

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**EFFECTOS DEL CUIDO MATERNO SOBRE LA RESPUESTA
CONDUCTUAL Y NEUROQUÍMICA DE JUVENILES DE *RATTUS*
NORVEGICUS (SPRAGUE DAWLEY)**

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en
Biología para optar al grado y título de Maestría Académica en Biología

MARIANELLA MASIS CALVO

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2013

DEDICATORIA

A las madres porque su esfuerzo que se ve reflejado en nosotros.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por su apoyo y amor.

Al comité de tesis por su paciencia y sus valiosos comentarios que me han hecho crecer como profesional.

A mis compañeras de maestría por su apoyo y colaboración durante el trabajo.

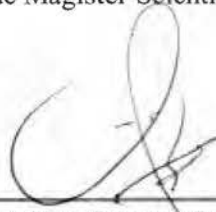
A todo el personal del Centro de Investigación en Neurociencias por su trabajo y ayuda.

Al personal del LEBI, gracias por la colaboración brindada que fue vital para el desarrollo del trabajo.

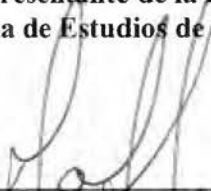
A Vicerrectoría de Investigación por el financiamiento brindado.

Finalmente, a la Escuela de Biología y la Universidad de Costa Rica por formarme como profesional y persona.

“Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado
en Biología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para
optar al grado de Magister Scientiae en Biología”



Dr. Domingo Campos Ramirez
**Representante de la Decana
Sistema de Estudios de Posgrado**



Ph.D Jaime Fornaguera Trias
Director de la Tesis



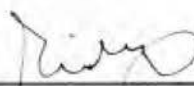
Ph.D. William Eberhard Crabtree
Asesor



Ph.D Adarli Romero Vásquez
Asesora



M.Sc. Daniel Briceño Lobo
**Representante del Director
Programa de Posgrado en Biología**



Marianella Masis Calvo
Candidata

RESUMEN

En el primer capítulo se analizó el cuidado materno de la cepa Sprague-Dawley de la especie *Rattus norvegicus*. Se analizaron factores que tradicionalmente se consideran modulan las conductas maternas como: la experiencia materna, el tamaño de camada y la proporción sexual de la camada. Además, se buscó evaluar si el modelo de alto y bajo lamido desarrollado principalmente en cepas como Long Evans o Wistar se podía aplicar a la cepa Sprague-Dawley. Para ello se evaluaron los efectos de la rutina de limpieza de los animales sobre la variable de lamido. No se encontraron efectos significativos de la rutina de limpieza sobre la frecuencia de lamido durante los tres primeros días postnatales, lo que sugirió que la clasificación de las madres no sería afectada. Además, la clasificación del lamido fue coherente entre diferentes mediciones. Lo anterior apunta a que la clasificación de lamido es confiable y el modelo de alto y bajo lamido también puede ser aplicado a ratas Sprague-Dawley. Por primera vez, se describió las variaciones temporales de las conductas maternas entre los grupos lamido para esta cepa. Se observó que el cuidado materno disminuye a lo largo de los días postnatales y en las sesiones diarias. Las diferencias entre sesiones de observación parecen ser las que contribuyen a la diferenciación entre los grupos de lamido. La estrategia de las madres de bajo lamido es mantener una frecuencia de lamido similar entre sesiones, mientras que las hembras de alto y medio lamido disminuyen el lamido entre las sesiones del día y la noche.

En el segundo capítulo se estudiaron cómo las variaciones del cuidado materno influyen la respuesta de los individuos ante estímulos estresantes. A nivel conductual, basados en el desempeño de las pruebas de campo abierto y el laberinto elevado en cruz se observó que el cuidado materno modula la respuesta ansiosa de los machos ante una situación de estrés moderado, pero no se afectan los comportamientos de desesperanza aprendida en nado forzado. Relacionado con lo anterior, a nivel neuroquímico se encontró un aumento de la actividad serotoninérgica y una mayor degradación de la dopamina en la corteza prefrontal. El orden en particular en que los elementos (neuroquímica y conducta) son modulados por el cuidado, debe ser evaluada en futuros estudios.

TABLA DE CONTENIDO

Dedicatoria.....	ii
Agradecimientos.....	iii
Hoja de aprobación.....	iv
Resumen.....	v
Lista de cuadros.....	vii
Lista de figuras.....	ix
Lista de anexos.....	xiv
Listas de abreviaturas.....	xv
Capítulo I: Caracterización del cuidado materno: uso del modelo de alto y bajo lamido en ratas de la cepa Sprague-Dawley.....	1
Capítulo II: Efectos del cuidado materno sobre la respuesta al estrés de la progenie masculina en ratas de la cepa Sprague-Dawley.....	32

LISTA DE CUADROS

Capítulo I

Cuadro 1. Efectos de la experiencia maternal sobre las conductas maternas.....	11
Cuadro 2. Efectos de la experiencia previa sobre las conductas auto-dirigidas de las madres.....	11
Cuadro 3. Relación entre el tamaño de la camada y la conducta de las madres (Coeficientes de correlación de Pearson y determinación, * $p < 0.05$).....	15
Cuadro 4 Frecuencia de lamido (promedio \pm error estándar) e intervalos de confianza por sesión y de cada grupo postnatal.....	16
Cuadro.5 Conductas de la madre (promedio \pm error estándar) por grupo de lamido (* $p < 0.05$).....	18
Cuadro 6. Comparación de las conductas de la hembra entre grupos de lamido.....	18
Cuadro 7. Intervalos de confianza entre grupos de lamido para cada día y Sesión.....	20
Cuadro 8. Comparación a través de los días y sesiones (ANOVA de medidas repetidas).....	20
Capítulo II	
Cuadro 1 Comparación de grupos de lamido en los parámetros de la prueba de CA (Prueba de Kruskall-Wallis).....	48
Cuadro 2 Conductas (promedio \pm error estándar) por grupo de lamido desplegadas en el LEC	53

Cuadro 3 Comparación entre grupos de lamido para las conductas de exploración y acicalamiento (Prueba de Kruskall-Wallis).....	53
Cuadro 4. Comparación entre grupos de lamido en la pre-prueba (5 minutos) y prueba de nado forzado (Prueba de Kruskall-Wallis).	54
Cuadro 5 Comparación de las concentraciones de los metabolitos por área cerebral entre grupos de lamido (Prueba de Kruskall-Wallis).....	55
Cuadro 6 Relación entre los tipos de acicalamiento y otros parámetros de las pruebas de CA y LEC (Coeficientes de Spearman, *p<0.05, **p<0.01).....	59
Cuadro 7 Coeficientes de Spearman (correlación unilateral) para asociaciones significativas entre las variables conductuales y neuroquímicas.....	60

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

- Fig.1. Vista ventral de las crías al DPN-0. En la izquierda se aprecia una hembra y a la derecha un macho (las líneas indican la distancia anogenital).....6
- Fig. 2 Histograma del porcentaje de lamido total en madres Sprague-Dawley (N=88, en rojo la curva de la distribución normal).....10
- Fig.3. Distribución de las conductas de las madres durante los 6DPN. En A) Porcentaje de las conductas maternas asociadas significativamente con la ubicación dentro del nido (“sin contacto” es el complemento de contacto con las crías), en B) porcentaje de las conductas auto-dirigidas de la madre..... 10
- Fig. 4 Efecto de la experiencia materna sobre el comportamiento de las madres (Promedios \pm error estándar). *Prueba Sidak-Bonferroni, $p < 0.05$ 13
- Fig. 5 Número de crías (promedio \pm error estándar) según el número de parto. *Prueba Tukey, $p < 0.05$ 13
- Fig 6. Efecto del tamaño de la camada sobre A) ubicación dentro del nido ($r_{60} = -0.42$, $p < 0.05$) y en B) postura de lactancia cubriendo ($r_{60} = -0.49$, $p < 0.05$)..... 14
- Fig 7. Frecuencia de lamido (promedio \pm error estándar) entre las sesiones 1 y 2 por cada grupo de rutina de limpieza (RL).....15
- Fig. 8 Porcentaje de la frecuencia de lamido (promedio \pm error estándar) por medición.....17
- Fig.9. Madres clasificadas dentro de cada categoría de lamido por medición (BL: bajo lamido, ML: medio lamido y AL: alto lamido)..... 17

Fig 10. Conductas maternas (promedio \pm error estándar) por grupo de lamido (BL: bajo lamido, ML: medio lamido y AL: alto lamido). En A, C y E a lo largo de los días en B, D y F entre sesiones. Los bloques indican la sesión en fase oscura. Diferencias significativas: A para el grupo de AL, M para el grupo de ML y B para el grupo de BL.....21

Fig.11. Frecuencia de las tres posturas de lactancia (promedio \pm error estándar). En A) a través de los días, en B) entre las sesiones diarias. El eje izquierdo muestra los valores para las posturas arqueada y pasiva, el eje derecho los valores correspondiente a la postura cubriendo. La escala de las tres posturas de lactancia está multiplicada por 10.....22

Capítulo II

Fig. 1. Fotografías de los aparatos usados en las mediciones de comportamiento. En **A)** El campo abierto (CA) con la cuadrícula de medición superpuesta en la imagen, el cuadro gris demarca el área central el resto se toma como área periférica, en **B)** El Laberinto elevado en cruz (LEC) elevado a 76 cm del suelo, en **C)** Cilindro de prueba de nado forzado (PNF).....39

Fig. 2 Conducta de exploración vertical “Rearing”. En A) se aprecia la conducta sin apoyo de pared en posición completamente vertical, suele durar muy poco tiempo, en B) Rearing en diversas ubicaciones de la prueba de CA en posición vertical. En C) Rearing en brazo cerrado del LEC en posición vertical.....40

Fig. 3 Fases de acicalamiento, modificado de K. Berridge en Bergner *et al.* 2010.....40

Fig. 4 Vista dorsal de la conducta de Head-dipping. Se aprecia que la conducta se puede ubicar en diferentes zonas del LEC.....41

Fig.5 Conducta de estiramiento “Strech-attemp” (SAP). En A) SAP en brazo cerrado, en B) SAP en el área central, en C) posición normal sin estiramiento, se observan curvas.....42

Fig. 6 Conductas en la prueba de nado forzado,. En A) nado, en B) escalamiento y en C) inmovilidad. (modificado de Cryan et al. 2002).....43

Fig.7 Anatomía del cerebro de rata, en Vista Dorsal, a la izquierda fotografía en la que se indican los puntos de medición del largo y ancho cerebral (mm), las líneas azules marcan cortes de estructuras que no se incluyen en el pesado.....43

Fig. 8 Esquema utilizado para la disección del CP, figuras modificadas de Paxinos y Watson (1998). **En A)** las coordenadas estereotáxicas utilizadas, en **B)** Vista dorsal del cerebro que muestra el corte inicial (en verde) que elimina restos de los bulbos olfatorios y el segundo corte a 1 mm del borde anterior (en azul).....44

Fig. 9 Disección del EV (figuras modificadas de Paxinos y Watson 1998). En A) Coordenadas estereotáxicas para la extracción del EV. En B) Plano ventral del cerebro, la línea azul marca el quiasma óptico donde se realiza el primer corte y 2mm antes de este se hace el segundo corte (línea verde). En C) Corte coronal, se resaltan: las comisuras y la fisura rinal. En D) Se ubican las comisuras anteriores (puntos blancos), allí se delimita la parte anterior del EV, el segundo punto de ubicación es la fisura rinal para distinguir el límite inferior.....45

Fig. 10. Extracción del hipocampo. En A) Diagrama sagital de la parte interna de uno de los hemisferios cerebrales, se distinguen en rojo estructuras como el fornix, cuerpo calloso y área septal que deben ser retirados con cuidado, introduciendo una espátula fina de disección en el ángulo indicado (línea roja), para exponer el hipocampo. En B) se aprecia el diagrama sagital de un corte más interno que permite ver la parte inicial del hipocampo (resaltado en verde), la

espátula sigue por debajo de este hasta que suavemente se libera del resto del tejido.....45

Figura 11. Parámetros conductuales en CA (Promedio \pm error estándar) entre los grupos de lamido (BL N=17, ML=45 y AL N=22). En A) Entradas al área central, B) Tiempo de permanencia en el área central, en C) número de cruces totales, en D) Frecuencia de rearing, en E) Distancia recorrida (m) y en F) Velocidad promedio total.....50

Fig.12 Acicalamiento por grupo de lamido en el campo abierto (BL: N=17 y AL: N=22), en A) promedio de la duración (\pm error estándar) y en B) promedio de la latencia de inicio (\pm error estándar). Diferencias significativas entre grupos de lamido** y entre tipos de acicalamiento* con $p < 0.05$51

Fig.13. Distribución temporal de la frecuencia de acicalamiento entre los grupos de alto (N=22) y bajo (N=17) lamido en la prueba de CA. En A) acicalamiento unitario y en B) acicalamiento secuencial.....51

Fig. 14 Preferencia entre áreas del LEC en grupos de lamido (BL N=17, ML=45 y AL N=22). En A) Entradas promedio (\pm error estándar) a cada área, en B) Porcentaje promedio de tiempo invertido (\pm error estándar) en cada área. Las letras en minúscula sobre las barras indican diferencias significativas entre los grupos de lamido para ^a brazo abierto, ^b brazo cerrado y ^c área central, con una $p < 0.05$ en todos los casos.....52

Fig. 15. Duración promedio (\pm error estándar) de las conductas en la prueba de nado forzado entre los grupos de lamido (BL N=17, ML=45 y AL N=22). En A) Inmovilidad. B) Nado y C) Escalamiento. * Comparación en Pre-prueba entre grupos de lamido, **Comparación de Wilcoxon PRE-TEST y TEST a nivel intra-grupos de lamido, $p < 0.01$54

Fig. 16 Concentraciones promedio (\pm error estándar) de algunas monoaminas y sus metabolitos entre grupos de lamido (BL N=17, ML=45 y AL N=22) en la Corteza prefrontal, en A) DA y DOPAC B) 5-HT y 5HIAA y en C) NE. Todas las concentraciones se expresan en ng/mg de tejido húmedo, * $p < 0.05$55

