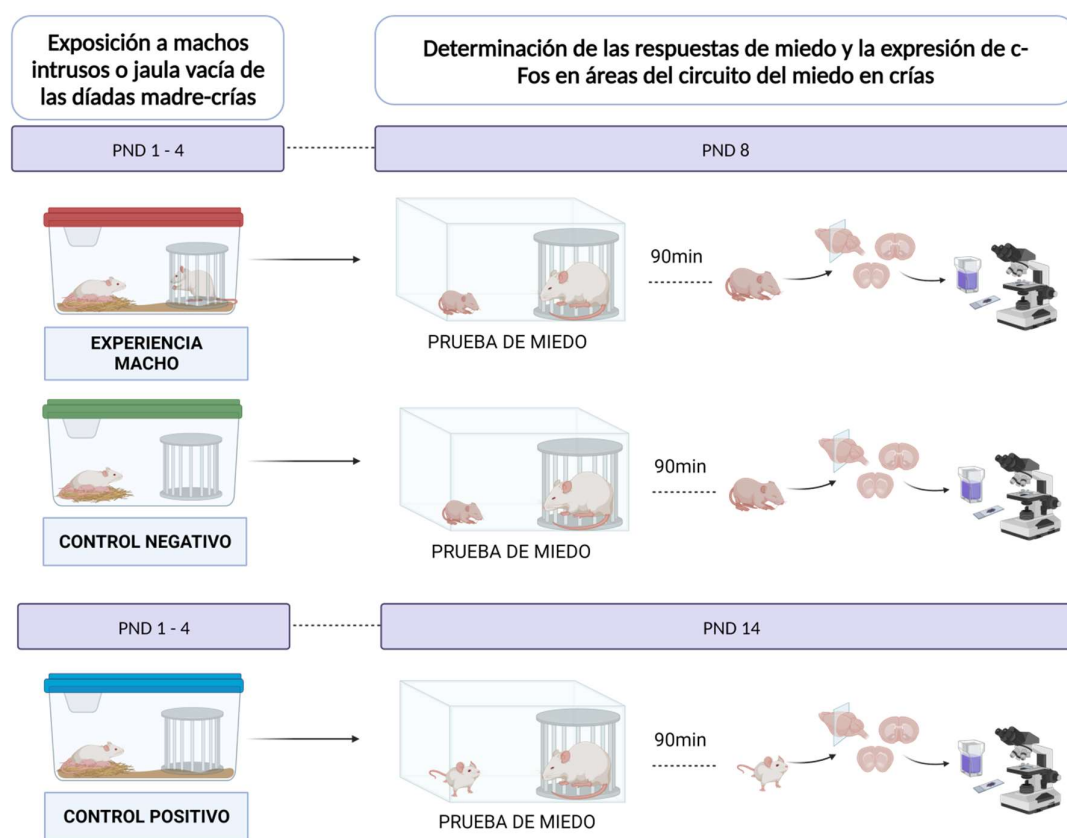


Figura 3. Representación esquemática del procedimiento realizado y de los tres grupos experimentales generados para el experimento 1. Las díadas madre-crías fueron expuestas a un macho intruso dentro de una jaula (experiencia macho) o una jaula vacía (control negativo o positivo) en la caja materna del DPN 1-4. En el DPN 8, una cría macho y una cría hembra de los grupos experimentales experiencia macho y control negativo fueron expuestas individualmente a un macho adulto anestesiado (prueba de miedo) y 90 min después se realizó la extracción de tejido para inmunohistoquímica. En el DPN 14 una cría macho y una cría hembra de cada camada expuesta a jaula vacía (control positivo) fueron expuestas individualmente a un macho adulto anestesiado (prueba de miedo) y 90 min después se extrajo el tejido para la determinación de c-Fos.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se expresan como medianas (rangos inter-cuartiles) (RIQ) ya que no presentaron una distribución normal ni homogeneidad de varianzas (Siegel, 1956). El análisis del comportamiento durante la prueba de miedo a macho anestesiado y la expresión de la proteína c-Fos en SN se realizó mediante la prueba de Kruskal–Wallis, seguida de la prueba U de Mann–Whitney. Las comparaciones entre los sexos se realizaron mediante la prueba de Wilcoxon, puesto que las crías provenían de una misma camada.

RESULTADOS

Respuesta comportamental de miedo en crías frente a un macho anestesiado

Como se muestra en la tabla 1, la respuesta de miedo difirió entre los grupos experimentales tanto en crías machos (USV: $H_{(2, 16)}=9,3$; $p \leq 0,05$; TTI: $H_{(2, 16)}=10,6$; $p \leq 0,05$) como en crías hembras (USV: $H_{(2, 16)}=12,6$; $p \leq 0,05$; TTI: $H_{(2, 16)}=9,2$; $p \leq 0,05$). Las crías machos expuestas previamente a machos intrusos (experiencia macho: USV: $U_{(6,5)}= 5,0$; $p \leq 0,05$; TTI: $U_{(6,5)}= 1,0$; $p \leq 0,05$), así como las crías de 14 días de edad (control positivo: USV: $U_{(6,5)}= 1,0$; $p \leq 0,05$; TTI: $U_{(6,5)}= 1,0$; $p \leq 0,05$), disminuyeron sus USVs y aumentaron el TTI respecto a las crías en DPN 8 expuestas a la jaula vacía (control negativo). Asimismo, las crías hembras de los grupos experiencia macho (USV: $U_{(6,5)}= 1,0$; $p \leq 0,05$; TTI: $U_{(6,5)}= 4,0$; $p \leq 0,05$) y control positivo (USV: $U_{(6,5)}= 0,0$; $p \leq 0,05$; TTI: $U_{(6,5)}= 0,0$; $p \leq 0,05$) redujeron la emisión de USVs y aumentaron el TTI en comparación con las crías expuestas a jaula vacía

No se observaron diferencias en el comportamiento entre machos y hembras dentro de cada grupo experimental (control negativo USV: $T_{(5)}= 8,0$; $p=0,6$; TTI: $T_{(5)}= 4,0$; $p=0,17$; experiencia macho: USV: $T_{(6)}= 9,0$; $p=0,75$; TTI: $T_{(6)}= 7,0$; $p=0,46$; control positivo: USV: $T_{(5)}= 4,0$; $p=0,17$; TTI: $T_{(5)}= 8,0$; $p=0,6$)

Tabla 1. Respuesta comportamental de crías machos y hembras durante la prueba de miedo

CRÍAS	MACHOS		HEMBRAS	
	N° USV	TTI	N° USV	TTI
CONTROL NEGATIVO	158(78-244,3)	4,5(0,8-14,3)	240,5(160,8-312)	15,5(8,8-24,5)
EXPERIENCIA MACHO	36(12,5-58)*	89,5(70,5-106,3)*	10(10-61,8)*	86,5(33,8-115,3)*
CONTROL POSITIVO	13(4,8-25)*	116,5(64,3-165)*	6(1,3-10)*	105(80-110,5)*

Datos expresados en mediana(RIQ) y analizados por la prueba de Kruskal Wallis seguida de la prueba U de Mann-Whitney; *p ≤ 0,05 vs. control negativo.

Activación áreas neurales relacionadas con el control del miedo en crías frente a macho anestesiado

Como se observa en la figura 4, a partir del procesamiento de las imágenes obtenidas, se observó que la tinción fue únicamente nuclear y no difirió de la expresión de c-Fos reportada en otros estudios en crías (Dent et al., 2000; Fenoglio et al., 2006; C. Wiedenmayer, 2001). Asimismo, las incubaciones realizadas sin el anticuerpo primario para c-Fos no mostraron tinción, demostrando que no se detectó una marca inespecífica.

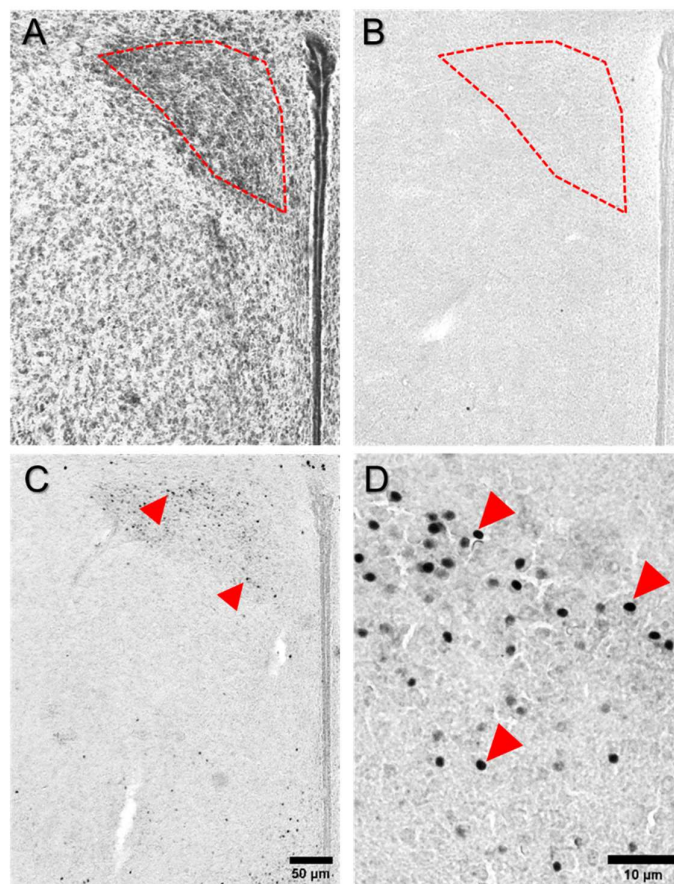


Figura 4. Fotomicrografías representativas del núcleo paraventricular bajo: A) Tinción con Nissl, B) inmunohistoquímica sin la incubación con anticuerpo primario, C) inmunohistoquímica con el anticuerpo primario c-Fos. Barra corresponde a 50 μ m. Magnificación: 10X, D) tinción de núcleos por inmunohistoquímica con el anticuerpo primario c-Fos. Barra corresponde a 10 μ m. Magnificación: 40X.

AMÍGDALA

La cuantificación de c-Fos mostró una expresión diferencial entre los grupos experimentales en distintas áreas de la amígdala tanto en machos como en hembras. En particular, las áreas activadas luego de la prueba de miedo fueron la amígdala medial, cortical, basolateral y basomedial (Figuras 5 a 8), en tanto no se observó expresión de c-Fos a nivel de la amígdala central (Tabla 2). A continuación, se describen por separado los resultados obtenidos en amígdala medial, cortical, basolateral y basomedial.

Tabla 2. Expresión de c-Fos en amígdala central (AC) frente a la prueba de miedo

	AC	
	MACHOS	HEMBRAS
Control negativo	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)
Experiencia macho	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)
Control positivo	0,8 (0,4-0,4)	0,0 (0,0-0,0)
H _(2, 16)	6,9 (p=ns)	2,0 (p=ns)

Datos expresados en mediana (RIQ) y analizados por la prueba de Kruskal Wallis.

Amígdala medial

En la figura 5 se observa el número de células positivas para c-Fos a nivel de la AMe, en donde observamos una expresión diferencial dependiendo si las crías fueron expuestas a machos intrusos o a jaula vacía (machos: $H_{(2, 16)} = 12,53$; $p \leq 0,05$; hembras: $H_{(2, 15)} = 11,83$; $p \leq 0,05$).

La exposición a machos intrusos provocó una expresión mayor de c-Fos en AMe respecto al control negativo (machos: $U_{(6,5)} = 4,0$; $p \leq 0,05$; hembras: $U_{(6,5)} = 0,5$; $p \leq 0,05$) y una expresión menor respecto a la del control positivo (machos: $U_{(6,5)} = 0,0$; $p \leq 0,05$; hembras: $U_{(6,5)} = 1,0$; $p \leq 0,05$) tanto en crías machos como en hembras. Como se esperaba, en la figura 5 se muestra que en el control positivo fue mayor la expresión de c-Fos respecto a la del control negativo en ambos sexos (machos: $U_{(5,5)} = 0,0$; $p \leq 0,05$; hembras: $U_{(5,5)} = 0,0$; $p \leq 0,05$).

En el control positivo se observó una expresión de c-Fos sexualmente diferente entre las crías, siendo mayor el número de células positivas para c-Fos en la AMe de crías machos respecto al de las hembras ($T_{(5)} = 0,0$; $p \leq 0,05$).

Amígdala cortical

Al igual que en AMe, en la ACo de crías se observó una expresión diferencial en el número de células c-Fos positivas entre las condiciones experimentales (machos: $H_{(2, 16)} = 14,15$; $p \leq 0,05$; hembras: $H_{(2, 15)} = 11,28$; $p \leq 0,05$, Figura 6). En este sentido, la exposición a machos intrusos aumentó la expresión de c-Fos en ACo respecto a la del control negativo en ambos

sexos (machos: $U_{(6,5)} = 0,0$; $p \leq 0,05$; hembras: $U_{(6,5)} = 0,0$; $p \leq 0,05$). Como era de esperarse, en el control positivo la expresión de c-Fos fue mayor respecto al control negativo en ambos sexos (machos: $U_{(5,5)} = 0,0$; $p \leq 0,05$; hembras: $U_{(5,5)} = 0,0$; $p \leq 0,05$). En tanto, la expresión de c-Fos en crías machos del control positivo fue mayor a la observada en los expuestos a macho ($U_{(6,5)} = 0,0$; $p \leq 0,05$, Figura 6).

A diferencia de lo observado en la AMe, en la ACo no se observó una expresión de c-Fos significativamente diferente entre machos y hembras de los tres grupos experimentales (control negativo: $T_{(5)} = 0,0$; $p = 0,17$; control positivo: $T_{(5)} = 1,0$; $p = 0,07$; experiencia macho: $T_{(5)} = 5,0$; $p = 0,5$).

Amígdala basomedial

Como se evidencia en la figura 7, la expresión de c-Fos varió entre las diferentes condiciones experimentales en la ABM en crías machos y hembras (machos ABM: $H_{(2, 16)} = 8,02$; $p \leq 0,05$; hembras ABM: $H_{(2, 15)} = 8,33$; $p \leq 0,05$). En este sentido, la exposición a machos intrusos incrementó la expresión de c-Fos en ABM respecto al control negativo en crías machos ($U_{(6,5)} = 3,5$; $p \leq 0,05$) pero no en hembras ($U_{(5,5)} = 4,0$; $p = 0,09$). No se observó una diferencia significativa entre la expresión de c-Fos de crías machos y hembras expuestas a machos respecto a los grupos control positivo (machos: $U_{(6,5)} = 16,0$; $p = 0,16$; hembras: $U_{(5,5)} = 5,5$; $p = 0,16$). El control positivo presentó una mayor expresión de c-Fos respecto al control negativo en ambos sexos (machos: $U_{(5,5)} = 0,0$; $p \leq 0,05$; hembras: $U_{(5,5)} = 0,0$; $p \leq 0,05$, Figura 7).

No se observaron diferencias significativas en la expresión de c-Fos dependiendo del sexo de las crías (control negativo ABM: $T_{(5)} = 0,0$; $p = \text{ns}$; control positivo ABM $T_{(5)} = 3,0$; $p = 0,22$; experiencia macho ABM $T_{(6)} = 7,0$; $p = 0,89$).

Amígdala basolateral

El número de células c-Fos positivas varió entre las diferentes condiciones experimentales en la ABL en crías machos y hembras (machos ABL: $H_{(2, 15)} = 11,64$; $p \leq 0,05$; hembras ABL: $H_{(2, 15)} = 9,87$; $p \leq 0,05$). En este sentido, la exposición a macho provocó una mayor expresión de c-Fos en ABL en crías hembras expuestas a machos intrusos ($U_{(6,5)} = 3,5$; $p \leq 0,05$), pero no en crías machos ($U_{(5,5)} = 5,0$; $p = 0,14$) respecto al control negativo. Asimismo, tanto en machos como en hembras expuestas a machos intrusos no se observó una diferencia

significativa en el número de células positivas para c-Fos respecto al control positivo (machos: $U_{(6,5)} = 7,5$; $p = 1,54$; hembras: $U_{(6,5)} = 3,0$; $p = 1,88$). Tal como se esperaba, se observó una expresión mayor de c-Fos en el control positivo respecto al control negativo en crías machos y hembras (machos: $U_{(5,5)} = 0,0$; $p \leq 0,05$; hembras: $U_{(5,5)} = 0,0$; $p \leq 0,05$, Figura 8).

No se observó una diferencia significativa entre machos y hembras en la expresión de c-Fos en esta área (control negativo ABL: $T_{(5)} = 0,0$; $p > 0,99$; control positivo ABL $T_{(5)} = 5,0$; $p = 0,5$; experiencia macho ABL $T_{(6)} = 3,0$; $p = 0,22$).

NÚCLEO PARAVENTRICULAR DEL HIPOTÁLAMO

En la figura 9 se muestra el número de células marcadas positivamente para c-Fos en el NPV del hipotálamo de crías machos y hembras luego de la prueba de miedo, expuestas previamente a machos intrusos o jaula vacía (controles negativo y positivo). Observamos una diferencia significativa en la expresión de c-Fos tanto en machos como en hembras dependiendo de la condición experimental (machos: $H_{(2, 16)} = 10,96$; $p \leq 0,05$; hembras: $H_{(2, 16)} = 11,83$; $p \leq 0,05$). En este sentido, tanto las crías machos como hembras de 8 días de edad, previamente expuestas a machos intrusos, presentaron una mayor expresión de c-Fos en comparación con las crías de 8 días de edad expuestas a jaula vacía durante los primeros cuatro días posparto (control negativo; machos: $U_{(6,5)} = 0,0$; $p \leq 0,05$; hembras: $U_{(6,5)} = 0,0$; $p \leq 0,05$) luego de la prueba de miedo; mientras que dicha expresión no se diferenció al comparar con el control positivo (machos: $U_{(6,5)} = 9,0$; $p = 0,54$; hembras: $U_{(6,5)} = 4,0$; $p = 0,052$). Tal como se esperaba, se observó un claro aumento en el número de células positivas para c-Fos en el NPV de crías del control positivo en comparación con el control negativo tanto en crías machos ($U_{(6,5)} = 0,0$; $p \leq 0,05$) como en hembras ($U_{(6,5)} = 0,0$; $p \leq 0,05$).

De forma interesante, la exposición a macho intruso provocó una expresión de c-Fos sexualmente diferente en las crías, siendo mayor el número de células positivas para c-Fos en las crías machos respecto a las hembras ($T_{(5)} = 0,0$; $p \leq 0,05$).

HIPOTÁLAMO VENTROMEDIAL

En la figura 10 se representa el número de células marcadas positivamente para c-Fos en el Hipotálamo ventromedial (HVM) de crías machos y hembras expuestos a macho intruso o jaula vacía (controles negativo y positivo). Observamos una diferencia significativa en la expresión de c-Fos tanto en machos como en hembras dependiendo de si fueron expuestos o no a machos intrusos (machos: $H_{(2, 15)} = 7,5$; $p \leq 0,05$; hembras: $H_{(2, 15)} = 8,9$; $p \leq 0,05$). Únicamente, las crías hembras de 8 días de edad previamente expuestas a machos intrusos presentaron una mayor expresión de c-Fos en comparación con las crías de 8 días de edad expuestas a jaula vacía (machos: $U_{(5,5)} = 4,0$; $p = 0,09$; hembras: $U_{(5,5)} = 3,5$; $p \leq 0,05$). No se observaron diferencias significativas tanto en crías machos como en hembras al comparar la expresión de c-Fos del grupo experiencia macho con el control positivo (machos: $U_{(5,5)} = 8,0$; $p = 0,42$; hembras: $U_{(5,5)} = 4,5$; $p = 0,09$). Finalmente, se observó un claro aumento en el número de células positivas para c-Fos en el HVM de crías del control positivo en comparación con el control negativo tanto en crías machos ($U_{(5,5)} = 0,0$; $p \leq 0,05$) como en hembras ($U_{(5,5)} = 0,0$; $p \leq 0,05$).

No se observaron diferencias significativas en la expresión de c-Fos dependiendo del sexo de las crías tanto en HVM (control negativo: $T_{(5)} = 5,0$; $p = 0,57$; control positivo: $T_{(5)} = 5,0$; $p = 0,5$; experiencia macho: $T_{(6)} = 5,0$; $p = 0,5$).

HIPOCAMPO DORSAL Y VENTRAL

En crías machos se observó una expresión de c-Fos diferencial de acuerdo al grupo experimental en el hipocampo ventral anterior (HCVa: $H_{(2, 14)} = 7,37$, $p \leq 0,05$) y en el hipocampo ventral posterior (HCVp: $H_{(2, 14)} = 5,46$, $p \leq 0,05$), mientras que en crías hembras la activación diferencial fue solamente en HCVa ($H_{(2, 14)} = 6,57$, $p \leq 0,05$, Figura 11). En cambio, en el hipocampo dorsal anterior y posterior no se observó una activación de c-Fos en ninguno de los tres grupos experimentales (mediana (RIQ) del control negativo HCDa: 0,0 (0,0-0,0), HCDp: 0,0 (0,0-0,0); experiencia macho HCDa: 0,0 (0,0-0,0), HCDp: 0,0 (0,0-0,0); y control positivo HCDa: 0,0 (0,0-0,0), HCDp: 0,0 (0,0-0,0)).

Las crías machos expuestas a macho presentaron una mayor activación de c-Fos respecto al control positivo en HCVa ($U_{(5,5)} = 1,0$; $p \leq 0,05$) y en HCVp ($U_{(5,5)} = 1,0$; $p \leq 0,05$), mientras que no se diferenciaron del control negativo en ninguna de las dos áreas (HVCa: $U_{(5,4)} = 4,0$; $p = 0,19$; HVCp: $U_{(5,4)} = 7,0$; $p = 0,88$).

En tanto las crías hembras expuestas a macho presentaron un mayor número de células positivas para c-Fos en HVCa en comparación al grupo control positivo ($U_{(5,5)} = 1,5$; $p \leq 0,05$). No se observaron diferencias significativas con el control negativo ($U_{(5,4)} = 8,5$; $p = 0,73$).

No se observaron diferencias significativas en la expresión de c-Fos dependiendo del sexo de las crías tanto en HCVa (control negativo: $T_{(5)} = 0,0$; $p > 0,99$; control positivo: $T_{(5)} = 3,0$; $p = 0,22$; experiencia macho: $T_{(6)} = 7,0$; $p = 0,89$) como en HVCp (control negativo: $T_{(5)} = 0,0$; $p > 0,99$; control positivo: $T_{(5)} = 3,0$; $p = 0,22$; experiencia macho: $T_{(6)} = 7,0$; $p = 0,89$).

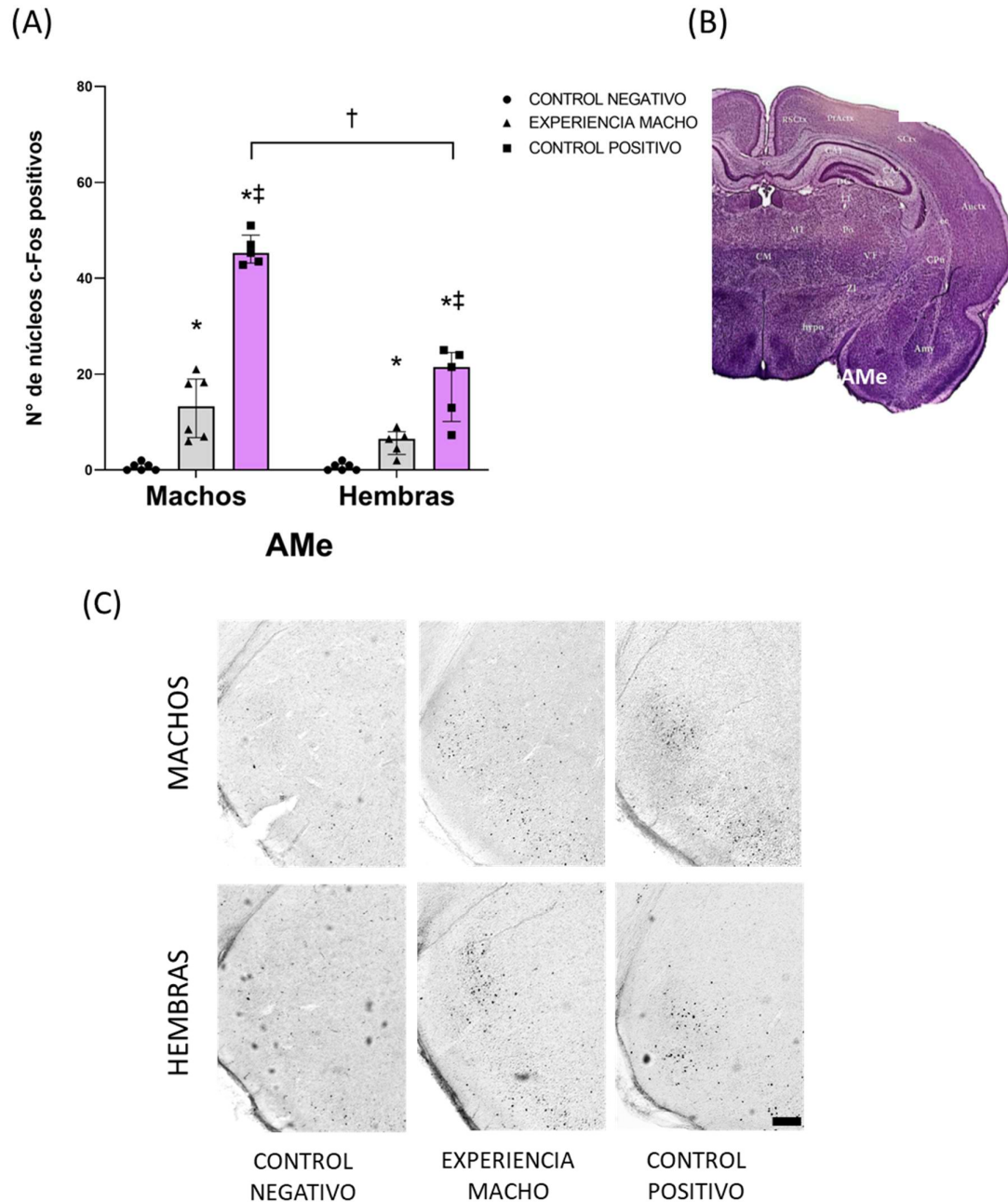


Figura 5. Expresión de c-Fos en amígdala medial (AMe) frente a macho anestesiado de crías machos y hembras de 8 días de edad expuestas previamente jaula vacía (control negativo, $n=5$, barra blanca) o machos intrusos (experiencia macho, $n=5$, barra gris) y crías machos y hembras de 14 días de edad expuestas a jaula vacía (control positivo, $n=6$, barra violeta). A) Número de núcleos c-Fos positivos en AMe. Los datos se expresan mediana (RIQ) y fueron analizados mediante la prueba de Kruskal-Wallis seguido de la prueba U de Mann-Whitney para las comparaciones entre grupos experimentales y para comparaciones entre sexos se utilizó la prueba de Wilcoxon. * $p \leq 0,05$ vs. control negativo; † $p \leq 0,05$ vs. experiencia macho. ‡ $p \leq 0,05$ vs. crías hembras. B) Figura representativa utilizada como referencia para ubicar el área en cerebro de crías (Ramachandra & Subramanian, 2016). C) Fotomicrografías representativas de la expresión de c-Fos en AMe en crías machos y hembras de los tres grupos evaluados. Barra de escala=50 μm . Magnificación: 10X.

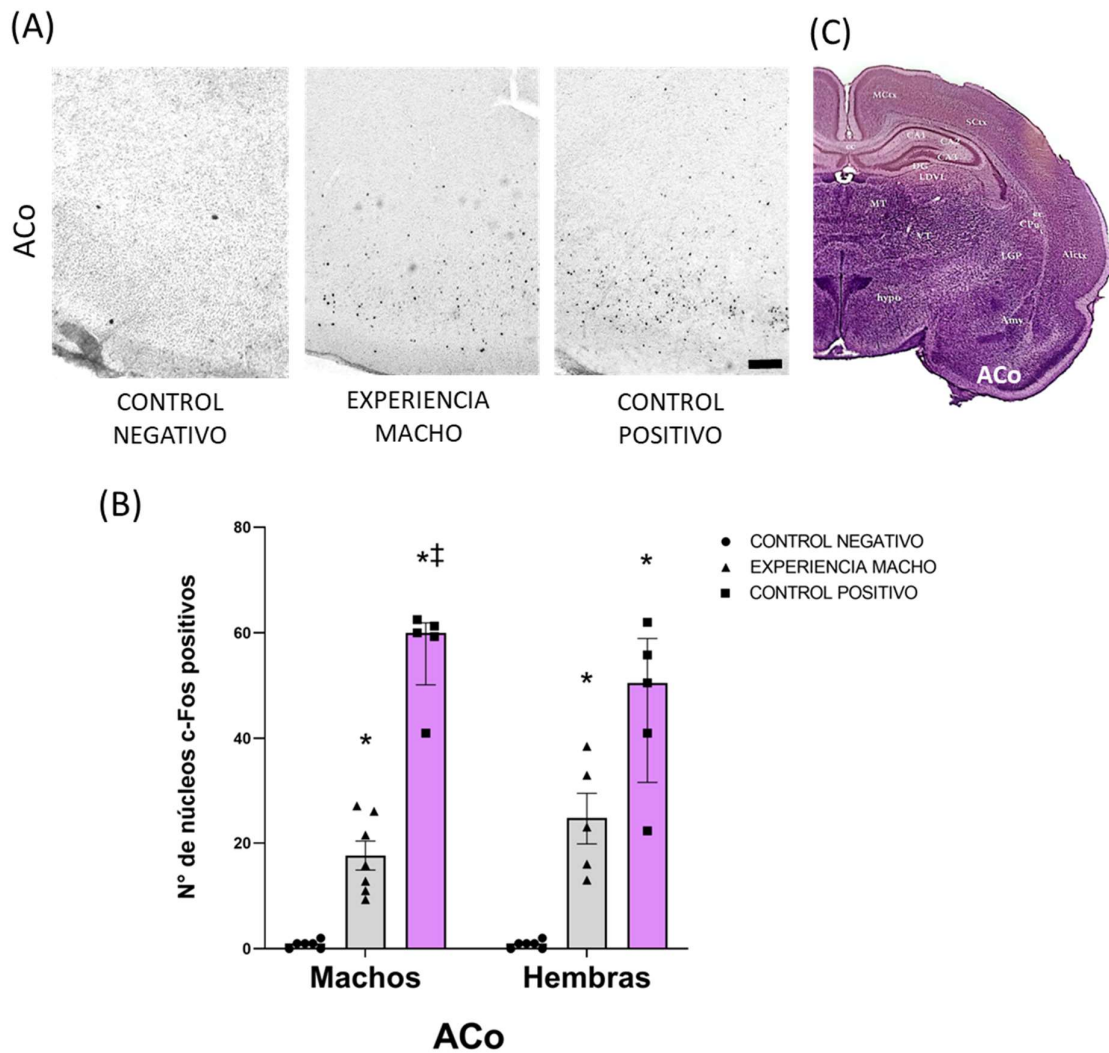


Figura 6. Expresión de c-Fos en amígdala cortical (ACo) frente a macho anestesiado de crías machos y hembras de 8 días de edad expuestas previamente jaula vacía (control negativo, $n=5$, barra blanca) o machos intrusos (experiencia macho, $n=5$, barra gris) y crías machos y hembras de 14 días de edad expuestas a jaula vacía (control positivo, $n=6$, barra violeta). A) Fotomicrografías representativas de la expresión de c-Fos en ACo en crías machos expuestas a experiencia macho o jaula vacía (control negativo y positivo). Barra de escala = 50 μm . Magnificación: 10X. B) Figura representativa que se utilizó como referencia para ubicar el área en cerebro de crías (Ramachandra & Subramanian, 2016). C) Número de núcleos c-Fos positivos en ACo. Los datos se muestran como mediana (RIQ) y fueron analizados mediante la prueba de Kruskal-Wallis seguido de la prueba U de Mann-Whitney para las comparaciones entre grupos experimentales y para comparaciones entre sexos se utilizó la prueba de Wilcoxon. $*p \leq 0,05$ vs. control negativo; $\dagger p \leq 0,05$ vs. experiencia macho.

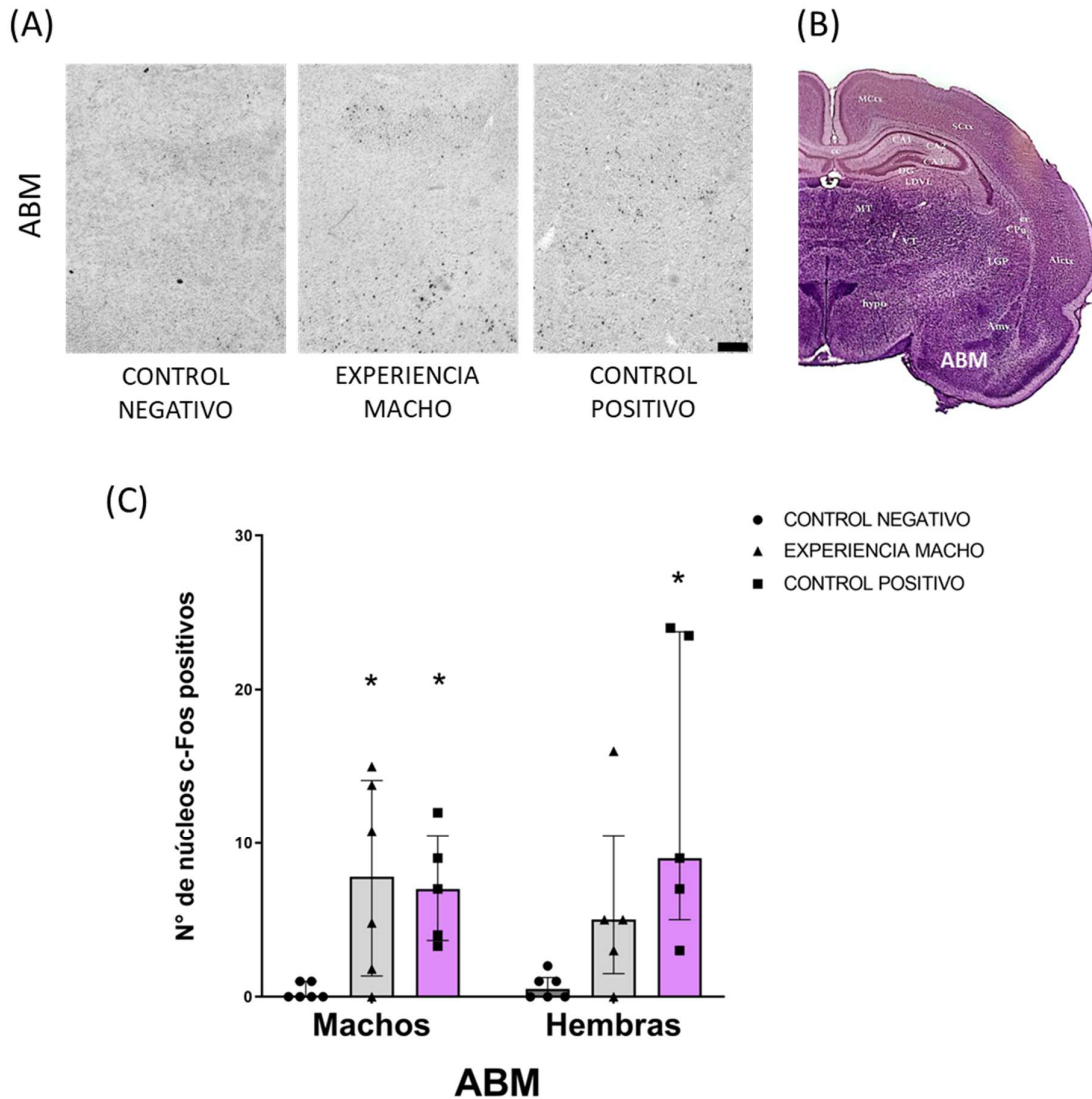


Figura 7. Expresión de c-Fos en amígdala basomedial (ABM) frente a macho anestesiado de crías machos y hembras de 8 días de edad expuestas previamente jaula vacía (control negativo, $n=5$, barra blanca) o machos intrusos (experiencia macho, $n=5$, barra gris) y crías machos y hembras de 14 días de edad expuestas a jaula vacía (control positivo, $n=6$, barra violeta). A) Fotomicrografías representativas de la expresión de c-Fos en ABM en crías machos expuestas a experiencia macho o jaula vacía (control negativo y positivo). Barra de escala=50 μm . Magnificación: 10X. B) Figura representativa que se utilizó como referencia para ubicar el área en cerebro de crías (Ramachandra & Subramanian, 2016). C) Número de núcleos c-Fos positivos en ABM. Los datos se muestran como mediana (RIQ) y fueron analizados mediante la prueba de Kruskal-Wallis seguido de la prueba U de Mann-Whitney para las comparaciones entre grupos experimentales y para comparaciones entre sexos se utilizó la prueba de Wilcoxon. * $p \leq 0,05$ vs. control negativo.

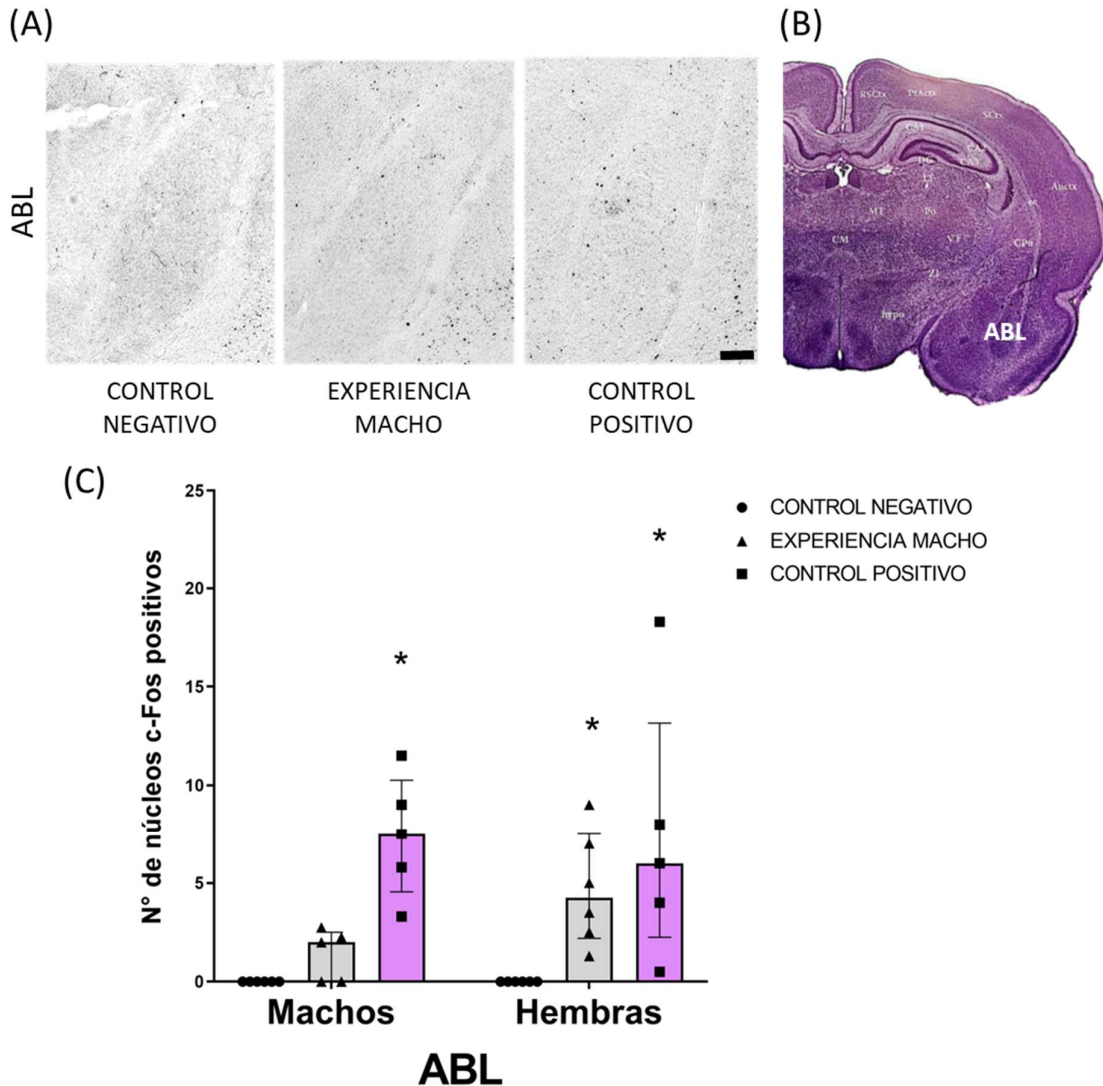


Figura 8. Activación de c-Fos en amígdala basomedial (ABL) frente a macho anestesiado de crías machos y hembras de 8 días de edad expuestas previamente jaula vacía (control negativo, $n=5$, barra blanca) o machos intrusos (experiencia macho, $n=5$, barra gris) y crías machos y hembras de 14 días de edad expuestas a jaula vacía (control positivo, $n=6$, barra violeta). A) Fotomicrografías representativas de la expresión de c-Fos en ABL en crías machos expuestas a experiencia macho o jaula vacía (control negativo y positivo). Barra de escala = 50 μm . Magnificación: 10X. B) Figura representativa que se utilizó como referencia para ubicar el área en cerebro de crías (Ramachandra & Subramanian, 2016). C) Número de núcleos c-Fos positivos en ABL. Los datos se muestran como mediana (RIQ) y fueron analizados mediante la prueba de Kruskal-Wallis seguido de la prueba U de Mann-Whitney para las comparaciones entre grupos experimentales y para comparaciones entre sexos se utilizó la prueba de Wilcoxon. $*p \leq 0,05$ vs. control negativo.

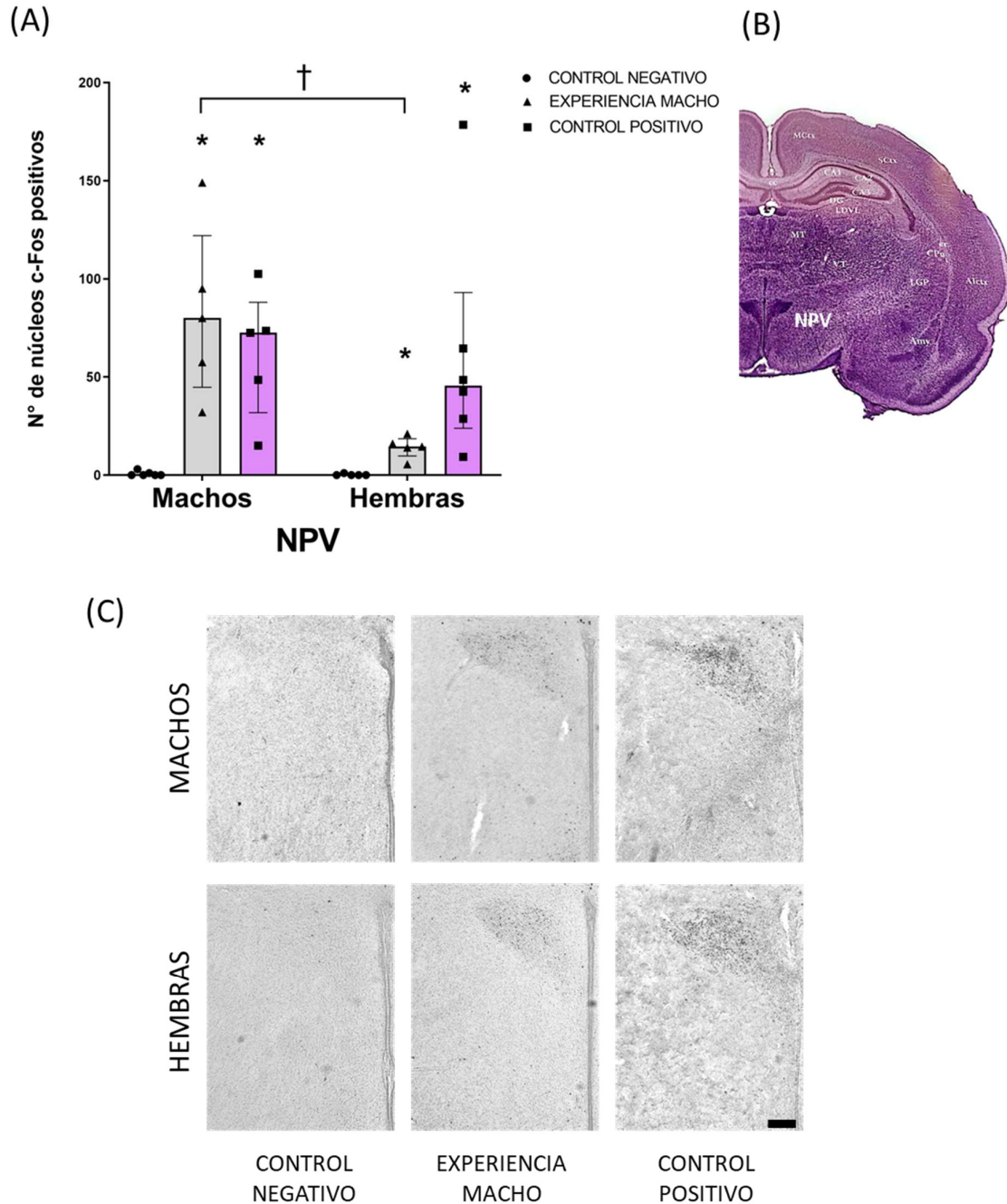


Figura 9. Expresión de c-Fos en el núcleo paraventricular (NPV) frente a macho anestesiado de crías machos y hembras de 8 días de edad expuestas previamente jaula vacía (control negativo, $n=5$, barra blanca) o machos intrusos (experiencia macho, $n=5$, barra gris) y crías machos y hembras de 14 días de edad expuestas a jaula vacía (control positivo, $n=6$, barra violeta). A) Número de núcleos c-Fos positivos en NPV. Los datos se muestran como mediana (RIQ) y fueron analizados mediante la prueba de Kruskal-Wallis seguido de la prueba U de Mann-Whitney para las comparaciones entre grupos experimentales y para comparaciones entre sexos se utilizó la prueba de Wilcoxon. $*p \leq 0,05$ vs. control negativo; $^{\dagger}p \leq 0,05$ vs. crías hembras. B) Figura representativa que se utilizó como referencia para ubicar el área en cerebro de crías (Ramachandra & Subramanian, 2016). C) Fotomicrografías representativas de la expresión de c-Fos en NPV en crías machos y hembras en los tres grupos evaluados. Barra de escala=50 μ m. Magnificación: 10X.

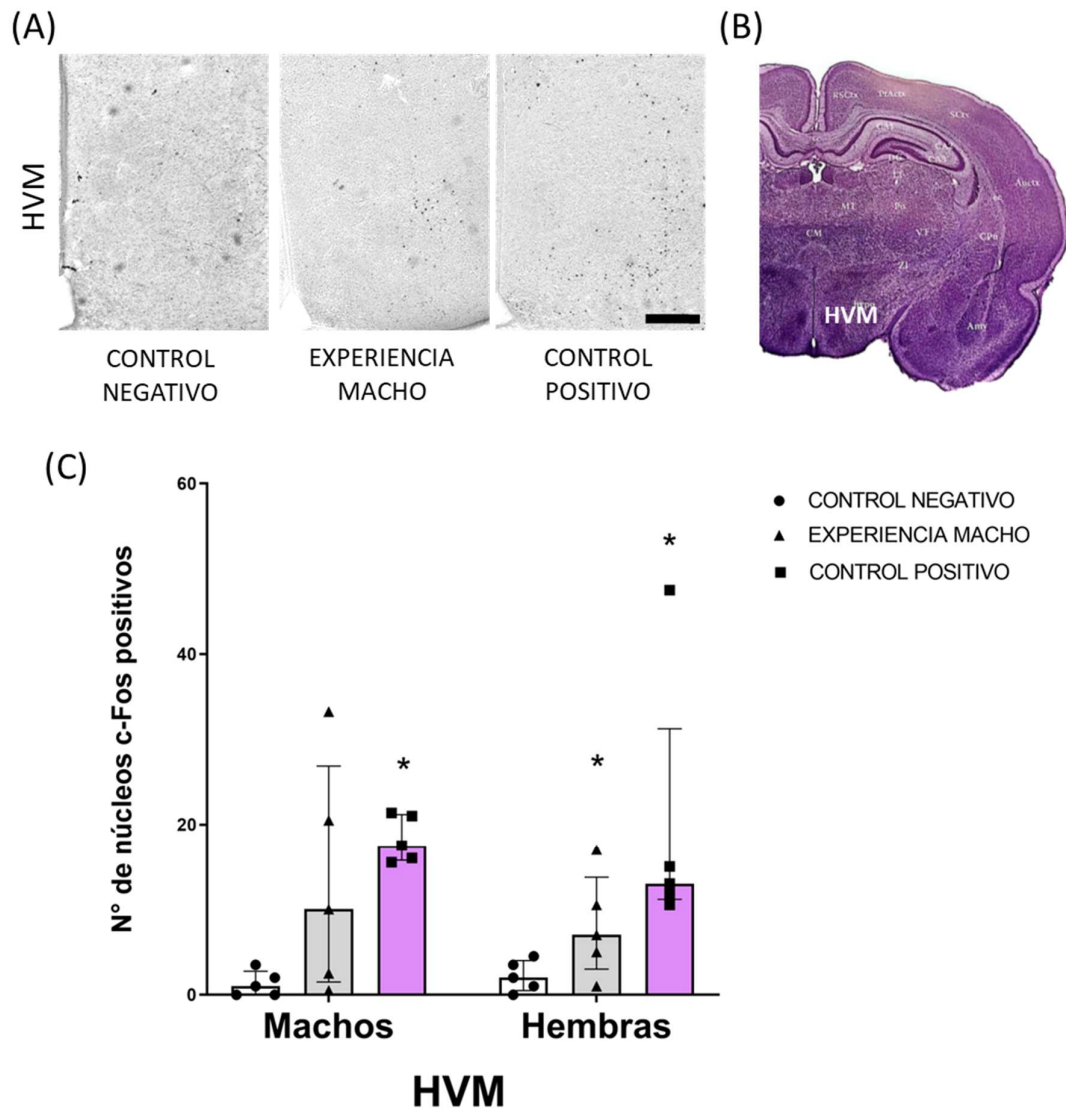


Figura 10. Expresión de c-Fos en hipotálamo ventromedial (HVM) frente a macho anestesiado de crías machos y hembras de 8 días de edad expuestas previamente jaula vacía (control negativo, n=5, barra blanca) o machos intrusos (experiencia macho, n=5, barra gris) y crías machos y hembras de 14 días de edad expuestas a jaula vacía (control positivo, n=6, barra violeta). A) Fotomicrografías representativas de la expresión de c-Fos en HVM en crías machos expuestas a experiencia macho o jaula vacía (control negativo y positivo). Barra de escala=50 μ m. Magnificación: 10X. B) Figura representativa utilizada como referencia para ubicar el área en cerebro de crías (Ramachandra & Subramanian, 2016). C) Número de núcleos c-Fos positivos en HVM. Los datos se muestran como mediana (RIQ) y fueron analizados mediante la prueba de Kruskal-Wallis seguido de la prueba U de Mann-Whitney para las comparaciones entre grupos experimentales y para comparaciones entre sexos se utilizó la prueba de Wilcoxon. *p $\leq$ 0,05 vs. control negativo.

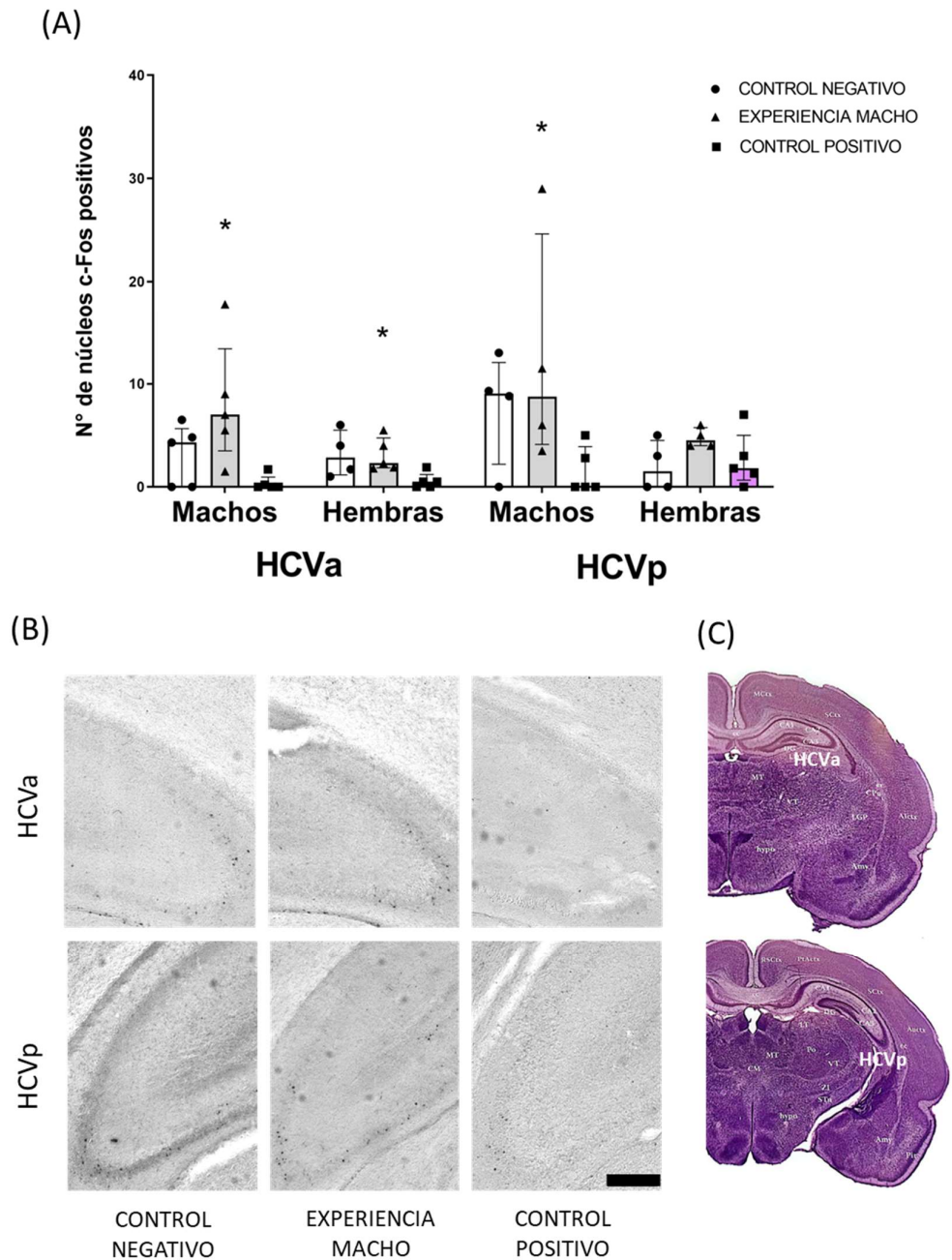


Figura 11. Expresión de c-Fos en hipocampo ventral anterior (HCVa) y posterior (HCVp) frente a macho anestesiado de crías machos y hembras de 8 días de edad expuestas previamente jaula vacía (control negativo, $n=5$, barra blanca) o machos intrusos (experiencia macho, $n=5$, barra gris) y crías machos y hembras de 14 días de edad expuestas a jaula vacía (control positivo, $n=6$, barra violeta). A) Número de núcleos c-Fos positivos en HCVa y HCVp. Los datos se muestran como mediana (RIQ) y fueron analizados mediante la prueba de Kruskal-Wallis seguido de la prueba U de Mann-Whitney para las comparaciones entre grupos experimentales y para comparaciones entre sexos se utilizó la prueba de Wilcoxon. $*p \leq 0,05$ vs. control positivo. B) Fotomicrografías representativas de la expresión de c-Fos en HCVa y HCVp en crías machos expuestas a experiencia macho o jaula vacía (control negativo y positivo). Barra de escala=50 μ m. Magnificación: 10X. C) Figura representativa utilizada como referencia para ubicar el área en cerebro de crías (Ramachandra & Subramanian, 2016).

Patrón de activación de las áreas del circuito de miedo en relación a la condición experimental y al sexo de los individuos

En la figura 12 se representa las medianas del número de células positivas de c-Fos para cada área de crías machos y hembras en cada condición experimental (control negativo, experiencia macho y control positivo). La activación de las áreas analizadas en su conjunto muestra un patrón de activación que varía dependiendo del sexo y las condiciones experimentales a las que las crías fueron expuestas. En este sentido, las áreas implicadas en la respuesta de miedo fuera del período HRE serían las mismas para machos y hembras, pero las hembras presentan una menor activación. En particular, las crías machos presentaron una diferencia significativa en la activación de AMe respecto a las crías hembras. A pesar de que el patrón entre machos y hembras expuestas a machos fue diferente, la respuesta comportamental fue la misma.

En crías machos expuestas a machos intrusos la respuesta de miedo estaría mediada por la activación del NPV y la amígdala (AMe, ACo y ABM), ya que estas áreas presentaron una mayor expresión de c-Fos respecto al control negativo. En tanto, en las crías hembras expuestas a machos intrusos la respuesta de miedo estaría relacionada con la activación de NPV, AMe, ACo, ABL y HVM. De manera interesante, los machos presentaron una mayor activación de NPV.

Al comparar el patrón de activación de las condiciones experiencia macho y el control positivo observamos que las crías machos expuestas a machos intrusos presentaron una activación en NPV similar a la registrada para el control positivo, pero a nivel de la AMe y ACo esta activación fue significativamente menor al control positivo. En tanto, en las hembras el patrón de activación, aunque tuvo una menor intensidad, fue similar entre experiencia macho y control positivo, observándose únicamente una diferencia a nivel de la AMe.

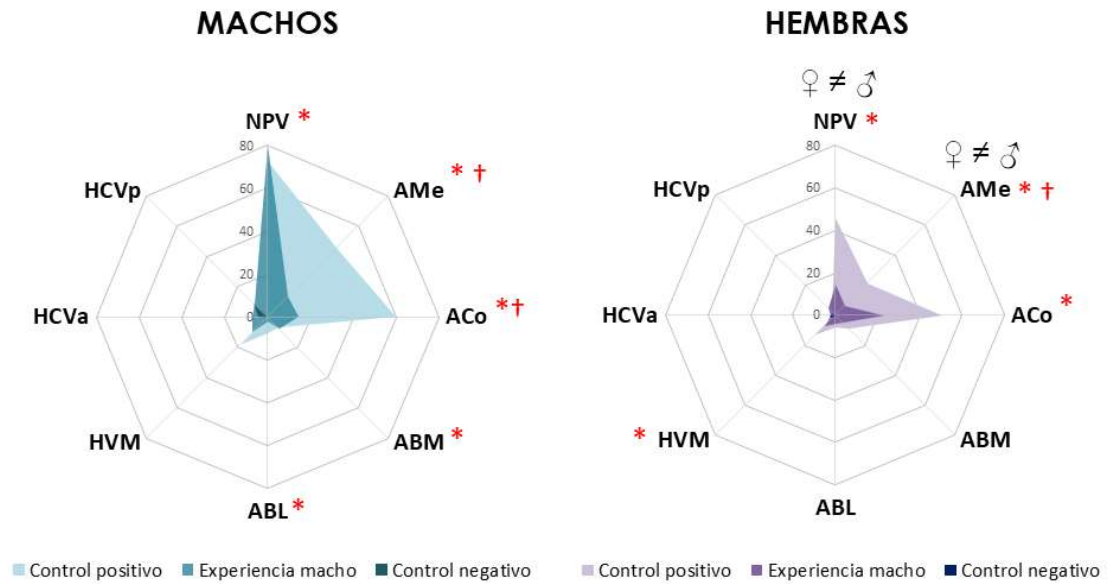


Figura 12. Representación esquemática del patrón de expresión de c-Fos en las áreas analizadas del circuito de miedo de crías machos y hembras de 8 días de edad expuestas previamente jaula vacía (control negativo, área azul oscuro y violeta oscuro) o machos intrusos (experiencia macho, área azul y violeta) y crías machos y hembras de 14 días de edad expuestas a jaula vacía (control positivo, área celeste y lila). Cada vértice de las áreas coloreadas es la mediana de la expresión de c-Fos en cada grupo experimental. El NPV presentó una mayor activación en crías machos expuestas a machos intrusos respecto a las hembras, mientras que la AMe difirió entre sexos en las crías del control positivo. * $p \leq 0,05$ experiencia macho vs. control negativo, † $p \leq 0,05$ experiencia macho vs. control positivo.

DISCUSIÓN

Los principales resultados obtenidos en este capítulo son:

- La expresión temprana de respuestas de miedo en las crías machos y hembras, generada por la exposición prolongada de la diada a machos intrusos durante los primeros días del postparto, se acompañó de la activación selectiva de áreas del circuito de miedo.
- Las crías de 14 días de edad, que ya atravesaron el período HRE, presentaron respuestas de miedo frente a un macho anestesiado y una robusta activación de áreas como el núcleo paraventricular, los sub-núcleos de la amígdala y el hipotálamo ventromedial.
- Si bien crías machos y hembras expuestas al macho intruso no difirieron en su respuesta comportamental de miedo, la actividad del circuito neural asociada a la prueba de miedo varió de acuerdo al sexo.

La exposición temprana a un macho intruso y la activación del circuito neural de miedo

Las respuestas de miedo en crías machos y hembras expuestas previamente a machos intrusos en la caja materna durante el período de HRE se acompañó de la activación de las mismas áreas neurales que se activan en crías de 14 días de edad (fuera del período de HRE). En particular, crías de 8 días de vida previamente expuestas a macho intruso y crías de 14 días de vida previamente expuestas a una jaula vacía, exhibieron una expresión robusta de c-Fos en respuesta a un macho anestesiado en las subdivisiones de la amígdala medial, cortical, basomedial y basolateral (AMe, ACo, ABM y ABL), así como en el núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV) y el hipotálamo ventromedial (HVM), áreas fuertemente involucradas en la organización de la respuesta de miedo (Figura 13) (Pentkowski et al., 2006; Pitkänen et al., 1997, 2000; Silva et al., 2013; Takahashi, 2014; C. Wiedenmayer, 2001). Este resultado sugiere que el mismo circuito neural es responsable de

la expresión de miedo dentro del período de HRE que luego del mismo, y por ende esta respuesta comportamental temprana se debe a su activación temprana.

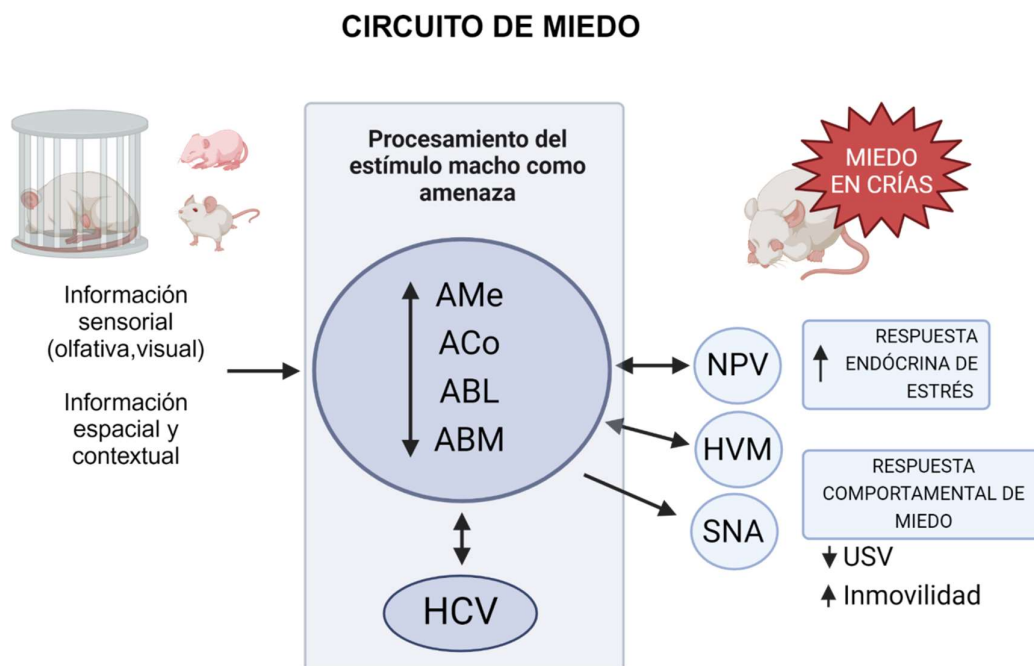


Figura 13. Esquema de áreas implicadas en la organización de la respuesta de miedo. Dependiendo de la edad y el grado de desarrollo de las crías, la amígdala recibe información sensorial (olfativa y visual) e información espacial o contextual, la cual es procesada por los distintos sub núcleos amigdaloides (AMe, ACo, ABL, ABM) y el hipocampo ventral para asignarle al estímulo macho el valor de aversivo. Posteriormente, la amígdala influye en la actividad de áreas como el núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV), hipotálamo ventromedial (HVM) y núcleos del tronco encéfálico relacionados con la respuesta autónoma para provocar la respuesta endócrina y comportamental de miedo.

Estos resultados concuerdan con un estudio previo (C. Wiedenmayer, 2001) donde se reportó una expresión de c-Fos a nivel de NPV de crías de 14 días de vida. Sin embargo, la ontogenia de la activación de los sub-núcleos de la amígdala difieren entre ese trabajo y nuestros resultados. En particular, Weindenmayer y Barr (2001) reportaron expresión de c-Fos principalmente en la amígdala lateral de crías de 14 días y luego en la AMe y ACo de crías de 21 días frente a un macho anestesiado. Esta discrepancia podría deberse a diferencias en los diseños experimentales utilizados en ambos trabajos, ya que el protocolo de Weindenmayer y Bar (2001) consiste en la exposición de todas las crías de la camada juntas durante la prueba de miedo y no de forma individual como en este trabajo. En este sentido, se ha demostrado que el contacto de las crías entre sí disminuye los niveles de estrés (Morrison, 2016) por lo que la experiencia generada en el experimento de

Weindenmayer y Barr (2001) puede tener un menor valor aversivo que la provocada en esta tesis.

En concordancia con la existencia de cambios a lo largo de la ontogenia en la activación neural asociada a la respuesta de miedo en crías planteada por Weindenmayer y Barr (2001), en la presente tesis las crías de 8 días de edad previamente expuestas a macho, tanto hembras como machos, exhibieron una expresión de c-Fos menor que las crías de 14 días de vida en la AMe y ACo. Esta diferencia puede estar asociada a la maduración de estas áreas en este período (C. Wiedenmayer, 2001).

¿Qué rol juegan las áreas del circuito de miedo en las respuestas de miedo de las crías?

- ***Amígdala: procesadora de los estímulos aversivos y modulador de la respuesta de miedo***

El aumento en la expresión de c-Fos a nivel de la amígdala medial, cortical, basomedial y basolateral en comparación al control negativo en crías previamente expuestas a machos concuerda con el papel crucial de la amígdala en la detección de amenazas, la generación de conductas de miedo y en la modulación del aprendizaje y la memoria de miedo (Gross & Canteras, 2012; LeDoux, 2000; Pessoa & Adolphs, 2010; Rosen & Donley, 2006). En este sentido, otros estudios también reportan una intensa inducción de c-Fos luego de la exposición a factores estresantes como la exposición a depredadores, la separación maternal, la inmovilización y un co-específico dominante en adultos (Cullinan et al., 1995; Daskalakis et al., 2014; Day et al., 2004; Fekete et al., 2009; Hoffman et al., 2013; Masini et al., 2005; Razavi et al., 2020).

La amígdala es una estructura compleja, integrada por varios núcleos que desempeñan diversas funciones y a los cuales converge información multisensorial proveniente de distintas regiones del SN (Pitkänen et al., 1997). En particular, la AMe y la ACo reciben proyecciones tanto directas como indirectas del sistema olfativo y, por lo tanto, son relevantes en el procesamiento de estímulos olfativos asociados con experiencias emocionales y sociales (Collins, 2011; Gall et al., 1998; Otto et al., 2000; Shipley & Adamek, 1984). A su vez, la ABL también integra y procesa información multisensorial (olfativa, auditiva, visual, gustativa, somatosensorial), así como información espacial y contextual

(Maren, 1999; McDonald, 1998; Pitkänen et al., 2000). Lesiones en la AMe y la ACo en ratas adultas se asocian con un incremento en la frecuencia de interacciones con un gato sedado (R. J. Blanchard & Blanchard, 1972; Collins, 2011; Gross & Canteras, 2012, 2012), fomentan la exploración de objetos con olor de un depredador (Li et al., 2004) y reducen notablemente los comportamientos de huida y conductas defensivas (Kemble et al., 1984, 1990). Asimismo, en ratas adultas se ha reportado una activación de c-Fos en ABL tras la exposición a estímulos aversivos (Day et al., 2004; Masini et al., 2005; Staples et al., 2008). Sin embargo, hay resultados contradictorios sobre su contribución al control de la respuesta de miedo. Algunos estudios indican que la inactivación o lesiones en el ABL no producen deterioro significativo en la respuesta de inmovilidad (Müller & Fendt, 2006; Wallace & Rosen, 2001), mientras que otros sí lo hacen (Takahashi et al., 2007; Vazdarjanova et al., 2001).

En base a esta evidencia, la activación de c-Fos en AMe, ACo y ABL de crías tanto del grupo experiencia macho como del control positivo podría reflejar el procesamiento multisensorial del estímulo macho durante la prueba de miedo y contribuir a la asignación de valor aversivo o de amenaza a este estímulo (Bergan et al., 2014; Swanson & Petrovich, 1998), así como a la expresión de la respuesta de inmovilidad (Takahashi et al., 2007; Vazdarjanova et al., 2001).

Por otro lado, la AMe modula la activación del eje HHA a través de proyectar a NPV (Herman et al., 2005; Ivanova et al., 2023). En este sentido, lesiones en la AMe reducen la secreción de ACTH y/o CORT después de un evento de estrés (Feldman et al., 1994; Van de Kar et al., 1991), mientras que su estimulación aumenta la actividad del eje HHA (Dunn & Whitener, 1986; Redgate & Fahringer, 1973), por lo que su activación temprana en el grupo experiencia macho podría repercutir en la actividad del NPV.

La activación de ABM en los grupos experiencia macho y control positivo concuerda con otro estudio en ratas adultas donde también se observa una activación de esta área frente a estímulos aversivos (Martinez et al., 2011). La activación de ABM podría estar asociada con la modulación de núcleos ubicados en el tronco encefálico. En este sentido, la ABM modula el funcionamiento del núcleo parabraquial, implicado en la regulación de funciones autónomas, como la respiración (Saper & Loewy, 1980). Dado que las USV en crías se generan por variaciones en la frecuencia ventilatoria (Dupin et al., 2019; Lesch et al., 2021), la modulación de estos núcleos podría permitir la reducción de USV observada frente a la

presencia del macho anestesiado. A su vez, lesiones o inactivaciones de ABM resultan en la inhibición de la respuesta comportamental de inmovilidad en adultos (Takahashi et al., 2007; Vazdarjanova et al., 2001), con lo cual también podría estar implicada con modulación de la respuesta de inmovilidad frente al macho anestesiado.