Fig. 17 Promedios (\pm error estándar) de la tasa de recambio metabólico de neurotransmisores, por área cerebral entre grupos de lamido (BL N=17, ML=45 y AL N=22). * $p < 0.05$56

Fig. 18 Concentraciones promedio (\pm error estándar) de algunas monoaminas y sus metabolitos entre grupos de lamido en el hipocampo, en A) DA y DOPAC B) 5-HT y 5HIAA y en C) NE. Todas las concentraciones se expresan en ng/mg de tejido húmedo.....57

Fig. 19 Concentraciones promedio (\pm error estándar) de algunas monoaminas y sus metabolitos entre grupos de lamido en el estriado ventral, en A) DA y DOPAC B) 5-HT y 5HIAA y en C) NE. Todas las concentraciones se expresan en ng/mg de tejido húmedo, * $p < 0.05$58

LISTA DE ANEXOS

ANEXO I DESCRIPCIÓN DE LAS CONDUCTAS DE LA MADRE.....	78
ANEXO II HOJA DE REGISTRO.....	80
ANEXO III: RELACIÓN ENTRE LOS PARÁMETROS CONDUCTUALES DE LAS DIFERENTES PRUEBAS.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS

AL: Alto lamido

ML: Medio lamido

BL: Bajo lamido

RL: Rutina de limpieza

SD: Sprague-Dawley

HP: Hipocampo

CP: Corteza prefrontal

EV: Estriado ventral

CA: Campo abierto

LEC: Laberinto elevado en cruz

PNF: Prueba de nado forzado

HPLC-EC: Cromatografía de Alta Resolución Con Detección Electroquímica

DHBA: Ácido 2,3-Dihydroxybenzoico

DA: Dopamina

5-HT: Serotonina

NE: Norepinefrina

DOPAC: Ácido 3,4-Dihidroxifenilacético

5-HIAA: Ácido 5-Hidroxiindolacético

DOPAC/DA: Tasa de recambio metabólico para dopamina

5HIAA/5-HT: Tasa de recambio metabólico para serotonina

CAPITULO I

CARACTERIZACIÓN DEL CUIDO MATERNO: USO DEL MODELO DE ALTO Y BAJO LAMIDO EN RATAS SPRAGUE-DAWLEY

1. INTRODUCCIÓN

En la naturaleza los animales han desarrollado diversas estrategias para aumentar el éxito reproductivo; entre ellas se encuentra el cuidado parental (Clutton-Brock 1991, González-Mariscal & Poindron 2002). Esta estrategia puede definirse como “*el conjunto de conductas realizadas por los padres, que incrementan la posibilidad de sobrevivir y alcanzar la madurez sexual de los miembros inmaduros de la misma especie*” (Numan & Insel 2003). Asimismo, el cuidado parental puede involucrar un costo sobre la oportunidad de reproducirse en el futuro (Trivers 1972, Kleiman & Malcolm 1981).

En mamíferos, aproximadamente en un 90% de las familias, el cuidado parental es dado únicamente por la hembra (Gross 2005). Esta mayor inversión de las hembras se encuentra explicada en parte por la teoría de la selección sexual de Trivers (1972). Dicho autor propone entre sus argumentos la anisogamia. Lo anterior hace referencia a que debido a la mayor inversión de las hembras en los gametos, éstas están dispuestas a seguir invirtiendo en la progenie a través del cuidado (Trivers 1972). Asimismo, la confianza sobre la relación genética con la progenie también influye en la inversión sobre el cuidado (Trivers 1972). Es decir, a diferencia de los machos, las hembras tienen seguridad sobre su relación genética con la descendencia. Adicionalmente, se propone que el sexo que tiene más contacto con el embrión es el que invierte más en el cuidado de la descendencia (Williams 1975).

Por otra parte, el cuidado materno varía ampliamente entre especies. Lo anterior está relacionado con las diferentes necesidades de las crías. Por ejemplo, el periodo de lactancia varía desde los 4 días, en grupos como los pinnípedos (*Cystophora cristata*), hasta 900 días en chimpancés y orangutanes (Feldhamer *et al.* 2007). Incluso dentro de una misma especie se han reportado considerables variaciones, tanto en la cantidad

como en la calidad del cuidado materno, entre estos se encuentra el caso de los roedores (Champagne y Curley 2009, Franks *et al.* 2011).

En los roedores, el cuidado materno es de vital importancia ya que las crías son altriciales (Rees *et al.* 2005). Nacen poco desarrolladas y dependen totalmente de la madre para recibir nutrientes, estimulación sensorial y protección durante las primeras semanas de vida (Melo *et al.* 2006). Además, las madres también regulan aspectos como la temperatura y los procesos de excreción de las crías. El primero por medio del contacto corporal y el segundo por medio del lamido anogenital de estas (Numan & Insel 2003).

Este lamido materno también regula los procesos de diferenciación sexual en las crías (Moore 1992). Específicamente, a partir de la segunda semana postnatal las madres comienzan a lamer con mayor frecuencia a los machos en comparación con las hembras (Rees *et al.* 2005). Por ejemplo, existen estudios donde se interrumpía esta preferencia de lamido hacia los machos, lo cual estuvo asociado con que estos mostraran una afectación en diferentes características de la copula como las latencias: de eyaculación, segundas intromisiones e intervalos entre copulas (Moore 1984).

Además del lamido, la madre también ejecuta otras conductas como las posturas de lactancia. Rees *et al.* (2005) define la postura de “*cubrir*”, en la cual la madre se posiciona sobre las crías y mantiene amplia movilidad para realizar otras conductas, como mover material del nido. La postura de “*arqueada*”, que es similar a la de cubrir pero se distingue por la extensión de las extremidades y el arco que se forma en el cuello (Rees *et al.* 2005). Finalmente, en este estudio se define como postura de lactancia “*pasiva*” cuando las crías aprovechan la relajación de la madre para alimentarse.

Por otra parte, existen otras conductas de cuidado materno que incluyen la construcción del nido, la recuperación de las crías (mover crías hacia el nido) y de manera indirecta algunos autores consideran la defensa de las crías o agresión maternal (Rees *et al.* 2005, Numan & Insel 2003). Todas estas conductas maternas se encuentran bajo una regulación multisensorial que puede relacionarse a diferentes factores (Stern 1990).

Entre estos factores se incluyen la experiencia materna, el tamaño de la camada y la proporción sexual de la camada (Agnish & Keller 1997, Numan & Insel 2003 y Andersen *et al.* 2011). También, se ha observado que variaciones ambientales externas a la madre pueden modificar las conductas de cuidado materno (Macri & Wurbel 2006, Toki *et al.* 2007, Cummings *et al.* 2010). Por ejemplo, en el laboratorio, la rutina de limpieza (RL), que incluye el cambio del material de cama (burucha) y exposición de las crías a estimulación táctil. Asimismo, el contacto de las crías con estímulos olfatorios externos puede ser estresante para las madres y también para las crías (Burn *et al.* 2008). Dicho estrés puede interrumpir el despliegue del comportamiento materno (Pryce & Feldon 2003, Franks *et al.* 2011). Por tanto, cuantificar los efectos de la RL es parte importante de la estandarización de protocolos de cuidado materno, en especial teniendo en cuenta que es un elemento muy variable entre los laboratorios (Pryce & Feldon 2003).

Además de estos factores externos, existe una variación natural del cuidado materno a través del tiempo (Rees *et al.* 2005). Por ejemplo, la frecuencia de las conductas maternas decae conforme se acerca el período de destete de las crías (Champagne *et al.* 2003). Más aún, se observan variaciones diarias en las conductas de cuidado materno. Siendo más frecuentes durante los periodos diurnos que en los nocturnos (Grotta & Ader 1969, Toki *et al.* 2007). Curiosamente en los protocolos de medición frecuencial, se han reportado poco las variaciones temporales diarias del cuidado materno. No obstante, se ha señalado la importancia de estas variaciones temporales sobre la contribución que tienen a la frecuencia total del cuidado materno (Jensen-Peña & Champagne 2013). Esto es relevante porque es utilizada como predictor en estudios del comportamiento de la descendencia (Champagne 2011).

Por otro lado, el modelo de alto y bajo lamido utiliza las diferencias individuales en diferentes conductas maternas (Myers *et al.* 1989). Este modelo permite estudiar el cuidado materno sobre la descendencia (Francis 2000, Champagne *et al.* 2003, Cameron *et al.* 2005). Tiene como ventaja el no ser invasivo, lo que permite evaluar cómo la cantidad del cuidado materno influye sobre las crías, sin involucrar los posibles efectos de la manipulación *per se*, de otros modelos como el de la separación maternal (Claessens

et al. 2011). Lastimosamente, existe poca información en la cepa Sprague-Dawley, ya que se ha aplicado principalmente en Long Evans (Francis 2000, Champagne 2011).

Estudios previos describen diferencias en el estilo de cuidado materno entre estas cepas (MacIver & Jeffrey 1967). Lo que para algunos autores explica en parte que los efectos observados sobre la descendencia no concuerden con los descritos previamente en ratas Long Evans (Barha *et al.* 2007, Clinton *et al.* 2007, Sequeira *et al.* 2013). Es así como, la comparación entre cepas permitiría obtener información adicional sobre cómo el cuidado materno interactúa con las diferencias genéticas que subyacen a estas. Por lo que estandarizar este modelo en la cepa Sprague-Dawley sería de gran utilidad.

En vista de lo discutido anteriormente el objetivo general del presente capítulo fue estandarizar un protocolo de medición del cuidado materno en ratas Sprague-Dawley. Planteando como objetivos específicos: i) describir las conductas involucradas en el cuidado materno; ii) estudiar el efecto de la experiencia materna, tamaño y proporción sexual de la camada, iii) determinar el efecto de la rutina de limpieza sobre la frecuencia de lamido de la madre y iv) caracterizar el comportamiento de las madres según la clasificación en grupos de lamido materno (modelo de alto y bajo lamido).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Animales y alojamiento

Las observaciones de cuidado materno se llevaron a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Ensayos Biológicos (LEBI, Universidad de Costa Rica). Los animales se mantuvieron bajo condiciones estándar de laboratorio con ciclos de 12 horas luz/oscuridad (iniciando a las 6:00 am el ciclo de luz), a $25.5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, con un rango de humedad relativa del 78–87% y un sistema de 10 recambios de aire /por hora.

Para caracterizar el cuidado materno, se utilizaron 88 hembras y sus respectivas camadas. Se observaron hembras con diferentes experiencias reproductivas: de primer parto o primíparas de tres meses de edad (N=60), hembras de segundo parto de cinco meses de edad (N=13) y hembras de tercer parto de ocho meses de edad (N=15). Las hembras fueron previamente apareadas, colocando dos hembras por macho en una caja durante una semana para propiciar la cópula (el celo de las hembras ocurre

espontáneamente cada 5 días, así que hay alta probabilidad que durante la semana se dé la cópula sin coordinar previamente la fase estral de las hembras). Posteriormente, las hembras se alojaron individualmente en cajas de plexiglas transparentes (borde superior 26.5 x 42 cm, largo 22 x 37.5 cm, profundidad 18 cm y base 82.5 cm², Alphete, Alemania). A partir de los 20 días de gestación se realizó un control diario para revisar si habían ocurrido nacimientos.

El fondo de la caja de alojamiento fue cubierto con burucha de madera autoclavada. Durante todo el experimento todos los animales tuvieron acceso libre al alimento y al agua. Los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con los lineamientos de la “Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio” del Ministerio de Ciencia y Tecnología de Costa Rica, como parte del cumplimiento de la Ley de Bienestar de los Animales N° 7451 y bajo el consentimiento previo del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales (CICUA-12-09) de la Universidad de Costa Rica.

2.2 Registro del cuidado materno

Se registró la conducta materna durante los primeros seis días post-natales (DPN) de las crías. Se tomó como día cero el día de nacimiento (DPN-0), en que las crías se contaron y sexaron. Para realizar el sexado se revisaba la distancia anogenital, medida entre la uretra (que es el orificio más cercano al abdomen) y el ano (que es el orificio inferior). La distancia anogenital es mayor en machos en comparación con las hembras. Además el orificio de la uretra es más pronunciado en machos porque se abre paso a través del pene (Fig.1). No se realizó ninguna manipulación adicional de las camadas (ej. equiparación del número de crías total o por cada sexo, ya que para hacerlo se deben sacrificar crías de las camadas).

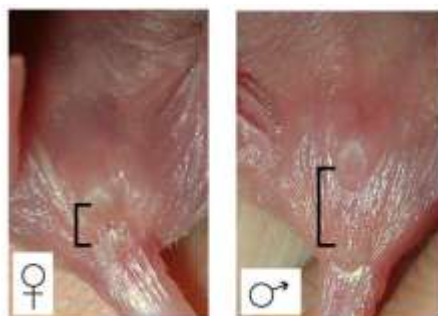


Fig.1. Vista ventral de las crías al DPN-0. En la izquierda se aprecia una hembra y a la derecha un macho (las líneas indican la distancia anogenital).

Las hembras permanecieron sin perturbar a excepción de la rutina de limpieza (RL) una vez a la semana. La RL iniciaba a las 9 am y consistía en trasladar a la hembra y su camada (toda la camada se trasladaba con ambas manos) de manera gentil y rápida a una nueva caja con burucha limpia. Tres observadores realizaron las mediciones de las conductas maternas. Tuvieron una confiabilidad inter-observador mayor al 90% en todas las conductas. Esta confiabilidad se calculó en base al porcentaje de empate obtenido entre cada pareja de observadores ($\% = \text{frecuencia menor} / \text{frecuencia mayor} \times 100$) para cada una de las conductas.

Las conductas realizadas por la madre se clasificaron en conductas maternas (dirigidas hacia las crías) y conductas auto-dirigidas (ambas descritas en Anexo I). Entre las conductas maternas se contabilizó la frecuencia en que se observaba a la hembra en: contacto con las crías, lamiendo a las crías, la postura de lactancia (clasificada en “arqueada, cubriendo y pasiva”) y la ubicación de la madre con respecto del nido (dentro o fuera). Entre las conductas auto-dirigidas se registró la frecuencia en que se observaba a la hembra en algunas de las siguientes acciones: comer/beber, rearing (RE, exploración vertical que el animal hace levantándose sobre sus dos patas traseras), acicalarse y descansar.