No todos los núcleos de la amígdala están involucrados en la modulación de la respuesta de miedo en crías frente a macho anestesiado. En este sentido, se observó una ausencia de expresión de c-Fos en AC tanto en el control positivo como en la experiencia macho, la cual coincide con lo reportado previamente por Weindenmayer y Barr (2001). Esta área junto con ABL estarían más involucradas con el aprendizaje y la memoria durante el condicionamiento de miedo (Gross & Canteras, 2012; LeDoux, 2000; Pessoa & Adolphs, 2010; Rosen & Donley, 2006) y no con las respuestas innatas de miedo (Takahashi, 2014). En este sentido, lesiones o inactivación temporal del AC resultan ineficaces para atenuar la respuesta innata de miedo frente a olor a depredador (Fendt et al., 2003).

- ***Núcleo paraventricular del hipotálamo: activador de la respuesta endócrina al estrés***

El incremento en la expresión de c-Fos en el NPV de las crías de 8 días de vida, previamente expuestas a macho, podría indicar la activación del eje HHA en respuesta a la presencia del macho anestesiado, ya que este núcleo es clave en la coordinación de la respuesta endocrina al estrés, a través de la síntesis y liberación de la hormona liberadora de corticotropina (CRH). Esta hormona, producida por las neuronas parvocelulares del NPV (Wamsteeker Cusulin et al., 2013), modula la liberación de ACTH desde la hipófisis y por ende la liberación, desde las glándulas adrenales, de glucocorticoides como la CORT en roedores (Grammatopoulos, 2012; Ulrich-Lai & Herman, 2009). Se ha vinculado la expresión de c-Fos en NPV con un aumento en los niveles de CRH tanto en ratas adultas como en crías (Dent et al., 2000; Imaki et al., 1995). Particularmente, en crías se ha visto una relación entre los niveles de c-Fos en NPV y la respuesta endócrina del eje HHA (Dent et al., 2000). La exposición a machos intrusos por 10 minutos de crías de 14 días de edad genera un aumento en los niveles de ACTH y CORT (Takahashi, 1992a; C. P. Wiedenmayer et al., 2003). A su vez, la AMe, que también exhibió aumento en la expresión de c-Fos en crías previamente expuestas a macho, proyecta al NPV modulando su actividad y la liberación de CRH (Ulrich-Lai & Herman, 2009). En base a estas evidencias, podemos proponer que en estas crías, el macho anestesiado adquiere un valor aversivo por el procesamiento en los sub

núcleos de la amígdala, que desencadena una respuesta endócrina de estrés a través de la activación del NPV. Es fundamental en experimentos futuros cuantificar la respuesta del eje HHA a un macho anestesiado en crías en el período de HRE previamente expuestas a macho.

Por otra parte, estudios en ratas adultas han demostrado que la arginina vasopresina (AVP), producida por las neuronas magnocelulares del NPV (Zhao & Ai, 2011), ejerce una acción sinérgica sobre la liberación de ACTH (Rivier & Vale, 1983; Wotjak et al., 1996). Curiosamente, la AVP parece ser el principal mediador de la respuesta de ACTH en crías de 18 días de edad, debido a una expresión más rápida y robusta del ARNm de AVP en comparación con la respuesta del gen CRH (Dent et al., 2000). En base a esta evidencia, podríamos considerar que la expresión de c-Fos en NPV y la respuesta del eje HHA también estén asociadas a un aumento en la expresión de AVP. Sería interesante explorar si la exposición a macho influye sobre los niveles de CRH y AVP en las crías dentro y fuera del período de HRE. Asimismo, sería interesante caracterizar a las poblaciones de neuronas magno y parvocelulares del NPV en crías y determinar si la exposición a intruso influye sobre su fisiología.

- ***Hipotálamo ventromedial: mediador de la respuesta comportamental de miedo***

El HVM tiene un rol central en el circuito de control del miedo ya que recibe información directa de áreas de procesamiento sensorial olfativo como la AMe y la ACo (Bergan et al., 2014; Choi et al., 2005; Swanson & Petrovich, 1998) necesarias para detectar estímulos relacionados con amenazas, y al mismo tiempo proporciona la salida directa al área gris periacueductal (PAG) implicada en las respuestas comportamentales defensivas (D. C. Blanchard et al., 1981; Deng et al., 2016; Graeff, 1994; Motta et al., 2009). Por este motivo, el incremento en la expresión de c-Fos en el HVM de crías de 8 días expuestas previamente a macho y de crías de 14 días expuestas a jaula vacía, podría mediar su respuesta comportamental de miedo frente a macho anestesiado.

Es importante destacar que este es el primer estudio que evalúa el rol del HVM en las respuestas de miedo en crías. Sería interesante profundizar en el rol del HVM en la respuesta de miedo de las crías hacia machos intrusos.

- **Hipocampo**

En estudios previos se ha observado que el hipocampo se activa selectivamente en función del tipo específico de estímulo aversivo al que los individuos se enfrentan. En este sentido, la exposición a depredadores activa el HCV de ratas adultas (Day et al., 2004; Heale et al., 1994; Phillips & LeDoux, 1992) y únicamente lesiones en esta región, pero no en HCD, inhiben las respuestas de miedo frente al olor de gato (Pentkowski et al., 2006). Al igual que en ratas adultas, el HCD no participaría de la respuesta de miedo en crías, dado que no se observó una activación de c-Fos en esta área (Fanselow & Dong, 2010; Takahashi, 2014). En contraste con lo observado en adultos, las crías de 14 días de edad, que presentan una respuesta de miedo hacia macho anestesiado, no presentaron una activación de c-Fos en HCV. A su vez, en crías de 8 días de edad expuestas a macho se observó una mayor activación de c-Fos en HCV respecto al control positivo, sin embargo, estas crías no se diferenciaron de las expuestas a jaula vacía (control negativo). Tomando en cuenta estos resultados no podemos descartar que el HCV esté involucrado en la respuesta de miedo de crías durante el periodo de HRE. Su implicancia en la respuesta de miedo podría estar asociada al reforzamiento en el procesamiento sensorial del estímulo macho como estímulo aversivo ya que posee conexiones recíprocas con AMe, ACo y el bulbo olfatorio (Kim & Fanselow, 1992; Phillips & LeDoux, 1992; W. N. Zhang et al., 2001).

Patrón de activación del circuito de miedo: influencia de la condición experimental y el sexo de los individuos

Si bien no observamos diferencias en la respuesta comportamental de miedo dentro y fuera del periodo HRE, al integrar la expresión de c-Fos en las diferentes áreas del circuito de miedo emergen diferencias en el patrón de activación y la intensidad de la misma de acuerdo a la condición experimental y el sexo de los individuos (Figura 12).

En las hembras el patrón de activación fue similar entre experiencia macho y control positivo, lo que sugiere que el circuito neural de miedo se está activando durante el período de hiporespuesta, pero el mismo aún está madurando. De forma interesante, las crías machos expuestas a machos intrusos presentaron un patrón de activación del circuito neural de miedo con predominancia del NPV. A diferencia de la alta expresión de c-Fos en NPV, AMe y ACo observada en los machos de 14 días de vida. Este resultado podría deberse a que la maduración del circuito de miedo difiere entre ambos sexos, y/o a que el efecto de la

experiencia con un macho intruso tiene un efecto diferente en crías hembras y machos. Estas hipótesis se refuerzan por el hecho de que tanto en las crías de 8 días expuestas a macho intrusos como en las de 14 días de vida los machos exhibieron una mayor expresión de c-Fos en el circuito de miedo, y durante el período de hiporespuesta el patrón de activación de este circuito difirió de acuerdo al sexo. En este sentido, durante la etapa postnatal temprana aún están ocurriendo procesos de maduración y organización del SN diferentes en machos y hembras (Bock et al., 2005, 2014; Cirulli et al., 2003, 2010; Garvin & Bolton, 2022; Kikusui et al., 2009).

La expresión mayor de c-Fos en el NPV de crías machos respecto a las crías hembras de 8 días de vida previamente expuestas a un macho, concuerda con otros estudios donde se identificaron diferencias de sexo en la organización y función de este núcleo del hipotálamo (Bingham et al., 2006; Garvin & Bolton, 2022; Heck & Handa, 2019; Renard et al., 2010). En este sentido, se ha reportado que las células del NPV en ratas macho tienden a ser más grandes y exhiben una mayor densidad de receptores para hormonas esteroideas en comparación con las de las hembras (Bingham et al., 2006). En tanto, en ratas adultas se observa una mayor cantidad de neuronas AVP activadas en hembras que en machos en respuesta a un estesor (Renard et al., 2010). Asimismo, las experiencias adversas tempranas alteran la función microglial y la poda sináptica en NPV, resultando en un mayor número de sinapsis excitadoras en las neuronas PVN-CRH positivas en crías machos que en hembras (Garvin & Bolton, 2022). Por lo tanto, estas diferencias en la actividad neuronal y la sensibilidad a la señalización hormonal y experiencias tempranas entre los sexos en el NPV durante el desarrollo postnatal, podrían influir en la maduración y función de los circuitos neuroendocrinos que regulan la respuesta al estrés, la homeostasis y otros procesos fisiológicos cruciales (Bingham et al., 2006; Garvin & Bolton, 2022; Heck & Handa, 2019; Renard et al., 2010; Sánchez-Lafuente et al., 2022; Winkelmann-Duarte et al., 2007).

Debido a que observamos una expresión diferencial de c-Fos en el núcleo paraventricular entre machos y hembras expuestas a macho, que no se replicó en crías de 14 días. Sería interesante profundizar en la organización del circuito de miedo, en particular analizando el rol del núcleo paraventricular del hipotálamo y la respuesta endócrina asociada a su activación. En este sentido, proponemos determinar si existen diferencias entre crías machos y hembras de 8 y 14 días de vida, expuestas o no a macho en los niveles de CRH y AVP, así como en las poblaciones de neuronas magno y parvocelulares asociadas a la síntesis de estas hormonas.

La mayor expresión de c-Fos en la AMe detectada en crías machos de 14 días de edad respecto a hembras, previamente expuestas a jaula vacía, está en consonancia con investigaciones previas que han identificado marcadas diferencias sexuales en esta región. En particular, se ha reportado un mayor volumen del área, del tamaño neuronal y la densidad de receptores para andrógenos y/o estrógenos en machos respecto a hembras (Cooke et al., 2007; Simerly et al., 1990), así como diferencias funcionales (Cooke & Woolley, 2009). El hecho de que las diferencias de sexo en AMe se observaron en un grupo que no fue expuesto a un ambiente temprano adverso, nos permite concluir que la exposición a macho no estaría involucrada en este proceso de diferenciación sexual, sino que podemos atribuirlo a los efectos organizacionales sobre la AMe de las hormonas gonadales. En este sentido, los machos presentan elevados niveles de testosterona hasta el DPN 6-10 y la administración de estradiol y testosterona desde el DPN 1 hasta el DPN 30 masculiniza el volumen de AMe en ratas (Nishizuka & Arai, 1981a, 1981b, 1982).

El hecho de que el patrón de activación de las áreas neurales difiera entre crías machos y hembras expuestas a machos y aquellas que están fuera del periodo HRE, sugiere que la relevancia relativa de las áreas cambia de acuerdo a la edad y/o al efecto de las experiencias adversas vividas. Sería interesante evaluar si el patrón de activación cambia en crías expuestas a machos a mediada que se avanza en el periodo de HRE. Futuros experimentos podrían abordar esto.

iii. CAPÍTULO II. EFECTO DE LA EXPOSICIÓN TEMPRANA A UN MACHO INTRUSO SOBRE EL COMPORTAMIENTO DE LA MADRE Y LA MEMORIA OLFATIVA DE LAS CRÍAS

Las modificaciones en el ambiente postnatal temprano también pueden afectar los procesos de aprendizaje olfativo de las crías (do Prado et al., 2016; Garcia et al., 2013; McEwen, 2000). A partir del DPN 10 las crías pueden caminar y desplazarse, lo que aumenta la posibilidad de que salgan del nido sin estar bajo el cuidado materno, por lo que es fundamental poder reconocer y orientarse hacia el nido. El aprendizaje del olor materno surge prenatalmente, continúa durante el periodo postnatal y es mantenido por los cuidados maternos (Raineke et al., 2010). Hasta el momento tampoco se ha estudiado qué ocurre con este comportamiento relevante para la supervivencia de las crías, como el reconocimiento del nido materno, una vez finalizada la exposición al macho.

Por lo tanto, este capítulo profundizará en los efectos sobre las crías de la exposición a macho intruso una vez concluida la experiencia adversa.

HIPÓTESIS

La exposición de la díada madre-crías a machos intrusos afecta el reconocimiento del olor del nido materno por parte de las crías luego de la exposición/experiencia adversa.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si luego de la exposición de la díada madre-crías a un macho intruso modifica la capacidad de reconocimiento del nido de las crías.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Evaluar si la exposición previa a macho intruso afecta la preferencia por el olor materno de crías de 11 días de edad luego de la exposición, y si esta posible afectación varía de acuerdo al sexo de las crías.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Experimento 1. Efecto de la exposición a machos sobre el reconocimiento del nido de las crías

Del DPN 1 al 4, hembras primíparas lactantes junto a sus crías fueron expuestas en la caja materna a macho intruso ($n_{\text{díadas}}=12$) o jaula vacía (control, $n_{\text{díadas}}=10$) de acuerdo al protocolo de exposición a intrusos descrito anteriormente. En el DPN 11, evaluamos la preferencia a olor del nido materno de crías machos y hembras expuestas a la condición control o macho intruso de acuerdo al protocolo previamente descrito. Las pruebas se realizaron durante la fase de luz del ciclo (de 1000 a 1200 h, Figura 14).

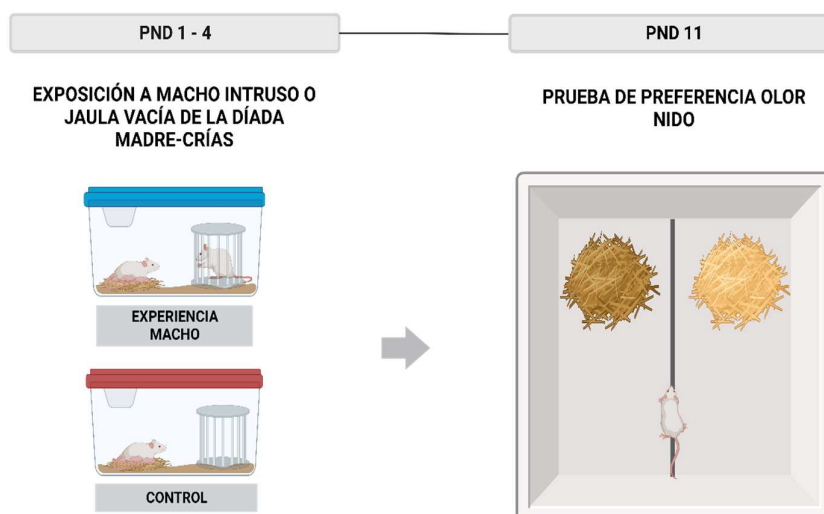


Figura 14. Representación esquemática del procedimiento realizado. Las díadas madre-crías fueron expuestas a un macho intruso dentro de una jaula (experiencia macho) o una jaula vacía (control) en la caja materna del DPN 1-4. En el DPN 11, una cría macho y una cría hembra de los grupos experimentales fueron expuestos individualmente a la prueba de preferencia a olor materno.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se expresan como medianas (rango intercuartil, RIQ) dada la falta de una distribución normal u homogeneidad de varianzas (Siegel, 1956). En la prueba de reconocimiento del nido, el tiempo de permanencia, el número de entradas y la latencia entrar entre las distintas áreas de las crías se analizó mediante la prueba de Wilcoxon y el análisis del efecto de la convivencia con machos sobre la prueba de preferencia a nido se analizó con la prueba U de Mann-Whitney. Dado que las crías machos y hembras provienen

de la misma camada, las comparaciones entre sexos se realizaron mediante la prueba de Wilcoxon. En todos los casos el nivel de significación estadística seleccionado fue $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

Experimento 1. Efecto de la exposición a machos sobre el reconocimiento del nido de las crías

Como se muestra en la figura 15, las crías machos expuestas a machos intrusos a jaula vacía permanecieron más tiempo en el área con viruta de nido que en el área con viruta limpia o en el área neutral (experiencia macho: nido vs. limpia: $T_{(11)} = 0,0$; $p \leq 0,05$; nido vs. neutral: $T_{(11)} = 0,0$; $p \leq 0,05$; control: nido vs. limpia: $T_{(10)} = 0,0$; $p \leq 0,05$; nido vs. neutral: $T_{(10)} = 0,0$; $p \leq 0,05$). Asimismo, las crías machos de ambos grupos mostraron un tiempo de permanencia mayor en el área neutral respecto al área limpia (experiencia macho: neutral vs. limpia: $T_{(11)} = 0,0$; $p \leq 0,05$; control: neutral vs. limpia: $T_{(10)} = 7,0$; $p \leq 0,05$).

Las crías hembras del grupo control presentaron una mayor permanencia en el área con viruta de nido que en el área con viruta limpia o neutral (nido vs. limpia: $T_{(10)} = 1,0$; $p \leq 0,05$; nido vs. neutral: $T_{(10)} = 0,0$; $p \leq 0,05$). No se observó una diferencia significativa entre los tiempos de permanencia entre el área con viruta limpia y el área neutra (limpia vs. neutral: $T_{(10)} = 0,0$; $p \leq 0,05$). En tanto, las crías hembras expuestas a macho permanecieron más tiempo en el área con viruta de nido respecto al área con viruta limpia ($T_{(12)} = 0,0$; $p \leq 0,05$), pero no con el área neutral ($T_{(12)} = 32,0$; $p = 0,58$). De forma interesante, el tiempo de permanencia en el área neutral fue mayor respecto al área con viruta limpia ($T_{(12)} = 0,0$; $p \leq 0,05$, Figura 15).

La comparación de las preferencias entre sexos en el grupo control, no arrojó diferencias significativas en el tiempo de permanencia en las áreas con viruta de nido o limpia (nido: $T_{(10)} = 25,0$; $p = 0,8$; limpia: $T_{(10)} = 18,0$; $p = 0,3$). Sin embargo, las hembras del grupo control pasaron más tiempo en el área neutral en comparación con los machos ($T_{(10)} = 0,0$; $p \leq 0,05$). Por otro lado, la experiencia macho previa afectó el tiempo de permanencia en las áreas dependiendo del sexo de las crías. Así, las crías hembras expuestas a machos disminuyeron el tiempo de permanencia en el área con viruta del nido ($T_{(11)} = 0,0$; $p \leq 0,05$).

y aumentaron el tiempo en el área neutra ($T_{(11)} = 0,0$; $p \leq 0,05$) en comparación con las crías machos del mismo grupo (Figura 15).

Al comparar el comportamiento de las crías entre los grupos experimentales observamos que las hembras expuestas a machos disminuyeron el tiempo de permanencia en el área con viruta del nido en comparación con el grupo control ($U_{(10,12)} = 8,0$; $p \leq 0,05$) y aumentaron el tiempo de permanencia en el área neutra ($U_{(10,12)} = 0,0$; $p \leq 0,05$). No se observó diferencia significativa en el tiempo de permanencia en el área con viruta limpia entre los grupos ($U_{(10,12)} = 45,0$; $p = 0,3$). En tanto, los machos expuestos a macho solo aumentaron el tiempo de permanencia en el área neutra ($U_{(10,12)} = 12,0$; $p \leq 0,05$), pero el tiempo de permanencia en las áreas con viruta del nido o viruta limpia no difirió del control ($U_{(10,11)} = 53,0$; $p = 0,9$; $U_{(10,11)} = 29,0$; $p = 2,0$; respectivamente).

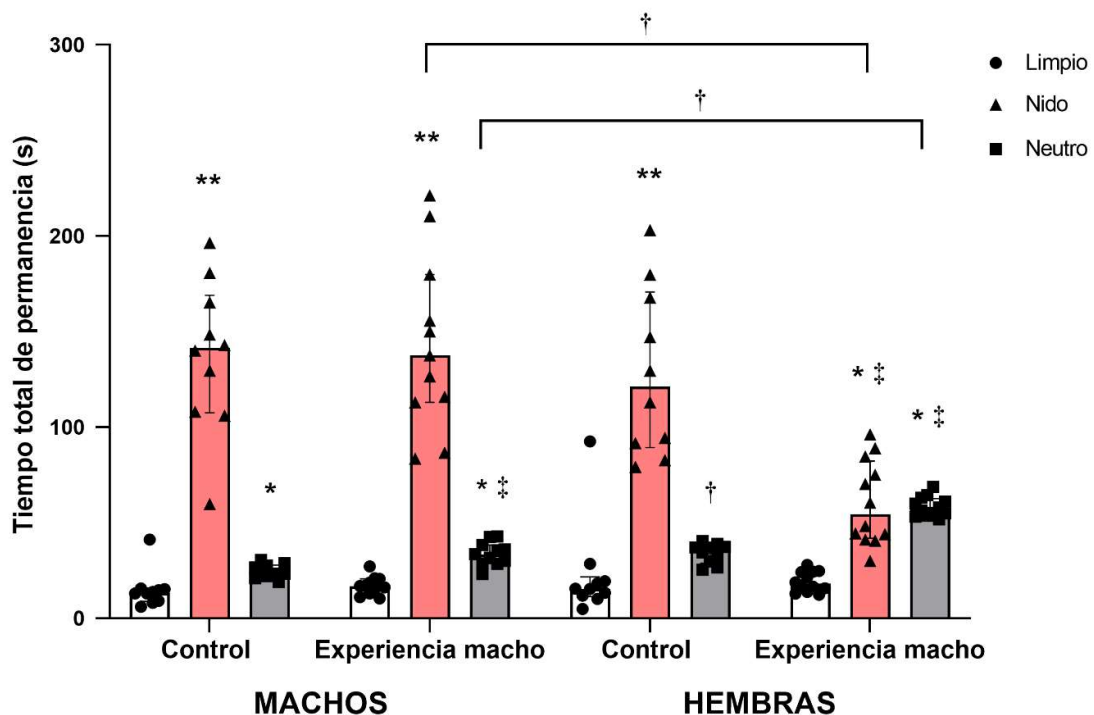


Figura 15. Tiempo de permanencia en segundos (s) en las áreas con viruta de nido (barra roja), viruta limpia (barra blanca) o neutra (barra gris) del modelo de preferencia a olor materno de crías machos y hembras de 11 días de edad expuestas previamente a jaula vacía (control, $n=10$) o macho intruso (experiencia macho, $n=12$). Los datos se expresan como mediana (RIQ) y fueron analizados mediante la prueba de Wilcoxon para comparar el tiempo de permanencia entre las tres áreas y entre sexos, y la prueba U de Mann-Whitney para las comparaciones entre grupos experimentales. Los círculos, triángulos y cuadrados representan los valores individuales. * $p \leq 0,05$ vs. área limpia, ** $p \leq 0,05$ vs. áreas limpia y neutra, † $p \leq 0,05$ vs. machos del mismo grupo, ‡ $p \leq 0,05$ vs. control (jaula vacía).

La figura 16 muestra que el número de entradas al área de viruta de nido fue mayor que al área de la viruta limpia tanto en crías expuestas a machos como las expuestas a jaula vacía (Control: machos: $T_{(10)} = 0,0$; $p \leq 0,05$; hembras: $T_{(10)} = 0,0$; $p \leq 0,05$; Experiencia macho: machos: $T_{(11)} = 0,0$; $p \leq 0,05$; hembras: $T_{(12)} = 0,0$; $p \leq 0,05$).

No se observó una variación en el número de entradas al área limpia o de nido entre crías machos y hembras controles (limpia: $T_{(2)} = 0,0$; $p = 0,18$; nido: $T_{(9)} = 15,0$; $p = 0,37$). En tanto en el grupo experiencia macho, las hembras mostraron más entradas al área limpia que los machos ($T_{(8)} = 3,5$; $p \leq 0,05$).

La exposición a machos generó una disminución en el número de entradas al área con viruta de nido en comparación con el control (machos: $U_{(10,11)} = 18,0$; $p \leq 0,05$; hembras $U_{(10,12)} = 5,0$; $p \leq 0,05$), mientras que el número de entradas al área con viruta limpia solo aumentó en crías hembras expuestas a macho (hembras: $U_{(10,12)} = 5,0$; $p \leq 0,05$; machos: $U_{(10,11)} = 35,0$; $p = 0,16$).

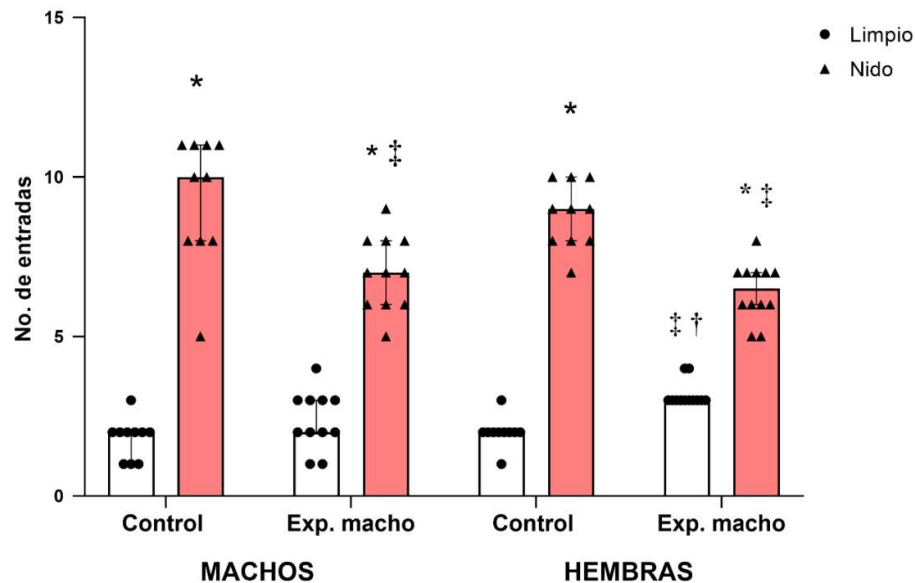


Figura 16. Número total de entradas a las áreas con viruta de nido (barra roja) o viruta limpia (barra blanca) del modelo de preferencia a olor materno de crías machos y hembras de 11 días de edad previamente expuestas a jaula vacía (control, $n=10$) o macho intruso (Exp. macho, $n=12$). Los datos se expresan como mediana (RIQ) y fueron analizados mediante la prueba de Wilcoxon para comparar el tiempo de permanencia entre las tres áreas y entre sexos, y la prueba U de Mann-Whitney para las comparaciones entre grupos experimentales. Los círculos y triángulos representan los valores individuales. * $p \leq 0,05$ vs. área limpia, † $p \leq 0,05$ vs. machos del mismo grupo, ‡ $p \leq 0,05$ vs control (jaula vacía).

Se observó que tanto machos como hembras de ambos grupos entraron primero al área con viruta del nido que al limpio (Control: machos: $T= 0,0$; $p \leq 0,05$; hembras: $T= 0,0$; $p \leq 0,05$; Intruso: machos: $T= 0,0$; $p \leq 0,05$; hembras: $T= 0,0$; $p \leq 0,05$). Las hembras expuestas a macho presentaron una mayor latencia a entrar al área con viruta de nido ($T= 9,0$; $p \leq 0,05$) y una menor latencia a entrar al área con viruta limpia que los machos de su mismo grupo ($T= 11,0$; $p \leq 0,05$). Asimismo, las hembras expuestas a machos presentaron un aumento en la latencia a entrar al nido ($U_{(10,12)}= 2,0$; $p \leq 0,05$) y disminuyeron la latencia a entrar al área con viruta limpia ($U_{(10,12)}= 10,0$; $p \leq 0,05$) respecto a las hembras control (Figura 17).

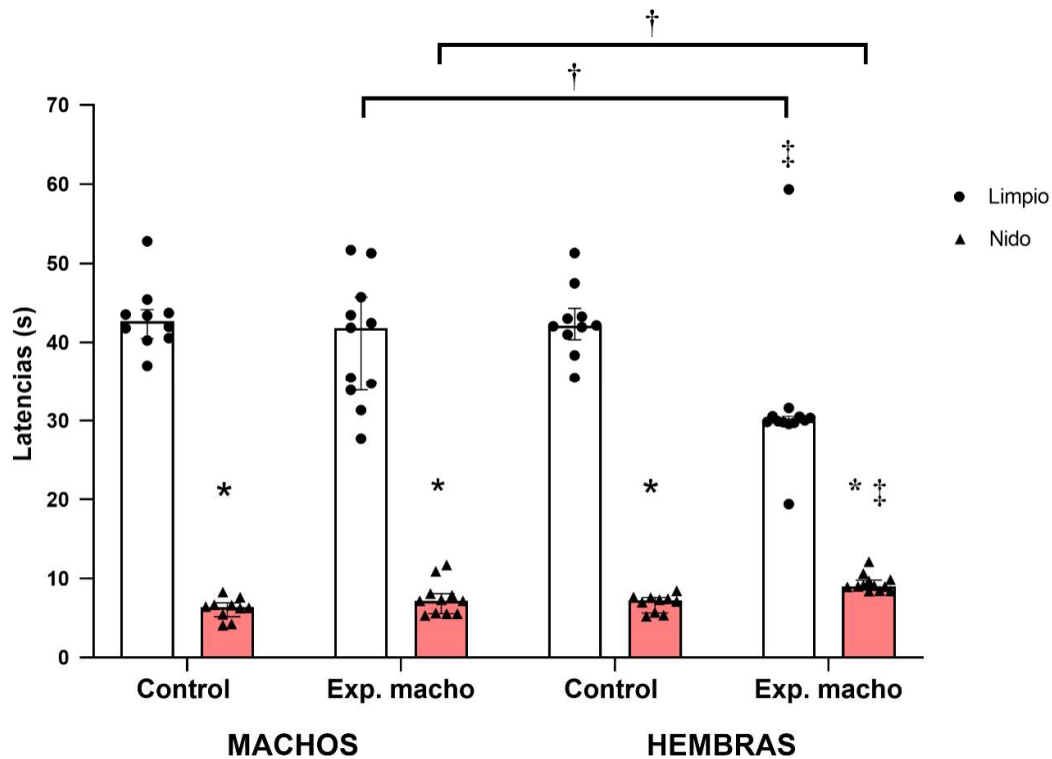


Figura 17. Latencias (en segundos, s) a entrar al área con viruta de nido (barra roja) o viruta limpia del (barra blanca) modelo de preferencia a olor materno de crías machos y hembras de 11 días de edad previamente expuestas a jaula vacía (control, $n=10$) o macho intruso (Exp. macho, $n=12$). Los datos se expresan como mediana (RIQ) y fueron analizados mediante la prueba de Wilcoxon para comparar el tiempo de permanencia entre las tres áreas y entre sexos, y la prueba U de Mann-Whitney para las comparaciones entre grupos experimentales. Los círculos y triángulos representan los valores individuales. * $p \leq 0,05$ vs. área limpia, † $p \leq 0,05$ vs. machos del mismo grupo, † $p \leq 0,05$ vs control (jaula vacía).

DISCUSIÓN

Los principales resultados obtenidos en este capítulo son:

- La exposición a macho intruso no afectó la capacidad de las crías machos y hembras de reconocer el olor a nido materno. Sin embargo, redujo el tiempo de permanencia en la viruta del nido materno en las hembras.

La experiencia macho y el reconocimiento del olor a nido de las crías

El mayor número de entradas y tiempo de permanencia en el área con viruta del nido en la prueba de preferencia olfativa de las crías, independientemente de su condición experimental, evidencia que la exposición a machos intrusos no afecta la capacidad de las crías de reconocer el olor a nido materno. El hecho de que la experiencia macho, no afectara el reconocimiento del nido marca la robustez de este comportamiento y da cuenta su importancia para la supervivencia de las crías. En este sentido, previamente reportamos (Zuluaga et al., 2014) que otro comportamiento fundamental para la supervivencia de las crías, como es la respuesta de "llanto" de las crías durante el aislamiento, tampoco es alterado por la experiencia macho. Este comportamiento que ocurre cuando la cría es separada del nido, de la madre y de sus hermanos, se caracteriza por la emisión de USVs con el fin de captar la atención de la madre y promover su acercamiento (D'Amato & Cabib, 1987; Hofer, 1996; Hofer & Shair, 1987; Jans & Leon, 1983; Noirot, 1972).

Una posible explicación a estos resultados podría ser que la adquisición de esta memoria olfativa fuera previa a la exposición al macho. En este sentido, es sabido que el olor materno se aprende prenatalmente y se refuerza durante el parto ya que la hembra lactante unta líquido amniótico en su región ventral, lo que atrae a las crías y favorece posteriormente la preferencia por su olor (Schaal & Orgeur, 1992; Teicher & Blass, 1976, 1977; Varendi et al., 1996).

Tomando en cuenta que la madre es la mediadora principal de la información del ambiente, la ausencia de efecto negativo de la experiencia macho sobre el reconocimiento olfativo del nido, podría deberse a que la afectación del comportamiento maternal que esta experiencia genera es transitoria, ya que ésta representa un estresor moderado para la madre (como se

discutió previamente). Por otra parte, también es posible que el aumento transitorio en la frecuencia de lamidos de la madre provocado por la exposición al macho (Zuluaga et al., 2014), sea responsable del mantenimiento de la preferencia por el olor a nido. Esta idea se fundamenta en que la administración de estimulación táctil artificial, que imita el lamido materno, a crías durante la exposición a un olor nuevo, provoca una preferencia por este olor (Kojima & Alberts, 2009; Raineke et al., 2010; Sullivan et al., 1989).

De forma interesante, a pesar de mostrar una preferencia por el olor a nido, las crías hembras expuestas a machos, redujeron su permanencia en el área con viruta de nido en comparación con las crías machos del mismo grupo y a las crías hembras del grupo control. Este resultado muestra un efecto sexualmente diferente de la exposición al macho sobre los procesos de aprendizaje olfativo e indica una mayor sensibilidad de las hembras a los efectos de esta experiencia, lo cual concuerda con otros estudios (de Souza et al., 2012; Raineke et al., 2009). El efecto dependiente del sexo de la exposición al macho sobre los procesos de aprendizaje olfativo quizás esté asociado a variaciones en el comportamiento maternal. En este sentido, si bien reportamos que la exposición a macho aumenta la frecuencia de lamidos en las hembras lactantes durante la exposición (Zuluaga et al., 2014), no distinguimos si uno de los sexos recibió más lamidos. Debido a que variaciones en el lamido recibido por las crías se asocian a perfiles conductuales diferentes en los individuos (Champagne et al., 2003; Curley & Champagne, 2016; C.-D. Walker, 2010), un incremento diferencial de acuerdo al sexo en los lamidos maternos podría ser responsable de la diferencia en el comportamiento de machos y hembras en el modelo de preferencia olfativa. En línea con esta idea, se ha reportado que las hembras lactantes lamen más a las crías machos que a las hembras (Melniczek & Ward, 1994; Moore et al., 1997), por lo que podríamos hipotetizar que la robusta preferencia de las crías machos por el olor a nido se deba a una mayor estimulación por parte de la madre. Sería interesante abordar si el comportamiento maternal se modifica de forma diferente del acuerdo al sexo de las crías en función de las experiencias en el postparto temprano, así como evaluar otros procesos de aprendizaje mediados por el comportamiento de la madre en ambos sexos.