Se realizaron las mediciones siguiendo el protocolo descrito por Champagne *et al.* (2003) con las siguientes modificaciones: Se realizaron cuatro sesiones de observaciones diarias, tres durante el periodo de luz (sesión #1: 7am, sesión #2: 10am, sesión #3: 1pm) y una sesión durante el periodo de oscuridad (sesión #4: 6 pm). En este último periodo se usó luz roja durante la medición para no perturbar a los animales.

Cada sesión tuvo una duración de 72 minutos, a lo largo de la cual se registraba la conducta de cada madre cada 3 minutos. Estas revisiones en promedio duraban 5 segundos por hembra, las conductas se marcaban en una lista de recolección de datos (Ver Anexo II). En cada periodo se obtenían 25 observaciones. De esta manera se obtuvieron 100 observaciones diarias (25 observaciones por sesión x 4 sesiones por día) y un total de 600 observaciones por madre durante los 6 días post-natales.

2.3 Clasificación de la progenie en grupos de lamido

Las madres se clasificaron según el porcentaje de la frecuencia de lamido total en grupos de alto, medio y bajo lamido. Se utilizó el promedio y la desviación estándar de todas las madres como criterio de clasificación (Champagne *et al.* 2003). Las hembras con porcentajes de frecuencia de lamido mayores a una desviación estándar por encima del promedio se incluyeron al grupo de **alto lamido (AL)**. Aquellas con valores menores a una desviación estándar por debajo del promedio se clasificaron como madres de **bajo lamido (BL)**. Las hembras restantes se clasificaron como **medio lamido (ML)**.

2.4 Análisis estadístico

Para analizar el comportamiento general de las madres, se probó la normalidad de los datos con la prueba de Kolmogorov-Smirnov. La relación entre las conductas maternas y auto-dirigidas se evaluó utilizando el coeficiente de correlación de Pearson. Para determinar si existen efectos por la experiencia materna (número de parto) sobre las conductas de las hembras (maternales y auto-dirigidas) se realizó un análisis de covarianza (ANCOVA). El tamaño de la camada y la proporción sexual de la camada (esta última calculada dividiendo el número de machos entre el número de hembras) se incluyeron como covariables en este análisis. Los análisis post-hoc se realizaron con la prueba de pares de Bonferroni.

Teniendo en cuenta los efectos de la experiencia materna, los análisis que se describen a continuación se realizaron solo con las madres de primer parto (N=60), las cuales se distribuyeron en cinco mediciones. Para analizar el efecto del tamaño de camada y la proporción sexual sobre las conductas de las hembras (maternales y auto-

dirigidas) se realizaron análisis de regresión lineal simple. Para evaluar la confiabilidad de la clasificación de las madres según su frecuencia de lamido se realizaron los siguientes análisis:

En primer lugar, se buscó evaluar si la rutina de limpieza (RL) en el laboratorio afectaba la frecuencia de lamido. Como se mencionó en la introducción la RL puede modificar la conducta materna. Debido a que los nacimientos ocurrieron en diferentes días a lo largo de una semana, las madres se clasificaron en grupos según el día postnatal en que recibieron la RL. Esto debido a que existe variación de las conductas maternas a lo largo de los días postnatales (Champagne *et al.* 2003). Para ver si había un efecto de la RL en cada grupo postnatal se compararon la sesión 1 versus la sesión 2. La RL iniciaba 1 hora después de la sesión 1 (7 am) y terminaba minutos antes del inicio de la sesión 2 (10 am), por lo que se eligió comparar estas sesiones. Las comparaciones entre la sesión 1 versus la sesión 2, a nivel intra-grupos como entre grupos según el día postnatal se hicieron mediante una ANOVA de medidas repetidas.

En segundo lugar, relacionado a la confiabilidad de la clasificación de las madres se estudio la variación de la frecuencia de lamido entre mediciones. Esto se tomó en cuenta ya que la clasificación de cada hembra dependerá del promedio y la desviación estándar del grupo de hembras en el que fueron medidas (*Ver sección 2.3*). Si estos parámetros difieren mucho entre mediciones puede ocasionar, por ejemplo, que madres que tengan una misma frecuencia de lamido se clasifiquen en diferentes categorías según el grupo en que fueron medidas. Esto debilitaría la confiabilidad de la clasificación de las madres. Para evaluar la variabilidad en la clasificación se compararon los promedios de la frecuencia de lamido entre mediciones con una ANCOVA. Adicionalmente se determinó el grado de concordancia entre la clasificación de lamido basada en cada medición y una clasificación general (basada en el total de madres) con un análisis de correlación de Spearman.

Para comparar las conductas de las hembras (conductas maternas y auto-dirigidas) entre grupos de lamido, se usó un ANCOVA. Incluyendo como covariables: el tamaño de camada y la proporción sexual. La variación temporal de las conductas maternas a los largo de los días postnatales y entre las sesiones diarias de medición se

evaluaron con una ANOVA de medidas repetidas. Se usó la prueba de Mauchys para evaluar el supuesto de esfericidad de la prueba, en casos donde hubo una desviación de este supuesto se utilizó la corrección de Huynh-Feldt (Girden 1992). Para analizar las diferencias a posteriori entre sesiones se compararon los intervalos de confianza.

3. RESULTADOS

3.1. Comportamiento general de las madres

Los datos se presentaron como el porcentaje de ocurrencia de cada conducta (frecuencia total de la conducta observada / número de observaciones disponibles x 100).

El porcentaje promedio de la frecuencia de lamido total (tomando en cuenta los 6 DNP) fue de $9.08\% \pm 2.06$. Esta variable presentó una distribución normal ($Z=0.66$, $p=0.771$, Fig.2). La postura de lactancia cubriendo tuvo la mayor frecuencia ($X=52\% \pm 9.03$) en comparación con las posturas pasiva ($X=11\% \pm 5.37$) y arqueada ($X=1\% \pm 0.99$). El lamido no mostró correlación significativa con ninguna de las posturas de lactancia (arqueada: $r_{(85)}=-0.05$, $p=0.616$; cubriendo: $r_{(88)}=-0.12$, $p=0.276$ y pasiva: $r_{(88)}=-0.12$, $p=0.288$).

Las hembras pasaron la mayor parte del periodo en que fueron observadas dentro del nido ($X = 65\% \pm 7.79$, Fig.3 A). Esto se vio reflejado en la asociación positiva significativa con la frecuencia de contacto activo con las crías ($X = 69\% \pm 9.25$, $r_{88}=0.75$, $p<0.001$), el lamido de las crías ($r_{88}=0.21$, $p<0.05$) y la postura de lactancia cubriendo ($r_{88}=0.43$, $p<0.001$) (Fig.3A).

La conducta auto-dirigida comer/beber (Fig.3B) se asoció negativamente a la ubicación de la madre dentro del nido ($r_{88}=-0.43$, $p<0.001$) y el contacto activo con las crías ($r_{88}=-0.46$, $p<0.001$). Cabe resaltar que las madres eran libres de elegir donde alimentarse. Por ejemplo, en algunas ocasiones se observó que las hembras llevaban pellets de alimento al nido. También algunas hembras colocaban el nido cercano a la rejilla de alimento por lo que podían alcanzarlo desde el nido extendiéndose un poco hacia la rejilla. Pero esta asociación sugiere que la mayoría sale del nido para alimentarse.

La conducta de descansar alcanzó el mayor porcentaje de las conductas auto-dirigidas (Fig.3B) y se encuentra significativamente asociada con la lactancia en postura pasiva ($r_{88}=0.34$, $p<0.001$). El resto de las conductas auto-dirigidas tuvieron menor frecuencia y no se asociaron significativamente con otras conductas (Fig.3B).

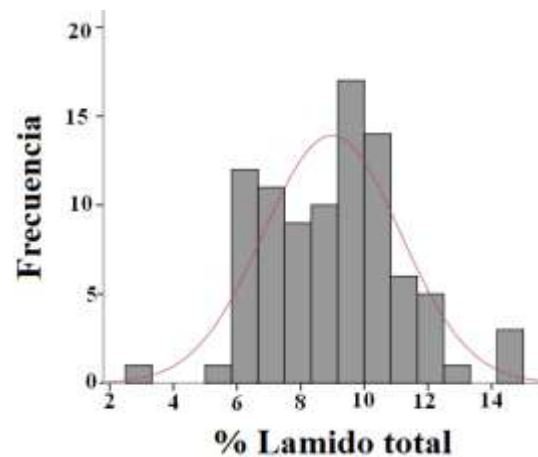


Fig. 2 Histograma del porcentaje de lamido total en madres Sprague-Dawley (N=88, en rojo la curva de la distribución normal)

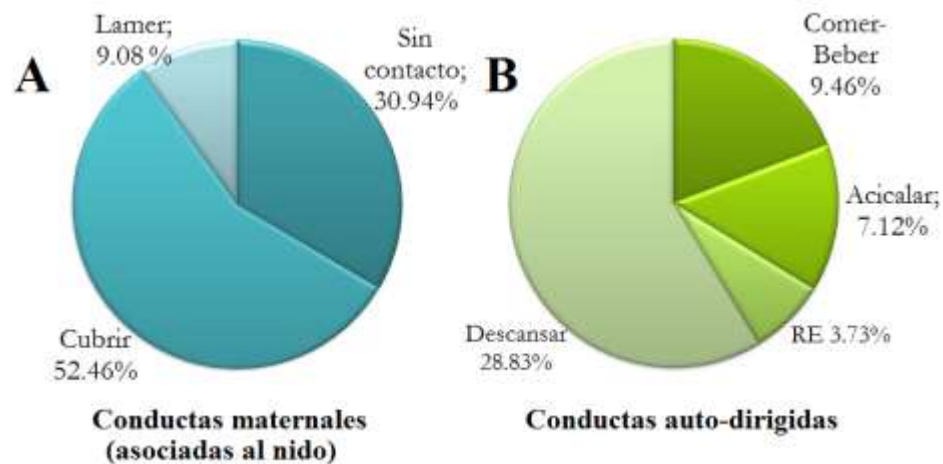


Fig.3. Distribución de las conductas de las madres durante los 6DPN. En A) Porcentaje de las conductas maternas asociadas significativamente con la ubicación dentro del nido (“sin contacto” es el complemento de contacto con las crías), en B) porcentaje de las conductas auto-dirigidas de la madre

3.2 Efecto de la experiencia maternal

Se compararon madres primíparas, de segundo y tercer parto entre sí para determinar si la experiencia maternal tiene algún efecto sobre las diferentes conductas de la madre. No se encontraron diferencias significativas entre las conductas maternas dirigidas a la cría tales como: el lamido, la postura de lactancia pasiva o la ubicación de la madre con respecto al nido (Cuadro 1). Tampoco en la conducta auto-dirigida de acicalamiento se observaron diferencias (Cuadro 2).

Cuadro 1. Efectos de la experiencia maternal sobre las conductas maternas

	Lamido		Ubicación dentro del nido		Contacto		Posturas de Lactancia					
	F	p	F	P	F	p	Arqueada		Cubriendo		Pasiva	
Covariables	F	p	F	P	F	p	F	P	F	p	F	P
Proporción sexual	1.73	0.192	0.38	0.537	2.88	0.093	2.06	0.155	0.47	0.493	0.21	0.649
Tamaño camada	1.25	0.267	19.52	<0.01	5.53	0.021	4.43	0.039	23.06	<0.01	3.73	0.057
Factor												
Número de parto	0.99	0.376	1.58	0.212	10.07	<0.01	3.74	0.028	12.01	<0.01	2.68	0.074

Cuadro 2. Efectos de la experiencia maternal sobre las conductas auto-dirigidas de las madres.

Covariable	Come/Bebe		Acicala		Rearing		Descansar	
	F	p	F	p	F	p	F	p
Proporción sexual	0.37	0.543	0.01	0.922	0.13	0.722	2.90	0.092
Tamaño camada	1.50	0.224	0.57	0.451	0.08	0.780	0.19	0.668
Factor								
Número de parto	4.45	p< 0.01	1.57	0.215	4.72	p< 0.01	7.02	p< 0.01

Al contrario, se observó que algunas conductas disminuyeron del primer parto al segundo parto y aumentaron nuevamente en el tercer parto como: el contacto con las crías (Fig.4A, Cuadro 1), la postura de lactancia cubriendo (Fig.4C, Cuadro 1) y la conducta de descansar (Fig.4F, Cuadro 2). Mientras que en el caso de la postura de

lactancia arqueada (Fig.4B, Cuadro 1) y la frecuencia de comer o beber (Fig.4D, Cuadro 2) se observó lo contrario. Las conductas aumentan del primer al segundo parto y decrecen del segundo al tercer parto. Por otro lado la frecuencia de rearing tiene una tendencia a decrecer con la experiencia materna (Fig.4E, Cuadro 2).

Parte de la variación de estas conductas maternas según la experiencia materna se explica por el efecto de la covariable tamaño de camada. El tamaño de camada explica en un 6% la variación en el contacto con las crías entre los grupos con diferente experiencia materna (Cuadro 1). Al respecto se observó que las camadas de segundo parto son más numerosas que las del primer parto. A su vez el tamaño de camada presenta una relación negativa con el contacto madre-crías. Así mismo, la variación en la postura de lactancia arqueada es explicada en un 5% por el tamaño de camada y en un 21% en la postura de lactancia cubriendo. Nuevamente el mayor número de crías en el segundo parto podría estimular la postura arqueada y en complemento disminuir la postura cubriendo que es complementaria a la arqueada. En la siguiente sección se describen los efectos directos del tamaño de camada sobre las conductas maternas.

Por último, se observó que la proporción sexual de la camada (#machos/#hembras) cambia según la experiencia maternal ($F_{2,86}=4.38$, $p=0.016$). Camadas de hembras primíparas tienen una proporción sexual cercana a 1 ($X = 0.92 \pm 0.63$). En el segundo parto la proporción sexual se desvía a machos ($X = 1.44 \pm 0.85$) y en el tercer parto se desvía a hembras ($X = 0.76 \pm 0.41$). Esta variación se debe al cambio en el número de machos ($F_{2,87}=4.513$, $p= 0.014$, Fig. 5), ya que el número de hembras y crías totales por camada es similar entre los grupos ($F_{2,87}=1.801$, $p= 0.171$ y $F_{2, 87}=0.674$, $p= 0.512$, respectivamente).

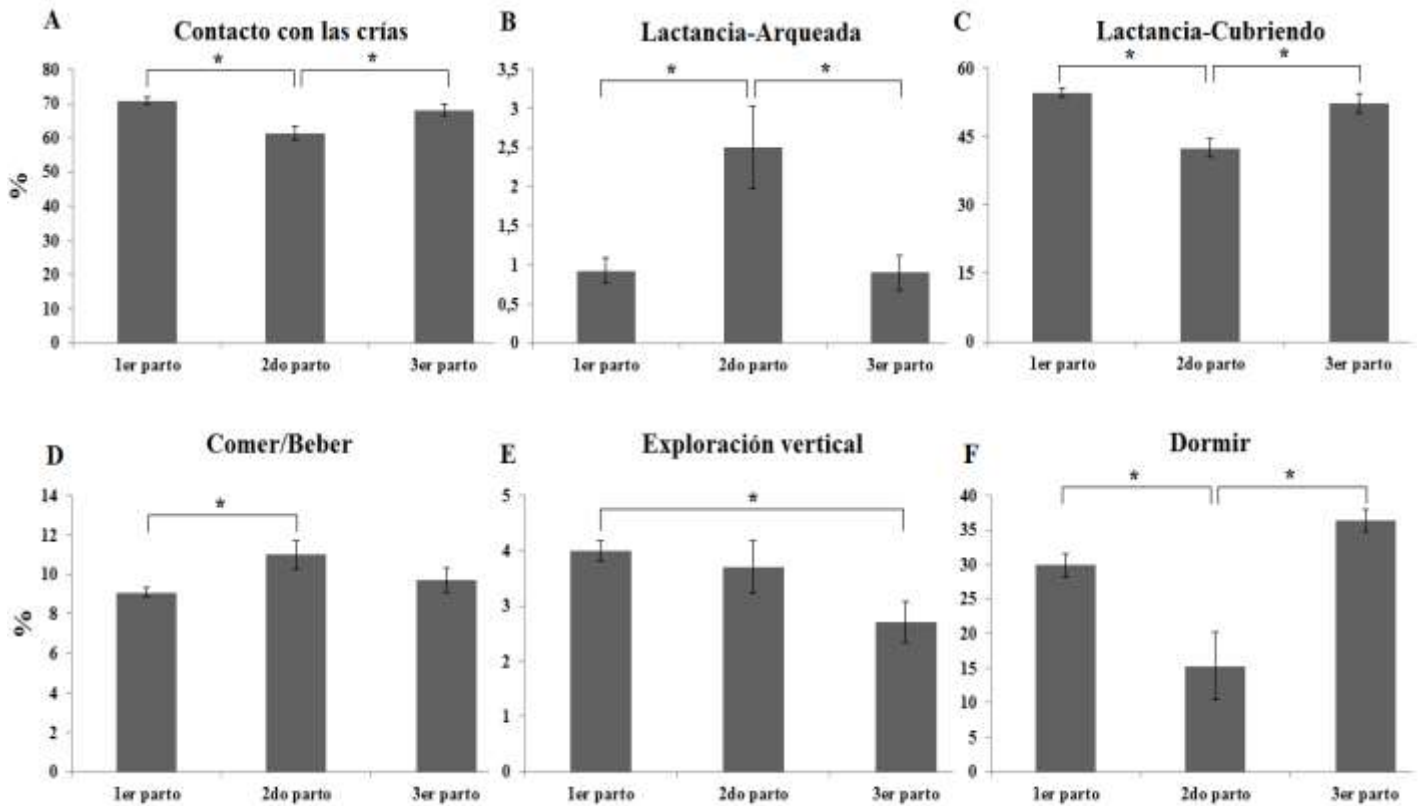


Fig. 4 Efecto de la experiencia materna sobre el comportamiento de las madres (Promedios \pm error estándar). *Prueba Sidak-Bonferroni, $p < 0.05$.

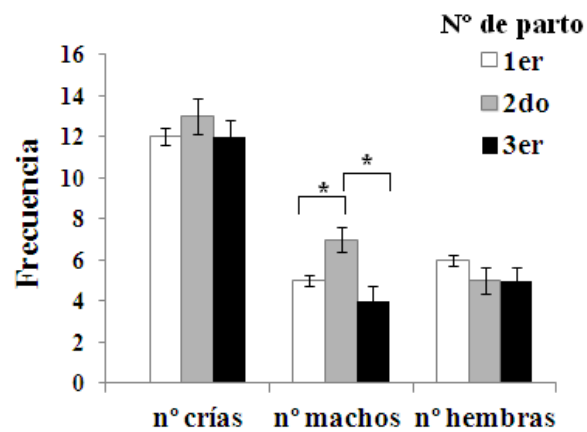


Fig. 5 Número de crías (promedio \pm error estándar) según el número de parto.

*Prueba Tukey, $p < 0.05$.

Teniendo en cuenta los efectos significativos de la experiencia de parto obtenidos, en el resto de los análisis se utilizaron solo hembras primíparas (N=60). Las cuales se midieron en 5 mediciones.

3.3 Relación del tamaño y la proporción sexual de la camada con la conducta materna

Solo la ubicación de la madre dentro del nido y la postura de lactancia cubriendo, tuvieron una relación negativa significativa con el tamaño de la camada (Fig. 6, Cuadro 3). El tamaño de camada explica un 18% ($F_{1,59}=12.28$, $p=0<0.01$) y un 24% ($F_{1,59}=18.30$, $p=0<0.01$) de la variación en estas conductas respectivamente. La proporción sexual solo mostró relación negativa significativa con la conducta de descansar (Cuadro 3), que explica un 7% de la variación en la proporción sexual ($F_{1,59}=4.45$, $p=0.039$).

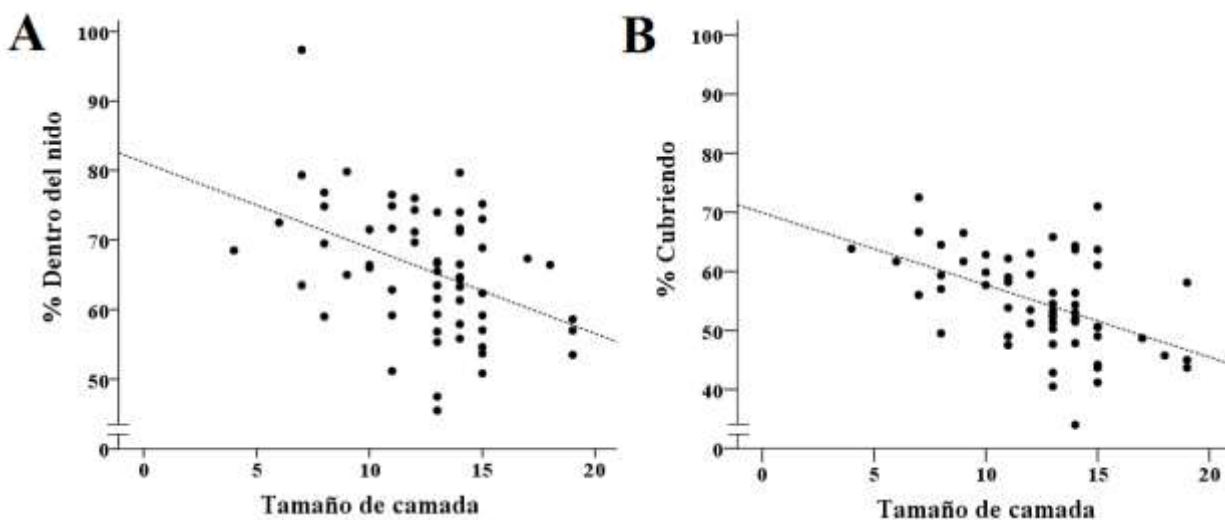


Fig 6. Efecto del tamaño de la camada sobre A) ubicación dentro del nido ($r_{60}=-0.42$, $p<0.05$) y en B) postura de lactancia cubriendo ($r_{60}=-0.49$, $p<0.05$).

Cuadro 3. Relación entre el tamaño de la camada y la conducta de las madres
(Coeficientes de correlación de Pearson y determinación, * $p < 0.05$).

	Maternales						Auto-dirigidas				
	Lamido	Dentro	Contacto	Arqueada	Cubriendo	Pasiva	Come/Bebe	Acicala	Rearing	Descansa	
Tamaño de camada	R	-0.18	-0.42*	-0.21	0.17	-0.49*	0.15	0.1	0.22	0.14	-0.15
	R²	0.03	0.18	0.04	0.03	0.24	0.02	0.01	0.05	0.02	0.02
Proporción sexual	r	0.064	0.031	0.111	0.136	0.029	-0.032	0.064	0.019	0.055	-0.27*
	R²	0.004	0.001	0.012	0.019	0.001	0.001	0.004	0.000	0.003	0.07

3.4 Estudio del cuidado materno según grupos de lamido

3.4.1 Confiabilidad de la clasificación según la frecuencia del lamido materno

Para esta sección se utilizaron las frecuencias netas por sesión. Para los análisis las madres se dividieron según el día postnatal en que recibieron la RL, obteniendo los siguiente grupos: en el día-1 (N=17), día-2 (N=17), día-3 (N=16) y grupo control (N=10). Las hembras del grupo control no recibieron ninguna manipulación en los primeros tres días, reflejando el comportamiento de las madres según el día postnatal específico (Fig.7). A nivel intra-grupo no se observaron diferencias significativas entre las sesiones 1 y 2 (Cuadro 4, Fig.7). Tampoco se observaron diferencias entre-grupos en ninguna de las sesiones ($F_{3,56}=1.375$, $p=0.260$, Fig.7).

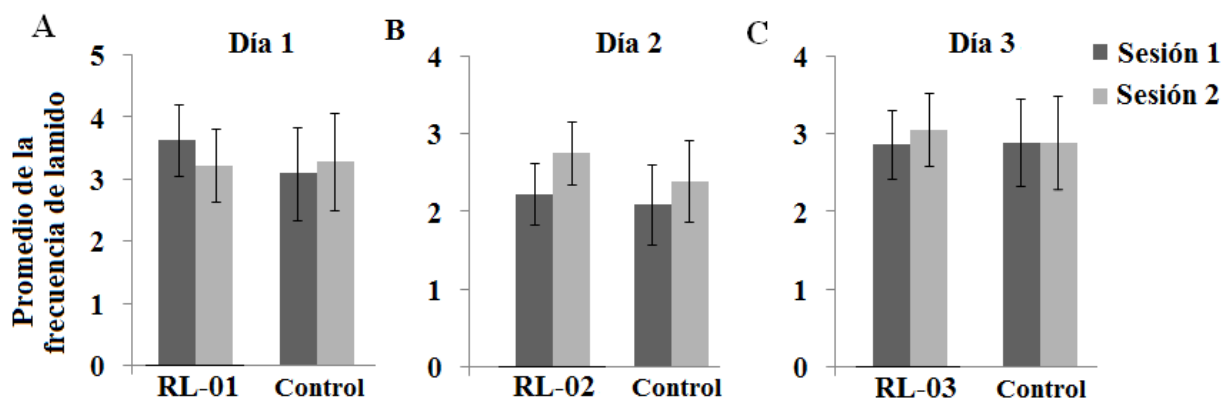


Fig 7. Frecuencia de lamido (promedio \pm error estándar) entre las sesiones 1 y 2 por cada grupo de rutina de limpieza (RL).

Cuadro 4 Frecuencia de lamido (promedio \pm error estándar) e intervalos de confianza por sesión y de cada grupo postnatal

Día	Sesión	DR-1				DR-2				DR-3				Control			
		X	Ee	Li	Ls	X	Ee	Li	Ls	X	ee	Li	Ls	X	ee	Li	Ls
1	1	3.65	0.57	2.50	4.80	3.35	0.57	2.20	4.50	3.56	0.59	2.38	4.75	3.10	0.75	1.60	4.60
	2	3.24	0.60	2.04	4.43	2.94	0.60	1.74	4.14	2.56	0.62	1.33	3.80	3.30	0.78	1.74	4.86
2	1	2.82	0.40	2.02	3.62	2.24	0.40	1.43	3.04	2.56	0.41	1.74	3.39	2.10	0.52	1.06	3.14
	2	3.35	0.41	2.54	4.17	2.76	0.41	1.95	3.58	2.88	0.42	2.04	3.71	2.40	0.53	1.34	3.46
3	1	2.12	0.43	1.26	2.97	2.06	0.43	1.20	2.91	2.88	0.44	1.99	3.76	2.90	0.56	1.79	4.01
	2	2.00	0.46	1.08	2.92	2.76	0.46	1.84	3.68	3.06	0.47	2.11	4.01	2.90	0.60	1.70	4.10
4	1	2.53	0.39	1.75	3.31	2.24	0.39	1.45	3.02	2.06	0.40	1.26	2.87	1.90	0.51	0.88	2.92
	2	2.53	0.44	1.65	3.41	1.65	0.44	0.76	2.53	1.50	0.45	0.59	2.41	2.10	0.57	0.95	3.25

Se resalta en negrita el grupo que recibió la RL. Para saber si hay diferencias significativas entre los grupos se analizan los intervalos de confianza, si hay traslape entre los intervalos de las sesiones no hay diferencias. X= promedio, ee=error estándar, Li=intervalo inferior, Ls= intervalo superior.