La exposición a macho provocó una respuesta temprana de miedo, pero no alteró el reconocimiento del nido materno. Estos dos resultados favorecen a la supervivencia de las crías frente a la situación de amenaza en la que se encuentran. Sin embargo, desconocemos si estas respuestas son transitorias o tienen un efecto más a largo plazo volviendo a los individuos más alertas o más tolerantes al riesgo. Sería interesante evaluar si la exposición a

machos afecta funciones cognitivas y emocionales en otros contextos de amenaza que se pueden presentar durante adolescencia o la adultez, por ejemplo, evaluando la respuesta de forrajeo en condiciones de estrés o la respuesta en modelos de evaluación de riesgos.

iv. CAPÍTULO III. RESPUESTA DE MIEDO DE CRÍAS A UN ESTÍMULO SOCIAL NO INNATO DE MIEDO: EVIDENCIA DE LA PARTICIPACIÓN DE PROCESOS DE MEMORIA

Las crías son capaces de aprender y retener memorias tempranas (Gruest et al., 2004; Hoffman et al., 2013; Kehoe & Blass, 1986; Languille et al., 2008, 2009). Sin embargo, se desconoce si la madre puede influir en el aprendizaje aversivo de las crías y si ese aprendizaje es diferente en machos y hembras. Con base en la fuerte influencia que tiene la madre en el desarrollo cognitivo y emocional de las crías, nos preguntamos si la exposición prolongada de la diada a una hembra adulta en proestro, que constituye un estímulo no innato de miedo, pero es aversivo para la madre, resulta en el desarrollo de la respuesta de miedo de las crías. La expresión de miedo frente a un macho anestesiado luego de la exposición a machos intrusos en el período de HRE (capítulo I) podría deberse a una maduración de áreas relacionadas al control del miedo o a un aprendizaje asociativo entre el comportamiento alterado de la madre y el olor del macho, que es un estímulo innato de miedo luego del período de HRE. El uso de hembras, que no son estímulos innatos de miedo para las crías incluso fuera del período de HRE, permite plantear la hipótesis de que la expresión de miedo frente a una hembra anestesiada se deba a un proceso de aprendizaje entre el olor de la hembra intrusa y el comportamiento alterado de la madre. Si la respuesta de miedo de estas crías a una hembra anestesiada se debe a un proceso de memoria asociado al comportamiento alterado de la madre hacia la hembra intrusa, esperamos que ésta se vea alterada por agentes amnésicos. El uso de hembras en proestro como intrusas se sustenta en el hecho de que provocan una mayor agresión en la madre y un mayor tiempo fuera del nido, en comparación con las hembras en otras etapas del ciclo estral (Haney & Miczek, 1993; Zuluaga et al., 2014), pero no provocan respuestas de miedo en las crías (Zuluaga et al., 2014).

Los resultados de este capítulo dieron lugar a la publicación: **Zuluaga, M. J., Agrati, D., Athaide, V., Ferreira, A., Uriarte, N. (2023). Fear response of rat pups to a non-aversive social stimulus: Evidence for the involvement of memory processes. *Developmental Psychobiology*, 65(7), e22417, <https://doi.org/10.1002/dev.22417>** que se adjunta en el ANEXO II de esta tesis.

HIPÓTESIS

Las crías son capaces de expresar respuesta de miedo frente a un estímulo social no innato de miedo en el período del hiporrespuesta al estrés, como consecuencia de un proceso de aprendizaje mediado por la madre.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si la exposición de la díada madre-crías a un estímulo social aversivo para la madre pero no para las crías, induce respuestas de miedo en las crías frente a este estímulo social a través de un proceso de memoria dependiente de la madre.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar si la exposición temprana de la díada madre-crías a hembras intrusas en proestro induce la expresión de miedo en crías durante el período de hiporrespuesta al estrés.
2. Determinar el efecto de la administración de agentes amnésicos sobre la respuesta de miedo de crías expuestas a hembra en proestro junto a su madre en los primeros días posparto.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Experimento 1: Respuestas de miedo de las crías hacia una hembra adulta

Para determinar si la exposición prolongada de la díada a una hembra intrusa en proestro promueve la expresión de respuestas de miedo en las crías, se evaluaron las respuestas de crías expuestas a la condición hembra intrusa ($n_{\text{díadas}} = 8$) o a la condición de control ($n_{\text{díadas}} = 9$) en la prueba de miedo. En el DPN 8, una cría macho y una hembra de cada camada expuestas a hembra intrusa o jaula vacía se sometieron a la prueba de miedo frente a una hembra en proestro anestesiada. El orden de las pruebas fue contrabalanceado entre machos y hembras.

Experimento 2: Efecto de CHX en la respuesta de miedo de las crías hacia una hembra adulta

Como mencionamos anteriormente, si la respuesta de miedo de las crías hacia una hembra adulta fuera consecuencia de un proceso de memoria, entonces el valor aversivo de la hembra estaría sujeto a un proceso de reconsolidación luego de una nueva exposición, y sería susceptible de ser alterado por agentes amnésicos como la cicloheximida (CHX), un inhibidor de la síntesis de proteínas (Dudai & Eisenberg, 2004; Flint & Marino, 2007; Pavlík & Teisinger, 1980). Por lo tanto, determinamos si la administración de CHX, luego de la exposición a hembra anestesiada en el DPN 8, inhibe la respuesta de miedo de las crías durante una prueba de miedo en el DPN 9.

Debido a que solo las hembras presentaron respuestas de miedo frente a hembra en proestro (resultados obtenidos en el Experimento 1), para este experimento se utilizaron crías hembras. La Figura 18 muestra una representación esquemática del procedimiento llevado a cabo y los grupos experimentales utilizados en el experimento 2. En primer lugar, las díadas madre-camada se dividieron en dos condiciones experimentales: exposición a hembra intrusa ($n_{\text{díadas}} = 10$) o a una jaula vacía (condición de control, $n_{\text{díadas}} = 8$) según el procedimiento de exposición a hembra intrusa descrito en el Experimento 1. Durante la mañana del DPN 8, las cuatro crías hembras de cada camada de ambas condiciones fueron asignadas a uno de los grupos experimentales que se detallan a continuación:

Grupos CHX/expuesto y vehículo (VEH)/expuesto: Dos crías hembras de 8 días de edad de camadas expuestas a intrusas fueron expuestas individualmente a la prueba de miedo hacia una hembra anestesiada e inmediatamente después fueron inyectadas con CHX (Sigma 0,2 mg/kg/2 ml 0,2% NaCl, sc.) o VEH (solución salina estéril, 2 ml/kg, sc.), y 24 h después (DPN 9), se re-evaluaron las respuestas de miedo hacia una hembra anestesiada diferente.

Grupos VEH/no expuesto y CHX/no expuesto: Con el fin de controlar si la administración de CHX influye sobre el proceso de reconsolidación, las otras dos crías hembras de la camada expuesta a hembra intrusa fueron sometidas individualmente a las condiciones de la prueba de miedo, pero en ausencia de la hembra adulta anestesiada, y posteriormente fueron tratadas con CHX o VEH. Veinticuatro horas después, estas crías fueron evaluadas en la prueba de miedo con una hembra adulta anestesiada.

Grupos en la condición control: Para controlar el posible efecto de CHX *per se* sobre el comportamiento de las crías, las cuatro crías hembras de la condición de control (jaula vacía, $n_{\text{diadas}}=8$) fueron sometidas a las mismas condiciones experimentales descritas anteriormente y por lo tanto se obtuvieron los mismos cuatro grupos experimentales en la camada de control (CHX/expuesto, VEH/expuesto, CHX/no expuesto y VEH/no expuesto).

Las dosis y la latencia de administración de CHX se eligieron a partir de estudios previos (Dudai&Eisenberg, 2004; Flint & Marino, 2007; Pavlík&Teisinger, 1980) y se ajustaron en experimentos preliminares. El orden de asignación al grupo experimental en el DPN 8, así como el orden de prueba de las crías en la prueba de miedo en el DPN 9 fue contrabalanceado.

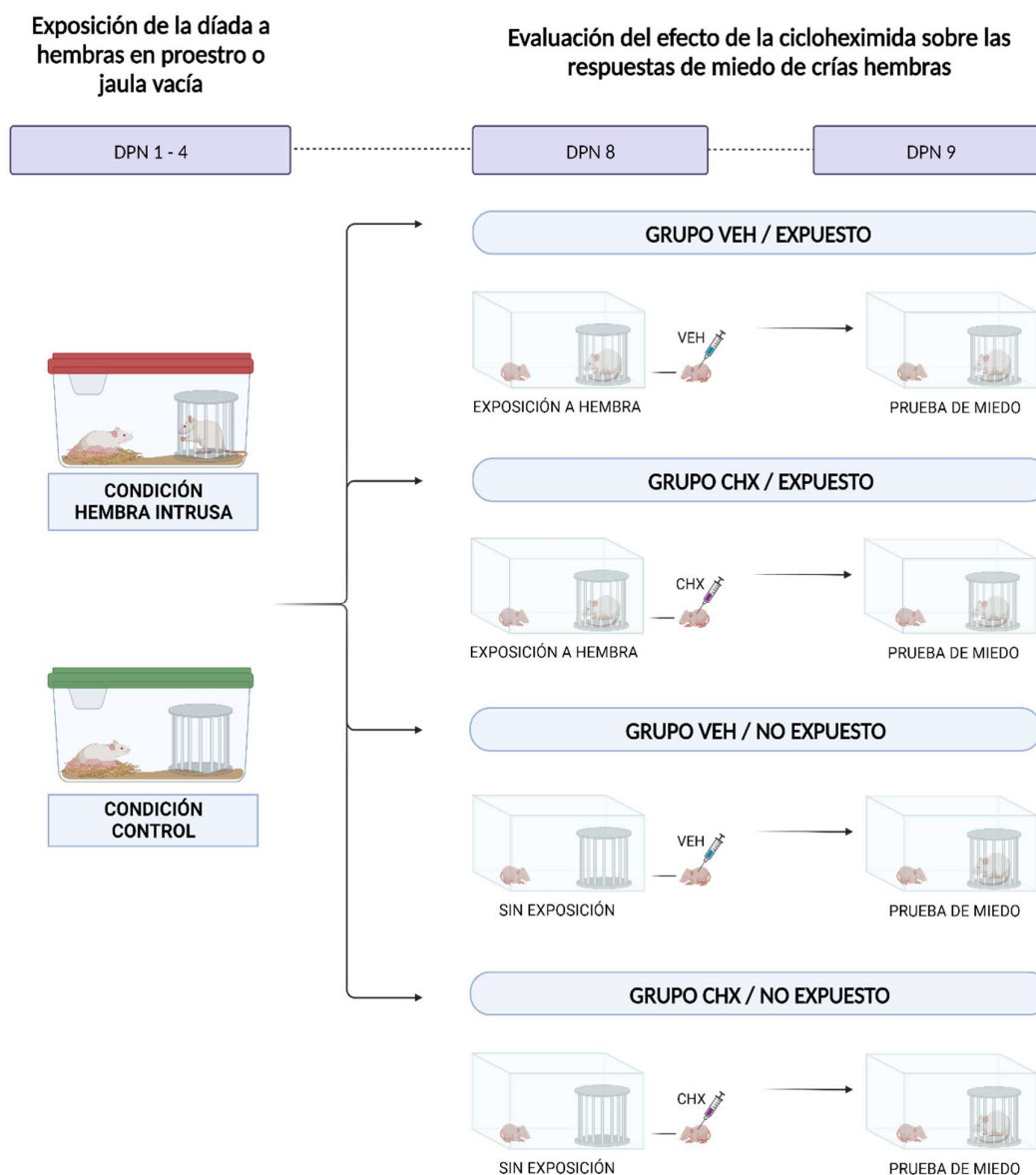


Figura 18. Representación esquemática del procedimiento realizado y los cuatro grupos experimentales generados en el Experimento 2. Las díadas madre-crías fueron expuestas en la caja materna a una hembra intrusa dentro de una jaula de malla de alambre (condición de intrusa hembra) o a una jaula vacía (condición control) desde el DPN 1 al 4. Del DPN 8 al 9, evaluamos el efecto de la cicloheximida (CHX) sobre la respuesta de miedo de las crías hacia una hembra en proestro anestesiada. En el DPN 8, cuatro crías hembras de cada díada de las condiciones hembra intrusa y control fueron asignadas a uno de los grupos experimentales ilustrados. **Grupos VEH o CHX/ expuestos:** las crías fueron expuestas a una hembra anestesiada en el DPN 8, inmediatamente después, se les inyectó VEH o 0,2 mg/kg de CHX, y en el DPN 9 se evaluaron sus respuestas de miedo hacia una hembra anestesiada en la prueba de miedo. **Grupos VEH o CHX/ no expuestos:** en el DPN 8 se expusieron crías al recinto donde se hizo la exposición a hembra, pero sin la presencia de la hembra adulta anestesiada, luego se les inyectó VEH o 0,2 mg/kg de CHX, y en el DPN 9, se observaron sus respuestas de miedo hacia una hembra anestesiada.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se expresan como medianas (rango intercuartil) ya que no se detectó distribución normal ni homogeneidad de varianzas (Siegel, 1956). En el Experimento 1, el efecto de la convivencia previa con una hembra intrusa sobre las respuestas de miedo de las crías se analizó mediante la prueba U de Mann-Whitney. Dado que las crías machos y hembras provienen de la misma camada, las comparaciones entre sexos se realizaron mediante la prueba de Wilcoxon. En el Experimento 2, las comparaciones entre los grupos hembra intrusa y condición control se analizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney, y las comparaciones dentro de cada condición (VEH o CHX/expuesta y VEH o CHX/no expuesta) se realizaron mediante la prueba de Friedman seguido de la prueba de Wilcoxon. En todos los casos, el nivel de significación estadística seleccionado fue $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

Experimento 1: Respuestas de miedo de las crías hacia una hembra adulta

La exposición prolongada a hembras intrusas promovió la expresión de respuestas de miedo en las crías hembras, lo que se reflejó en una disminución en el número de USV ($U_{(8,9)} = 8,0$; $p \leq 0,05$) y un aumento en el TTI ($U_{(8,9)} = 7,0$; $p \leq 0,05$), en comparación con la condición de control (Figura 19). Por el contrario, las respuestas de las crías machos expuestas a una hembra intrusa no difirieron de las de las crías machos del grupo control (USV: $U_{(8,9)} = 24,0$; $p = 0,27$ y TTI: $U_{(8,9)} = 19,5$; $p = 0,07$, Figura 21). En consecuencia, la exposición a hembra intrusa provocó que la respuesta de miedo de las crías hembras difiriese de la de las crías machos (USV: $T_{(8)} = 0,0$ y TTI: $T_{(8)} = 3,0$; $p \leq 0,05$), mientras que no se encontraron diferencias significativas entre machos y hembras en la condición control (USV: $T_{(9)} = 6,0$; $p = 0,17$ y TTI: $T_{(9)} = 9,0$; $p = 0,75$).

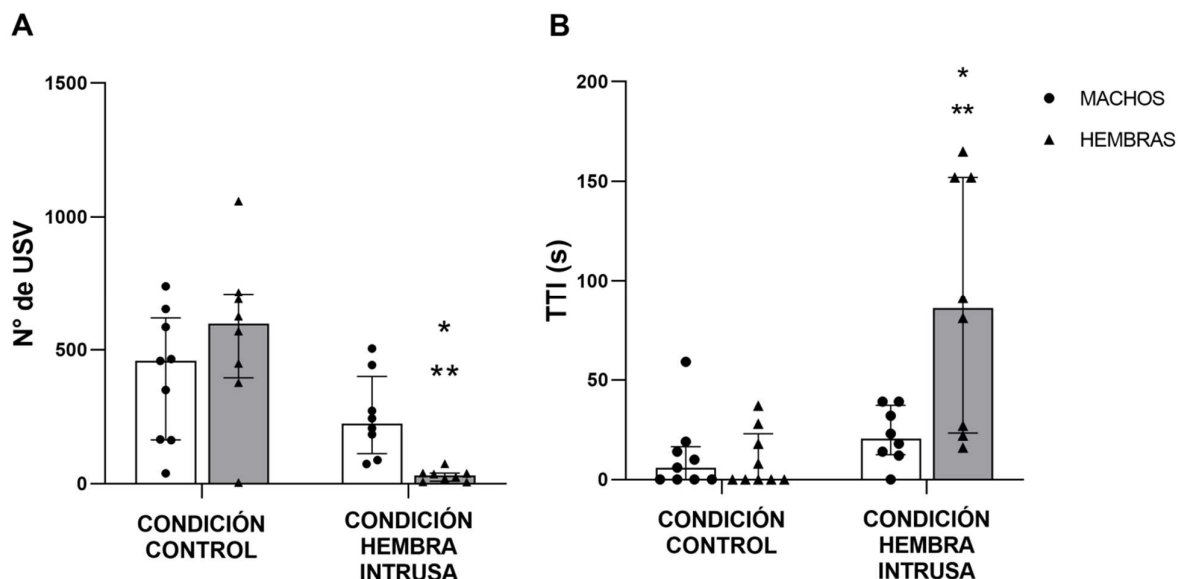


Figura 19. Respuestas de miedo hacia una hembra en proestro anestesiada. A) Número de vocalizaciones ultrasónicas (USV) y B) tiempo total de inmovilidad (s) (TTI) de crías macho (barra blanca) y crías hembra (barra gris) de 8 días de edad expuestos del PND 1 al 4 a una jaula vacía (condición control) o una hembra intrusa. Los datos se expresan como medianas (rango intercuartil [IQR]) con círculos y triángulos que representan valores individuales. Las comparaciones entre los grupos experimentales se realizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney, * $p \leq 0,05$ vs. condición control. Las comparaciones entre sexos se realizaron mediante la prueba de Wilcoxon, ** $p \leq 0,05$ vs. crías machos.

Experimento 2: Efecto de CHX en la respuesta de miedo de las crías hacia una hembra adulta

En la condición de exposición a hembra intrusa, la respuesta de miedo de las crías hembras durante la prueba realizada en el DPN 9 varió en función del tratamiento farmacológico (VEH o CHX) y de la exposición previa a una hembra anestesiada en el DPN 8 (grupos expuestos o no expuestos; USV: $\chi^2_{(3)} = 14,85$ y TTI: $\chi^2_{(3)} = 16,6$; $p \leq 0,05$). Como se muestra en la figura 20, en la condición de intrusa, las crías CHX/expuestas no exhibieron una respuesta de miedo, presentando un número mayor de USV y una disminución del TTI en comparación con las crías VEH/expuestas (USV: $T_{(10)} = 0,0$, TTI: $T_{(10)} = 1,0$; $p \leq 0,05$). Cuando las crías de la condición de hembra en proestro intrusa no fueron expuestas a una hembra anestesiada en el DPN 8 (grupos CHX/no expuesto y VEH/no expuesto), su respuesta conductual en la prueba de miedo del DPN 9 no difirió (USV: $T_{(10)} = 15,5$; $p = 0,72$; TTI: $T_{(10)} = 9,5$; $p = 0,12$, Figura 20).

La exposición a una hembra anestesiada en DPN 8 de las crías de la condición hembra intrusa no afectó las respuestas de miedo en DPN 9, ya que no se detectaron diferencias entre la respuesta de miedo de los grupos VEH/expuestos y VEH/no expuestos (USV: $T_{(10)} = 11,0$; $p=0,17$ y TTI: $T_{(10)} = 22,0$; $p=0,57$). Como se muestra en la Figura 20, dentro de la condición control (crías expuestas a una jaula vacía del DPN 1 al 4), ni la exposición previa a una hembra anestesiada en el DPN 8 ni la administración de CHX afectaron el número de USV o TTI de las crías durante la prueba de miedo en DPN 9 (USV: $\chi^2_{(3)} = 2,7$; $p= 0,44$ y TTI: $\chi^2_{(3)} = 3,2$; $p= 0,36$).

Cuando comparamos las condiciones intrusa y control, las crías de la condición hembra intrusa tratadas con VEH (VEH/expuestos) exhibieron una clara respuesta de miedo, como lo muestra la reducción de la emisión de USV y el aumento de TTI, en comparación con el grupo VEH/expuesto en condición de control (USV: $U_{(8,10)} = 0,0$, TTI: $U_{(8,10)} = 4,0$; $p \leq 0,05$). Sin embargo, no se detectaron diferencias en la emisión de USV y TTI entre los grupos CHX/expuestos de condiciones de intrusa y control (USV: $U_{(8,10)} = 30,0$; $p= 0,39$ y TTI: $U_{(8,10)} = 20,0$; $p= 0,08$; Figura 20). Tanto las crías de los grupos VEH/no expuestos como las del grupo CHX/no expuestos de la condición hembra intrusa mostraron respuestas de miedo, en comparación con los mismos grupos de la condición de control (condición de intrusa versus control: VEH/no expuesto: USV: $U_{(8,9)} = 4,0$; TTI: $U_{(8,10)} = 1,0$; $p \leq 0,05$ y CHX/no expuesto: USV: $U_{(8,9)} = 13,0$; TTI: $U_{(8,9)} = 9,0$; $p \leq 0,05$).

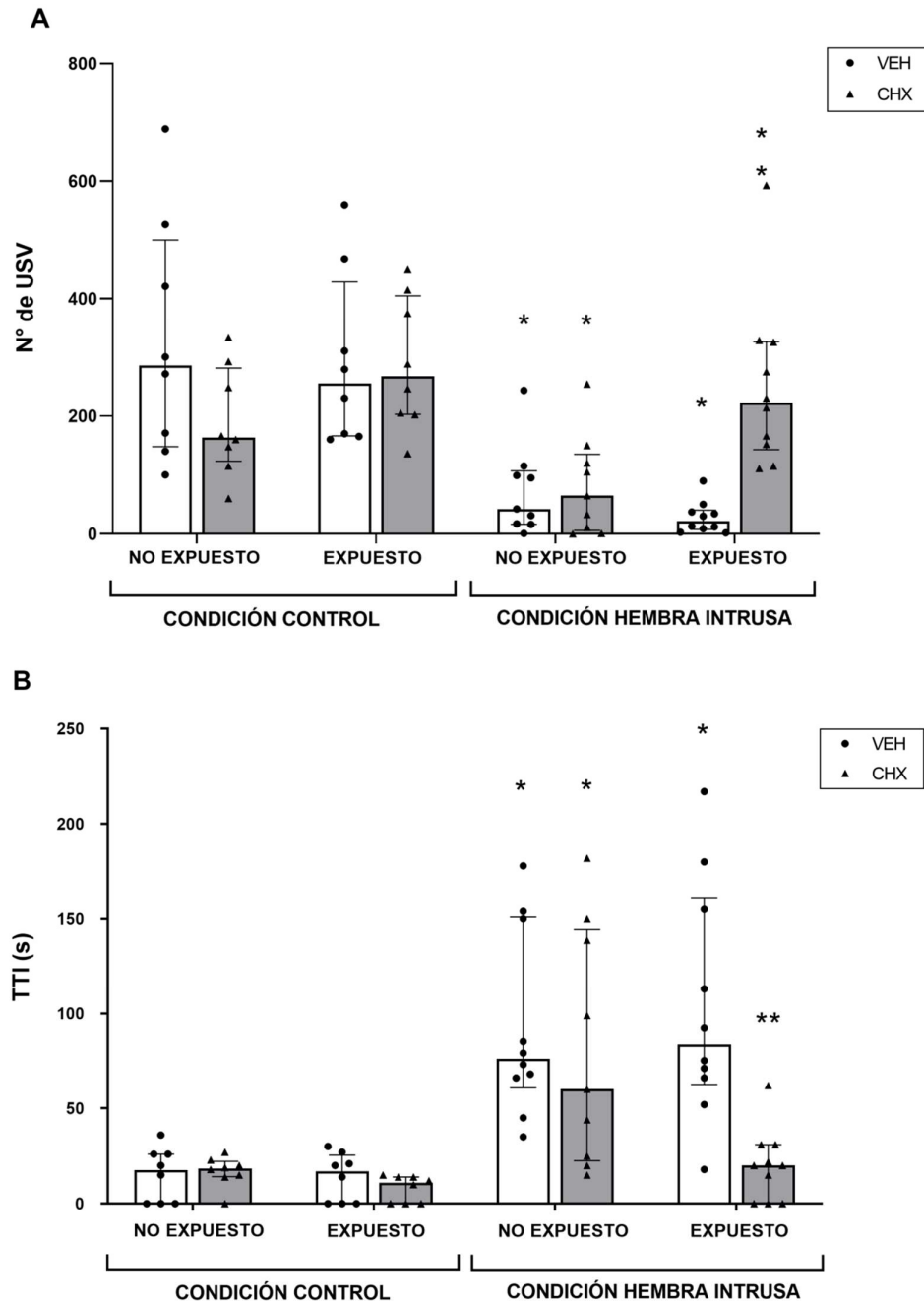


Figura 20. Respuestas de miedo hacia una hembra en proestro anestesiada en la prueba de miedo. A) Número de ultravocalizaciones (USV) y B) tiempo total en inmovilidad (TTI, en segundos, s) de crías hembras en DPN 9 expuestas a jaula vacía (condición control) o hembra en proestro intrusa. La barra blanca representa a las crías hembras tratadas con vehículo (VEH) y la barra gris a las tratadas con cicloheximida (CHX) que fueron expuestas o no a una hembra anestesiada en el DPN 8. Los datos se expresan en medianas (RIQ), los círculos y triángulos representan los valores individuales. Se utilizó la prueba U de Mann-Whitney para las comparaciones entre las condiciones control y hembra intrusa, * $p \leq 0,05$ vs. el mismo grupo experimental en la condición control. Las comparaciones dentro de las condiciones se realizaron mediante el ANOVA de Friedman seguido de la prueba de Wilcoxon, ** $p \leq 0,05$ frente a los grupos VEH/expuestos, CHX/expuestos y VEH/no expuestos de la condición de hembra intrusa.

DISCUSIÓN

Los principales resultados obtenidos en este capítulo son:

- La exposición prolongada a una hembra intrusa provocó una respuesta de miedo en las crías hembra, pero no en las crías machos, durante la prueba de miedo frente a hembra en proestro.
- La administración del inhibidor de la síntesis de proteínas cicloheximida, luego de la exposición a hembra en proestro anestesiada en el DPN 8, bloqueó la respuesta de miedo de las crías hembras cuando se las re-expuso a este adulto en el DPN 9.

La hembra lactante como mediadora en la adquisición de memorias de miedo en las crías

El hecho de que las hembras adultas en proestro no representen un estímulo aversivo *per se* para las crías (Brunelli et al., 1998; Zuluaga et al., 2014, 2023) indica que la respuesta de miedo de las crías hembras previamente expuestas a una hembra intrusa no puede atribuirse únicamente a una maduración temprana de los sistemas de miedo/estrés como consecuencia de la convivencia con la intrusa tal como observamos en los experimentos del capítulo I. Estos resultados, a su vez, indican que probablemente la madre sea la mediadora del valor aversivo que la hembra intrusa adquiere para sus crías durante la convivencia. A su vez, la inhibición farmacológica (mediante la administración de un inhibidor de la síntesis de proteínas) de la respuesta de miedo de las crías hembras hacia la hembra adulta prueba que esta respuesta es el resultado de la evocación de una memoria de miedo. Ambos experimentos demuestran que las crías aprenden que la hembra en proestro intrusa es un estímulo aversivo debido a los cambios en el comportamiento materno, desencadenando así una respuesta de miedo hacia este adulto cuando se las re-expone. En este sentido, Debiec y Sullivan (2014) mostraron que las crías durante el período de HRE, son capaces de expresar miedo frente a un olor cuando este es previamente asociado con la respuesta de miedo de la madre hacia ese mismo olor.

Estos resultados resaltan la importancia crucial del entorno y del comportamiento materno a la hora de influir sobre el desarrollo emocional, social y cognitivo de las crías (Champagne et al., 2003; Cirulli et al., 2003; Coutellier et al., 2008; Levine, 1994; Mashoodh et al., 2009; McLeod et al., 2007; Uriarte et al., 2007; C.-D. Walker et al., 2004), ya que la madre media el valor aversivo que la hembra en proestro adquiere para sus crías durante la convivencia. En este sentido, la presencia de la hembra intrusa en proestro provoca en las hembras lactantes un aumento en la agresión maternal la cual conduce a un mayor tiempo fuera del nido (Zuluaga et al., 2014). Se ha demostrado que cuando se lleva a cabo un condicionamiento de miedo, se observan resultados diferentes en presencia o ausencia de la madre, indicando que su presencia puede influir en los procesos de aprendizaje temprano en crías (Debiec & Sullivan, 2014; Moriceau et al., 2006). A su vez, la separación maternal se ha asociado con una mejora en la retención de memorias de miedo (Callaghan & Richardson, 2011; Sampath et al., 2014). En este sentido, las crías de 17 días que fueron separadas de sus madres y condicionadas a un sonido combinado con shocks eléctricos, retuvieron esta memoria del miedo por 10 días después del condicionamiento, a diferencia de las criadas en condiciones estándar (Callaghan & Richardson, 2011).

¿La respuesta de miedo de las crías hacia una hembra adulta es consecuencia de un proceso de memoria?

En la condición de exposición a una hembra intrusa, la administración de CHX a las crías inmediatamente después de la exposición a una hembra en proestro anestesiada en el DPN 8 suprimió la expresión de miedo en el DPN 9, sugiriendo que las respuestas de miedo de las crías son el resultado de un proceso de memoria. En este sentido, la evocación de memorias consolidadas genera un período lábil en el cual la reconsolidación de una memoria a largo plazo necesita la síntesis *a novo* de proteínas (Bevilaqua et al., 2008; Dudai et al., 2015; Dudai & Eisenberg, 2004; Nader et al., 2000). El tratamiento con CHX después de la exposición a una hembra adulta en el DPN 8 probablemente abolió las respuestas de miedo hacia ella en el DPN 9 porque bloqueó la síntesis *a novo* de proteínas necesaria para reestabilizar la memoria evocada el día anterior. En consonancia con este resultado, otros estudios han mostrado que el tratamiento con anisomicina, otro inhibidor de la síntesis de proteínas, en crías de 3 días de edad bloquea el comportamiento de evitación hacia sabores que previamente fueron asociados negativamente con la ingesta de litio (Gruet et al., 2004; Languille et al., 2008, 2009).

La especificidad del tratamiento CHX para afectar el proceso de reconsolidación de la memoria está respaldada por el hecho de que su administración no tuvo efecto sobre las respuestas de miedo de aquellas crías donde no se produjo la exposición a una hembra adulta en el DPN 8 (VEH/no expuesto y CHX/grupos no expuestos), es decir en aquellas donde no se evocó la memoria de miedo. Dado que la memoria no se reactivó en las crías no expuestas a una hembra en el DPN 8, independientemente del tratamiento farmacológico, la huella de la memoria permaneció intacta ante el efecto del inhibidor de la síntesis de proteínas (como lo demostraron Nader et al., 2000). Por tanto, las respuestas de miedo pudieron expresarse en el DPN 9.

Dentro de la condición control, ni la exposición previa a un adulto hembra en el DPN 8 ni la administración de CHX influyó en el número de USV o el TTI de las crías en la prueba de miedo en el DPN 9. Dado que las crías no estuvieron expuestas a hembras intrusas y por tanto no adquirieron memorias de miedo, se esperaba que las crías de la condición control vocalizaran y se movieran cuando se enfrentaran a la hembra anestesiada en la prueba de miedo. Estos resultados concuerdan con hallazgos previos que muestran que las hembras en proestro provocan un acercamiento de las crías fuera del periodo HRE (Brunelli et al., 1998; Zuluaga et al., 2014). Además, los resultados obtenidos en la condición control demuestran que la CHX *per se* no tuvo efecto sobre las vocalizaciones o la movilidad de las crías, lo que descarta un efecto motor del fármaco en el aumento de las mismas. Los resultados de ambos experimentos, junto con el comportamiento observado en los grupos control, sugieren fuertemente que la exposición de la díada madre-crías a una intrusa del DPN 1 al 4 puede promover la adquisición y consolidación de una memoria de miedo, que está siendo mediado por la madre, y que esta memoria de miedo puede reactivarse al volverse a exponer al estímulo de miedo. Estos resultados apoyan la idea de que los procesos de consolidación y reconsolidación son habilidades que ya están presentes al comienzo de la vida, como se informó anteriormente en otros estudios (Gruest et al., 2004; Languille et al., 2008, 2009).

La respuesta de miedo de las crías ante una hembra adulta anestesiada sugiere que ciertos atributos de este estímulo son suficientes para evocar la memoria del miedo. Estudios anteriores han demostrado que diferentes tipos de recordatorios pueden inducir la recuperación de la memoria en diversas condiciones. Por ejemplo, las señales contextuales pueden facilitar la memoria de hábitos olvidados en los laberintos (Deweert et al., 1980). Al igual que en los adultos, en las crías no es necesario revivir la experiencia donde se adquirió

la memoria del miedo, sino que ésta puede ser desencadenada por un atributo de ese recuerdo (Spear, 1973). Nuestra hipótesis es que es el olor de la hembra anestesiada lo que desencadena el recuerdo y la expresión de miedo durante la prueba de miedo, ya que no se permitió ningún contacto físico con este adulto. En este sentido, durante las interacciones agresivas se liberan señales olfativas (J.-X. Zhang et al., 2008), que podrían influir directamente en las crías y contribuir a la adquisición de la memoria del miedo. En línea con esta hipótesis, se ha observado que la anosmia en crías de 12 días de edad bloquea su inmovilidad frente a un adulto (Shair et al., 1999). Curiosamente, ciertos olores individuales pueden ser comunes, mientras que otros pueden variar entre las hembras dependiendo de la fase de su ciclo estral (Brown, 1988; Lucas et al., 1982). Aunque hemos determinado que la exposición previa a una hembra intrusa en proestro induce una respuesta de miedo a este estímulo social, no está claro si esta respuesta es específica de las hembras en proestro o si se extiende a todas las hembras. Sería interesante investigar si la presencia de una hembra en diestro durante la prueba de miedo, o incluso los olores de las hembras en diestro y en proestro, provocan una respuesta de miedo en crías de 8 días previamente expuestas a hembras intrusas en proestro.

Diferencias de sexo en el proceso de memoria las respuestas de miedo de las crías

El hecho de que sólo las crías hembras y no las crías machos, que estuvieron previamente expuestas a intrusas expresaran una respuesta de miedo en el DPN 8 (experimento 1) indica una diferencia de sexo en los mecanismos que subyacen al efecto de esta experiencia temprana. Este resultado es consistente con nuestro estudio previo en el que demostramos que la exposición a una hembra intrusa provoca una mayor respuesta de miedo en las crías hembras, en comparación con la de las crías machos durante una prueba de miedo frente a un macho anestesiado (Zuluaga et al., 2014). De manera similar, también se han informado diferencias de sexo en la influencia de las experiencias estresantes en los procesos de memoria en individuos adultos. En este sentido, las hembras expuestas a estrés crónico por restricción muestran un mejor desempeño en tareas de memoria espacial y pruebas de memoria de reconocimiento (Beck & Luine, 2002; Bowman, 2005; Kittraki et al., 2004; McLaughlin et al., 2005), mientras que los machos estresados muestran deterioro en el desempeño de las mismas tareas (Beck & Luine, 2002; Bowman, 2005; Kittraki et al., 2004).

Las diferencias de sexo en la adquisición de memorias de miedo pueden estar relacionadas con variaciones en la respuesta endocrina al estrés, la cual se sabe que modula los procesos de aprendizaje (Chakraborty & Chattarji, 2019; Knox et al., 2012; Miracle et al., 2006) y la maduración del circuito neural involucrado en estos procesos (Moriceau et al., 2004; Takahashi, 1995). En esta línea de pensamiento, las hembras suelen exhibir una mayor respuesta del eje HHA en condiciones estresantes que los machos (Patchev et al., 1995; Seale et al., 2004) y fundamentalmente esta respuesta es mediada por AVP (Renard et al., 2010). Como mencionamos anteriormente, la AVP sería el principal mediador de la respuesta de ACTH en crías (Dent et al., 2000). Por lo tanto, una mayor respuesta HHA, por acción de la AVP en las crías hembras podría haber facilitado la formación de memorias de miedo durante la exposición a una hembra intrusa.