Con respecto a la comparación de la frecuencia de lamido entre mediciones, no se encontraron diferencias significativas ($F_{4,59} = 1.97$, $p = 0.117$, Fig.8). Tampoco se detectaron efectos significativos de las covariables: tamaño de camada ($F_{1, 59} = 0.04$, $p = 0.830$) y proporción sexual ($F_{1,59} = 0.58$, $p = 0.450$). Adicionalmente, se compararon las clasificaciones basadas en los parámetros de cada medición contra la clasificación basada en el promedio general de todas madres ($N = 60$). Se espera que este promedio general represente mejor el promedio de la frecuencia de esta variable. Se encontró un alto grado de concordancia entre la clasificación general y la de cada medición (Correlación de Spearman: $r_{60} = 0.80$, $p < 0.01$). En la figura 9 se observa el porcentaje de madres en las diferentes categorías de lamido. Cerca del 60% de las madres en las diferentes mediciones fueron clasificadas en el grupo de ML, 20% en el grupo de BL y alrededor de un 10% en el grupo AL.

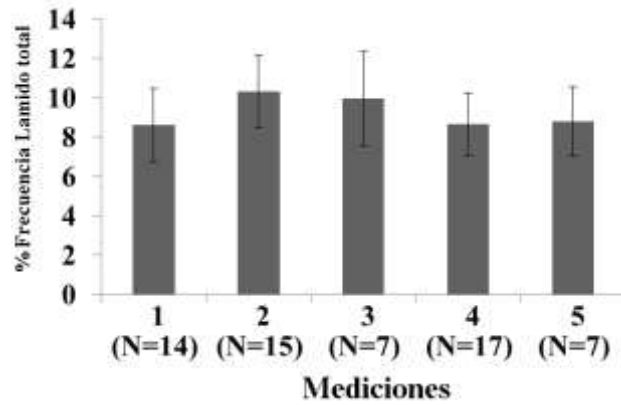


Fig. 8 Porcentaje de la frecuencia de lamido (promedio \pm error estándar) por medición.

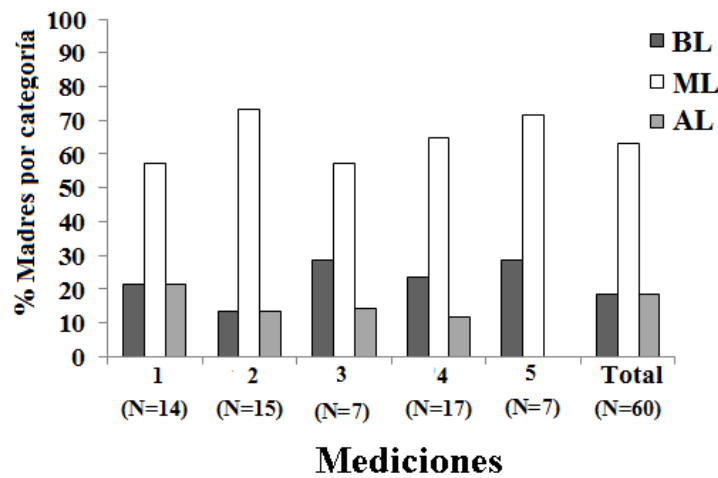


Fig.9. Madres clasificadas dentro de cada categoría de lamido por medición (BL: bajo lamido, ML: medio lamido y AL: alto lamido).

3.4.2 Comportamiento materno de las madres por grupos de lamido

Dado que las madres pueden ser clasificadas de manera confiable entre los grupos de lamido se describieron las conductas maternas y auto-dirigidas en cada uno de estos grupos. El promedio de la frecuencia de lamido total fue de $9.22\% \pm 1.93$ (N=60) y presentó una distribución normal ($Z_{60} = 0.71$, $p = 0.200$). **Se clasificaron 11 hembras en el grupo de alto lamido (AL), 38 hembras en medio lamido (ML) y 11 hembras de bajo lamido (BL).** Entre estos grupos se encontraron diferencias significativas en la frecuencia de lamido ($F_{2, 60}=95.45$, $p<0.01$). No se observaron efectos significativos de las covariables sobre la frecuencia de lamido (tamaño de camada: $F_{1,60}=0.346$, $p=0.559$ y proporción sexual: $F_{1,60}=0.488$, $p=0.488$). Las madres de

AL lamieron a sus crías casi el doble que las madres de BL ($p<0.01$) y con mayor frecuencia que el grupo ML ($p<0.01$). No se observaron diferencias significativas entre los grupos en el resto de las conductas de la madre tanto las conductas maternas y auto-dirigidas (Cuadro 5, Cuadro 6).

Cuadro.5 Conductas de la madre (promedio \pm error estándar) por grupo de lamido (* $p<0.05$)

	Conductas Maternas											
	Lamido*		Madre en el nido		Madre sin contacto con las crías		Arqueada		Cubriendo		Pasiva	
BL	6.48	± 0.14	66.11	± 2.68	30.06	± 1.61	0.99	± 0.33	55.01	± 2.33	11.02	± 1.27
ML	9.20	± 0.16	64.96	± 1.60	29.97	± 1.24	0.78	± 0.14	53.37	± 1.28	11.98	± 1.01
AL	12.07	± 0.27	68.42	± 2.35	24.71	± 1.80	0.71	± 0.30	58.81	± 2.41	14.07	± 1.32

	Conductas Auto-dirigidas							
	Come/bebe		Acicalamiento		Rearing		Descansar	
BL	8.01	± 0.47	6.74	± 0.68	3.53	± 0.26	28.68	± 4.73
ML	9.52	± 0.32	7.14	± 0.42	4.21	± 0.24	28.78	± 2.06
AL	8.59	± 0.46	6.20	± 0.30	3.70	± 0.40	34.88	± 2.40

Cuadro 6. Comparación de las conductas de la hembra entre grupos de lamido

Conductas maternas	F	p	Conductas Auto-dirigidas	F	P
Madre dentro del nido	0.591	0.557	Come/bebe	3.430	0.039
Madre sin contacto con las crías	2.543	0.088	Acicalarse	0.733	0.485
Arqueada	0.279	0.758	Rearing	1.401	0.255
Cubriendo	2.061	0.137	Descansar	1.065	0.352
Pasiva	0.877	0.421			

3.4.3 Variación de cuidado materno a través del tiempo en los grupos de lamido

Para esta sección se utilizaron las frecuencias netas diarias y por sesión.

Se estudiaron las conductas maternas a lo largo del tiempo con respecto a los días postnatales y las cuatro sesiones de observación realizadas. Para la conducta de lamido en el grupo ML la frecuencia de lamido decae y esta disminución es evidente a partir del tercer día (Fig.10A). Análisis a posteriori, mostraron que estas diferencias se encuentran entre el día 1 con los días 3, 4, 5 y 6 (Cuadro 7). En los grupos de AL y BL el lamido

decae en un gradiente muy sutil ya que no presentaron diferencias entre los primeros seis días (Datos no mostrados).

Por otro lado, entre las sesiones de observación se encontraron diferencias significativas en las frecuencias de lamido ($F_{3, 57}=7.72$, $p<0.01$, Fig.10B). La frecuencia de lamido decae a través del día. En particular, las diferencias significativas se encontraron entre la sesión 4 (fase oscura) y cada una de las sesiones en fase de luz (Cuadro 7). A excepción del grupo de BL en donde la frecuencia de lamido se mantiene similar entre sesiones (Cuadro 7). Las diferencias generales entre-grupos de lamido se mantienen entre días y sesiones ($F_{2, 57}=106.42$, $p<0.01$).

Con respecto a otras conductas maternas, como la frecuencia dentro del nido o el no tener contacto con las crías (madre sin contacto con las crías), no se observaron diferencias significativas entre-grupos ($F_{2, 57}=0.800$, $p=0.454$ y $F_{2, 57}=4.415$, $p=0.08$, respectivamente) pero si se observaron cambios temporales. Se encontraron diferencias significativas por día (madre en el nido: $F_{5, 57}=21.05$, $p<0.01$ y madre sin contacto con las crías: $F_{5, 57}=19.26$, $p<0.01$, respectivamente) y entre sesiones (madre en el nido: $F_{3, 60}=75.80$, $p<0.01$ y madre sin contacto con las crías: $F_{3, 60}=121.09$, $p<0.01$, respectivamente). A lo largo de los días y entre sesiones la frecuencia de la madre en el nido disminuye (Fig.10 C, D) y consecuentemente la frecuencia sin tener contacto con las crías aumenta (Fig.10E, F).

Finalmente, al analizar las posturas de lactancia no se encontraron diferencias significativas entre grupos (arqueada: $F_{2, 57}=0.157$, $p=0.855$, cubriendo: $F_{2, 57}=2.46$, $p=0.094$, y pasiva: $F_{2, 57}=0.879$, $p=0.421$). Tampoco se encontraron efectos significativos por día o por sesión (Cuadro 8). Las tendencias generales se muestran en la figura 11, tanto a través de los días (Fig.11 A) y entre sesiones (Fig. 11B). La postura cubriendo disminuye, la postura pasiva aumenta, mientras que la postura arqueada permanece estable.

Cuadro 7. Intervalos de confianza entre grupos de lamido para cada día y sesión

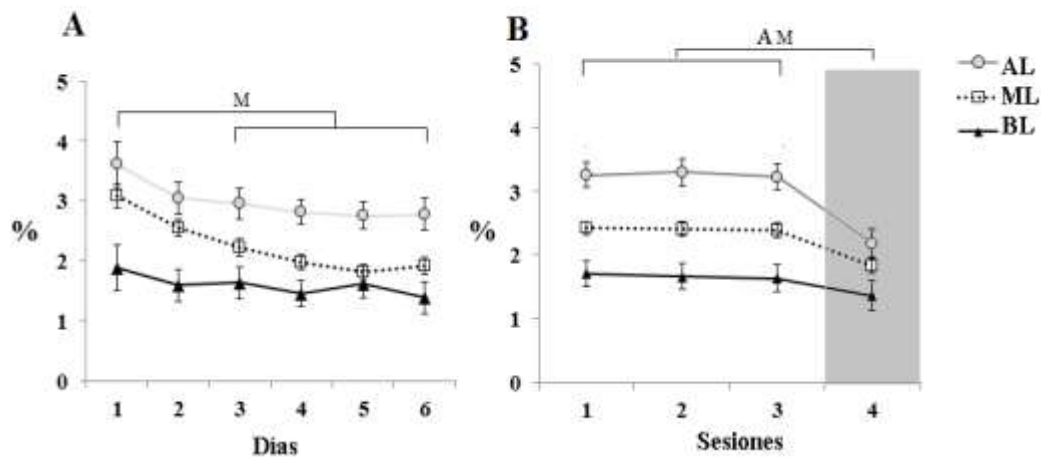
DÍA	ML		SESIÓN	ML		BL		AL	
	Li	Ls		Li	Ls	Li	Ls	Li	Ls
1	2.676	3.495	1luz	2.210	2.641	1.311	2.113	2.856	3.659
2	2.272	2.833	2luz	2.178	2.629	1.248	2.086	2.884	3.722
3	1.940	2.507	3luz	2.161	2.611	1.218	2.055	2.809	3.646
4	1.752	2.208	4 oscura	1.582	2.085	0.896	1.831	1.714	2.649
5	1.573	2.058							
6	1.623	2.206							

*El traslape de los intervalos indica que no hay diferencias entre las sesiones o los grupos

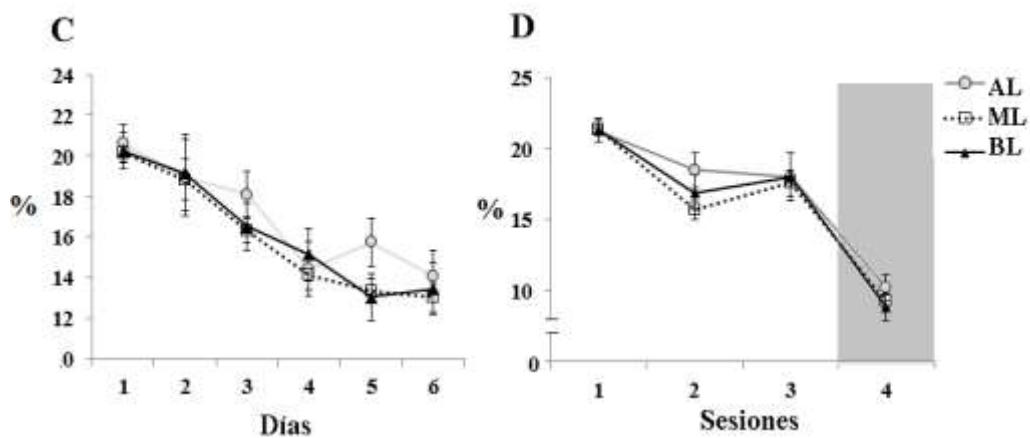
Cuadro 8. Comparación a través de los días y sesiones (ANOVA de medidas repetidas)

	Arqueada			Cubriendo			Pasiva		
	<i>F</i>	<i>gl</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>gl</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>gl</i>	<i>p</i>
Día	0.038	4.66	0.999	1.421	4.88	0.225	0.703	5.00	0.622
		88.52			92.72			95.00	
Sesión	0.120	2.10	0.896	13.405	3.00	<0.01	1.317	3.00	0.278
		39.90			57.00			57.00	

Lamido materno



Madre dentro del nido



Madre sin contacto con las crías

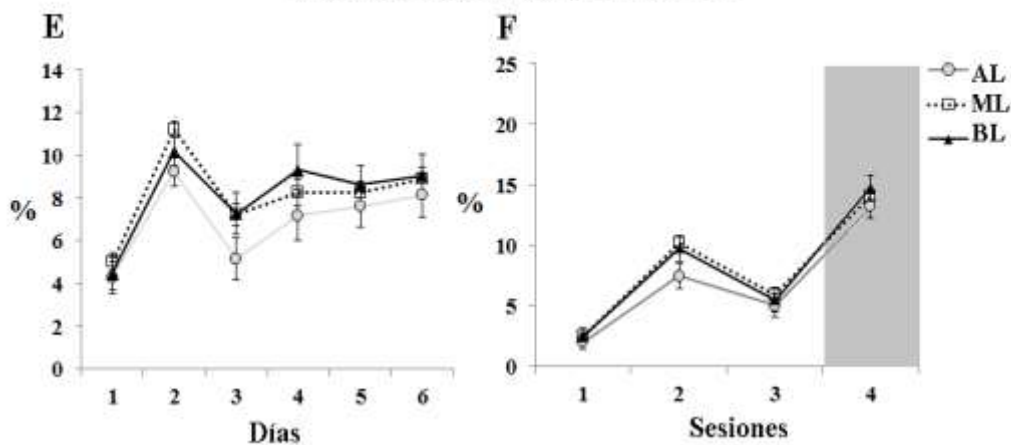


Fig 10. Conductas maternas (promedio \pm error estándar) por grupo de lamido (BL: bajo lamido, ML: medio lamido y AL: alto lamido). En A, C y E a lo largo de los días en B, D y F entre sesiones. Los bloques indican la sesión en fase oscura. Diferencias significativas: ^A para el grupo de AL, ^M para el grupo de ML y ^B para el grupo de BL.