Por otro lado, variaciones en los niveles de esteroides gonadales durante la exposición a hembra intrusa podrían haber influido en la adquisición de la memoria de miedo. Así, hasta los DPN 6 a 10, la testosterona está elevada en las crías machos (Arnold & Gorski, 1984; MacLusky & Naftolin, 1981), y se ha demostrado que esta hormona enlentece la maduración de la amígdala (Kolodkin & Auger, 2011), un área necesariamente involucrada en la formación de la memoria del miedo tanto en adultos (Bailey et al., 1999; Kochli et al., 2015; Kwapis et al., 2011; Schafe & LeDoux, 2000) como en crías (Debiec & Sullivan, 2014; Moriceau et al., 2006; Tallot et al., 2016; Thompson et al., 2008). Este potencial efecto de la testosterona en los machos podría explicar por qué exhibieron una respuesta de miedo total (tanto USV como inmovilidad) sólo en condiciones altamente aversivas (es decir, un macho intruso).

A su vez, numerosos estudios sugieren que los mecanismos moleculares implicados en la formación de memorias de miedo pueden variar entre sexos (Frick et al., 2015; Méndez-López et al., 2009; Mizuno & Giese, 2010). El proceso de formación de memorias a largo plazo es complejo y no solo requiere la síntesis de proteínas *a novo*, sino que también implica la degradación de proteínas mediada por el sistema ubiquitina-proteosoma (SUP) (Bisaz et al., 2014; Josselyn & Tonegawa, 2020; Kandel et al., 2014). Se ha demostrado un papel fundamental del SUP en la formación de memorias de miedo (Cullen et al., 2017; Lopez-Salon et al., 2001). Curiosamente, las ratas macho y hembra difieren en sus mecanismos reguladores del proteosoma en la amígdala y el hipocampo (Devulapalli et al., 2021). Quizás la susceptibilidad de las hembras a formar un recuerdo de miedo hacia la intrusa podría estar relacionada con una diferencia en el SUP.

En resumen, los resultados de este capítulo indican que las crías pueden adquirir memorias de miedo desde los primeros días posnatales y resaltan la importancia del entorno materno temprano en la configuración del aprendizaje del miedo y las conductas de evitación en contextos sociales. Este efecto es dependiente del sexo, ya que únicamente estuvo presente en las crías hembras. Este fenómeno justifica una mayor investigación para desentrañar el papel de las hormonas gonadales y la interacción del estrés en estos efectos, así como su importancia adaptativa.

En este sentido, sería interesante profundizar en el proceso de memoria asociado a la respuesta de miedo frente a hembras en proestro, evaluando las otras etapas vinculadas a este proceso, como la adquisición, la reactivación y la extinción de la memoria. Por ejemplo mediante intervenciones farmacológicas con agonistas gabaérgicos o inhibidores de la síntesis de proteínas podríamos afectar las distintas etapas del proceso de memoria y determinar si se mantiene o no la memoria de miedo hacia hembras en proestro. También se podría evaluar si esta respuesta de miedo se mantiene fuera del periodo de HRE o incluso luego del destete. Asimismo, dado que la respuesta de miedo hacia hembras en proestro solamente se observó en crías hembras y que los procesos de degradación de proteínas parecen ser más sensibles en las hembras, sería interesante evaluar el rol de las hormonas gonadales durante la etapa postnatal sobre el sistema ubiquitina-proteosoma.

V. DISCUSIÓN GENERAL

En conjunto, los tres capítulos de esta tesis muestran que:

1. La convivencia con machos durante el período de HRE afectó el comportamiento maternal de las madres durante su presencia e indujo respuestas de miedo y la maduración temprana de circuitos neurales de miedo que son semejantes a los que se activaron fuera del período de HRE (Capítulo I)
2. La convivencia con machos no alteró el reconocimiento del olor a nido en crías machos ni en crías hembras, pero las crías hembras redujeron su tiempo de permanencia en el área con viruta de nido en relación al de los machos, sugiriendo que son más sensibles a los efectos de esta experiencia (Capítulo II)
3. La experiencia de convivir con hembras intrusas, un estímulo social no innato de miedo, habilitó procesos de aprendizaje aversivo (Capítulo III) en las crías hembras, sugiriendo que la madre, a través de su comportamiento es clave para inducir comportamientos de miedo frente a potenciales peligros, incluso en el período de HRE.

Esta evidencia aporta a la comprensión de períodos tempranos de la vida, e ilustra cómo el sistema nervioso de individuos neonatos con escaso grado de desarrollo es sensible variaciones en el ambiente, intermediadas por la madre, que modulan su desarrollo de forma compleja y específica de acuerdo a factores externos -como la naturaleza del intruso- e internos -como el sexo-. Esto abre un abanico de preguntas, desde cuáles son los mecanismos específicos que subyacen la influencia del ambiente a cuál es el posible significado biológico de los cambios observados en el desarrollo.

¿Cómo influye la madre sobre la respuesta de miedo de las crías hacia machos o hembras intrusas?

Si bien durante el periodo de HRE, las crías de 8 días de edad presentan una respuesta endócrina atenuada a varios factores estresantes (Moriceau et al., 2004; Takahashi, 1994; C. D. Walker et al., 1991), ésta es modulada por la madre y las variaciones en el comportamiento maternal recibido afectan esta hiporrespuesta (C.-D. Walker, 2010; C.-D.

Walker et al., 2004). Específicamente, se ha demostrado que la disminución de la estimulación táctil durante la separación maternal, potencian las respuestas de c-Fos, y de AVP y CRH a nivel del NPV e incrementan los niveles de ACTH y CORT en crías durante este período (Dent et al., 2000; M. Schmidt et al., 2004; Suchecki et al., 1993, 1995; C.-D. Walker, 2010).

En este sentido, se ha demostrado que la administración exógena de CORT induce la expresión de respuestas de miedo hacia machos adultos desconocidos en el período de HRE, mientras que la adrenalectomía impide su expresión (Moriceau et al., 2004; Takahashi & Kim, 1994). Asimismo, la administración de CORT a crías de 7 días de edad habilita el aprendizaje aversivo, mientras que la adrenalectomía en crías de 12 días lo elimina (Moriceau et al., 2006). En concordancia con estos resultados, la separación maternal se ha asociado con una mejora en la retención de memorias de miedo (Callaghan & Richardson, 2011; Sampath et al., 2014). Esta evidencia sugiere que un incremento en los niveles de CORT mediado por el cambio en el comportamiento maternal, podría subyacer la maduración temprana de circuitos de miedo en las crías expuestas a macho.

Una estructura clave en el procesamiento de estímulos innatos aversivos, así como en los procesos de aprendizaje y memoria aversivos, y en la expresión de respuestas de miedo es la amígdala (LeDoux, 2000). En adultos, los procesos de consolidación y reconsolidación de la memoria de miedo dependen en gran medida de la actividad de la amígdala, y estos procesos generan la síntesis *de novo* de proteínas en las neuronas de esta área (Bailey et al., 1999; Kochli et al., 2015; Kwapis et al., 2011; Schafe & LeDoux, 2000). La inactivación temporal de la amígdala impide la consolidación de memorias de miedo (Ferry & McGaugh, 2000; Takahashi et al., 2007). Esta área presenta receptores a glucocorticoides (RG) (Ahima & Harlan, 1990; Aronsson et al., 1988; Makino et al., 1994), y por ende es susceptible a señales relacionadas con variaciones en los niveles plasmáticos de CORT. De forma interesante, el estrés temprano y las interacciones madre-crías modulan la expresión y la función de los RG en la amígdala durante la etapa postnatal (Alcántara-Alonso et al., 2024; Trujillo et al., 2016). En este sentido, una separación maternal de 4 horas durante todo el periodo de lactancia provoca un aumento en la densidad de GR en amígdala medial (Trujillo et al., 2016).

Tomando en cuenta esta evidencia en su conjunto podemos especular que la exposición a macho y hembra intrusos induce la maduración de la amígdala, área clave del circuito de

miedo, como producto del aumento en los niveles de CORT provocados por la disminución del tiempo de contacto de la madre con las crías. Apoyando esta hipótesis, la administración de CORT a crías acelera la activación de la amígdala (Moriceau et al., 2004; Upton & Sullivan, 2010) durante el período de HRE y la adrenalectomía durante este período la inhibe, eliminando la expresión de respuestas de miedo frente a machos adultos (Takahashi & Kim, 1994).

La maduración temprana de la amígdala durante el período de HRE habilitaría procesos de aprendizaje de miedo mediados por la madre, como la respuesta de miedo ante una hembra adulta en proestro. En este sentido, se ha demostrado que es necesario que la amígdala haya madurado para que ocurran condicionamientos de miedo asociados a un estímulo neutro en crías (Debiec & Sullivan, 2014; Moriceau et al., 2006; Tallot et al., 2016; Thompson et al., 2008). Por otra parte, en el capítulo I de esta tesis, observamos que la presencia de un intruso macho, que provoca una disminución en el contacto materno (al igual que la presencia de una hembra en proestro intrusa) generó una activación temprana de la amígdala. Estos resultados sugieren fuertemente que la exposición a hembras intrusas, a través de incrementar el tiempo de separación madre-crías, también induce una maduración de esta área que permitirá el aprendizaje aversivo.

En conjunto, los resultados presentados en esta tesis indican que experiencias adversas tempranas, que provocan la maduración temprana del circuito neural del miedo, no sólo habilitan la expresión de respuestas de miedo innatas (como la observada ante un macho adulto), sino que habilita procesos de aprendizaje aversivo mediado por la madre (como se observa luego de la exposición a hembra intrusa). Sería interesante determinar si la exposición a machos o hembras intrusos altera los niveles de CORT en crías y si otras áreas del circuito de miedo se ven afectadas en su organización y funcionamiento por la exposición a esta hormona durante este periodo crítico del desarrollo. En este sentido, durante el período postnatal temprano, aún están ocurriendo procesos de organización del SN que pueden ser influidos por los niveles de CORT, como la neurogénesis, la gliogénesis y la mielinización (Figura 21) (Bock et al., 2005; Cirulli et al., 2003, 2010; Garvin & Bolton, 2022; Kikusui et al., 2007, 2009).

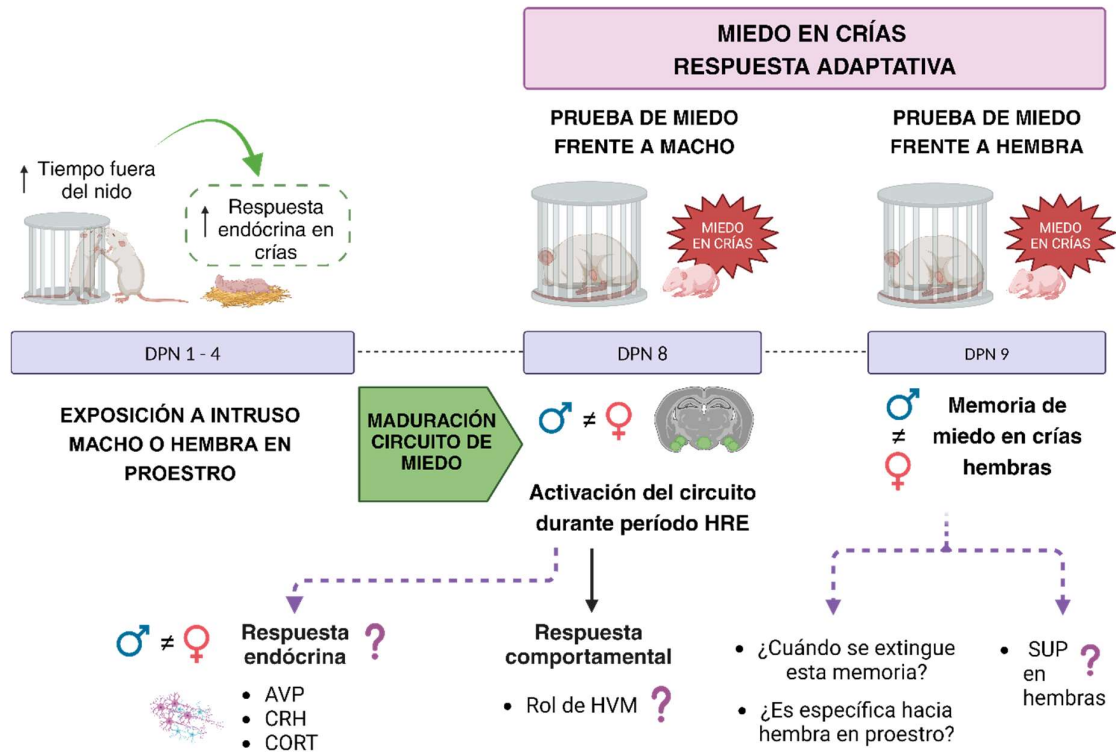


Figura 21. Esquema representativo que ilustra la influencia del ambiente adverso para la madre en la respuesta de miedo de las crías, destacando cómo la presencia de los intrusos macho y hembra aumenta el tiempo fuera del nido de la madre lo que posiblemente genere una respuesta endócrina en crías. Estas alteraciones provocan la maduración del circuito de miedo, habilitando por un lado la respuesta temprana de miedo frente a macho adulto y por otro la capacidad de las crías en poder adquirir una memoria aversiva asociada a los cambios en la respuesta materna que posteriormente se expresa como una respuesta de miedo frente a la hembra en proestro. A su vez, los resultados plantean una serie de preguntas (líneas punteadas), que van desde los mecanismos específicos que subyacen a la influencia del ambiente y a las respuestas y memorias de miedo hasta el posible significado biológico de los cambios en el desarrollo observados.

La respuesta precoz de miedo como conducta adaptativa

En esta tesis mostramos como una situación de estrés social para la madre, como lo es la presencia de la hembra intrusa, provoca una respuesta de miedo en las crías la cual depende de un proceso de memoria. Estos resultados resaltan la importancia del entorno materno temprano en la configuración del aprendizaje del miedo y las conductas de evitación en contextos sociales. Las crías son capaces de regular su comportamiento en situaciones nuevas utilizando la respuesta emocional de la madre durante la situación estresante. Esta capacidad les permite desarrollar estrategias de supervivencia eficientes, ya que los individuos en desarrollo deben aprender sobre amenazas ambientales específicas que

desencadenan el miedo en la madre (Debiec & Sullivan, 2017; Frith, 2008; Murray et al., 2008).

Podríamos interpretar nuestros resultados en el marco de la hipótesis de estrés de "*match/mismatch*" (Frankenhuis & Del Giudice, 2012; Nederhof & Schmidt, 2012; Oitzl et al., 2010; M. V. Schmidt, 2011). Esta hipótesis propone que el resultado de la exposición al estrés en los primeros años de vida no es necesariamente patológica, sino que también puede desencadenar procesos adaptativos vinculados al ambiente en el cual esos individuos están siendo criados. Surge el concepto de respuesta adaptativa predictiva, es decir, la experiencia de estrés y las estrategias para afrontarlo en el pasado se pueden "aplicar" para hacer frente a condiciones ambientales futuras de forma adaptativa (*match*) (Gluckman et al., 2005). Por ejemplo, las crías de madres "negligentes" mostraron un rendimiento cognitivo más bajo en condiciones basales (sin estrés) en comparación con las crías de madres que expresaron mayores cuidados maternos (*mismatch*). Sin embargo, dentro de una situación estresante, que es comparable a su experiencia en la vida temprana, las crías de madres "negligentes" tuvieron un mejor desempeño en comparación con las crías de madres que expresaron mayores cuidados maternos (*match*) (Champagne, 2008). Si tomamos en cuenta los resultados del capítulo I y III de esta tesis, al re-exponer a las crías a los intrusos macho o hembra en la prueba de miedo en el DPN 8 o 9, éstas exhiben una respuesta adaptativa coherente a la situación de amenaza en la que se encuentran, mientras que aquellas crías que no fueron expuestas a intrusos no presentan respuestas de miedo. Asimismo, en el capítulo II, la exposición a macho no alteró el reconocimiento del nido materno, lo que favorecería a la supervivencia de las crías ya que en el nido es probable que tengan la protección materna.

El macho adulto: ¿un potencial depredador o un co-específico dominante?

Hace ya varias décadas, Bolles (1970) postuló que los mismos comportamientos defensivos (como la inmovilidad y la huida) son desencadenados por todas las amenazas ambientales percibidas, desde los depredadores naturales hasta las descargas eléctricas (Crawford & Masterson, 1982). El circuito neural asociado a la organización de este comportamiento sería común al procesamiento de todas las amenazas (Fanselow, 1994). Sin embargo, los estudios de mapeo de c-Fos en individuos adultos han demostrado que la exposición a un depredador o a un co-específico dominante reclutan circuitos diferentes a los descritos para el miedo condicionado (Fanselow & Ponnusamy, 2008; Motta et al., 2009; Silva et al., 2013). En este

sentido, se ha observado que tanto el HCV como el HVM se activan selectivamente en función del tipo específico de estímulo aversivo al que los individuos se enfrentan. En el caso de la exposición a depredadores, se activan el HCV y la división dorsomedial del HVM (HVMdm) en ratas adultas (Day et al., 2004; Esteban Masferrer et al., 2020; Heale et al., 1994; Phillips & LeDoux, 1992; Silva et al., 2013; W. N. Zhang et al., 2001). En tanto, en el modelo de derrota social (presencia de co-específico dominante, otro macho adulto) se observa una activación a nivel del HVM ventrolateral (HVMvl) (Fekete et al., 2009; Silva et al., 2013), pero no a nivel del HVMdm o de hipocampo (Esteban Masferrer et al., 2020; Kunwar et al., 2015; Lin et al., 2011; Silva et al., 2013). Esta activación diferencial provoca las respuestas de miedo frente a estas dos situaciones aversivas (Silva et al., 2013).

Nuestros resultados muestran que, en contraste con lo reportado en adultos, las crías de 14 días de edad, que presentan una respuesta de miedo hacia macho anestesiado, no presentan activación de c-Fos en HCV, pero sí aumentaron la expresión de c-Fos a nivel del HVMvl respecto al control negativo. Tomando en cuenta estos resultados podemos sugerir que el HCV no estaría involucrado en la ontogenia de la respuesta de miedo de crías durante esta etapa del desarrollo.

De manera interesante, el aumento en la expresión de c-Fos en HVM de crías de 14 días se concentró en el HVMvl. La activación específica del HVMvl, sugiere que las crías estarían catalogando al estímulo macho como un miedo social y no como un depredador y que por lo tanto la expresión de la respuesta de miedo fuera del periodo HRE se debería a la presencia de un co-específico dominante, el macho adulto. Esta afirmación se sustenta por el hecho de que la probabilidad de cometer infanticidios por parte de los machos adultos disminuye con la edad, siendo poco frecuente a la edad de 14 días (Paul & Kupferschmidt, 1975). No obstante, esta interpretación requiere de una investigación más exhaustiva, puesto que como mencionamos en el capítulo I, las áreas del circuito de miedo activadas en crías frente a machos adultos coinciden con las áreas que se activan en adultos frente a potenciales depredadores y frente a un co-específico dominante. Por lo tanto, debemos realizar una disección funcional de los circuitos neurales que subyacen a la respuesta de miedo en crías hacia estos dos tipos de estímulos aversivos. En este sentido, sería interesante determinar si la inhibición farmacológica del HVMvl en crías de 14 días de edad inhibe la respuesta de miedo hacia machos desconocidos o si las hembras intrusas activan esta área.

Consideraciones finales

Esta tesis enfatiza la importancia de abordar las bases neurales de los efectos de las experiencias tempranas sobre el desarrollo del SN y destaca el impacto de la madre como transmisora de la información del medio, en particular de las experiencias adversas, en crías altriciales. A su vez, consideramos que el análisis de los efectos del estrés materno en las crías, desde los períodos iniciales de vida, es relevante permite identificar impactos inmediatos, contrastando con la tendencia a investigar los efectos a largo plazo en adultos.

vi. PERSPECTIVAS Y CONTRIBUCIONES

Mis perspectivas contemplan finalizar la escritura y edición de manuscritos para publicar de los resultados obtenidos en la tesis. En este sentido y como ya mencionamos, los resultados obtenidos en el capítulo III dieron lugar a la publicación: Zuluaga, M. J., Agrati, D., Atháide, V., Ferreira, A., Uriarte, N. (2023). Fear response of rat pups to a non-aversive social stimulus: Evidence for the involvement of memory processes. *Developmental Psychobiology*, 65(7), e22417, <https://doi.org/10.1002/dev.22417>. Los resultados obtenidos en el capítulo I se reúnen en un manuscrito a ser enviado a la revista arbitrada *International Journal of Developmental Neuroscience* como un artículo completo: Zuluaga MJ, Agrati D, Ferreira A, Uriarte N. Effect of early exposure to a male intruder on the activation of the fear circuit. En tanto, los resultados del capítulo II y Anexo I serán resumidos y publicados en *Developmental Psychobiology* de forma conjunta con el fin de ampliar la caracterización del modelo sobre experiencia temprana adversas por exposición a un macho intruso.

La exposición temprana a situaciones adversas influye sobre ciertos los procesos de memoria, como el reconocimiento del intruso en la prueba de miedo, pero no alteró el reconocimiento del nido materno. A partir de estos resultados nos propusimos profundizar en el efecto del contexto social temprano sobre procesos de memoria en la rata. Para ello la Dra. Vanessa Athaide, desarrolló su proyecto de investigación postdoctoral, en el cual participé como colaboradora, financiado por la Agencia Nacional de Investigación e Innovación donde se exploró si la exposición temprana a intruso tenía un efecto a largo plazo sobre las funciones cognitivas y emocionales durante adolescencia y la adultez. Planeamos junto con la Dra. Athaide trabajar en la escritura de un manuscrito para publicar los resultados obtenidos.

Desde el punto de vista metodológico una de las contribuciones más destacadas de este trabajo involucró la puesta a punto de la cuantificación de la expresión de la proteína c-Fos en el sistema nervioso de crías mediante la técnica de inmunohistoquímica. En este sentido, tuve que ajustar los protocolos de colecta de encéfalos y preparación del tejido, así como la identificación de las áreas a analizar, dado que las secciones varían en su morfología entre crías y adultos. Asimismo, me capacité en el análisis de imágenes para la determinación de

la expresión de c-Fos en el cerebro de crías realizando el curso de Posgrado y Seminario Interdisciplinario: Procesamiento de Imágenes para Biología y Medicina dictado por Imagina: Centro de obtención y Análisis de imágenes biomédicas.

Los datos obtenidos en este trabajo de tesis fueron presentados como comunicaciones en los siguientes congresos nacionales, regionales e internacionales:

- Zuluaga M.J., Ferreira A. Precocious fear expression in rat pups and its association with early maturation of areas related with fear control. Parental Brain: Biological and Behavioural Perspectives in Parental Health, satellite event to the International Congress on Neuroendocrinology, 2018.
- Zuluaga M.J., Agrati D., Uriarte N., Bedó G., Ferreira A. Efecto del estrés temprano sobre la expresión de c-Fos en áreas relacionadas con expresión de respuesta de miedo en crías de *Rattus norvegicus*. I Reunión de Biología del Comportamiento del Cono Sur, Argentina, 2017.
- Athaide V.; Zuluaga M.J.; Uriarte N.; Ferreira A. Efecto del estrés temprano en los procesos de memoria de la rata (#0341). Congreso Nacional de Biociencias, Uruguay, 2017.
- Athaide V.; Uriarte N.; Zuluaga MJ; Agrati D; Ferreira A. Efecto del contexto social temprano en procesos de memoria en la rata. Simposio de Educación, Cognición y Neurociencias, Uruguay, 2017.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adamec, R. E., & Shallow, T. (1993). Lasting effects on rodent anxiety of a single exposure to a cat. *Physiology & Behavior*, 54(1), 101-109. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(93\)90050-p](https://doi.org/10.1016/0031-9384(93)90050-p)
- Agrati, D., Browne, D., Jonas, W., Meaney, M., Atkinson, L., Steiner, M., Fleming, A. S., & MAVAN research team. (2015). Maternal anxiety from pregnancy to 2 years postpartum: Transactional patterns of maternal early adversity and child temperament. *Archives of Women's Mental Health*, 18(5), 693-705. <https://doi.org/10.1007/s00737-014-0491-y>
- Agrati, D., & Lonstein, J. S. (2016). Affective changes during the postpartum period: Influences of genetic and experiential factors. *Hormones and Behavior*, 77, 141-152. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2015.07.016>
- Agrati, D., & Uriarte, N. (2023). What can challenging reproductive contexts tell us about the rat's maternal behavior? *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 17, 1239681. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2023.1239681>
- Aguggia, J. P., Suárez, M. M., & Rivarola, M. A. (2013). Early maternal separation: Neurobehavioral consequences in mother rats. *Behavioural Brain Research*, 248, 25-31. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.03.040>
- Ahima, R. S., & Harlan, R. E. (1990). Charting of type II glucocorticoid receptor-like immunoreactivity in the rat central nervous system. *Neuroscience*, 39(3), 579-604. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(90\)90244-x](https://doi.org/10.1016/0306-4522(90)90244-x)
- Alberts, J. R. (1994). Learning as adaptation of the infant. *Acta Paediatrica (Oslo, Norway: 1992). Supplement*, 397, 77-85. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.1994.tb13269.x>
- Alcántara-Alonso, V., García-Luna, C., Soberanes-Chávez, P., Estrada-Camarena, E., & Gortari, P. de. (2024). Two Adverse Early Life Events Induce Differential Changes in Brain CRH and Serotonin Systems in Rats along with Hyperphagia and Depression. *Journal of Integrative Neuroscience*, 23(2), Article 2. <https://doi.org/10.31083/j.jin2302041>
- Angelucci, L., Patacchioli, F. R., Chierichetti, C., & Laureti, S. (1983). Perinatal mother-offspring pituitary-adrenal interrelationship in rats: Corticosterone in milk may affect adult life. *Endocrinologia Experimentalis*, 17(3-4), 191-205.
- Arnold, A. P., & Gorski, R. A. (1984). Gonadal Steroid Induction of Structural Sex Differences in the Central Nervous System. *Annual Review of Neuroscience*, 7(1), Article 1. <https://doi.org/10.1146/annurev.ne.07.030184.002213>
- Aronsson, M., Fuxe, K., Dong, Y., Agnati, L. F., Okret, S., & Gustafsson, J. A. (1988). Localization of glucocorticoid receptor mRNA in the male rat brain by in situ hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(23), 9331-9335. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.23.9331>
- Avishai-Eliner, S., Brunson, K. L., Sandman, C. A., & Baram, T. Z. (2002). Stressed-out, or in (utero)? *Trends in Neurosciences*, 25(10), 518-524. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(02\)02241-5](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(02)02241-5)
- Bailey, D. J., Kim, J. J., Sun, W., Thompson, R. F., & Helmstetter, F. J. (1999). Acquisition of fear conditioning in rats requires the synthesis of mRNA in the amygdala. *Behavioral Neuroscience*, 113(2), Article 2. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.113.2.276>

- Baracz, S. J., Everett, N. A., & Cornish, J. L. (2020). The impact of early life stress on the central oxytocin system and susceptibility for drug addiction: Applicability of oxytocin as a pharmacotherapy. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 110, 114-132. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.08.014>
- Bath, K. G. (2020). Synthesizing Views to Understand Sex Differences in Response to Early Life Adversity. *Trends in Neurosciences*, 43(5), 300-310. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2020.02.004>
- Bath, K. G., Nitenson, A. S., Lichtman, E., Lopez, C., Chen, W., Gallo, M., Goodwill, H., & Manzano-Nieves, G. (2017). Early life stress leads to developmental and sex selective effects on performance in a novel object placement task. *Neurobiology of Stress*, 7, 57-67. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2017.04.001>
- Beck, K. D., & Luine, V. N. (2002). Sex differences in behavioral and neurochemical profiles after chronic stress. *Physiology & Behavior*, 75(5), Article 5. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(02\)00670-4](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(02)00670-4)
- Bergan, J. F., Ben-Shaul, Y., & Dulac, C. (2014). Sex-specific processing of social cues in the medial amygdala. *eLife*, 3, e02743. <https://doi.org/10.7554/eLife.02743>
- Bevilaqua, L. R., Medina, J. H., Izquierdo, I., & Cammarota, M. (2008). Reconsolidation and the fate of consolidated memories. *Neurotoxicity Research*, 14(4), Article 4. <https://doi.org/10.1007/BF03033859>
- Biala, Y. N., Bogoch, Y., Bejar, C., Linial, M., & Weinstock, M. (2011). Prenatal stress diminishes gender differences in behavior and in expression of hippocampal synaptic genes and proteins in rats. *Hippocampus*, 21(10), 1114-1125. <https://doi.org/10.1002/hipo.20825>
- Bingham, B., Williamson, M., & Viau, V. (2006). Androgen and estrogen receptor-beta distribution within spinal-projecting and neurosecretory neurons in the paraventricular nucleus of the male rat. *The Journal of Comparative Neurology*, 499(6), 911-923. <https://doi.org/10.1002/cne.21151>
- Bisaz, R., Travaglia, A., & Alberini, C. M. (2014). The Neurobiological Bases of Memory Formation: From Physiological Conditions to Psychopathology. *Psychopathology*, 47(6), Article 6. <https://doi.org/10.1159/000363702>
- Blanchard, D. C., Canteras, N. S., Markham, C. M., Pentkowski, N. S., & Blanchard, R. J. (2005). Lesions of structures showing FOS expression to cat presentation: Effects on responsivity to a Cat, Cat odor, and nonpredator threat. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 29(8), 1243-1253. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.04.019>
- Blanchard, D. C., Williams, G., Lee, E. M. C., & Blanchard, R. J. (1981). Taming of wild *Rattus norvegicus* by lesions of the mesencephalic central gray. *Physiological Psychology*, 9(2), 157-163. <https://doi.org/10.3758/BF03332917>
- Blanchard, R. J., & Blanchard, D. C. (1972). Effects of hippocampal lesions on the rat's reaction to a cat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 78(1), 77-82. <https://doi.org/10.1037/h0032176>
- Boccia, M. L., Razzoli, M., Vadlamudi, S. P., Trumbull, W., Caleffie, C., & Pedersen, C. A. (2007). Repeated long separations from pups produce depression-like behavior in rat mothers. *Psychoneuroendocrinology*, 32(1), 65-71. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2006.10.004>
- Bock, J., Gruss, M., Becker, S., & Braun, K. (2005). Experience-induced Changes of Dendritic Spine Densities in the Prefrontal and Sensory Cortex: Correlation with Developmental Time Windows. *Cerebral Cortex*, 15(6), 802-808. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhh181>

- Bock, J., Rether, K., Gröger, N., Xie, L., & Braun, K. (2014). Perinatal programming of emotional brain circuits: An integrative view from systems to molecules. *Frontiers in Neuroscience*, 8, 11. <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00011>
- Bölükbas, I., Mundorf, A., & Freund, N. (2020). Maternal separation in rats induces neurobiological and behavioral changes on the maternal side. *Scientific Reports*, 10(1), 22431. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80087-6>
- Bowman, R. E. (2005). Stress-Induced Changes in Spatial Memory are Sexually Differentiated and Vary Across the Lifespan. *Journal of Neuroendocrinology*, 17(8), Article 8. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2005.01335.x>
- Boyer, P., & Bergstrom, B. (2011). Threat-detection in child development: An evolutionary perspective. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 35(4), 1034-1041. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2010.08.010>
- Breton, J. M., Cort, Z., Demaestri, C., Critz, M., Nevins, S., Downend, K., Ofray, D., Romeo, R. D., & Bath, K. G. (2024). Early life adversity reduces affiliative behavior with a stressed cagemate and leads to sex-specific alterations in corticosterone responses in adult mice. *Hormones and Behavior*, 158, 105464. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2023.105464>
- Brown, R. E. (1988). Individual odors of rats are discriminable independently of changes in gonadal hormone levels. *Physiology & Behavior*, 43(3), Article 3. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(88\)90199-0](https://doi.org/10.1016/0031-9384(88)90199-0)
- Brunelli, S. A., Masmela, J. R., Shair, H. N., & Hofer, M. A. (1998). Effects of biparental rearing on ultrasonic vocalization (USV) responses of rat pups (*Rattus norvegicus*). *Journal of Comparative Psychology*, 112(4), Article 4. <https://doi.org/10.1037/0735-7036.112.4.331>
- Callaghan, B. L., & Richardson, R. (2011). Maternal separation results in early emergence of adult-like fear and extinction learning in infant rats. *Behavioral Neuroscience*, 125(1), Article 1. <https://doi.org/10.1037/a0022008>
- Canteras, N. S., Chiavegatto, S., Ribeiro do Valle, L. E., & Swanson, L. W. (1997). Severe reduction of rat defensive behavior to a predator by discrete hypothalamic chemical lesions. *Brain Research Bulletin*, 44(3), 297-305. [https://doi.org/10.1016/s0361-9230\(97\)00141-x](https://doi.org/10.1016/s0361-9230(97)00141-x)
- Carver, L. J., & Vaccaro, B. G. (2007). 12-month-old infants allocate increased neural resources to stimuli associated with negative adult emotion. *Developmental Psychology*, 43(1), 54-69. <https://doi.org/10.1037/0012-1649.43.1.54>
- Caza, P. A., & Spear, N. E. (1984). Short-term exposure to an odor increases its subsequent preference in preweanling rats: A descriptive profile of the phenomenon. *Developmental Psychobiology*, 17(4), Article 4. <https://doi.org/10.1002/dev.420170407>
- Chakraborty, P., & Chattarji, S. (2019). Timing is everything: Differential effects of chronic stress on fear extinction. *Psychopharmacology*, 236(1), Article 1. <https://doi.org/10.1007/s00213-018-5053-y>
- Champagne, F. A. (2008). Epigenetic mechanisms and the transgenerational effects of maternal care. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 29(3), 386-397. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2008.03.003>
- Champagne, F. A., Francis, D. D., Mar, A., & Meaney, M. J. (2003). Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. *Physiology & Behavior*, 79(3), 359-371. [https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(03\)00149-5](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(03)00149-5)
- Charney, D. S., Grillon, C., & Bremner, J. D. (1998a). Review: The Neurobiological Basis of Anxiety and Fear: Circuits, Mechanisms, and Neurochemical Interactions (Part I. *The Neuroscientist*, 4(1), 35-44. <https://doi.org/10.1177/107385849800400111>

- Charney, D. S., Grillon, C. C. G., & Bremner, J. D. (1998b). The neurobiological basis of anxiety and fear: Circuits, mechanisms, and neurochemical interactions (Part II). *Neuroscientist*, 4(2), 122-132. <https://doi.org/10.1177/107385849800400208>
- Chen, S. W. C., Shemyakin, A., & Wiedenmayer, C. P. (2006). The role of the amygdala and olfaction in unconditioned fear in developing rats. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(1), 233-240. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2890-05.2006>
- Choi, G. B., Dong, H.-W., Murphy, A. J., Valenzuela, D. M., Yancopoulos, G. D., Swanson, L. W., & Anderson, D. J. (2005). Lhx6 delineates a pathway mediating innate reproductive behaviors from the amygdala to the hypothalamus. *Neuron*, 46(4), 647-660. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.04.011>
- Cirulli, F., Berry, A., & Alleva, E. (2003). Early disruption of the mother–infant relationship: Effects on brain plasticity and implications for psychopathology. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 27(1-2), Article 1-2. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(03\)00010-1](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(03)00010-1)
- Cirulli, F., Berry, A., Bonsignore, L. T., Capone, F., D'Andrea, I., Aloe, L., Branchi, I., & Alleva, E. (2010). Early life influences on emotional reactivity: Evidence that social enrichment has greater effects than handling on anxiety-like behaviors, neuroendocrine responses to stress and central BDNF levels. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 34(6), 808-820. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2010.02.008>
- Coggeshall, R. E., Pover, C. M., & Fitzgerald, M. (1994). Dorsal root ganglion cell death and surviving cell numbers in relation to the development of sensory innervation in the rat hindlimb. *Brain Research. Developmental Brain Research*, 82(1-2), 193-212. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(94\)90163-5](https://doi.org/10.1016/0165-3806(94)90163-5)
- Collins, D. R. (2011). Synthetic versus natural cat odorant effects on rodent behavior and medial amygdala plasticity. *Behavioral Neuroscience*, 125(1), 124-129. <https://doi.org/10.1037/a0021955>
- Cooke, B. M., Stokas, M. R., & Woolley, C. S. (2007). Morphological sex differences and laterality in the prepubertal medial amygdala. *The Journal of Comparative Neurology*, 501(6), 904-915. <https://doi.org/10.1002/cne.21281>
- Cooke, B. M., & Woolley, C. S. (2009). Effects of prepubertal gonadectomy on a male-typical behavior and excitatory synaptic transmission in the amygdala. *Developmental Neurobiology*, 69(2-3), 141-152. <https://doi.org/10.1002/dneu.20688>
- Cost, K., McGowan, P., & Pawluski, J. (2021). Gestational Stress and Parenting: A Review of Human and Animal Literature. En A. Wazana, E. Székely, & T. F. Oberlander (Eds.), *Prenatal Stress and Child Development* (pp. 317-346). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-60159-1_12
- Coutellier, L., Friedrich, A.-C., Failing, K., Marashi, V., & Würbel, H. (2008). Effects of rat odour and shelter on maternal behaviour in C57BL/6 dams and on fear and stress responses in their adult offspring. *Physiology & Behavior*, 94(3), 393-404. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2008.02.006>
- Crawford, M., & Masterson, F. A. (1982). Species-specific defense reactions and avoidance learning. An evaluative review. *The Pavlovian Journal of Biological Science*, 17(4), 204-214. <https://doi.org/10.1007/BF03001275>
- Cullen, P. K., Ferrara, N. C., Pullins, S. E., & Helmstetter, F. J. (2017). Context memory formation requires activity-dependent protein degradation in the hippocampus. *Learning & Memory*, 24(11), Article 11. <https://doi.org/10.1101/lm.045443.117>