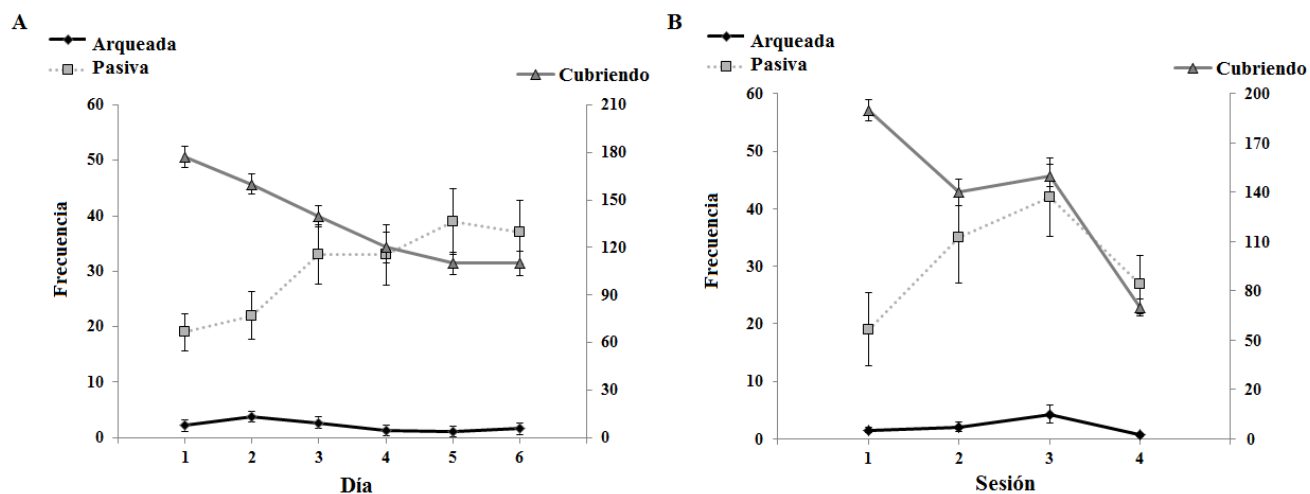


Fig.11. Frecuencia de las tres posturas de lactancia (promedio \pm error estándar). En A) a través de los días, en B) entre las sesiones diarias. El eje izquierdo muestra los valores para las posturas arqueada y pasiva, el eje derecho los valores correspondiente a la postura cubriendo. La escala de las tres posturas de lactancia está multiplicada por 10.

4. DISCUSIÓN

El objetivo del presente capítulo fue establecer un protocolo de medición del cuidado materno. Este protocolo permitió no solo describir las principales conductas maternas en las ratas Sprague-Dawley, sino además contar con una medida que permite realizar comparaciones con otras cepas. La comparación entre cepas es importante ya que puede ser el primer paso para identificar loci encargados del control de dichas diferencias.

Las ratas Sprague-Dawley a pesar de tener una frecuencia similar de lamido (9,1%) a ratas Long Evans (10,6%, Champagne *et al.* 2003) y Wistar (8,1%, Uriarte *et al.* 2007) presentaron diferencias importantes en otras conductas como la postura de lactancia arqueada. Al respecto, no se encontró la relación significativa entre la frecuencia de lamido y la postura arqueada (Liu *et al.* 1997, Caldji *et al.* 1998, Champagne *et al.* 2003, Uriarte *et al.* 2007).

Esta diferencia en los estilos de cuidado materno entre cepas es relevante ya que la postura arqueada no sirve como criterio de clasificación de las madres en el caso de la

cepa Sprague-Dawley. Esta diferencia además sugiere que existe una regulación de las áreas cerebrales que controlan el comportamiento materno distinto entre cepas. Esta disociación entre el lamido y la postura arqueada, es respaldada por la hipótesis de que dichas conductas responden a mecanismos neurobiológicos independientes (*Ver revisión en Jensen-Peña & Champagne 2013*).

Dichas conductas tienen distintos papeles a nivel funcional en el desarrollo de las crías (*Jensen-Peña & Champagne 2013*), lo que responde a las necesidades diferenciales de las crías según la cepa. Al respecto, se ha sugerido que más allá de las diferencias en el comportamiento materno se debe incluir la demanda de las crías como promotor de las diferencias conductuales observadas en las madres (*Clinton et al. 2010*). A futuro es importante que incluya parámetros que permitan cuantificar el papel de las crías para fortalecer los modelos de mediación materno. Por ejemplo, con la cuantificación de vocalizaciones, el control de peso de las crías por mencionar algunas medidas a considerar.

Además, se encontraron variaciones temporales (entre las sesiones diarias de observación) que se reportan por primera vez para ratas Sprague-Dawley. Estas permiten caracterizar los estilos de cuidado de las madres de alto y bajo lamido. En donde las primeras modulan los niveles de lamido entre sesiones y las segundas optan por mantener un nivel bajo pero constante. En madres de AL y ML el lamido a las crías disminuye al llegar a la fase oscura (sesión 4). Esta disminución se explica en parte porque las madres salen del nido con más frecuencia por la noche y consecuentemente tienen menos cuidado de las crías en esos periodos (*Deviterne 1990*).

Por otro lado, fue importante analizar algunos aspectos tradicionales que modulan la conducta de las madres como la experiencia materno, el tamaño de camada y la proporción sexual que se discuten a continuación.

El lamido materno mostró ser un rasgo que no se afecta por las distintas experiencias de parto. Estudios que han dado seguimiento de madres a través del tiempo también lo confirman (*Champagne et al. 2003*). Otras conductas en cambio muestran influencia de la experiencia materno, como la postura de lactancia arqueada (aumento del primer al segundo parto). Este cambio puede estar relacionado al

aprendizaje de la madre, ya que esta postura en particular es más compleja (Stern 1989, Numan & Insel 2003). El aumento de esta postura explica a su vez la disminución de la postura cubriendo, ya que estas posturas de lactancia se complementan entre sí ($r_{(85)} = -0.29$, $p = 0.007$).

La disminución de la postura arqueada del segundo al tercer parto podría deberse a varios factores. Entre ellos la disminución en el número de crías que disminuye la estimulación necesaria para promover esta postura (Numan & Insel 2003). Por otro lado, la disminución de esta postura podría estar afectada por la condición física de la madre. En el tercer parto ha ocurrido un desgaste físico en gran parte propio de la edad. Debido a que esta postura requiere de un mayor esfuerzo muscular podría ser ejecutada con menos frecuencia por madres de tercer parto. Pero esta última hipótesis es difícil de probar ya que no se dispone por el momento de mediciones metabólicas que respalden la observación.

El número de parto no solo afectó la postura de lactancia arqueada, sino también la frecuencia de alimentación (aumento) y la frecuencia con que las hembras descansaban (diminución). Lo anterior refleja una mayor actividad de las hembras de segundo parto y explica la disminución observada en el contacto con las crías. Ya que para alimentarse o forrajear la madre por lo general sale del nido (comer/beber se correlacionó negativamente con el contacto $r = -0.46$ y ubicación dentro del nido $r = -0.47$, $p < 0.01$ en ambas).

Además de la hipótesis de mayor forrajeo, se sugiere que la disminución en la frecuencia de contacto con las crías del segundo parto, se debe a un manejo más eficiente por parte de las madres, lo cual supone menos contacto con las crías (Fairbanks 1996). Ya sea que esta eficiencia es alcanzada por efectos de la madurez fisiológica o la experiencia adquirida (Numan & Insel 2003). En el presente estudio, con el número de parto aumenta la edad relacionada a la madurez fisiológica por lo que no se puede discriminar entre este factor y el aprendizaje adquirido por la experiencia materna. Una debilidad que ha sido identificada en la mayoría de estudios sobre el número de parto en roedores (Numan & Insel 2003).

En último lugar, la variación observada en la proporción sexual según la experiencia maternal o número de parto está relacionada con los recursos internos de la hembra. Se ha planteado que según los recursos de la hembra esta proporción se desvía a machos en condiciones óptimas y a hembras en casos de pocos recursos (Ver revisión en Rosenfeld & Roberts 2004). Debido a que las condiciones de laboratorio brindan a las hembras recursos constantes, la variación se debe a la condición física que está ligada a la edad de hembra y varía con el número de parto.

En segundo lugar, se estudió el efecto de tamaño de camada. Este mostró una relación negativa con la ubicación de la madre dentro del nido. Lo anterior ha sido reportado en ratas (Grotta & Ader 1969) y ratones (Priestnall 1972). Se sugiere que salir del nido con mayor frecuencia, se debe a que la madre tiene que forrajear más para cubrir la mayor demanda de lactancia de camadas más grandes (Andersen *et al.* 2011). Sin embargo, en este trabajo no se encontró relación entre el tamaño de camada y la frecuencia de alimentación de las hembras (Cuadro 3). Aún así no se descarta esta hipótesis completamente ya que la frecuencia de alimentación no necesariamente tiene una relación directamente proporcional con la ingesta neta que realiza la madre. Además del forrajeo, se ha propuesto que estar fuera del nido también puede ser explicado por factores relacionados con la fatiga o incomodidad de la hembra (Seitz 1958 en Priestnall 1972). Pero esta hipótesis de fatiga de la hembra no ha sido probada, probablemente por la dificultad de cuantificar en la hembra este estado de fatiga. También se observó una correlación negativa entre el tamaño de la camada y el contacto con las crías. Lo cual se ha relacionado a esta mayor salida del nido discutida previamente.

Por otra parte, el tamaño de la camada explica parte de la variación de las posturas de lactancia: cubriendo ($R^2=-0.24$) y arqueada ($R^2=0.03$). Mostrando una relación negativa con la primera y positiva con la segunda. Lo anterior se ha relacionado con el grado de estimulación somato-sensorial de la parte ventral que recibe la hembra por parte de las crías. La postura arqueada en particular requiere de mayor estimulación y se presenta en forma reducida en hembras con pocas crías (Stern & Johnson 1990). Además esta postura ofrece mayor espacio bajo la hembra para acomodar camadas más

grandes y permite mejor acceso a los pezones, lo que a su vez mejora la eyección de leche por el estímulo de succión (Stern 1989).

Finalmente, es relevante señalar que no se observaron efectos en la frecuencia de lamido de las madres debidos a la rutina de limpieza (RL). Esto permite asegurar que la clasificación de las madres en BL o AL no se ve afectada por esta variable. En contraste, estudios en la misma cepa encontraron una disminución en la frecuencia de lamido a las crías (Chaverri-Herra 2012). Esta diferencia en los efectos de la RL puede deberse a la frecuencia de la RL. En el presente estudio solo se realizó una vez por semana mientras que Chaverri-Herra (2012) lo realizó dos veces por semana. Esto sugiere que una manipulación adicional puede estar estresando a la hembra y provocando que disminuya su cuidado materno. Al respecto, se debería evaluar con algunas variables fisiológicas en la hembra si la disminución en el lamido esta explicada por el estrés. También resalta la importancia de evaluar cómo se realiza la manipulación de las hembras y sus camadas (Burn *et al.* 2008). Adicionalmente, se encontró que la clasificación de lamido mostró confiabilidad entre mediciones.

En conclusión, el protocolo de medición de cuidado materno estandarizado en el presente trabajo mostró ser una herramienta rápida y accesible para el estudio de las conductas maternas. En ratas Sprague-Dawley las variaciones naturales del lamido permiten clasificar a las madres en grupos de alto y bajo lamido. Estas diferencias se deben a la modulación que las madres realizan a lo largo del día en esta conducta. Además, el presente estudio muestra que los comportamientos asociados con el cuidado materno están modulados por factores como la experiencia maternal, el tamaño de camada y la proporción sexual que se deben tomar en cuenta dentro de los protocolos de medición.

REFERENCIAS

- Andersen I.L., Nævdal E., Bøe K.E. 2011. Maternal investment, sibling competition, and offspring survival with increasing litter size and parity in pigs (*Sus scrofa*). *Behav Ecol Sociobiol*, 65:1159–1167.
- Agnish N.D., Keller K.A. 1997. The Rationale for Culling of Rodent Litters. *Fundamental and Applied Toxicology*, 38, 2 – 6.
- Barha C. 2007. Maternal care affects male and female offspring working memory and stress reactivity (Master dissertation). The University of British Columbia. Vancouver, Canada.
- Bosch O.J., Neumann I.D. 2012. Review Both oxytocin and vasopressin are mediators of maternal care and aggression in rodents: From central release to sites of action. *Hormones and Behavior*, 6: 293–303
- Burn, C.C., Deacon R.M.J., Mason G.J. 2008. Marked for Life? Effects of Early Cage-Cleaning Frequency, Delivery Batch, and Identification Tail-Marking on Rat Anxiety Profiles. *Dev Psychobiol.*, 50(3):266-77. doi: 10.1002/dev.20279.
- Caldji C., Tannenbaum B., Sharma S., Francis D., Plotsky P., Meaney M.J. 1998. Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of behavioral fearfulness in adult in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*; 95: 5335-5340.
- Champagne F., Francis F., 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 and Behavior*, 79: 359– 371.