- Cullinan, W. E., Herman, J. P., Battaglia, D. F., Akil, H., & Watson, S. J. (1995). Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. *Neuroscience*, 64(2), 477-505. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)00355-9](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)00355-9)
- Curley, J. P., & Champagne, F. A. (2016). Influence of maternal care on the developing brain: Mechanisms, temporal dynamics and sensitive periods. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 40, 52-66. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2015.11.001>
- Czéh, B., Vardya, I., Varga, Z., Febraro, F., Csabai, D., Martis, L.-S., Højgaard, K., Henningsen, K., Bouzinova, E. V., Miseta, A., Jensen, K., & Wiborg, O. (2018). Long-Term Stress Disrupts the Structural and Functional Integrity of GABAergic Neuronal Networks in the Medial Prefrontal Cortex of Rats. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00148>
- D'Amato, F. R., & Cabib, S. (1987). Chronic exposure to a novel odor increases pups' vocalizations, maternal care, and alters dopaminergic functioning in developing mice. *Behavioral and Neural Biology*, 48(2), 197-205. [https://doi.org/10.1016/s0163-1047\(87\)90738-2](https://doi.org/10.1016/s0163-1047(87)90738-2)
- D'Andrea, I., Gracci, F., Alleva, E., & Branchi, I. (2010). Early social enrichment provided by communal nest increases resilience to depression-like behavior more in female than in male mice. *Behavioural Brain Research*, 215(1), 71-76. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.06.030>
- Daskalakis, N. P., Diamantopoulou, A., Claessens, S. E. F., Remmers, E., Tjälve, M., Oitzl, M. S., Champagne, D. L., & de Kloet, E. R. (2014). Early experience of a novel-environment in isolation primes a fearful phenotype characterized by persistent amygdala activation. *Psychoneuroendocrinology*, 39, 39-57. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2013.09.021>
- Davis, E. P., Stout, S. A., Molet, J., Vegetabile, B., Glynn, L. M., Sandman, C. A., Heins, K., Stern, H., & Baram, T. Z. (2017). Exposure to unpredictable maternal sensory signals influences cognitive development across species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(39), 10390-10395. <https://doi.org/10.1073/pnas.1703444114>
- Davis, H. P., & Squire, L. R. (1984). Protein synthesis and memory: A review. *Psychological Bulletin*, 96(3), Article 3.
- Day, H. E. W., Masini, C. V., & Campeau, S. (2004). The pattern of brain c-fos mRNA induced by a component of fox odor, 2,5-dihydro-2,4,5-trimethylthiazoline (TMT), in rats, suggests both systemic and processive stress characteristics. *Brain Research*, 1025(1-2), 139-151. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.07.079>
- de Souza, M. A., Szawka, R. E., Centenaro, L. A., Diehl, L. A., & Lucion, A. B. (2012). Prenatal stress produces sex differences in nest odor preference. *Physiology & Behavior*, 105(3), 850-855. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.10.012>
- Debiec, J., & Sullivan, R. M. (2014). Intergenerational transmission of emotional trauma through amygdala-dependent mother-to-infant transfer of specific fear. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(33), 12222-12227. <https://doi.org/10.1073/pnas.1316740111>
- Debiec, J., & Sullivan, R. M. (2017). The neurobiology of safety and threat learning in infancy. *Neurobiology of Learning and Memory*, 143, 49-58. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2016.10.015>
- Demaestri, C., Gallo, M., Mazenod, E., Hong, A. T., Arora, H., Short, A. K., Stern, H., Baram, T. Z., & Bath, K. G. (2022). Resource scarcity but not maternal separation provokes unpredictable maternal care sequences in mice and both upregulate Crh-associated gene expression in the amygdala. *Neurobiology of Stress*, 20, 100484. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2022.100484>
- Deng, H., Xiao, X., & Wang, Z. (2016). Periaqueductal Gray Neuronal Activities Underlie Different Aspects of Defensive Behaviors. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 36(29), 7580-7588. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4425-15.2016>

- Dent, G. W., Okimoto, D. K., Smith, M. A., & Levine, S. (2000). Stress-induced alterations in corticotropin-releasing hormone and vasopressin gene expression in the paraventricular nucleus during ontogeny. *Neuroendocrinology*, 71(6), 333-342. <https://doi.org/10.1159/000054554>
- 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. *Journal of Neuroendocrinology*, 15(5), 486-497. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.2003.01022.x>
- Devulapalli, R., Jones, N., Farrell, K., Musaus, M., Kugler, H., McFadden, T., Orsi, S. A., Martin, K., Nelsen, J., Navabpour, S., O'Donnell, M., McCoig, E., & Jarome, T. J. (2021). Males and females differ in the regulation and engagement of, but not requirement for, protein degradation in the amygdala during fear memory formation. *Neurobiology of Learning and Memory*, 180, 107404. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2021.107404>
- Deweere, B., Sara, S. J., & Hars, B. (1980). Contextual cues and memory retrieval in rats: Alleviation of forgetting by a pretest exposure to background stimuli. *Animal Learning & Behavior*, 8(2), Article 2. <https://doi.org/10.3758/BF03199605>
- Dias, B. G., & Ressler, K. J. (2014). Parental olfactory experience influences behavior and neural structure in subsequent generations. *Nature Neuroscience*, 17(1), 89-96. <https://doi.org/10.1038/nn.3594>
- do Prado, C. H., Narahari, T., Holland, F. H., Lee, H.-N., Murthy, S. K., & Brenhouse, H. C. (2016). Effects of early adolescent environmental enrichment on cognitive dysfunction, prefrontal cortex development, and inflammatory cytokines after early life stress. *Developmental Psychobiology*, 58(4), 482-491. <https://doi.org/10.1002/dev.21390>
- Dudai, Y., & Eisenberg, M. (2004). Rites of Passage of the Engram. *Neuron*, 44(1), Article 1. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.09.003>
- Dudai, Y., Karni, A., & Born, J. (2015). The Consolidation and Transformation of Memory. *Neuron*, 88(1), Article 1. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.09.004>
- Dunn, J. D., & Whitener, J. (1986). Plasma corticosterone responses to electrical stimulation of the amygdaloid complex: Cytoarchitectural specificity. *Neuroendocrinology*, 42(3), 211-217. <https://doi.org/10.1159/000124442>
- Dupin, M., Garcia, S., Boulanger-Bertolus, J., Buonviso, N., & Mouly, A.-M. (2019). New Insights from 22-kHz Ultrasonic Vocalizations to Characterize Fear Responses: Relationship with Respiration and Brain Oscillatory Dynamics. *eNeuro*, 6(2), ENEURO.0065-19.2019. <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0065-19.2019>
- Erskine, M. S., Barfield, R. J., & Goldman, B. D. (1980). Postpartum aggression in rats: II. Dependence on maternal sensitivity to young and effects of experience with pregnancy and parturition. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 94(3), 495-505. <https://doi.org/10.1037/h0077677>
- Esteban Masferrer, M., Silva, B. A., Nomoto, K., Lima, S. Q., & Gross, C. T. (2020). Differential Encoding of Predator Fear in the Ventromedial Hypothalamus and Periaqueductal Grey. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 40(48), 9283-9292. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0761-18.2020>
- Fanselow, M. S. (1994). Neural organization of the defensive behavior system responsible for fear. *Psychonomic Bulletin & Review*, 1(4), 429-438. <https://doi.org/10.3758/BF03210947>
- Fanselow, M. S., & Dong, H.-W. (2010). Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron*, 65(1), 7-19. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.11.031>

- Fanselow, M. S., & Ponnusamy, R. (2008). *Handbook of Anxiety and Fear, Volume 17—1st Edition / Elsevier Shop*. <https://shop.elsevier.com/books/handbook-of-anxiety-and-fear/blanchard/978-0-444-53065-3>
- Fekete, E. M., Zhao, Y., Li, C., Sabino, V., Vale, W. W., & Zorrilla, E. P. (2009). Social defeat stress activates medial amygdala cells that express type 2 corticotropin-releasing factor receptor mRNA. *Neuroscience*, 162(1), 5-13. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.03.078>
- Feldman, S., Conforti, N., Itzik, A., & Weidenfeld, J. (1994). Differential effect of amygdaloid lesions on CRF-41, ACTH and corticosterone responses following neural stimuli. *Brain Research*, 658(1-2), 21-26. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(09\)90005-1](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(09)90005-1)
- Fendt, M., Endres, T., & Apfelbach, R. (2003). Temporary inactivation of the bed nucleus of the stria terminalis but not of the amygdala blocks freezing induced by trimethylthiazoline, a component of fox feces. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(1), 23-28. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-01-00023.2003>
- Fenoglio, K. A., Chen, Y., & Baram, T. Z. (2006). Neuroplasticity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis early in life requires recurrent recruitment of stress-regulating brain regions. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(9), 2434-2442. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4080-05.2006>
- Ferreira, A., & Hansen, S. (1986). Sensory control of maternal aggression in *Rattus norvegicus*. *Journal of Comparative Psychology (Washington, D.C.: 1983)*, 100(2), 173-177.
- Ferreira, A., Hansen, S., Nielsen, M., Archer, T., & Minor, B. G. (1989). Behavior of mother rats in conflict tests sensitive to anti-anxiety agents. *Behavioral Neuroscience*, 103(1), 193-201. <https://doi.org/10.1037//0735-7044.103.1.193>
- Ferreira, A., Pereira, M., Agrati, D., Uriarte, N., & Fernández-Guasti, A. (2002). Role of maternal behavior on aggression, fear and anxiety. *Physiology & Behavior*, 77(2-3), 197-204. [https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(02\)00845-4](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(02)00845-4)
- Ferry, B., & McGaugh, J. L. (2000). Role of amygdala norepinephrine in mediating stress hormone regulation of memory storage. *Acta Pharmacologica Sinica*, 21(6), 481-493.
- Fleming, A. S., & Luebke, C. (1981). Timidity prevents the virgin female rat from being a good mother: Emotionality differences between nulliparous and parturient females. *Physiology & Behavior*, 27(5), 863-868. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(81\)90054-8](https://doi.org/10.1016/0031-9384(81)90054-8)
- Flint, R. W., & Marino, C. L. (2007). Cycloheximide impairs reconsolidation of a contextually reactivated memory in a conditioned taste aversion paradigm. *Behavioral Neuroscience*, 121(2), Article 2. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.121.2.433>
- Frankenhuis, W. E., & Del Giudice, M. (2012). When do adaptive developmental mechanisms yield maladaptive outcomes? *Developmental Psychology*, 48(3), 628-642. <https://doi.org/10.1037/a0025629>
- Frick, K. M., Kim, J., Tuscher, J. J., & Fortress, A. M. (2015). Sex steroid hormones matter for learning and memory: Estrogenic regulation of hippocampal function in male and female rodents. *Learning & Memory*, 22(9), Article 9. <https://doi.org/10.1101/lm.037267.114>
- Frith, C. D. (2008). Social cognition. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 363(1499), 2033-2039. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0005>
- Gall, C. M., Hess, U. S., & Lynch, G. (1998). Mapping brain networks engaged by, and changed by, learning. *Neurobiology of Learning and Memory*, 70(1-2), 14-36. <https://doi.org/10.1006/nlme.1998.3835>

- Gallo, M., Shleifer, D. G., Godoy, L. D., Ofray, D., Olaniyan, A., Campbell, T., & Bath, K. G. (2019). Limited Bedding and Nesting Induces Maternal Behavior Resembling Both Hypervigilance and Abuse. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 13, 167. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00167>
- Garcia, V. A., Hirotsu, C., Matos, G., Alvarenga, T., Pires, G. N., Kapczinski, F., Schröder, N., Tufik, S., & Andersen, M. L. (2013). Modafinil ameliorates cognitive deficits induced by maternal separation and sleep deprivation. *Behavioural Brain Research*, 253, 274-279. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2013.07.029>
- Garvin, M. M., & Bolton, J. L. (2022). Sex-specific behavioral outcomes of early-life adversity and emerging microglia-dependent mechanisms. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 16, 1013865. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2022.1013865>
- Gatewood, J. D., Morgan, M. D., Eaton, M., McNamara, I. M., Stevens, L. F., Macbeth, A. H., Meyer, E. A. A., Lomas, L. M., Kozub, F. J., Lambert, K. G., & Kinsley, C. H. (2005). Motherhood mitigates aging-related decrements in learning and memory and positively affects brain aging in the rat. *Brain Research Bulletin*, 66(2), 91-98. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2005.03.016>
- Ghosal, S., Hare, B., & Duman, R. S. (2017). Prefrontal Cortex GABAergic Deficits and Circuit Dysfunction in the Pathophysiology and Treatment of Chronic Stress and Depression. *Current opinion in behavioral sciences*, 14, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.cobeha.2016.09.012>
- Gluckman, P. D., Cutfield, W., Hofman, P., & Hanson, M. A. (2005). The fetal, neonatal, and infant environments-the long-term consequences for disease risk. *Early Human Development*, 81(1), 51-59. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2004.10.003>
- Graeff, F. G. (1994). Neuroanatomy and neurotransmitter regulation of defensive behaviors and related emotions in mammals. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Medicas E Biologicas*, 27(4), 811-829.
- Grammatopoulos, D. K. (2012). Insights into mechanisms of corticotropin-releasing hormone receptor signal transduction. *British Journal of Pharmacology*, 166(1), 85-97. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01631.x>
- Gross, C. T., & Canteras, N. S. (2012). The many paths to fear. *Nature Reviews. Neuroscience*, 13(9), 651-658. <https://doi.org/10.1038/nrn3301>
- Gruest, N., Richer, P., & Hars, B. (2004). Memory Consolidation and Reconsolidation in the Rat Pup Require Protein Synthesis. *The Journal of Neuroscience*, 24(46), Article 46. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2984-04.2004>
- Gunnar, M. R., Hostinar, C. E., Sanchez, M. M., Tottenham, N., & Sullivan, R. M. (2015). Parental buffering of fear and stress neurobiology: Reviewing parallels across rodent, monkey, and human models. *Social Neuroscience*, 10(5), 474-478. <https://doi.org/10.1080/17470919.2015.1070198>
- Haney, M., & Miczek, K. A. (1993). Ultrasounds during agonistic interactions between female rats (*Rattus norvegicus*). *Journal of Comparative Psychology*, 107(4), Article 4. <https://doi.org/10.1037/0735-7036.107.4.373>
- Hansen, S., Ferreira, A., & Selart, M. E. (1985). Behavioural similarities between mother rats and benzodiazepine-treated non-maternal animals. *Psychopharmacology*, 86(3), 344-347. <https://doi.org/10.1007/BF00432226>
- Hård, E., & Hansen, S. (1985). Reduced fearfulness in the lactating rat. *Physiology & Behavior*, 35(4), 641-643. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(85\)90155-6](https://doi.org/10.1016/0031-9384(85)90155-6)

- Heale, V. R., Vanderwolf, C. H., & Kavaliers, M. (1994). Components of weasel and fox odors elicit fast wave bursts in the dentate gyrus of rats. *Behavioural Brain Research*, 63(2), 159-165. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(94\)90087-6](https://doi.org/10.1016/0166-4328(94)90087-6)
- Heck, A. L., & Handa, R. J. (2019). Sex differences in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis' response to stress: An important role for gonadal hormones. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 44(1), 45-58. <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0167-9>
- Heim, C., & Nemeroff, C. B. (2001). The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: Preclinical and clinical studies. *Biological Psychiatry*, 49(12), 1023-1039. [https://doi.org/10.1016/s0006-3223\(01\)01157-x](https://doi.org/10.1016/s0006-3223(01)01157-x)
- Herman, J. P., Ostrander, M. M., Mueller, N. K., & Figueiredo, H. (2005). Limbic system mechanisms of stress regulation: Hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 29(8), 1201-1213. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2005.08.006>
- Hofer, M. A. (1996). Multiple regulators of ultrasonic vocalization in the infant rat. *Psychoneuroendocrinology*, 21(2), 203-217. [https://doi.org/10.1016/0306-4530\(95\)00042-9](https://doi.org/10.1016/0306-4530(95)00042-9)
- Hofer, M. A., & Shair, H. N. (1987). Isolation distress in two-week-old rats: Influence of home cage, social companions, and prior experience with littermates. *Developmental Psychobiology*, 20(4), 465-476. <https://doi.org/10.1002/dev.420200410>
- Hoffman, A. N., Anouti, D. P., Lacagnina, M. J., Nikulina, E. M., Hammer, R. P., & Conrad, C. D. (2013). Experience-dependent effects of context and restraint stress on corticolimbic c-Fos expression. *Stress (Amsterdam, Netherlands)*, 16(5), 587-591. <https://doi.org/10.3109/10253890.2013.804505>
- Hoffmann, H., Molina, J. C., Kucharski, D., & Spear, N. E. (1987). Further examination of ontogenetic limitations on conditioned taste aversion. *Developmental Psychobiology*, 20(4), 455-463. <https://doi.org/10.1002/dev.420200409>
- Imaki, T., Xiao-Quan, W., Shibasaki, T., Yamada, K., Harada, S., Chikada, N., Naruse, M., & Demura, H. (1995). Stress-induced activation of neuronal activity and corticotropin-releasing factor gene expression in the paraventricular nucleus is modulated by glucocorticoids in rats. *The Journal of Clinical Investigation*, 96(1), 231-238. <https://doi.org/10.1172/JCI118026>
- Ivanova, D., Li, X.-F., McIntyre, C., & O'Byrne, K. T. (2023). Posterodorsal Medial Amygdala Urocortin-3, GABA, and Glutamate Mediate Suppression of LH Pulsatility in Female Mice. *Endocrinology*, 164(2), bqac196. <https://doi.org/10.1210/endocr/bqac196>
- Ivy, A. S., Brunson, K. L., Sandman, C., & Baram, T. Z. (2008). Dysfunctional nurturing behavior in rat dams with limited access to nesting material: A clinically relevant model for early-life stress. *Neuroscience*, 154(3), 1132-1142. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.04.019>
- Jans, J. E., & Leon, M. (1983). Determinants of mother-young contact in Norway rats. *Physiology & Behavior*, 30(6), 919-935. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(83\)90258-5](https://doi.org/10.1016/0031-9384(83)90258-5)
- Josselyn, S. A., & Tonegawa, S. (2020). Memory engrams: Recalling the past and imagining the future. *Science*, 367(6473), Article 6473. <https://doi.org/10.1126/science.aaw4325>
- Kalinichev, M., Easterling, K. W., & Holtzman, S. G. (2000). Periodic postpartum separation from the offspring results in long-lasting changes in anxiety-related behaviors and sensitivity to morphine in Long-Evans mother rats. *Psychopharmacology*, 152(4), 431-439. <https://doi.org/10.1007/s002130000556>

- Kalueff, A. V., & Nutt, D. J. (2007). Role of GABA in anxiety and depression. *Depression and Anxiety*, 24(7), 495-517. <https://doi.org/10.1002/da.20262>
- Kandel, E. R., Dudai, Y., & Mayford, M. R. (2014). The Molecular and Systems Biology of Memory. *Cell*, 157(1), Article 1. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.03.001>
- Kehoe, P., & Blass, E. M. (1986). Conditioned aversions and their memories in 5-day-old rats during suckling. *Journal of Experimental Psychology. Animal Behavior Processes*, 12(1), 40-47.
- Kemble, E. D., Blanchard, D. C., & Blanchard, R. J. (1990). Effects of regional amygdaloid lesions on flight and defensive behaviors of wild black rats (*Rattus rattus*). *Physiology & Behavior*, 48(1), 1-5. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(90\)90251-x](https://doi.org/10.1016/0031-9384(90)90251-x)
- Kemble, E. D., Blanchard, D. C., Blanchard, R. J., & Takushi, R. (1984). Taming in wild rats following medial amygdaloid lesions. *Physiology & Behavior*, 32(1), 131-134. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(84\)90084-2](https://doi.org/10.1016/0031-9384(84)90084-2)
- Kikusui, T., Ichikawa, S., & Mori, Y. (2009). Maternal deprivation by early weaning increases corticosterone and decreases hippocampal BDNF and neurogenesis in mice. *Psychoneuroendocrinology*, 34(5), 762-772. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2008.12.009>
- Kikusui, T., Kiyokawa, Y., & Mori, Y. (2007). Deprivation of mother-pup interaction by early weaning alters myelin formation in male, but not female, ICR mice. *Brain Research*, 1133(1), 115-122. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.11.031>
- Kim, J. J., & Fanselow, M. S. (1992). Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science (New York, N.Y.)*, 256(5057), 675-677. <https://doi.org/10.1126/science.1585183>
- Kitraki, E., Kremmyda, O., Youlatos, D., Alexis, M. N., & Kittas, C. (2004). Gender-dependent alterations in corticosteroid receptor status and spatial performance following 21 days of restraint stress. *Neuroscience*, 125(1), Article 1. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2003.12.024>
- Klampf, S. M., & Bosch, O. J. (2019). Mom doesn't care: When increased brain CRF system activity leads to maternal neglect in rodents. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 53, 100735. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2019.01.001>
- Klampf, S. M., Brunton, P. J., Bayerl, D. S., & Bosch, O. J. (2014). Hypoactivation of CRF receptors, predominantly type 2, in the medial-posterior BNST is vital for adequate maternal behavior in lactating rats. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 34(29), 9665-9676. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4220-13.2014>
- Klampf, S. M., Neumann, I. D., & Bosch, O. J. (2013). Reduced brain corticotropin-releasing factor receptor activation is required for adequate maternal care and maternal aggression in lactating rats. *The European Journal of Neuroscience*, 38(5), 2742-2750. <https://doi.org/10.1111/ejn.12274>
- Klampf, S. M., Schramm, M. M., Stinnett, G. S., Bayerl, D. S., Seasholtz, A. F., & Bosch, O. J. (2016). Brain CRF-binding protein modulates aspects of maternal behavior under stressful conditions and supports a hypo-anxious state in lactating rats. *Hormones and Behavior*, 84, 136-144. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2016.06.009>
- Knox, D., George, S. A., Fitzpatrick, C. J., Rabinak, C. A., Maren, S., & Liberzon, I. (2012). Single prolonged stress disrupts retention of extinguished fear in rats. *Learning & Memory*, 19(2), Article 2. <https://doi.org/10.1101/lm.024356.111>
- Kochli, D. E., Thompson, E. C., Fricke, E. A., Postle, A. F., & Quinn, J. J. (2015). The amygdala is critical for trace, delay, and contextual fear conditioning. *Learning & Memory*, 22(2), Article 2. <https://doi.org/10.1101/lm.034918.114>

- Kojima, S., & Alberts, J. R. (2009). Maternal Care Can Rapidly Induce an Odor-guided Huddling Preference in Rat Pups. *Developmental psychobiology*, 51(1), 10.1002/dev.20349. <https://doi.org/10.1002/dev.20349>
- Kolodkin, M. H., & Auger, A. P. (2011). Sex Difference in the Expression of DNA Methyltransferase 3a in the Rat Amygdala During Development: Sexually dimorphic DNMT3a in neonatal rat. *Journal of Neuroendocrinology*, 23(7), Article 7. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2011.02147.x>
- Korosi, A., & Baram, T. Z. (2009). The pathways from mother's love to baby's future. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 3, 27. <https://doi.org/10.3389/neuro.08.027.2009>
- Korosi, A., Naninck, E. F. G., Oomen, C. A., Schouten, M., Krugers, H., Fitzsimons, C., & Lucassen, P. J. (2012). Early-life stress mediated modulation of adult neurogenesis and behavior. *Behavioural Brain Research*, 227(2), 400-409. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.07.037>
- Kosten, T. A., & Kehoe, P. (2010). Immediate and enduring effects of neonatal isolation on maternal behavior in rats. *International Journal of Developmental Neuroscience: The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 28(1), 53-61. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2009.09.005>
- Kunwar, P. S., Zelikowsky, M., Remedios, R., Cai, H., Yilmaz, M., Meister, M., & Anderson, D. J. (2015). Ventromedial hypothalamic neurons control a defensive emotion state. *eLife*, 4, e06633. <https://doi.org/10.7554/eLife.06633>
- Kwapis, J. L., Jarome, T. J., Schiff, J. C., & Helmstetter, F. J. (2011). Memory consolidation in both trace and delay fear conditioning is disrupted by intra-amygdala infusion of the protein synthesis inhibitor anisomycin. *Learning & Memory*, 18(11), Article 11. <https://doi.org/10.1101/lm.023945.111>
- Languille, S., Davis, S., Richer, P., Alcacer, C., Laroche, S., & Hars, B. (2009). Extracellular signal-regulated kinase activation is required for consolidation and reconsolidation of memory at an early stage of ontogenesis. *European Journal of Neuroscience*, 30(10), Article 10. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06971.x>
- Languille, S., Gruet, N., Richer, P., & Hars, B. (2008). The temporal dynamics of consolidation and reconsolidation decrease during postnatal development. *Learning & Memory*, 15(6), Article 6. <https://doi.org/10.1101/lm.933208>
- Lau, C., & Simpson, C. (2004). Animal models for the study of the effect of prolonged stress on lactation in rats. *Physiology & Behavior*, 82(2-3), Article 2-3. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.05.004>
- LeDoux, J. E. (2000). Emotion circuits in the brain. *Annual Review of Neuroscience*, 23, 155-184. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.23.1.155>
- Leon, M. (1975). Dietary control of maternal pheromone in the lactating rat. *Physiology & Behavior*, 14(3), Article 3. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(75\)90039-6](https://doi.org/10.1016/0031-9384(75)90039-6)
- Leon, M. (1992). Neuroethology of olfactory preference development. *Journal of Neurobiology*, 23(10), 1557-1573. <https://doi.org/10.1002/neu.480231012>
- Leon, M., & Moltz, H. (1972). The development of the pheromonal bond in the albino rat. *Physiology & Behavior*, 8(4), 683-686. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(72\)90095-9](https://doi.org/10.1016/0031-9384(72)90095-9)
- Lesch, R., Schwaha, T., Orozco, A., Shilling, M., Brunelli, S., Hofer, M., Bowling, D. L., Zimmerberg, B., & Fitch, W. T. (2021). Selection on vocal output affects laryngeal morphology in rats. *Journal of Anatomy*, 238(5), 1179-1190. <https://doi.org/10.1111/joa.13366>
- Levine, S. (1956). A further study of infantile handling and adult avoidance learning. *Journal of Personality*, 25(1), 70-80. <https://doi.org/10.1111/j.1467-6494.1956.tb01289.x>

- Levine, S. (1957). Infantile experience and resistance to physiological stress. *Science (New York, N.Y.)*, 126(3270), 405. <https://doi.org/10.1126/science.126.3270.405>
- Levine, S. (1962). Plasma-free corticosteroid response to electric shock in rats stimulated in infancy. *Science (New York, N.Y.)*, 135(3506), 795-796. <https://doi.org/10.1126/science.135.3506.795-a>
- Levine, S. (1994). The ontogeny of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. The influence of maternal factors. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 746, 275-288; discussion 289-293. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1994.tb39245.x>
- Levine, S. (2001). Primary social relationships influence the development of the hypothalamic—Pituitary—Adrenal axis in the rat. *Physiology & Behavior*, 73(3), 255-260. [https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(01\)00496-6](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(01)00496-6)
- Li, C.-I., Maglinao, T. L., & Takahashi, L. K. (2004). Medial amygdala modulation of predator odor-induced unconditioned fear in the rat. *Behavioral Neuroscience*, 118(2), 324-332. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.118.2.324>
- Lin, D., Boyle, M. P., Dollar, P., Lee, H., Lein, E. S., Perona, P., & Anderson, D. J. (2011). Functional identification of an aggression locus in the mouse hypothalamus. *Nature*, 470(7333), 221-226. <https://doi.org/10.1038/nature09736>
- Liu, D., Caldji, C., Sharma, S., Plotsky, P. M., & Meaney, M. J. (2000). Influence of neonatal rearing conditions on stress-induced adrenocorticotropin responses and norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Journal of Neuroendocrinology*, 12(1), 5-12. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.2000.00422.x>
- Loman, M. M., Gunnar, M. R., & Early Experience, Stress, and Neurobehavioral Development Center. (2010). Early experience and the development of stress reactivity and regulation in children. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 34(6), 867-876. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2009.05.007>
- Lonstein, J. S. (2005). Reduced anxiety in postpartum rats requires recent physical interactions with pups, but is independent of suckling and peripheral sources of hormones. *Hormones and Behavior*, 47(3), 241-255. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2004.11.001>
- Lonstein, J. S., Maguire, J., Meinschmidt, G., & Neumann, I. D. (2014). Emotion and mood adaptations in the peripartum female: complementary contributions of GABA and oxytocin. *Journal of Neuroendocrinology*, 26(10), 649-664. <https://doi.org/10.1111/jne.12188>
- 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. *Behavioral Neuroscience*, 112(6), 1502-1518. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.112.6.1502>
- Lopez-Salon, M., Alonso, M., Vianna, M. R. M., Viola, H., E Souza, T. M., Izquierdo, I., Pasquini, J. M., & Medina, J. H. (2001). The ubiquitin-proteasome cascade is required for mammalian long-term memory formation: Memory formation and ubiquitin-proteasome pathway. *European Journal of Neuroscience*, 14(11), Article 11. <https://doi.org/10.1046/j.0953-816x.2001.01806.x>
- Lucas, P. D., Donohoe, S. M., & Thody, A. J. (1982). The role of estrogen and progesterone in the control of preputial gland sex attractant odors in the female rat. *Physiology & Behavior*, 28(4), Article 4. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(82\)90037-3](https://doi.org/10.1016/0031-9384(82)90037-3)
- Lucassen, P. J., Naninck, E. F. G., van Goudoever, J. B., Fitzsimons, C., Joels, M., & Korosi, A. (2013). Perinatal programming of adult hippocampal structure and function; emerging roles of stress, nutrition and epigenetics. *Trends in Neurosciences*, 36(11), 621-631. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2013.08.002>

- Lupien, S. J., McEwen, B. S., Gunnar, M. R., & Heim, C. (2009). Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nature Reviews. Neuroscience*, 10(6), 434-445. <https://doi.org/10.1038/nrn2639>
- MacLusky, N. J., & Naftolin, F. (1981). Sexual Differentiation of the Central Nervous System. *Science*, 211(4488), Article 4488. <https://doi.org/10.1126/science.6163211>
- Makino, S., Gold, P. W., & Schulkin, J. (1994). Corticosterone effects on corticotropin-releasing hormone mRNA in the central nucleus of the amygdala and the parvocellular region of the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Brain Research*, 640(1-2), 105-112. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)91862-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)91862-7)
- Marcondes, F. K., Bianchi, F. J., & Tanno, A. P. (2002). Determination of the estrous cycle phases of rats: Some helpful considerations. *Brazilian Journal of Biology = Revista Brasileira De Biologia*, 62(4A), 609-614. <https://doi.org/10.1590/s1519-69842002000400008>
- Maren, S. (1999). Long-term potentiation in the amygdala: A mechanism for emotional learning and memory. *Trends in Neurosciences*, 22(12), 561-567. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(99\)01465-4](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(99)01465-4)
- Marmendal, M., Roman, E., Eriksson, C. J. P., Nylander, I., & Fahlke, C. (2004). Maternal separation alters maternal care, but has minor effects on behavior and brain opioid peptides in adult offspring. *Developmental Psychobiology*, 45(3), 140-152. <https://doi.org/10.1002/dev.20027>
- Martinez, R. C., Carvalho-Netto, E. F., Ribeiro-Barbosa, E. R., Baldo, M. V. C., & Canteras, N. S. (2011). Amygdalar roles during exposure to a live predator and to a predator-associated context. *Neuroscience*, 172, 314-328. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.10.033>
- Mashoodh, R., Sinal, C. J., & Perrot-Sinal, T. S. (2009). Predation threat exerts specific effects on rat maternal behaviour and anxiety-related behaviour of male and female offspring. *Physiology & Behavior*, 96(4-5), Article 4-5. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.01.001>
- Masini, C. V., Sauer, S., & Campeau, S. (2005). Ferret odor as a processive stress model in rats: Neurochemical, behavioral, and endocrine evidence. *Behavioral Neuroscience*, 119(1), 280-292. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.119.1.280>
- McDonald, A. J. (1998). Cortical pathways to the mammalian amygdala. *Progress in Neurobiology*, 55(3), 257-332. [https://doi.org/10.1016/s0301-0082\(98\)00003-3](https://doi.org/10.1016/s0301-0082(98)00003-3)
- McEwen, B. S. (2000). The neurobiology of stress: From serendipity to clinical relevance. *Brain Research*, 886(1-2), 172-189. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(00\)02950-4](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(00)02950-4)
- McGaugh, J. L. (1966). Time-Dependent Processes in Memory Storage: Recent studies of learning and memory indicate that memory storage involves time-dependent processes. *Science*, 153(3742), Article 3742. <https://doi.org/10.1126/science.153.3742.1351>
- McKlveen, J. M., Myers, B., & Herman, J. P. (2015). The Medial Prefrontal Cortex: Coordinator of Autonomic, Neuroendocrine, and Behavioral Responses to Stress. *Journal of neuroendocrinology*, 27(6), 446-456. <https://doi.org/10.1111/jne.12272>
- McLaughlin, K. J., Baran, S. E., Wright, R. L., & Conrad, C. D. (2005). Chronic stress enhances spatial memory in ovariectomized female rats despite CA3 dendritic retraction: Possible involvement of CA1 neurons. *Neuroscience*, 135(4), Article 4. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2005.06.083>
- McLeod, J., Sinal, C. J., & Perrot-Sinal, T. S. (2007). Evidence for non-genomic transmission of ecological information via maternal behavior in female rats. *Genes, Brain and Behavior*, 6(1), Article 1. <https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2006.00214.x>

- McLoyd, V. C. (1998). Socioeconomic disadvantage and child development. *The American Psychologist*, 53(2), 185-204. <https://doi.org/10.1037//0003-066x.53.2.185>
- Meaney, M. J., Aitken, D. H., Viau, V., Sharma, S., & Sarrieau, A. (1989). Neonatal handling alters adrenocortical negative feedback sensitivity and hippocampal type II glucocorticoid receptor binding in the rat. *Neuroendocrinology*, 50(5), 597-604. <https://doi.org/10.1159/000125287>
- Meaney, M. J., & Szyf, M. (2005). Environmental programming of stress responses through DNA methylation: Life at the interface between a dynamic environment and a fixed genome. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 7(2), 103-123. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2005.7.2/mmeaney>
- Melniczek, J. R., & Ward, I. L. (1994). Patterns of ano-genital licking mother rats exhibit toward prenatally stressed neonates. *Physiology & Behavior*, 56(3), 457-461. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(94\)90287-9](https://doi.org/10.1016/0031-9384(94)90287-9)
- Méndez-López, M., Méndez, M., López, L., & Arias, J. L. (2009). Sexually dimorphic c-Fos expression following spatial working memory in young and adult rats. *Physiology & Behavior*, 98(3), Article 3. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.06.006>
- Mennella, J. A., & Moltz, H. (1988). Infanticide in rats: Male strategy and female counter-strategy. *Physiology & Behavior*, 42(1), 19-28. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(88\)90254-5](https://doi.org/10.1016/0031-9384(88)90254-5)
- Miczek, K. A., Weerts, E. M., Vivian, J. A., & Barros, H. M. (1995). Aggression, anxiety and vocalizations in animals: GABAA and 5-HT anxiolytics. *Psychopharmacology*, 121(1), 38-56. <https://doi.org/10.1007/BF02245590>
- Miracle, A., Brace, M., Huyck, K., Singler, S., & Wellman, C. (2006). Chronic stress impairs recall of extinction of conditioned fear. *Neurobiology of Learning and Memory*, 85(3), Article 3. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2005.10.005>
- Mizuno, K., & Giese, K. P. (2010). Towards a molecular understanding of sex differences in memory formation. *Trends in Neurosciences*, 33(6), Article 6. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2010.03.001>
- Moles, A., Rizzi, R., & D'Amato, F. R. (2004). Postnatal stress in mice: Does ?stressing? the mother have the same effect as ?stressing? the pups? *Developmental Psychobiology*, 44(4), Article 4. <https://doi.org/10.1002/dev.20008>
- Molet, J., Maras, P. M., Avishai-Eliner, S., & Baram, T. Z. (2014). Naturalistic rodent models of chronic early-life stress. *Developmental Psychobiology*, 56(8), 1675-1688. <https://doi.org/10.1002/dev.21230>
- Molet, J., Maras, P. M., Kinney-Lang, E., Harris, N. G., Rashid, F., Ivy, A. S., Solodkin, A., Obenaus, A., & Baram, T. Z. (2016). MRI uncovers disrupted hippocampal microstructure that underlies memory impairments after early-life adversity. *Hippocampus*, 26(12), 1618-1632. <https://doi.org/10.1002/hipo.22661>
- Moore, C. L., Wong, L., Daum, M. C., & Leclair, O. U. (1997). Mother-infant interactions in two strains of rats: Implications for dissociating mechanism and function of a maternal pattern. *Developmental Psychobiology*, 30(4), 301-312.
- Moriceau, S., Roth, T. L., Okotoghaide, T., & Sullivan, R. M. (2004). Corticosterone controls the developmental emergence of fear and amygdala function to predator odors in infant rat pups. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 22(5-6), Article 5-6. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2004.05.011>
- Moriceau, S., Shionoya, K., Jakubs, K., & Sullivan, R. M. (2009). Early-life stress disrupts attachment learning: The role of amygdala corticosterone, locus ceruleus corticotropin releasing hormone, and olfactory bulb norepinephrine. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the*

- Society for Neuroscience*, 29(50), 15745-15755. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4106-09.2009>
- Moriceau, S., Wilson, D. A., Levine, S., & Sullivan, R. M. (2006). Dual Circuitry for Odor-Shock Conditioning during Infancy: Corticosterone Switches between Fear and Attraction via Amygdala. *Journal of Neuroscience*, 26(25), Article 25. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0499-06.2006>
- Morrison, I. (2016). Keep Calm and Cuddle on: Social Touch as a Stress Buffer. *Adaptive Human Behavior and Physiology*, 2(4), 344-362. <https://doi.org/10.1007/s40750-016-0052-x>
- Motta, S. C., Goto, M., Gouveia, F. V., Baldo, M. V. C., Canteras, N. S., & Swanson, L. W. (2009). Dissecting the brain's fear system reveals the hypothalamus is critical for responding in subordinate conspecific intruders. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(12), 4870-4875. <https://doi.org/10.1073/pnas.0900939106>
- Mouly, A.-M., & Sullivan, R. (2010). Memory and Plasticity in the Olfactory System: From Infancy to Adulthood. En A. Menini (Ed.), *The Neurobiology of Olfaction*. CRC Press/Taylor & Francis. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK55967/>
- Müller, M., & Fendt, M. (2006). Temporary inactivation of the medial and basolateral amygdala differentially affects TMT-induced fear behavior in rats. *Behavioural Brain Research*, 167(1), 57-62. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2005.08.016>
- Murray, L., de Rosnay, M., Pearson, J., Bergeron, C., Schofield, E., Royal-Lawson, M., & Cooper, P. J. (2008). Intergenerational transmission of social anxiety: The role of social referencing processes in infancy. *Child Development*, 79(4), 1049-1064. <https://doi.org/10.1111/j.1467-8624.2008.01175.x>
- Nader, K. (2003). Memory traces unbound. *Trends in Neurosciences*, 26(2), Article 2. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(02\)00042-5](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(02)00042-5)
- Nader, K., Schafe, G. E., & Le Doux, J. E. (2000). Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature*, 406(6797), Article 6797. <https://doi.org/10.1038/35021052>
- Nederhof, E., & Schmidt, M. V. (2012). Mismatch or cumulative stress: Toward an integrated hypothesis of programming effects. *Physiology & Behavior*, 106(5), 691-700. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.12.008>
- Nephew, B. C., & Bridges, R. S. (2011). Effects of chronic social stress during lactation on maternal behavior and growth in rats. *Stress (Amsterdam, Netherlands)*, 14(6), 677-684. <https://doi.org/10.3109/10253890.2011.605487>
- Neumann, I. D. (2001). Alterations in behavioral and neuroendocrine stress coping strategies in pregnant, parturient and lactating rats. *Progress in Brain Research*, 133, 143-152. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(01\)33011-x](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(01)33011-x)
- 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. *The Journal of Physiology*, 508 (Pt 1)(Pt 1), 289-300. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1998.289br.x>
- Nishizuka, M., & Arai, Y. (1981a). Organizational action of estrogen on synaptic pattern in the amygdala: Implications for sexual differentiation of the brain. *Brain Research*, 213(2), 422-426. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(81\)90247-x](https://doi.org/10.1016/0006-8993(81)90247-x)

- Nishizuka, M., & Arai, Y. (1981b). Sexual dimorphism in synaptic organization in the amygdala and its dependence on neonatal hormone environment. *Brain Research*, 212(1), 31-38. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(81\)90029-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(81)90029-9)
- Nishizuka, M., & Arai, Y. (1982). Synapse formation in response to estrogen in the medial amygdala developing in the eye. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(22), 7024-7026. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.22.7024>
- Noirot, E. (1972). Ultrasounds and maternal behavior in small rodents. *Developmental Psychobiology*, 5(4), 371-387. <https://doi.org/10.1002/dev.420050410>
- Oitzl, M. S., Champagne, D. L., van der Veen, R., & de Kloet, E. R. (2010). Brain development under stress: Hypotheses of glucocorticoid actions revisited. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 34(6), 853-866. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2009.07.006>
- Orso, R., Creutzberg, K. C., Wearick-Silva, L. E., Wendt Viola, T., Tractenberg, S. G., Benetti, F., & Grassi-Oliveira, R. (2019). How Early Life Stress Impact Maternal Care: A Systematic Review of Rodent Studies. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 13, 197. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00197>
- Orso, R., Wearick-Silva, L. E., Creutzberg, K. C., Centeno-Silva, A., Glusman Roithmann, L., Pazzin, R., Tractenberg, S. G., Benetti, F., & Grassi-Oliveira, R. (2018). Maternal behavior of the mouse dam toward pups: Implications for maternal separation model of early life stress. *Stress (Amsterdam, Netherlands)*, 21(1), 19-27. <https://doi.org/10.1080/10253890.2017.1389883>
- Otto, T., Cousens, G., & Herzog, C. (2000). Behavioral and neuropsychological foundations of olfactory fear conditioning. *Behavioural Brain Research*, 110(1-2), 119-128. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(99\)00190-4](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(99)00190-4)
- Own, L. S., & Patel, P. D. (2013). Maternal behavior and offspring resiliency to maternal separation in C57Bl/6 mice. *Hormones and Behavior*, 63(3), 411-417. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2012.11.010>
- Page, C. E., & Coutellier, L. (2019). Prefrontal excitatory/inhibitory balance in stress and emotional disorders: Evidence for over-inhibition. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 105, 39-51. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.07.024>
- Patchev, V. K., Hayashi, S., Orikasa, C., & Almeida, O. F. X. (1995). Implications of estrogen-dependent brain organization for gender differences in hypothalamo-pituitary-adrenal regulation. *The FASEB Journal*, 9(5), Article 5. <https://doi.org/10.1096/fasebj.9.5.7896013>
- Paul, L., & Kupferschmidt, J. (1975). Killing of conspecific and mouse young by male rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 88(2), 755-763. <https://doi.org/10.1037/h0076440>
- Pavlik, A., & Teisinger, J. (1980). Effect of cycloheximide administered to rats in early postnatal life: Prolonged inhibition of DNA synthesis in the developing brain. *Brain Research*, 192(2), Article 2. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(80\)90903-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(80)90903-8)
- Paxinos, G., & Watson, C. (2013). *The Rat Brain in stereotaxic coordinates 7th ED*. Agnathos. <https://agnathos.se/books-teaching/11-the-rat-brain-in-stereotaxic-coordinates-6th-ed.html>
- Pedersen, P. E., Williams, C. L., & Blass, E. M. (1982). Activation and odor conditioning of suckling behavior in 3-day-old albino rats. *Journal of Experimental Psychology. Animal Behavior Processes*, 8(4), 329-341.
- Pellow, S., & File, S. E. (1986). Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: A novel test of anxiety in the rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 24(3), 525-529. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(86\)90552-6](https://doi.org/10.1016/0091-3057(86)90552-6)

- Pentkowski, N. S., Blanchard, D. C., Lever, C., Litvin, Y., & Blanchard, R. J. (2006). Effects of lesions to the dorsal and ventral hippocampus on defensive behaviors in rats. *The European Journal of Neuroscience*, 23(8), 2185-2196. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04754.x>
- Pereira, M., & Ferreira, A. (2016). Neuroanatomical and neurochemical basis of parenting: Dynamic coordination of motivational, affective and cognitive processes. *Hormones and Behavior*, 77, 72-85. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2015.08.005>
- Pereira, M., Uriarte, N., Agrati, D., Zuluaga, M. J., & Ferreira, A. (2005). Motivational aspects of maternal anxiolysis in lactating rats. *Psychopharmacology*, 180(2), 241-248. <https://doi.org/10.1007/s00213-005-2157-y>
- Pessoa, L., & Adolphs, R. (2010). Emotion processing and the amygdala: From a «low road» to «many roads» of evaluating biological significance. *Nature Reviews. Neuroscience*, 11(11), 773-783. <https://doi.org/10.1038/nrn2920>
- Phillips, R. G., & LeDoux, J. E. (1992). Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behavioral Neuroscience*, 106(2), 274-285. <https://doi.org/10.1037//0735-7044.106.2.274>
- Phillips-Farfán, B. V., & Fernández-Guasti, A. (2007). C-Fos expression related to sexual satiety in the male rat forebrain. *Physiology & Behavior*, 91(5), 609-619. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2007.03.024>
- Pitkänen, A., Jolkkonen, E., & Kemppainen, S. (2000). Anatomic heterogeneity of the rat amygdaloid complex. *Folia Morphologica*, 59(1), 1-23.
- Pitkänen, A., Savander, V., & LeDoux, J. E. (1997). Organization of intra-amygdaloid circuitries in the rat: An emerging framework for understanding functions of the amygdala. *Trends in Neurosciences*, 20(11), 517-523. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(97\)01125-9](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(97)01125-9)
- Plenderleith, M. B., Wright, L. L., & Snow, P. J. (1992). Expression of lectin binding in the superficial dorsal horn of the rat spinal cord during pre- and postnatal development. *Brain Research. Developmental Brain Research*, 68(1), 103-109. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(92\)90252-r](https://doi.org/10.1016/0165-3806(92)90252-r)
- Plotsky, P. M., & Meaney, M. J. (1993). Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 18(3), 195-200. [https://doi.org/10.1016/0169-328x\(93\)90189-v](https://doi.org/10.1016/0169-328x(93)90189-v)
- Raineki, C., De Souza, M. A., Szawka, R. E., Lutz, M. L., De Vasconcellos, L. F. T., Sanvitto, G. L., Izquierdo, I., Bevilaqua, L. R., Cammarota, M., & Lucion, A. B. (2009). Neonatal handling and the maternal odor preference in rat pups: Involvement of monoamines and cyclic AMP response element-binding protein pathway in the olfactory bulb. *Neuroscience*, 159(1), 31-38. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2008.12.012>
- Raineki, C., Lucion, A. B., & Weinberg, J. (2014). Neonatal handling: An overview of the positive and negative effects. *Developmental Psychobiology*, 56(8), 1613-1625. <https://doi.org/10.1002/dev.21241>
- Raineki, C., Pickenhagen, A., Roth, T. L., Babstock, D. M., McLean, J. H., Harley, C. W., Lucion, A. B., & Sullivan, R. M. (2010). The neurobiology of infant maternal odor learning. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 43(10), Article 10. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2010007500090>
- Ramachandra, R., & Subramanian, T. (2016). *Atlas of the Neonatal Rat Brain*. CRC Press.
- Razavi, Y., Karimi, S., Karimi-Haghighi, S., Hesam, S., & Haghparast, A. (2020). Changes in c-fos and p-CREB signaling following exposure to forced swim stress or exogenous corticosterone during

- morphine-induced place preference are dependent on glucocorticoid receptor in the basolateral amygdala. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 98(11), 741-752. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2019-0712>
- Redgate, E. S., & Fahringer, E. E. (1973). A comparison of the pituitary adrenal activity elicited by electrical stimulation of preoptic, amygdaloid and hypothalamic sites in the rat brain. *Neuroendocrinology*, 12(6), 334-343. <https://doi.org/10.1159/000122182>
- Renard, G. M., Rivarola, M. A., & Suárez, M. M. (2010). Gender-Dependent Effects of Early Maternal Separation and Variable Chronic Stress on Vasopressinergic Activity and Glucocorticoid Receptor Expression in Adult Rats. *Developmental Neuroscience*, 32(1), 71-80. <https://doi.org/10.1159/000280102>
- Reul, J. M. H. M., & Holsboer, F. (2002a). Corticotropin-releasing factor receptors 1 and 2 in anxiety and depression. *Current Opinion in Pharmacology*, 2(1), 23-33. [https://doi.org/10.1016/s1471-4892\(01\)00117-5](https://doi.org/10.1016/s1471-4892(01)00117-5)
- Reul, J. M. H. M., & Holsboer, F. (2002b). On the role of corticotropin-releasing hormone receptors in anxiety and depression. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 4(1), 31-46. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2002.4.1/jreul>
- Rincón-Cortés, M., & Grace, A. A. (2022). Postpartum scarcity-adversity disrupts maternal behavior and induces a hypodopaminergic state in the rat dam and adult female offspring. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 47(2), 488-496. <https://doi.org/10.1038/s41386-021-01210-3>
- Rivier, C., & Vale, W. (1983). Interaction of corticotropin-releasing factor and arginine vasopressin on adrenocorticotropin secretion in vivo. *Endocrinology*, 113(3), 939-942. <https://doi.org/10.1210/endo-113-3-939>
- Rosen, J. B. (2004). The neurobiology of conditioned and unconditioned fear: A neurobehavioral system analysis of the amygdala. *Behavioral and Cognitive Neuroscience Reviews*, 3(1), 23-41. <https://doi.org/10.1177/1534582304265945>
- Rosen, J. B., & Donley, M. P. (2006). Animal studies of amygdala function in fear and uncertainty: Relevance to human research. *Biological Psychology*, 73(1), 49-60. <https://doi.org/10.1016/j.biopsycho.2006.01.007>
- Russell, A. L., Tasker, J. G., Lucion, A. B., Fiedler, J., Munhoz, C. D., Wu, T.-Y. J., & Deak, T. (2018). Factors promoting vulnerability to dysregulated stress reactivity and stress-related disease. *Journal of Neuroendocrinology*, 30(10), e12641. <https://doi.org/10.1111/jne.12641>
- Sabihi, S., Goodpaster, C., Maurer, S., & Leuner, B. (2021). GABA in the medial prefrontal cortex regulates anxiety-like behavior during the postpartum period. *Behavioural brain research*, 398, 112967. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2020.112967>
- Sampath, D., Sabitha, K. R., Hegde, P., Jayakrishnan, H. R., Kutty, B. M., Chattarji, S., Rangarajan, G., & Laxmi, T. R. (2014). A study on fear memory retrieval and REM sleep in maternal separation and isolation stressed rats. *Behavioural Brain Research*, 273, 144-154. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.07.034>
- Sánchez-Lafuente, C. L., Romay-Tallon, R., Allen, J., Johnston, J. N., Kalynchuk, L. E., & Caruncho, H. J. (2022). Sex differences in basal reelin levels in the paraventricular hypothalamus and in response to chronic stress induced by repeated corticosterone in rats. *Hormones and Behavior*, 146, 105267. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2022.105267>
- Saper, C. B., & Loewy, A. D. (1980). Efferent connections of the parabrachial nucleus in the rat. *Brain Research*, 197(2), 291-317. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(80\)91117-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(80)91117-8)

- Schaal, B., & Orgeur, P. (1992). Olfaction in utero: Can the rodent model be generalized? *The Quarterly Journal of Experimental Psychology. B, Comparative and Physiological Psychology*, 44(3-4), Article 3-4. <https://doi.org/10.1080/02724999208250615>
- Schafe, G. E., & LeDoux, J. E. (2000). Memory Consolidation of Auditory Pavlovian Fear Conditioning Requires Protein Synthesis and Protein Kinase A in the Amygdala. *The Journal of Neuroscience*, 20(18), Article 18. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-18-j0003.2000>
- Schmidt, M., Enthoven, L., Van Woezik, J. H. G., Levine, S., De Kloet, E. R., & Oitzl, M. S. (2004). The Dynamics of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis During Maternal Deprivation. *Journal of Neuroendocrinology*, 16(1), Article 1. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2004.01123.x>
- Schmidt, M. V. (2011). Animal models for depression and the mismatch hypothesis of disease. *Psychoneuroendocrinology*, 36(3), 330-338. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2010.07.001>
- Schwob, J. E., & Price, J. L. (1984). The development of axonal connections in the central olfactory system of rats. *The Journal of Comparative Neurology*, 223(2), 177-202. <https://doi.org/10.1002/cne.902230204>
- Seale, J. V., Wood, S. A., Atkinson, H. C., Harbuz, M. S., & Lightman, S. L. (2004). Gonadal Steroid Replacement Reverses Gonadectomy-Induced Changes in the Corticosterone Pulse Profile and Stress-Induced Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Activity of Male and Female Rats. *Journal of Neuroendocrinology*, 16(12), Article 12. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2004.01258.x>
- Shair, H. N., Masmela, J. R., & Hofer, M. A. (1999). The influence of olfaction on potentiation and inhibition of ultrasonic vocalization of rat pups. *Physiology & Behavior*, 65(4-5), 769-772. [https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(98\)00218-2](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(98)00218-2)
- Shipley, M. T., & Adamek, G. D. (1984). The connections of the mouse olfactory bulb: A study using orthograde and retrograde transport of wheat germ agglutinin conjugated to horseradish peroxidase. *Brain Research Bulletin*, 12(6), 669-688. [https://doi.org/10.1016/0361-9230\(84\)90148-5](https://doi.org/10.1016/0361-9230(84)90148-5)
- Siegel, S. (1956). *Nonparametric statistics for the behavioral sciences*. (pp. xvii, 312). McGraw-Hill.
- Silva, B. A., Mattucci, C., Krzywkowski, P., Murana, E., Illarionova, A., Grinevich, V., Canteras, N. S., Ragozzino, D., & Gross, C. T. (2013). Independent hypothalamic circuits for social and predator fear. *Nature Neuroscience*, 16(12), 1731-1733. <https://doi.org/10.1038/nn.3573>
- Simerly, R. B., Chang, C., Muramatsu, M., & Swanson, L. W. (1990). Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: An in situ hybridization study. *The Journal of Comparative Neurology*, 294(1), 76-95. <https://doi.org/10.1002/cne.902940107>
- Skilbeck, K. J., Johnston, G. A. R., & Hinton, T. (2010). Stress and GABA receptors. *Journal of Neurochemistry*, 112(5), 1115-1130. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06539.x>
- Smith, C. D., & Lonstein, J. S. (2008). Contact with infants modulates anxiety-generated c-fos activity in the brains of postpartum rats. *Behavioural Brain Research*, 190(2), 193-200. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2008.02.030>
- Smith, J., & Prior, M. (1995). Temperament and stress resilience in school-age children: A within-families study. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry*, 34(2), 168-179. <https://doi.org/10.1097/00004583-199502000-00012>
- Spear, N. E. (1973). Retrieval of memory in animals. *Psychological Review*, 80(3), Article 3. <https://doi.org/10.1037/h0034326>
- Staples, L. G., McGregor, I. S., Apfelbach, R., & Hunt, G. E. (2008). Cat odor, but not trimethylthiazoline (fox odor), activates accessory olfactory and defense-related brain regions in rats. *Neuroscience*, 151(4), 937-947. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2007.11.039>

- 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(3), 305-316. [https://doi.org/10.1016/0018-506x\(76\)90036-2](https://doi.org/10.1016/0018-506x(76)90036-2)
- SucHECKI, D., Nelson, D. Y., Van Oers, H., & Levine, S. (1995). Activation and inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of the neonatal rat: Effects of maternal deprivation. *Psychoneuroendocrinology*, 20(2), Article 2. [https://doi.org/10.1016/0306-4530\(94\)00051-B](https://doi.org/10.1016/0306-4530(94)00051-B)
- SucHECKI, D., Rosenfeld, P., & Levine, S. (1993). Maternal regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the infant rat: The roles of feeding and stroking. *Developmental Brain Research*, 75(2), Article 2. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(93\)90022-3](https://doi.org/10.1016/0165-3806(93)90022-3)
- Sukikara, M. H., Mota-Ortiz, S. R., Baldo, M. V., Felício, L. F., & Canteras, N. S. (2006). A role for the periaqueductal gray in switching adaptive behavioral responses. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(9), 2583-2589. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4279-05.2006>
- Sullivan, R. M., & Leon, M. (1986). Early olfactory learning induces an enhanced olfactory bulb response in young rats. *Brain Research*, 392(1-2), 278-282. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(86\)90256-7](https://doi.org/10.1016/0165-3806(86)90256-7)
- Sullivan, R. M., & Wilson, D. A. (1991). The role of norepinephrine in the expression of learned olfactory neurobehavioral responses in infant rats. *Psychobiology (Austin, Tex.)*, 19(4), 308-312. <https://doi.org/10.3758/bf03332084>
- Sullivan, R. M., Wilson, D. A., & Leon, M. (1989). Associative Processes in Early Olfactory Preference Acquisition: Neural and Behavioral Consequences. *Psychobiology (Austin, Tex.)*, 17(1), 29-33. <https://doi.org/10.3758/bf03337814>
- Sullivan, R. M., Wilson, D. A., Wong, R., Correa, A., & Leon, M. (1990). Modified behavioral and olfactory bulb responses to maternal odors in preweanling rats. *Brain Research. Developmental Brain Research*, 53(2), 243-247. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(90\)90013-o](https://doi.org/10.1016/0165-3806(90)90013-o)
- Sung, Y.-H., Shin, M.-S., Cho, S., Baik, H.-H., Jin, B.-K., Chang, H.-K., Lee, E.-K., & Kim, C.-J. (2010). Depression-like state in maternal rats induced by repeated separation of pups is accompanied by a decrease of cell proliferation and an increase of apoptosis in the hippocampus. *Neuroscience Letters*, 470(1), 86-90. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.12.063>
- Swanson, L. W., & Petrovich, G. D. (1998). What is the amygdala? *Trends in Neurosciences*, 21(8), 323-331. [https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(98\)01265-x](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(98)01265-x)
- Szyf, M., Weaver, I. C. G., Champagne, F. A., Diorio, J., & Meaney, M. J. (2005). Maternal programming of steroid receptor expression and phenotype through DNA methylation in the rat. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 26(3-4), 139-162. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2005.10.002>
- Takahashi, L. K. (1992a). Developmental expression of defensive responses during exposure to conspecific adults in preweanling rats (*Rattus norvegicus*). *Journal of Comparative Psychology (Washington, D.C.: 1983)*, 106(1), 69-77. <https://doi.org/10.1037/0735-7036.106.1.69>
- Takahashi, L. K. (1992b). Ontogeny of behavioral inhibition induced by unfamiliar adult male conspecifics in preweanling rats. *Physiology & Behavior*, 52(3), Article 3. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(92\)90336-Z](https://doi.org/10.1016/0031-9384(92)90336-Z)
- Takahashi, L. K. (1994). Organizing action of corticosterone on the development of behavioral inhibition in the preweanling rat. *Brain Research. Developmental Brain Research*, 81(1), Article 1. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(94\)90074-4](https://doi.org/10.1016/0165-3806(94)90074-4)

- Takahashi, L. K. (1995). Glucocorticoids, the hippocampus, and behavioral inhibition in the preweanling rat. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 15(9), 6023-6034. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-09-06023.1995>
- Takahashi, L. K. (2014). Olfactory systems and neural circuits that modulate predator odor fear. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8, 72. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00072>
- Takahashi, L. K., Hubbard, D. T., Lee, I., Dar, Y., & Sipes, S. M. (2007). Predator odor-induced conditioned fear involves the basolateral and medial amygdala. *Behavioral Neuroscience*, 121(1), 100-110. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.121.1.100>
- Takahashi, L. K., & Kim, H. (1994). Intracranial action of corticosterone facilitates the development of behavioral inhibition in the adrenalectomized preweanling rat. *Neuroscience Letters*, 176(2), 272-276. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(94\)90099-x](https://doi.org/10.1016/0304-3940(94)90099-x)
- Takahashi, L. K., Nakashima, B. R., Hong, H., & Watanabe, K. (2005). The smell of danger: A behavioral and neural analysis of predator odor-induced fear. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 29(8), 1157-1167. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2005.04.008>
- Tallot, L., Doyère, V., & Sullivan, R. M. (2016). Developmental emergence of fear/threat learning: Neurobiology, associations and timing: Development of aversive learning and timing. *Genes, Brain and Behavior*, 15(1), Article 1. <https://doi.org/10.1111/gbb.12261>
- Teicher, M. H., & Blass, E. M. (1976). Suckling in newborn rats: Eliminated by nipple lavage, reinstated by pup saliva. *Science (New York, N.Y.)*, 193(4251), Article 4251. <https://doi.org/10.1126/science.935878>
- Teicher, M. H., & Blass, E. M. (1977). First suckling response of the newborn albino rat: The roles of olfaction and amniotic fluid. *Science (New York, N.Y.)*, 198(4317), Article 4317. <https://doi.org/10.1126/science.918660>
- Thompson, J. V., Sullivan, R. M., & Wilson, D. A. (2008). Developmental emergence of fear learning corresponds with changes in amygdala synaptic plasticity. *Brain Research*, 1200, 58-65. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.01.057>
- Tong, M. T., Peace, S. T., & Cleland, T. A. (2014). Properties and mechanisms of olfactory learning and memory. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8, 238. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00238>
- Trujillo, V., Durando, P. E., & Suárez, M. M. (2016). Maternal separation in early life modifies anxious behavior and Fos and glucocorticoid receptor expression in limbic neurons after chronic stress in rats: Effects of tianeptine. *Stress (Amsterdam, Netherlands)*, 19(1), 91-103. <https://doi.org/10.3109/10253890.2015.1105958>
- Ulrich-Lai, Y. M., & Herman, J. P. (2009). Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nature Reviews. Neuroscience*, 10(6), 397-409. <https://doi.org/10.1038/nrn2647>
- Upton, K. J., & Sullivan, R. M. (2010). Defining age limits of the sensitive period for attachment learning in rat pups. *Developmental Psychobiology*, 52(5), 453-464. <https://doi.org/10.1002/dev.20448>
- Uriarte, N., Breigeiron, M. K., Benetti, F., Rosa, X. F., & Lucion, A. B. (2007). Effects of maternal care on the development, emotionality, and reproductive functions in male and female rats. *Developmental Psychobiology*, 49(5), Article 5. <https://doi.org/10.1002/dev.20241>
- Uriarte, N., Fernández, M. V., Agrati, D., Zuluaga, M. J., Ferreño, M., & Ferreira, A. (2014). Maternal and affective behaviors of lactating rats reared in overlapping litters. *Journal of Physiology-Paris*, 108(2-3), Article 2-3. <https://doi.org/10.1016/j.jphysparis.2014.04.001>

- Uriarte, N., Ferreira, A., Rosa, X. F., & Lucion, A. B. (2009). Effects of litter-overlapping on emotionality, stress response, and reproductive functions in male and female rats. *Developmental Psychobiology*, 51(3), 259-267. <https://doi.org/10.1002/dev.20360>
- Uriarte, N., Ferreira, A., Rosa, X. F., Sebben, V., & Lucion, A. B. (2008). Overlapping litters in rats: Effects on maternal behavior and offspring emotionality. *Physiology & Behavior*, 93(4-5), Article 4-5. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2008.02.004>
- Vaish, A., Grossmann, T., & Woodward, A. (2008). Not all emotions are created equal: The negativity bias in social-emotional development. *Psychological Bulletin*, 134(3), 383-403. <https://doi.org/10.1037/0033-2909.134.3.383>
- Van de Kar, L. D., Piechowski, R. A., Rittenhouse, P. A., & Gray, T. S. (1991). Amygdaloid lesions: Differential effect on conditioned stress and immobilization-induced increases in corticosterone and renin secretion. *Neuroendocrinology*, 54(2), 89-95. <https://doi.org/10.1159/000125856>
- van Oers, H. J., de Kloet, E. R., Li, C., & Levine, S. (1998). The ontogeny of glucocorticoid negative feedback: Influence of maternal deprivation. *Endocrinology*, 139(6), 2838-2846. <https://doi.org/10.1210/endo.139.6.6037>
- van Winkel, R., van Nierop, M., Myin-Germeys, I., & van Os, J. (2013). Childhood trauma as a cause of psychosis: Linking genes, psychology, and biology. *Canadian Journal of Psychiatry. Revue Canadienne De Psychiatrie*, 58(1), 44-51. <https://doi.org/10.1177/070674371305800109>
- Varendi, H., Porter, R. H., & Winberg, J. (1996). Attractiveness of amniotic fluid odor: Evidence of prenatal olfactory learning? *Acta Paediatrica (Oslo, Norway: 1992)*, 85(10), 1223-1227. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.1996.tb18233.x>
- Vazdarjanova, A., Cahill, L., & McGaugh, J. L. (2001). Disrupting basolateral amygdala function impairs unconditioned freezing and avoidance in rats. *The European Journal of Neuroscience*, 14(4), 709-718. <https://doi.org/10.1046/j.0953-816x.2001.01696.x>
- Viau, V., Sharma, S., Plotsky, P. M., & Meaney, M. J. (1993). Increased plasma ACTH responses to stress in nonhandled compared with handled rats require basal levels of corticosterone and are associated with increased levels of ACTH secretagogues in the median eminence. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 13(3), 1097-1105. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.13-03-01097.1993>
- Walker, C. D., Scribner, K. A., Cascio, C. S., & Dallman, M. F. (1991). The pituitary-adrenocortical system of neonatal rats is responsive to stress throughout development in a time-dependent and stressor-specific fashion. *Endocrinology*, 128(3), 1385-1395. <https://doi.org/10.1210/endo-128-3-1385>
- Walker, C.-D. (2010). Maternal touch and feed as critical regulators of behavioral and stress responses in the offspring. *Developmental Psychobiology*, 52(7), 638-650. <https://doi.org/10.1002/dev.20492>
- Walker, C.-D., Deschamps, S., Proulx, K., Tu, M., Salzman, C., Woodside, B., Lupien, S., Gallo-Payet, N., & Richard, D. (2004). Mother to infant or infant to mother? Reciprocal regulation of responsiveness to stress in rodents and the implications for humans. *Journal of Psychiatry & Neuroscience: JPN*, 29(5), Article 5.
- Wallace, K. J., & Rosen, J. B. (2001). Neurotoxic lesions of the lateral nucleus of the amygdala decrease conditioned fear but not unconditioned fear of a predator odor: Comparison with electrolytic lesions. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 21(10), 3619-3627. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-10-03619.2001>
- Wamsteeker Cusulin, J. I., Füzesi, T., Watts, A. G., & Bains, J. S. (2013). Characterization of corticotropin-releasing hormone neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus of

- Crh-IRES-Cre mutant mice. *PloS One*, 8(5), e64943. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064943>
- Wiedenmayer, C. (2001). Developmental changes in c-fos expression to an age-specific social stressor in infant rats. *Behavioural Brain Research*, 126(1-2), Article 1-2. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(01\)00260-1](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(01)00260-1)
- Wiedenmayer, C. P., Magarinos, A. M., McEwen, B. S., & Barr, G. A. (2003). Mother Lowers Glucocorticoid Levels of Prewaning Rats After Acute Threat. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1008(1), 304-307. <https://doi.org/10.1196/annals.1301.038>
- Winkelmann-Duarte, E. C., Todeschin, A. S., Fernandes, M. C., Bittencourt, L. C., Pereira, G. A. M., Samios, V. N., Schuh, A. F. S., Achaval, M. E., Xavier, L. L., Sanvito, G. L., Mandarim-de-Lacerda, C. A., & Lucion, A. B. (2007). Plastic changes induced by neonatal handling in the hypothalamus of female rats. *Brain Research*, 1170, 20-30. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.07.030>
- Wotjak, C. T., Kubota, M., Liebsch, G., Montkowski, A., Holsboer, F., Neumann, I., & Landgraf, R. (1996). Release of Vasopressin within the Rat Paraventricular Nucleus in Response to Emotional Stress: A Novel Mechanism of Regulating Adrenocorticotrophic Hormone Secretion? *Journal of Neuroscience*, 16(23), 7725-7732. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-23-07725.1996>
- Xu, B., Zhang, X., He, Y., Liu, C., Li, L., Liu, Q., Huang, Y., Chen, M., Ren, B., Guo, Y., & Chen, Y. (2022). The Impacts of Early-life Adversity on Striatal and Hippocampal Memory Functions. *Neuroscience*, 490, 11-24. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2022.02.029>
- Zhang, J.-X., Sun, L., Bruce, K. E., & Novotny, M. V. (2008). Chronic exposure of cat odor enhances aggression, urinary attractiveness and sex pheromones of mice. *Journal of Ethology*, 26(2), Article 2. <https://doi.org/10.1007/s10164-007-0060-1>
- Zhang, W. N., Bast, T., & Feldon, J. (2001). The ventral hippocampus and fear conditioning in rats: Different anterograde amnesias of fear after infusion of N-methyl-D-aspartate or its noncompetitive antagonist MK-801 into the ventral hippocampus. *Behavioural Brain Research*, 126(1-2), 159-174. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(01\)00256-X](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(01)00256-X)
- Zhao, D.-Q., & Ai, H.-B. (2011). Oxytocin and Vasopressin Involved in Restraint Water-Immersion Stress Mediated by Oxytocin Receptor and Vasopressin 1b Receptor in Rat Brain. *PLOS ONE*, 6(8), e23362. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023362>
- Zuena, A. R., Mairesse, J., Casolini, P., Cinque, C., Alemà, G. S., Morley-Fletcher, S., Chiodi, V., Spagnoli, L. G., Gradini, R., Catalani, A., Nicoletti, F., & Maccari, S. (2008). Prenatal restraint stress generates two distinct behavioral and neurochemical profiles in male and female rats. *PloS One*, 3(5), e2170. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002170>
- Zuluaga, M. J., Agrati, D., Athaide, V., Ferreira, A., & Uriarte, N. (2023). Fear response of rat pups to a non-aversive social stimulus: Evidence for the involvement of memory processes. *Developmental Psychobiology*, 65(7), e22417. <https://doi.org/10.1002/dev.22417>
- Zuluaga, M. J., Agrati, D., Uriarte, N., & Ferreira, A. (2014). Social aversive stimuli presented to the mother produce the precocious expression of fear in rat pups: Aversive Stimuli for the Mother and the Pups' Fear Responses. *Developmental Psychobiology*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/dev.21199>

ANEXO I. EFECTO DE LA EXPOSICIÓN TEMPRANA A UN MACHO INTRUSO SOBRE EL COMPORTAMIENTO DE LA MADRE

Estrés durante el posparto y comportamiento de la madre

El período posparto se caracteriza por grandes cambios fisiológicos, neuroendócrinos y comportamentales para las madres (Ferreira et al., 2002; Pereira & Ferreira, 2016). Comenzando durante la gestación y consolidándose luego del parto, estos cambios adaptativos incluyen la reducción de las respuestas neuroendócrina y comportamental de estrés (Lonstein et al., 2014; Neumann et al., 1998). Estas adaptaciones fisiológicas y conductuales permiten a la hembra, aún en situaciones adversas, brindar el cuidado adecuado crucial para el desarrollo de las crías, así como reducir el potencial impacto de la respuesta de estrés sobre las demandas fisiológicas propias del posparto (Gatewood et al., 2005; Sukikara et al., 2006). Junto con el desarrollo de cuidados directos hacia las crías, las madres modifican su respuesta frente a diversos estímulos del medio. Así, las ratas madres no solo aumentan su agresividad hacia individuos intrusos en el nido (Erskine et al., 1980; Ferreira & Hansen, 1986), sino que 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 (Lonstein, 2005; Lonstein et al., 1998; Pereira et al., 2005) cuando son comparadas con hembras en otras fases del ciclo reproductivo. Esta reducción generalizada del miedo y la ansiedad está íntimamente relacionada al cuidado de las crías. En este sentido, las hembras lactantes se aventuran en un ambiente novedoso para ir en búsqueda de sus crías (Stern & Mackinnon, 1976) y permanecen más tiempo en los brazos abiertos del laberinto elevado en cruz si estas están presentes (Pereira et al., 2005).