- Champagne F., Curley J.P. 2009. Epigenetic mechanisms mediating the long-term effects of maternal care on development. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 33(4):593-600.
- Chaverri-Herra, M. 2012. Efectos de la frecuencia de la limpieza de los recintos primarios en el bienestar animal de las ratas de la cepa Sprague-Dawley del Laboratorio de Ensayos Biológicos (LEBi) de la Universidad de Costa Rica. Universidad Técnica Nacional, Sede Atenas, Campus ECAG.
- Clinton S.M., Bedrosian T., Abraham A., Watson S., Akil H. 2010. Neural and environmental factors impacting maternal behavior differences in high- versus low-novelty-seeking rats. *Hormones and Behavior*, 57: 463–473
- Clutton-Brock T. H. 1991. *The Evolution of Parental Care*. Princeton University Press. 352 pp
- Deviterne D., Desor D., Krafft B. 1990. Maternal Behavior Variations and Adaptations, and Pup Development within Litters of Various Sizes in Wistar Rat. *Developmental Psychobiology*, 23(4):349-360
- Franks B., Curley J.P., and Champagne F.A. 2011. Measuring Variations in Maternal Behavior: Relevance for Studies of Mood and Anxiety. In Gould TD. (ed.), *Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice: Characterization Using Behavioral Tests, Volume II, Neuromethods*.
- Girden, E. 1992. *ANOVA: Repeated measures*. Newbury Park, CA: Sage.
- González-Mariscal, G. & Poindron P. 2002. Parental care in mammals: Immediate internal and sensory factors of control. In Pfaff, D., Arnold, A.P., Etgen, A.M.,

- Fahrbach, S.E., Rubin, R.T.(ed.), *Hormones, Brain and Behavior*. Academic Press, pp 215-298.
- Groos. M.T. 2005. The evolution of parental care. *The quarterly review of biology*, 80 (1): 37-45
- Grota L.J., Ader R. 1969. Continuous recording of maternal behaviour in *Rattus norvegicus*, *Animal Behaviour*, 17(4): 723-729.
- Jakubowski M., Terkel J. 1985. Incidence of pup killing and parental behavior in virgin female and male rats (*Rattus norvegicus*): Differences between Wistar and Sprague-Dawley stocks. *J. Comp. Psych*, 99: 93-97.
- Kleiman D.G., Malcolm J. 1981. The evolution of male parental investment in mammals. In: Gubernick D.J., Klopfer P.H. (ed.). *Parental care in mammals*, New York: Plenum Press. pp 347-387.
- Liu D., Diorio J., Tannenbaum B., Caldji C., Francis D., Freedman A., Sharma S., Pearson D., Plotsky P.M., Meaney MJ. 1997. Maternal Care, Hippocampal Glucocorticoid Receptors, and Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Responses to Stress *Science*. 277 (12):1659-1662
- Macrì S., Würbel H. 2006. Developmental plasticity of HPA and fear responses in rats: A critical review of the maternal mediation hypothesis. *Hormones and Behavior*. 50: 667-680
- MacIver A.H., Jeffrey W.E. 1967 .Strain differences in maternal behavior in rats. *Behaviour*, 28 (½): 210-216.

- Melo A.I, Lovic V., Gonzalez A., Madden M., Sinopoli K., Fleming A.S. 2006. Maternal and littermate deprivation disrupts maternal behavior and social-learning of food preference in adulthood: Tactile stimulation, nest odor, and social rearing prevent these effects. *Developmental Psychobiology*, 48 (3): 209–219.
- Moore C.L. 1984. Maternal contributions to the development of masculine sexual behavior in laboratory rats. *Developmental Psychobiology*.17(4):347-56.
- Moore C.L. 1992. The Role of Maternal Stimulation in the Development of Sexual Behavior and Its Neural Basis". *Annals of the New York Academy of Sciences*, 662:160-77
- Myers M.M., Brunelli S.A., Squire J.M., Shindeldecker R.D., Hofer M.A. 1989. Maternal behaviour of SHR rats and its relationship to offspring blood pressure. *Develop. Psychobiol.* 22 (1): 29–53.
- Numan M., Insel T.R. 2003. *The neurobiology of parental behavior*. New York: Springer- Verlag.
- Jensen-Peña C., Champagne F.A. 2013. Implications of Temporal Variation in Maternal Care for the Prediction of Neurobiological and Behavioral Outcomes in Offspring. *Behavioral Neuroscience*, 127(1): 33–46
- Priestnall R. 1972. Effects of litter size on the behaviour of lactating female mice (*Mus musculus*). *Animal Behaviour*, 20 (2): 386-3940.
- Pryce C.R, Feldon J. 2003. Long-term neurobehavioural impact of the postnatal environment in rats: manipulations, effects and mediating mechanisms. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 27: 57–71

- Rees, S., Lovic V., Fleming A. 2005. Maternal Behavior. In Whishaw I., and Kolb B. (ed.). *The behavior of the laboratory rat. A handbook with tests.* Oxford University Press. pp. 287-297
- Rosenfeld C., Roberts R. 2004. Maternal Diet and Other Factors Affecting Offspring Sex Ratio: A Review. *Biology of reproduction*, 71: 1063–1070
- Stern, J. M. 1989. Maternal behavior: Sensory, hormonal, and neural determinants. In, Brush F.R., Levine S., (ed.). *Psychoendocrinology.* New York:Academic Press. pp. 105-226
- Stern. J.M. 1990. Multisensory Regulation of Maternal Behavior and Masculine Sexual Behavior: A Revised View. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews.* 14:183-200
- Toki S., Morinobu S., Imanaka A., Yamamoto S., Yamawaki S., Honma K. 2007. Importance of early lighting conditions in maternal care by dam as well as anxiety and memory later in life of offspring. *Eur J Neurosci*; 25:815–29.
- Uriarte N., Breigeiron M.K., Benetti F., Rosa X.F., Lucion A.B. 2007. Effects of maternal care on the development, emotionality, and reproductive function in male and female rats. *Dev Psychobiol*, 49 (5):451–62.
- 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*, 93:1061–1070.

CAPITULO II

EFFECTOS DEL CUIDO MATERNO SOBRE LA RESPUESTA AL ESTRÉS DE LA PROGENIE MASCULINA EN RATAS DE LA CEPA SPRAGUE-DAWLEY *

1. INTRODUCCIÓN

En mamíferos, el cuidado materno tiene un profundo impacto sobre las características fisiológicas y conductuales de los individuos (Meaney 2001, Champagne *et al.* 2003, Priebe *et al.* 2005, Champagne & Meaney 2006, Kaplan *et al.* 2008). Estos efectos producto del cuidado materno, se han observado a lo largo de la vida de los individuos e incluso pueden ser transmitidos a la siguiente generación (Francis *et al.* 2002). En particular, uno de los aspectos más estudiados influenciados por el cuidado materno es la respuesta de los organismos ante situaciones de estrés (Francis 2000, Cameron *et al.* 2005). Esta respuesta relacionada al estrés puede ser difícil de definir, McEwen (2000) la define, “*como una respuesta fisiológica o conductual generada cuando los organismos se enfrentan ante un estímulo que representa una amenaza real o la interpretación de ésta, hacia la integridad fisiológica o psicológica de un individuo*”.

A nivel fisiológico, el cuidado materno se ha relacionado con cambios a nivel de los sistemas neurales responsables de la regulación de estas respuestas al estrés. En áreas cerebrales como el hipocampo (HP), la corteza prefrontal (CP) y el estriado ventral (EV) (Champagne *et al.* 2003, Francis *et al.* 1999, Weaver *et al.* 2006, Engert *et al.* 2010). Los cambios en dichas áreas se han descrito a nivel morfológico (Champagne *et al.* 2008, Bagot *et al.* 2009, Smit-Rigter *et al.* 2009), neuroquímico (Zhang *et al.* 2005, Champagne *et al.* 2004) genético y epigenético (Liu *et al.* 1997, Weaver *et al.* 2004, 2005). En particular, se han encontrado diferencias entre la descendencia de alto y bajo cuidado materno en el contenido neuroquímico, en los sistemas noradrenérgicos (Francis *et al.* 1999a).

* Los resultados del presente capítulo fueron publicados en:
Masís-Calvo M, Sequeira-Cordero A, Mora-Gallegos A, Fornaguera-Trías J. 2013. Behavioral and neurochemical characterization of maternal care effects on juvenile Sprague-Dawley rats. *Physiology & Behavior*, 118: 212–217

También ante estímulos estresantes se ha reportado que la descendencia de bajo cuidado materno presenta un aumento en la concentración de dopamina en la CP (Zhang *et al.* 2005). Además, se han observado cambios en el HP relacionados con los sistemas serotoninérgicos (Zhang *et al.* 2010).

Los efectos del cuidado materno también se han documentado en la regulación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA) (Francis 2000, Parent *et al.* 2005). Dicho eje regula la respuesta hormonal al estrés; su actividad se dispara por la estimulación inflamatoria, física o psicosocial relacionada con un estímulo estresante (Fulford & Harbuz 2005). En roedores y primates no-humanos que han recibido poco cuidado materno durante las primeras etapas de vida, el funcionamiento normal del eje HPA cambia y ante una situación de estrés se dispara una activación del eje HPA mucho más intensa y prolongada que la de los animales que recibieron mayor cuidado materno (Meaney *et al.* 1996, Liu *et al.* 1997, Francis *et al.* 1999_a). Una activación prolongada podría ocasionar un detrimento de la salud del organismo, debido al alto desgaste energético entre otras razones (Fulford & Harbuz 2005, Parent *et al.* 2005, Blanchard *et al.* 2008).

Como acabamos de ver el sustrato fisiológico en general relacionado con la respuesta ante el estrés es influenciado por el cuidado materno, lo que lleva a pensar que muy probablemente también la respuesta conductual evidencie cambios. De hecho, los comportamientos defensivos se han visto influenciados por el cuidado materno (Cameron *et al.* 2005, Caldji *et al.* 1998, 2000; Francis *et al.* 2000; Francis *et al.* 2002, Uriarte *et al.* 2007, Malkesman *et al.* 2008, Bagot *et al.* 2009). Entre los comportamientos defensivos se encuentran las respuestas de ansiedad (que se categorizan como defensivo-pasivos, se observan frente a una amenaza potencial) y temor (categorizadas como defensivo-activo, se observan frente a una amenaza concreta) (Blanchard *et al.* 2008, Maximino *et al.* 2010). Así también, otros comportamientos relacionados con la exposición prolongada a situaciones de estrés, como los comportamientos de “desesperanza aprendida” (Ver revisión en Brenes y Rodríguez 2004), también se han relacionado con variaciones en el cuidado materno (Weaver *et al.* 2005).

Existen pruebas conductuales que miden estas respuestas de ansiedad ante situaciones de estrés en los animales. Estas pruebas han sido validadas por medio de la correlación que tienen las conductas que en ellas se miden con respuestas fisiológicas de los

organismos, como la respuesta hormonal ante el estrés. A continuación se describen algunas de estas pruebas conductuales. Las primeras dos pruebas: la prueba de campo abierto (CA) y la prueba de laberinto elevado en cruz (LEC) se clasifican como pruebas incondicionadas, llamadas así porque no hay aprendizaje previo al enfrentar los estímulos estresantes presentes (Bakshi y Kalin 2002). Mientras que en la tercera prueba, la prueba de nado forzado (PNF) se requiere de un condicionamiento previo.

La prueba de CA (Hall 1934) es una de las pruebas incondicionadas más utilizadas, presenta estímulos estresores como la novedad y la iluminación, que se consideran estímulos estresantes moderados (Litvin *et al.* 2008). En la prueba de CA se distingue un área central que por lo general está más iluminada y expuesta en comparación con el área periférica. En dependencia de la evitación del área central (la cual es considerada como una potencial amenaza para el animal) se infiere el nivel de ansiedad del individuo (Rodgers & Johnson 1995).

Estudios en ratas sobre la respuesta de la descendencia adulta de cepas Long Evans y Wistar, reportan que los grupos de alto cuidado materno exploran más el área central del CA que los de bajo cuidado materno. Esto ha sido interpretado como una menor respuesta de ansiedad ante los estímulos de la prueba en el grupo de alto cuidado materno (Caldji *et al.* 1998, Liu *et al.* 1997, Weaver *et al.* 2006, Uriarte *et al.* 2007). Por lo que en el presente estudio en ratas de la cepa Sprague-Dawley se espera que los individuos de alto cuidado muestren mayor exploración del área central que los de bajo cuidado.

Hasta el momento en relación con el cuidado materno los estudios en CA se han limitado al uso de medidas espacio-temporales, como la permanencia en el área central mencionada anteriormente. Si bien estas medidas son las más usadas, existen otros indicadores de ansiedad que pueden brindar información importante, como el acicalamiento (Rodgers & Johnson 1995). La conducta de acicalamiento tiene gran importancia funcional en roedores, está relacionada con la limpieza corporal, termorregulación y despliegues específicos, entre otros (Van Erp *et al.* 1994).

En general se plantean varias hipótesis que relacionan el acicalamiento con la respuesta ansiosa ante el estrés, fuera de las condiciones de alojamiento (*homecage*), que se describen a continuación.

La primera hipótesis relaciona el acicalamiento con estados ansiosos producidos por un estímulo estresante moderado-agudo (Komorowska & Pisula 2003, Kalueff & Tuohimaa 2005). Se caracteriza por tener una latencia corta, presentarse como eventos de corta duración y que por lo general son de una sola fase (Kalueff & Tuohimaa 2005, Komorowska & Pisula 2003). La fase de acicalamiento se refiere a la clasificación de algunos autores según la zona corporal que se limpia, por ejemplo, sobre su rostro se considera fase I (ver Bergner *et al.* 2010). También los acicalamientos por ansiedad no presentan un orden en la secuencia de dichas fases, como si lo presenta un acicalamiento en condiciones normales (Kalueff & Tuohimaa 2005, Komorowska & Pisula 2003).

El acicalamiento se reduce significativamente con estímulos de estrés moderados-crónicos y en casos de estímulos estresantes de tipo severo-agudo, el acicalamiento se presenta de forma “estereotipada” (esta forma se define como el acicalamiento enfocado en una sola área corporal, por lo general los flancos), es acompañado de otros comportamientos como agresión, anhedonia y poca actividad (Kalueff *et al.* 2001).