A diferencia de la extensa literatura que investiga el impacto de la exposición temprana al estrés postnatal sobre la descendencia, pocas investigaciones examinan si la exposición a estresores y a situaciones adversas durante el período posparto afectan de forma duradera el comportamiento de la madre hacia sus crías, así como su respuesta ante otros estímulos del medio. Algunos autores reportan que las hembras lactantes, expuestas a estímulos o situaciones estresantes durante el posparto, muestran alteraciones en la frecuencia y calidad de las conductas de cuidado maternal (Demaestri et al., 2022; Gallo et al., 2019; Ivy

et al., 2008). Curiosamente, en trabajos utilizando el modelo de separación maternal, se observó un aumento en algunos componentes del comportamiento maternal, como la adopción de la postura de amamantamiento y el lamido de las crías (Kosten & Kehoe, 2010; Marmendal et al., 2004; Orso et al., 2018, 2019; Own & Patel, 2013).

A su vez, la separación de sus crías afecta la retención de la memoria a corto y largo plazo de la madre, aumenta sus niveles de ansiedad experimental (Aguggia et al., 2013) y las conductas de tipo depresivas (Boccia et al., 2007; Sung et al., 2010) al tiempo que reduce los efectos antinociceptivos de la morfina (Kalinichev et al., 2000). Sin embargo, también hay reportes contradictorios, mostrando que la separación maternal no afecta la conducta tipo depresiva (Aguggia et al., 2013) y, en algunos casos reduce la ansiedad experimental en comparación con las madres control (Kalinichev et al., 2000). Por otra parte, Ivy y colaboradores (2008) mostraron que tanto la cantidad como la calidad del cuidado maternal se ven afectadas en el modelo de restricción de materiales de nido, aumentando la fragmentación del comportamiento maternal, junto a un incremento de la ansiedad experimental de las hembras en el campo abierto, pero no en la prueba del laberinto elevado en cruz.

En estudios previos (Zuluaga et al., 2014) mostramos que la exposición al macho altera el comportamiento de la madre durante el período de exposición a los intrusos (día 4 a 8 posparto), provocando que la hembra permanezca más tiempo fuera del nido atacando al macho en la jaula y menos tiempo amamantando a sus crías. Sin embargo, hasta el momento no se ha evaluado si el comportamiento maternal y los cambios afectivos asociados de madres expuestas junto a sus crías a un macho intruso permanecen alterados una vez terminado el período de exposición a la situación adversa.

Las modificaciones en el ambiente postnatal temprano influyen en el comportamiento de la madre (Baracz et al., 2020; Bölükbas et al., 2020; C. D. Smith & Lonstein, 2008; Uriarte et al., 2008). En estudios previos (Zuluaga et al., 2014) mostramos que el comportamiento de la madre se altera durante la exposición al macho intruso. Sin embargo, hasta el momento desconocemos si el comportamiento de la madre, tanto el cuidado directo de las crías como los cambios en los comportamientos afectivos característicos de la maternidad, permanece alterado una vez terminada la exposición al macho intruso.

Por lo tanto, en este experimento que se anexa a la tesis se profundizará en los efectos sobre la madre de la exposición a macho intruso una vez concluida la experiencia adversa.

HIPÓTESIS

La exposición de la díada madre-crías a machos intrusos provoca alteraciones del comportamiento maternal y los comportamientos afectivos que acompañan la maternidad luego de la experiencia adversa.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si luego de la exposición de la díada madre-crías a un macho intruso se modifica el comportamiento maternal, la agresión maternal y la ansiedad experimental de las madres

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar si el comportamiento y la agresión maternal y la respuesta de ansiedad maternal de madres luego de finalizado el periodo de exposición al macho cambia en relación a aquellas expuestas a una jaula vacía.

MATERIALES Y MÉTODOS

ANIMALES

Se utilizaron ratas adultas machos y hembras (*Rattus norvegicus*, cepa Wistar, de 3 a 4 meses de edad) y crías machos y hembras de 5 días de edad. Los animales se alojaron en una habitación a temperatura ($22\pm^{\circ}\text{C}$) y humedad (65%) controlada y bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas (luces encendidas a las 06:00 horas), con libre acceso a alimento y agua. Las hembras sexualmente receptivas se alojaron con los machos durante la fase de oscuridad de 12 horas. Las ratas preñadas se mantuvieron en grupos de cuatro hasta el día 21 de gestación, cuando se alojaron individualmente en jaulas (48 x 33 x 16 cm) y se

asignaron aleatoriamente a una de las condiciones experimentales. En el día del parto se igualaron las camadas a ocho individuos (cuatro crías de cada sexo) y se consideró al día de parto como día 0 posparto. El presente protocolo experimental fue aprobado por la Comisión de Ética en el Uso de Animales de la Facultad de Ciencias de la Universidad de la República (Exp. 240012-000015-23).

EXPOSICIÓN TEMPRANA DE LA DÍADA MADRE-CRÍAS A MACHOS INTRUSOS

(Lau & Simpson, 2004; Zuluaga et al., 2014)

Se realizó el mismo protocolo descrito en materiales y métodos de la tesis. Brevemente, del día 1 al 4 del posparto, las hembras lactantes y sus camadas fueron expuestas a un nuevo macho intruso en una jaula o una jaula vacía como control durante 8 horas.

PRUEBAS COMPORTAMENTALES

Prueba de comportamiento maternal (Uriarte et al., 2014)

La prueba consiste en el registro de los comportamientos maternos durante 30 minutos luego de 10 minutos de separación de las crías. Se inicia la prueba introduciendo las crías a la caja materna, las cuales son esparcidas frente al nido de la hembra. Se registra la frecuencia de acarreo de las crías al nido, *mouthing* (rearreglos de las crías en el nido), lamido corporal (LC) y anogenital (LA) y la construcción del nido (CN). Además, se registra la duración total de las actividades de *hover-over* (la hembra se posiciona sobre las crías en el nido mientras realiza activamente otras conductas como lamer a las crías o acicalarse, H-O), y de las posturas de amamantamiento (low-kyphosis, LKP, y high-kyphosis, HKP, de acuerdo a la intensidad del arqueado corporal durante el amamantamiento), así como el tiempo en que la madre pasa fuera del nido.

Prueba de agresión maternal (Ferreira et al., 2002; Ferreira & Hansen, 1986)

Se coloca una rata macho en la caja residencia de la hembra lactante y sus crías y se registra la frecuencia de los siguientes comportamientos durante una prueba de 10 minutos: postura de ataque (la hembra se acerca lentamente agazapada de cara al intruso); ataque (o "ataque frontal": la hembra se lanza hacia el macho, a veces seguido de rodar y arrastrarse durante un breve período); mordida (boca de la hembra en contacto con el cuerpo del intruso, usualmente acompañado de una vocalización por parte del macho); postura lateral

(o "ataque lateral": la hembra se acerca al macho de lado presentándole la parte lateral de su cuerpo). Se registra, a su vez, el tiempo total en que el macho intruso adopta una postura de sumisión erguida (sentado sobre las patas traseras con la espalda curvada y las patas delanteras levantadas) durante la prueba. Además, se registran las latencias a la primera respuesta agresiva mostrada por la hembra (ataque, mordida o postura lateral) y a la primera postura subordinada del macho. A los animales que no responden se les asigna una latencia de 600 s. Para esta prueba se utilizaron machos diferentes a los utilizados en el protocolo de exposición a intruso del día 1-4 postparto.

Prueba de ansiedad experimental: Laberinto elevado en cruz (Pellow & File, 1986)

Este modelo consiste en un laberinto elevado (40 cm sobre el suelo) en forma de cruz con dos brazos cerrados opuestos entre sí y dos brazos abiertos también ubicados en oposición, que miden 50 cm de largo x 10 cm de ancho. Al comenzar la prueba cada animal es colocado en el centro del laberinto frente a un brazo cerrado. Se registra el tiempo total de permanencia en los brazos abiertos (TTA) y el número de entradas a los brazos abiertos (EA) y cerrados (EC) durante una sesión de 5 minutos. Una entrada en un brazo se define como una vez que el animal coloca sus cuatro patas dentro del mismo. Los datos se expresan como el porcentaje de entradas de brazos abiertos ($100 \times \text{abiertos}/\text{total}$), el porcentaje de tiempo pasado en brazos abiertos ($100 \times \text{abiertos}/\text{total}$), el número de cruces entre los brazos cerrados (CC) y el número de cruces entre los brazos abiertos (CA). También se registra el número de posturas erguidas y acicalamientos.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Experimento 1. Efecto de la exposición a machos sobre el comportamiento y la agresión maternal

Las diadas madre-crías fueron expuestas en la caja materna a macho intruso ($n_{\text{diadas}} = 10$) o jaula vacía (control, $n_{\text{diadas}} = 8$). En el día 5 posparto, luego de finalizada la exposición, las hembras lactantes fueron transportadas a la sala de prueba y luego de una hora de habituación, se retiró toda la camada. Luego de diez minutos, ocho crías fueron esparcidas en la jaula frente al nido de la hembra y se registró el comportamiento maternal. Inmediatamente después de finalizada la prueba de comportamiento maternal, se procedió con la prueba de agresión maternal hacia un macho adulto (300-350 g) en la caja materna. Ambas pruebas se realizaron durante la fase de luz del ciclo luz-oscuridad.

Experimento 2. Efecto de la exposición a machos sobre la ansiedad experimental de la madre

Las hembras primíparas lactantes junto a sus crías fueron expuestas en la caja materna a macho intruso ($n_{\text{díadas}}=16$) o jaula vacía (control, $n_{\text{díadas}}=16$) de acuerdo al protocolo de exposición a intrusos descrito anteriormente. En el día 5 postparto, luego de finalizada la exposición, se evaluó la ansiedad experimental de las hembras lactantes en la prueba del laberinto elevado en cruz, modelo ampliamente validado para evaluar ansiedad experimental (Pellow & File, 1986). Esta prueba se realizó durante la fase de luz del ciclo luz-oscuridad.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se expresan como medianas (rango intercuartil, RIQ) dada la falta de una distribución normal u homogeneidad de varianzas (Siegel, 1956). El comportamiento de las madres entre las condiciones de exposición a macho y jaula vacía se comparó mediante la prueba U de Mann Whitney. En todos los casos el nivel de significación estadística seleccionado fue $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

Experimento 1. Efecto de la exposición a machos sobre el comportamiento maternal y la agresión maternal

La exposición prolongada al macho intruso no provocó cambios en el comportamiento maternal (Figura 22) ni en la agresión maternal (Figura 23) de las hembras lactantes respecto a la condición control luego de finalizada la exposición al estresor social en el día 5 postparto.

Como se muestra en la figura 22A, el comportamiento maternal de las hembras previamente expuestas a macho intruso no varió respecto de a aquellas expuestas a jaula vacía en el número de acarreos ($U_{(8,10)} = 23,0$; $p = 0,11$), mouthing ($U_{(8,10)} = 30,5$; $p = 0,42$), lamidos corporales ($U_{(8,10)} = 34,5$; $p = 0,65$), lamidos anogenitales ($U_{(8,10)} = 25,5$; $p = 0,21$) ni en la construcción de nido ($U_{(8,10)} = 34,0$; $p = 0,62$). Tampoco se observaron diferencias entre los

grupos en el tiempo en contacto con las crías (H-O: $U_{(8,10)} = 29,0$; $p = 0,35$), la duración total de las posturas de amamantamiento (LKP: $U_{(8,10)} = 29,5$; $p = 0,35$; HKP: $U_{(8,10)} = 36,0$, $p > 0,99$), o en el tiempo fuera del nido ($U_{(8,10)} = 29,5$; $p = 0,37$, Figura 22B).

La agresión maternal de las hembras con experiencia macho no se diferenció respecto al control en las posturas de ataque ($U_{(8,10)} = 21,5$; $p = 0,1$), ataques ($U_{(8,10)} = 32,0$; $p = 0,49$), mordidas ($U_{(8,10)} = 36,0$; $p = 0,74$) y posturas laterales ($U_{(8,10)} = 23,5$; $p = 0,15$, Figura 23A). Tampoco difirieron entre los grupos experimentales las latencias al primer ataque de la hembra ($U_{(8,10)} = 21,5$; $p = 0,1$) y la primera postura de sumisión del macho ($U_{(8,10)} = 28,5$; $p = 0,32$) y el tiempo total que el macho permaneció en postura de sumisión ($U_{(8,10)} = 24,0$; $p = 0,17$, Figura 23B).

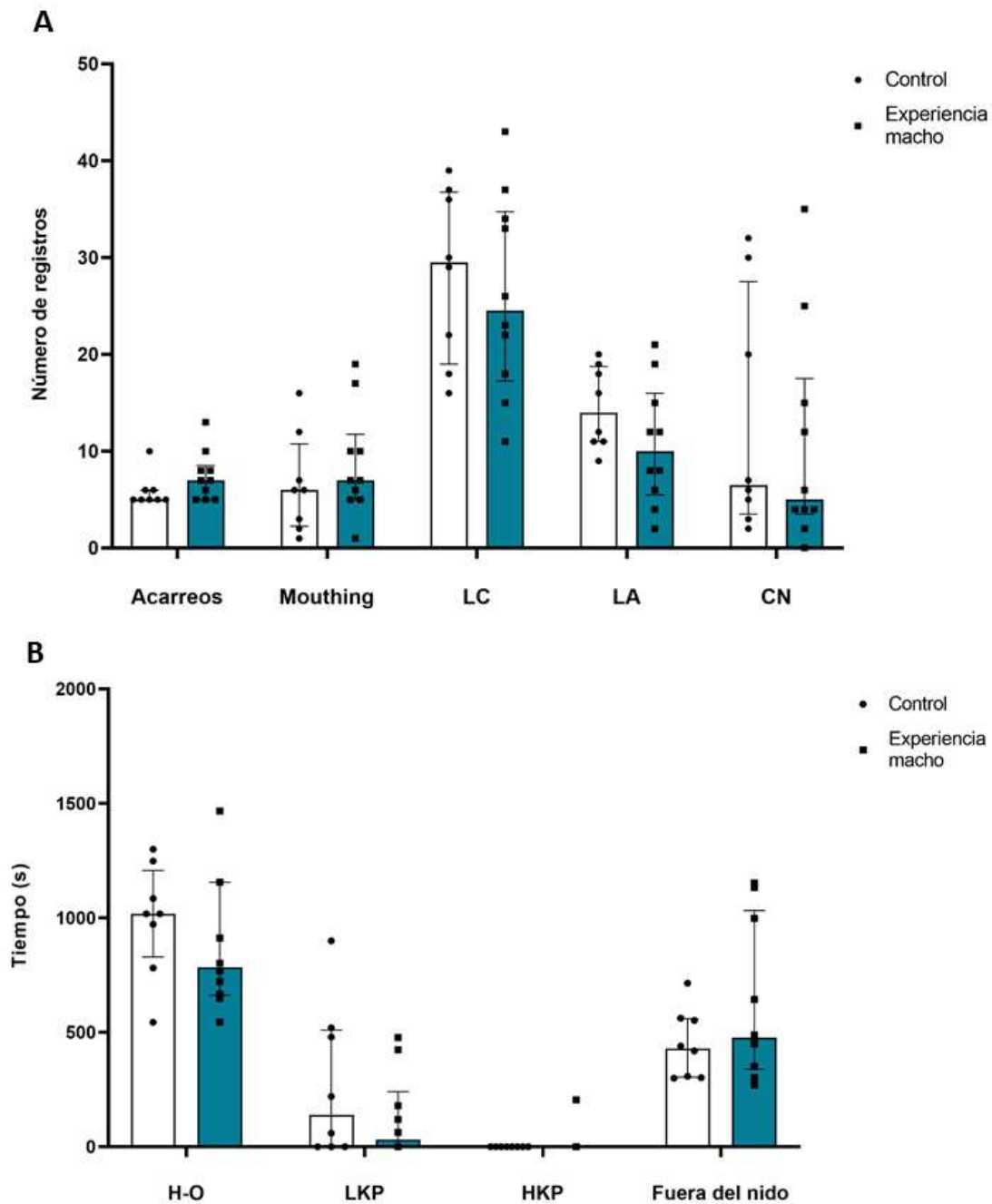


Figura 22. Comportamiento materno registrado en el DPN 5 durante una prueba de 30 min de hembras lactantes previamente expuestas del día 1-4 postparto a jaula vacía (control, barra blanca) o a machos intrusos (experiencia macho, barra azul). A) Número de observaciones registradas de componentes activos del comportamiento materno. B) Duración total en segundos de los componentes pasivos de este comportamiento materno, así como el tiempo que las hembras permanecieron fuera del nido. Los datos se expresan en medianas (RIQ) y fueron analizados mediante la prueba U de Mann-Whitney. Los círculos y cuadrados representan los valores individuales. LC: lamido corporal, LA: lamido anogenital, CN: construcción del nido, H-O: hover-over, LKP: postura de amamantamiento low-kyphosis (LKP), HKP: postura de amamantamiento high-kyphosis.

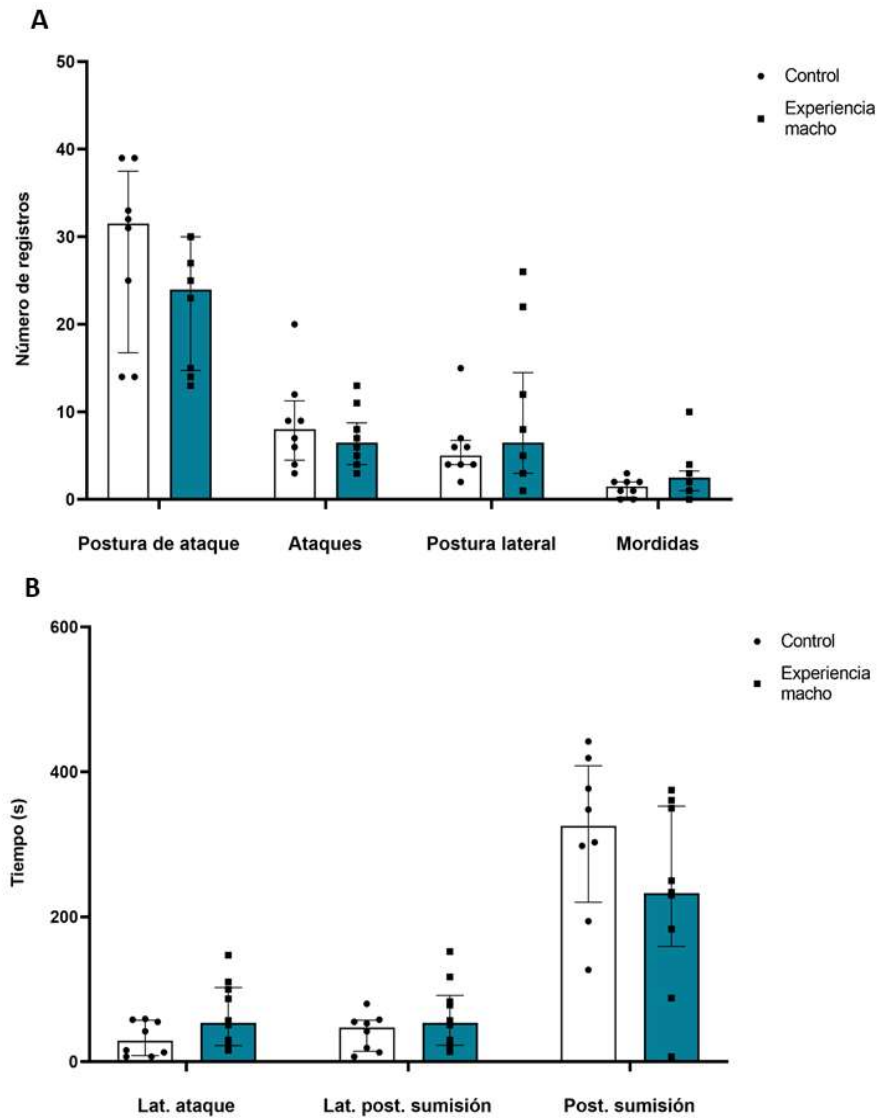


Figura 23. Agresión maternal frente a un macho adulto en el DPN 5 de hembras lactantes previamente expuestas del día 1-4 postparto a jaula vacía (control, barra blanca) o a machos intrusos (experiencia macho, barra azul). A) Número de los comportamientos agresivos exhibidos por las hembras lactantes frente al macho. B) Se muestran las latencias al primer ataque de la hembra lactante y a la primera postura de sumisión por parte del macho y el tiempo total que permaneció el macho en postura de sumisión. Los datos se expresan en medianas (RIQ) y fueron analizados mediante la prueba U de Mann-Whitney. Los círculos y cuadrados representan los valores individuales.

Experimento 2. Efecto de la exposición a machos sobre la ansiedad experimental de la madre

En el día 5 postparto, luego de finalizados los cuatro días de exposición al estresor social, las hembras lactantes expuestas a machos mostraron un aumento en la ansiedad maternal en comparación con las hembras control. Esto se reflejó en una disminución en el porcentaje de tiempo de permanencia en los brazos abiertos ($U_{(16,16)} = 58,5$; $p \leq 0,05$) y en el porcentaje de entradas a los brazos abiertos ($U_{(16,16)} = 67,5$; $p \leq 0,05$) del laberinto, respecto a las hembras control (Figura 24).

No se observaron diferencias significativas en el número de entradas a los brazos cerrados (EBA: $U_{(16,16)} = 83,0$; $p=0,09$), número de cruces dentro de los brazos cerrados (CC: $U_{(16,16)} = 107,0$; $p=0,43$) o abiertos (CA: $U_{(16,16)} = 96,0$; $p=0,24$), ni en comportamientos como posturas erguidas ($U_{(16,16)} = 82,5$; $p=0,09$) o acicalamiento ($U_{(16,16)} = 102,5$; $p=0,35$) registrados durante la prueba (Tabla 3).

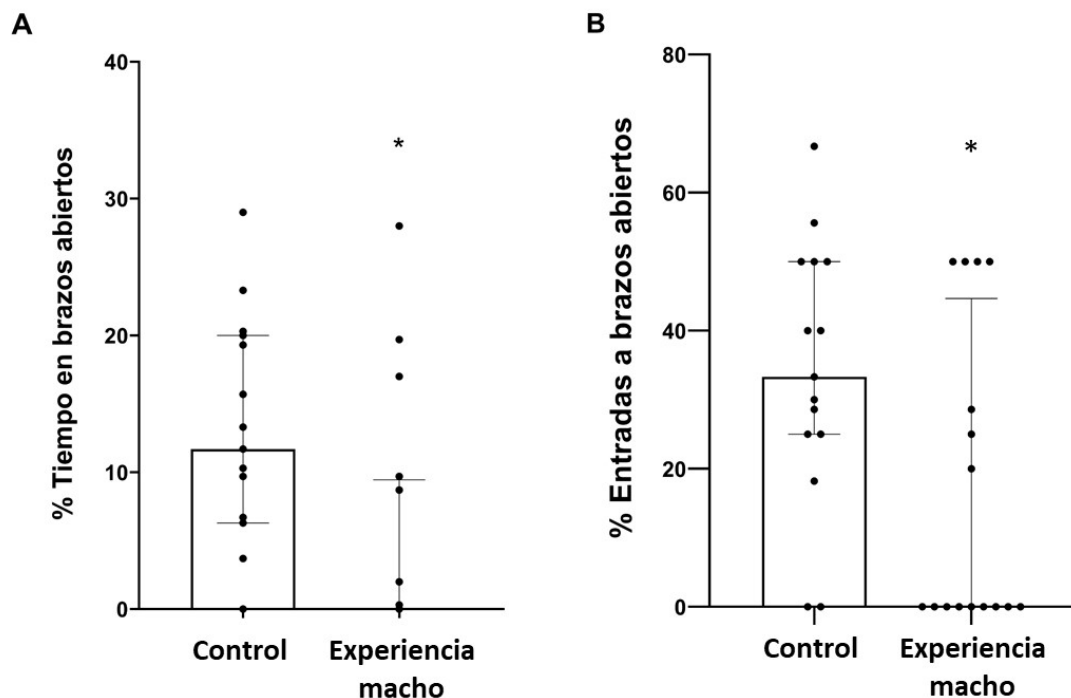


Figura 24. Ansiedad experimental de hembras lactantes expuestas a jaula vacía (control, $n=16$) o macho intruso (experiencia macho, $n=16$) evaluada en el laberinto elevado en cruz. A) Porcentaje de tiempo que permanecieron las hembras lactantes en los brazos abiertos y B) porcentaje del número de entradas a los brazos abiertos durante la prueba. Los datos se expresan como medianas (RIQ) y fueron analizados mediante la prueba U de Mann-Whitney. * $p \leq 0,05$ vs. control.

Tabla 3. Comportamiento de hembras lactantes en el laberinto elevado en cruz

	EBC	CC	CA	Posturas erguidas	Acicalamiento
Control	4,5 (2,0-6,0)	2,5 (0,8-3,3)	0,0 (0,0-1,0)	10,0 (5,8-12,3)	4,5 (3,0-7,0)
Experiencia macho	2,5 (0,0-4,3)	2,0 (0,0-3,0)	0,0 (0,0-0,0)	8,0 (4,0-9,3)	4,5 (2,0-5,3)

EBC: entradas a brazos cerrados, CC: cruces cerrados, CA: cruces abiertos, Datos expresados en mediana (RIQ) y analizados con la prueba U de Mann-Whitney; p=ns para todas las comparaciones.

DISCUSIÓN

Los resultados mostraron que la convivencia con un macho intruso no alteró las respuestas comportamentales de las madres en la prueba de comportamiento maternal y agresión maternal. Sin embargo, aumentó la ansiedad maternal, sugiriendo que esta experiencia representa un estresor moderado para las madres.

La ausencia de cambios en la respuesta de las madres hacia las crías en una prueba de comportamiento maternal y de agresión hacía un macho intruso luego de la exposición al machos intrusos, contrasta con los cambios en el comportamiento maternal observados en la mayoría de estudios que evalúan el efecto de protocolos de estrés aplicados durante la gestación o durante el posparto (Cost et al., 2021; Demaestri et al., 2022; Gallo et al., 2019; Ivy et al., 2008). De forma interesante, el efecto de estas experiencias adversas sobre el comportamiento maternal no es uniforme, sino que varía de acuerdo al protocolo de estrés aplicado. Por ejemplo, protocolos de separación maternal diaria durante el posparto aumentan la expresión de los cuidados maternos (Bölükbas et al., 2020; Kosten & Kehoe, 2010; Marmendal et al., 2004; Orso et al., 2018, 2019; Own & Patel, 2013), mientras que la reducción del material disponible para la construcción del nido, disminuye la expresión de componentes activos del comportamiento maternal y altera su ejecución, aumentando la fragmentación de la conducta (Ivy et al., 2008; Rincón-Cortés & Grace, 2022)

Utilizando un modelo de inestabilidad social crónica, similar al empleado en la presente tesis, Nephew y Bridges (2011) observaron que luego de la exposición a machos intrusos durante un período prolongado (del día 2 al 16 de lactancia) el comportamiento y la agresión maternal se ven disminuidos. Este protocolo de estrés, así como otros que reducen los cuidados brindados por las madres de forma sostenida en el tiempo, impacta en el desarrollo físico de las crías (Nephew & Bridges, 2011; Rincón-Cortés & Grace, 2022), indicando su alto grado de severidad. En contraposición, nuestro modelo de exposición a macho intruso del día 1 al 4 de lactancia, modifica el comportamiento maternal de forma transitoria cuando el macho está presente, pero no genera efectos a largo plazo en el comportamiento maternal o en el crecimiento de las crías (Zuluaga et al., 2014; presente tesis). Por lo tanto, la comparación de estos dos modelos de estrés psicosocial postparto, indica que la duración y la naturaleza de la experiencia generan efectos diferentes sobre el comportamiento y la agresión maternales. De acuerdo con este análisis, nuestro modelo constituye un protocolo de estrés moderado que genera consecuencias menos duraderas y perjudiciales que el propuesto por Nephew y Bridges (2011). Contar con modelos de estrés o experiencias adversas con diferentes características e intensidades permite ampliar el estudio del espectro de adaptaciones comportamentales y fisiológicas de la madre y las crías, así como evaluar cuál es el límite de la capacidad de flexibilidad y adaptación de la madre ante situaciones adversas.

Es importante destacar que en nuestro modelo de exposición a intruso, el comportamiento de la madre sí se ve alterado durante los cuatro días de exposición, aumentando el tiempo fuera del nido y el comportamiento agresivo hacia los intrusos (Zuluaga et al., 2014). Este resultado, junto con lo observado en el día 5 de lactancia, resalta la capacidad de adaptación de la madre al contexto en el que se desarrolla el comportamiento maternal, ya que una vez desaparecido el estímulo aversivo, es capaz de continuar cuidando de las crías en forma contingente a sus necesidades y el contexto (Agrati & Uriarte, 2023).

A pesar de que las alteraciones del comportamiento maternal son transitorias y se mantienen únicamente durante la presencia de los intrusos, tienen efecto en el desarrollo del SN y las respuestas comportamentales de las crías, como demostramos en el Capítulo I. Una posible explicación para este fenómeno radica en que las alteraciones del comportamiento maternal observadas durante la exposición adversa ocurren en el período en que las crías son más susceptibles a las variaciones del cuidado maternal (Champagne et al., 2003). Por ejemplo, los efectos de adopciones cruzadas en las crías de madres que naturalmente despliegan

diferentes frecuencias de lamido no se detectan si las adopciones se realizan luego del día 6 de lactancia (Curley & Champagne, 2016).

En contraste con la ausencia de cambios en el comportamiento y la agresión maternales, la exposición de la diada madre-crías a machos intrusos aumentó los niveles de ansiedad experimental de las madres, señalando un efecto de esta experiencia adversa sobre el estado emocional de las madres. Este resultado, que reafirma el carácter estresante de la experiencia macho, está de acuerdo con estudios previos que utilizan otros modelos de estrés donde se observa un efecto similar en la respuesta de ansiedad maternal (Agrati & Lonstein, 2016; Aguggia et al., 2013; Ivy et al., 2008).

El mayor impacto de la experiencia macho sobre la ansiedad respecto al comportamiento maternal de las hembras lactantes, podría deberse a un efecto directo de esta experiencia estresante sobre los sistemas de control de los estados emocionales. En este sentido, las experiencias adversas inducen cambios en el funcionamiento de diversos sistemas de neurotransmisión y neuromoduladores como el sistema GABAérgico (Ghosal et al., 2017; Skilbeck et al., 2010) o CRH (Reul & Holsboer, 2002a, 2002b), ambos implicados en la regulación de la ansiedad (Kalueff & Nutt, 2007; Miczek et al., 1995; Reul & Holsboer, 2002a, 2002b).

Un aumento de la actividad del sistema de CRH central puede tener un efecto ansiogénico durante la lactancia (Klampfl et al., 2013, 2014, 2016), pero también genera una afectación importante del comportamiento maternal de las hembras (Klampfl & Bosch, 2019). Por este motivo, si en nuestro modelo, el incremento de la ansiedad de las madres se asociara a un cambio en el sistema de CRH central, esperaríamos a su vez una reducción del cuidado de las crías. Por otra parte, el sistema de neurotransmisión GABAérgico, en particular el receptor GABA_A, también ha sido implicado en la reducción del miedo y de la ansiedad típica del período postparto (Hansen et al., 1985; Lonstein et al., 2014). Este sistema de neurotransmisión sufre cambios importantes mediados por experiencias estresantes, destacándose modificaciones funcionales del mismo en la corteza prefrontal medial (CPFm), área central en la coordinación de las respuestas endócrina, autónoma y comportamental frente a situaciones adversas (McKlveen et al., 2015). Por ejemplo, una disfunción del sistema GABAérgico a nivel de la CPFm se ha asociado a los efectos negativos del estrés crónico en los estados emocionales (Czéh et al., 2018; Ghosal et al., 2017; Page & Coutellier, 2019). De forma interesante, Sabihi y colaboradoras (2021) mostraron que antagonizar al

receptor GABA_A en la subregión Prelímbica de la CPFm de hembras lactantes aumenta la ansiedad de las madres en el laberinto elevado en cruz a niveles comparables a los observados en hembras vírgenes. Asimismo, las autoras observaron que la administración de un agonista del receptor GABA_A en esta región revierte el efecto ansiogénico de una separación prolongada de las crías en las madres en este modelo, sin afectar los niveles de ansiedad de hembras lactantes sin separación previa (Sabihi et al., 2021). Si bien son múltiples los posibles mecanismos a través de los cuales la experiencia macho impacta en la ansiedad de las madres, sería interesante determinar si el incremento de la neurotransmisión GABAérgica a través del receptor GABA_A en la región Prelímbica de la CPFm, revierte el efecto ansiogénico de la experiencia macho.

En resumen, estos resultados junto a los provenientes de estudios previos muestran que la experiencia de exposición a un macho intruso durante los primeros días de la lactancia afecta el comportamiento maternal y los cambios afectivos asociados de forma dependiente del contexto, modificando el comportamiento maternal durante la experiencia aversiva y la ansiedad experimental de las madres luego de la misma. Estos resultados indican que esta experiencia representa un estresor moderado para las madres, y abre caminos para profundizar en los mecanismos neurales o neuroendócrinos a través de los cuales se modifica el comportamiento de las madres.

ANEXO II: ARTÍCULO PUBLICADO