La segunda hipótesis plantea que el acicalamiento se da relacionado a procesos de habituación, en donde el animal ha evaluado previamente los riesgos del ambiente en el que se encuentra y se muestra poco ansioso. Despliega un acicalamiento que se caracteriza por un “engage” o alto grado de atención en la conducta (Brenes *et al.* 2006). Generalmente ocurre de forma secuencial en una dirección cefalocaudal (Kalueff & Tuohimaa 2005). Este tipo de acicalamiento tiene mayor duración en comparación al acicalamiento por ansiedad (Bergner *et al.* 2010). Dependiendo de las características que presente el acicalamiento en los grupos de cuidado materno, si se clasifica como acicalamiento ansioso, se espera que los animales de bajo cuidado presente una mayor frecuencia, mientras que si esta conducta es parte de la habituación se espera la tendencia contraria. Es decir, que tengan la menor frecuencia en comparación con los animales del grupo de alto cuidado materno.

Por otro lado, la prueba del Laberinto elevado en cruz (LEC, Pellow *et al.* 1985), permite medir el nivel de aversión incondicionada a ciertas áreas con lo cual se infiere el nivel de ansiedad de los animales (Montgomery 1955, Montgomery & Monkman 1955). En este caso las áreas aversivas son los brazos abiertos que además de estar más expuestos (más iluminados) se encuentran elevados sobre el suelo. Estos brazos están relacionados con estímulos estresantes moderados como la novedad, mayor iluminación y la

imposibilidad de thigmotaxis en contraposición a los brazos cerrados, estos últimos considerados como áreas de menor riesgo (Roy *et al.* 2009). Para esta prueba hay poca información sobre los efectos del cuidado materno (Cavigelli *et al.* 2010). Sin embargo, en estudios de separación materna (condición de poco cuidado materno) los animales se muestran más ansiosos y temerosos, explorando menos los brazos abiertos (Daniels *et al.* 2004). Por lo que se espera encontrar un comportamiento similar en el grupo de bajo cuidado materno, una menor exploración de los brazos abiertos debido a su perfil más ansioso en comparación con el grupo de alto cuidado materno.

Por último, el cuidado materno en ratas también se ha visto relacionado con la desesperanza aprendida en la prueba de nado forzado (PNF, Porsolt *et al.* 1977), donde animales de bajo cuidado materno mostraron una mayor desesperanza aprendida que los de alto cuidado materno (Weaver *et al.* 2005). Esta “desesperanza aprendida” se refiere a que los individuos aprenden (en un primer ensayo) que no pueden escapar de una situación estresante cuando esta es presentada por segunda ocasión (segundo ensayo) (Cryan *et al.* 2002). Se toman como indicadores la reducción de las conductas activas (como el nado, buceo y escalamiento) y el incremento de las conductas pasivas (tiempo de inmovilidad) entre estos dos ensayos (Cryan *et al.* 2004). Estos comportamientos son regulados por circuitos neurales similares a las que en los humanos regulan los estados de ánimo y algunos de los componentes relacionados con patologías como la depresión (Brenes y Rodríguez 2004). Por lo que se incluyó la PNF en la presente investigación para evaluar si ocurre la misma modulación en ratas Sprague-Dawley.

Si bien se han utilizado estas pruebas para caracterizar los efectos del cuidado materno, hasta el momento no se ha reportado el uso de las tres pruebas conductuales en serie (CA<LEC<PNF). El orden particular en que se aplican estas pruebas ofrece un gradiente en el nivel de estrés de los estímulos. Otro aspecto a considerar, es que utilizar diferentes pruebas conductuales podría reflejar mejor las diferencias en los estados ansiosos de los individuos (Bourin *et al.* 2007, Ramos & Mormede 1998).

Hasta ahora se ha realizado un recuento de múltiples aspectos modulados por el cuidado materno. Al respecto, es importante notar que la mayoría de la evidencia ha sido desarrollada utilizando principalmente en la cepa de ratas Long Evans (Francis 2000, Champagne 2011), lo que plantea la pregunta de si en otras cepas, como la Sprague-Dawley

se observan efectos similares. La interrogante anterior es sustentada no solo por la observación sobre que los estilos maternos varían según la cepa, como se discutió en el capítulo I del presente trabajo, sino también en que varios estudios han encontrado efectos maternos que difieren entre cepas (Barha *et al.* 2007, Clinton *et al.* 2007, Sequeira *et al.* 2013). Esta comparación no solo es necesaria sino que además puede brindar información adicional de cómo el cuidado materno interactúa con las diferencias genéticas que subyacen a las cepas.

Teniendo en cuenta lo descrito anteriormente, es que en el presente capítulo se planteó estudiar cómo las diferencias naturales en el cuidado materno (medido a través del lamido materno) modifican en juveniles de *Rattus norvegicus* la cepa Sprague-Dawley las respuestas ante estímulos estresantes. Este análisis se realizó desde dos niveles de estudio, el primero a nivel conductual, con un diseño experimental que enfrenta a los animales a un gradiente en el nivel de estrés por el orden en que se presentan las pruebas. Y en segundo lugar a nivel neuroquímico, cuantificando el contenido de algunos neurotransmisores y sus metabolitos en tres regiones cerebrales (HP, CP, y EV) que se sabe que están relacionadas con las respuestas conductuales estudiadas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Animales y alojamiento

Para evaluar los efectos del cuidado materno sobre la progenie, se utilizó el modelo de alto y bajo lamido. Se estudió una cohorte de 28 madres del cual se seleccionaron al azar no más de 3 machos por hembra. Esto permitió obtener al momento del destete (21 días de edad): un grupo 22 individuos provenientes de 7 madres de alto lamido (Grupo AL), 45 individuos provenientes de madres de lamido medio (Grupo ML) y 17 individuos provenientes de 5 madres de bajo lamido (Grupo BL). Los machos se marcaron de manera individual con códigos corporales usando ácido pícrico al 30%. Se alojaron en grupos de 3 animales (manteniendo a los hermanos juntos) en cajas de policarbonato (medida superior 26.5 cm. x 42 cm., medida inferior 22 cm x 37.5 cm, alto 18 cm y fondo 82.5 cm²; Alphete, Alemania).

Durante toda la experimentación los animales se mantuvieron bajo condiciones estándar de laboratorio: ciclos de 12 horas luz/oscuridad (iniciando a las 6:00 am el ciclo de luz), a

25.5 °C \pm 1 °C y 78–87% de humedad relativa y con un sistema de 10 recambios de aire /por hora. Los fondos de las cajas de alojamiento fueron cubiertos con burucha de madera autoclavada. Los animales tuvieron acceso libre al alimento y al agua. Todos los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con los lineamientos de la “Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio” del Ministerio de Ciencia y Tecnología de Costa Rica, como parte del cumplimiento de la Ley de Bienestar de los Animales N°7451 y bajo el consentimiento previo del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales (CICUA-12-09) de la Universidad de Costa Rica.

2.2 Pruebas conductuales

Las pruebas se realizaron bajo las condiciones estándar previamente descritas, bajo ruido blanco (del inyector y extractor de aire), entre las 8 y las 12 medio día. El orden en que los animales se sometieron a las pruebas se eligió de manera aleatoria, dicho orden se mantuvo en las tres pruebas conductuales. Previo a cada prueba conductual, con el fin de habituar a los animales a la iluminación utilizada en las pruebas, los animales permanecieron durante 1 hora en un cuarto con luz roja de 25 W, a 130 cm de altura. Todas las pruebas se grabaron en video, con cámaras (RoHS, modelo RL-CAMJKD436) que se colocaron arriba de los aparatos, con una visibilidad infrarroja de 1m de distancia. Primero se aplicó la prueba de campo abierto (CA) a los 27 días de edad (Fig.1A), después se realizó la prueba del laberinto elevado en cruz (LEC) a los 29 días de edad (Fig1.B) y finalmente se realizó la prueba de nado forzado (PNF, Fig.1C) que se subdividió en dos ensayos: pre-prueba y prueba, a los 31 y 32 días de edad respectivamente).



Fig. 1. Fotografías de los aparatos usados en las mediciones de comportamiento. En **A**) El campo abierto (CA) con la cuadrícula de medición superpuesta en la imagen, el cuadro gris demarca el área central el resto se toma como área periférica, en **B**) El Laberinto elevado en cruz (LEC) elevado a 76 cm del suelo, en **C**) Cilindro de prueba de nado forzado (PNF).

2.2.1 Prueba de Campo Abierto (CA):

El aparato utilizado en este estudio consistió en una caja hecha de madera (55 cm×55 cm×40 cm) de color negro. El área central correspondió a un cuadrado de 756 cm² subdividido en 4 cuadrantes y el área periférica la constituyó el pasillo alrededor del área central de 2269 cm², que también se subdividió en cuatro partes (Fig.1 A). Al inicio de la prueba el animal se colocó en el centro del campo y se registraron las conductas durante 10 minutos utilizando el software Etholog 2.25 (Ottoni 2000). Se registraron las siguientes conductas: entradas en las distintas áreas central y periférica (frecuencia y tiempo de permanencia) y la frecuencia de cruces entre los cuadrantes de la cuadrícula de registro (Fig.1A, se consideraba un cruce cuando el animal cruzó con las 4 patas las líneas virtuales). Adicionalmente se midió la distancia total recorrida (en metros) con el software ANY-maze versión 4.30 (Stoelting Co., USA). También se registró la frecuencia de “Rearing” o exploración vertical (cuando el animal se levanta sobre sus patas traseras en un ángulo mayor a los 45°, Fig. 2). Así como la frecuencia, duración y latencia de inicio del acicalamiento (complejas secuencias de movimientos que el animal realiza para mantener limpio su pelaje y piel; estos movimientos incluyen frotar, lamer y rascarse). Al final de cada prueba el aparato se limpió con alcohol al 70%.

Posteriormente, se realizaron análisis detallados del acicalamiento. Se determinó si cada evento de acicalamiento era unitario (en los casos en que solo se presenta una fase de acicalamiento) o secuencial (varías fases en orden estricto rostro-caudal: I-II, I,-II-III). Se usó una modificación de la descripción de Bergner *et al.* (2010) de las fases de acicalamiento (Ver Fig. 3). Además se incluyó la distribución temporal minuto a minuto de cada tipo de acicalamiento.



Fig. 2 Conducta de exploración vertical “Rearing”. En A) se aprecia la conducta sin apoyo de pared en posición completamente vertical, suele durar muy poco tiempo, en B) Rearing en diversas ubicaciones de la prueba de CA en posición vertical. En C) Rearing en brazo cerrado del LEC en posición vertical.

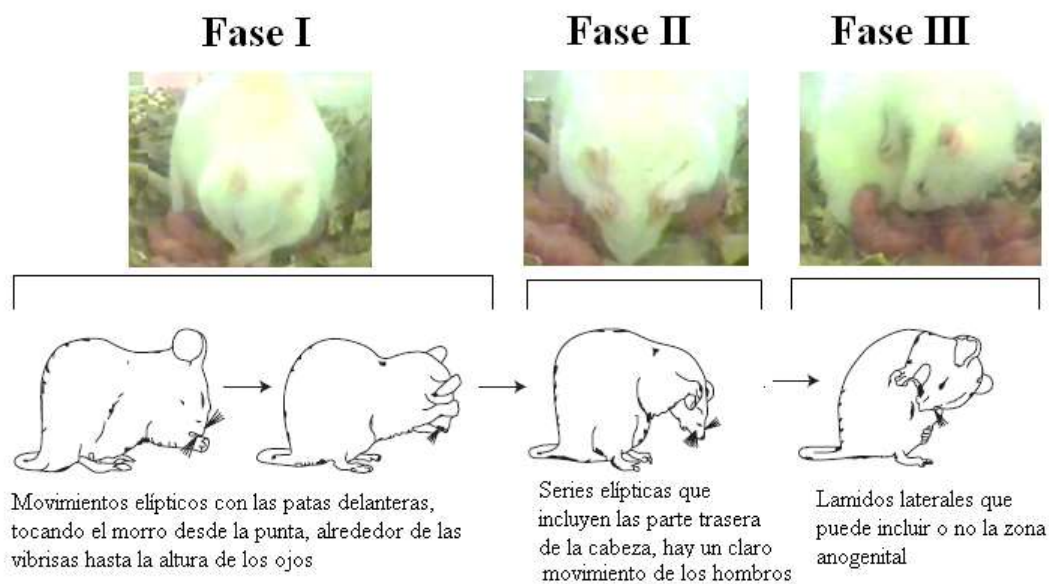


Fig. 3 Fases de acicalamiento, modificado de K. Berridge en Bergner *et al.* 2010.

2.2.2 Prueba de Laberinto Elevado en Cruz (LEC):

El laberinto consta de cuatro brazos de madera de igual dimensión (50 largo x 10 cm ancho) conectados por un área central de 100 cm². Está elevado a 76.5 cm del suelo. Dos de los brazos están cubiertos con paredes de 40 cm de altura, que se oponen perpendicularmente a dos brazos descubiertos (Fig. 1B). Al inicio de la prueba el animal se colocó en el área central del laberinto. Un observador registró las conductas durante 5 minutos. Se registraron los siguientes parámetros: entradas a las distintas áreas y tiempo de permanencia. Se calculó el porcentaje de tiempo invertido en los brazos abiertos (se sumaron los tiempos de permanencia de los dos brazos), brazos cerrados (se sumaron los tiempos de permanencia de los dos brazos) y área central durante la prueba con la siguiente fórmula: [tiempo de permanencia por área / tiempo total de la prueba] × 100.

Además, se registraron las siguientes conductas: frecuencia de rearing (ver descripción en la sección anterior, Fig.2C), exploración en “head-dipping” por su nombre en inglés (cuando el animal asomaba la cabeza por debajo del borde en los espacios abiertos, Fig.4), el estiramiento o “stretch-attempt” (SAP) para explorar (cuando el animal alarga de la cintura hacia adelante sin mover las patas traseras, se observa el cuerpo casi en línea recta Fig.5A y B, en comparación a las curvas que presenta en una posición normal sin estirarse Fig.5C) y el acicalamiento (Fig.3, solo que no se distinguieron las fases). El laberinto se limpió entre cada sesión con alcohol al 70%.

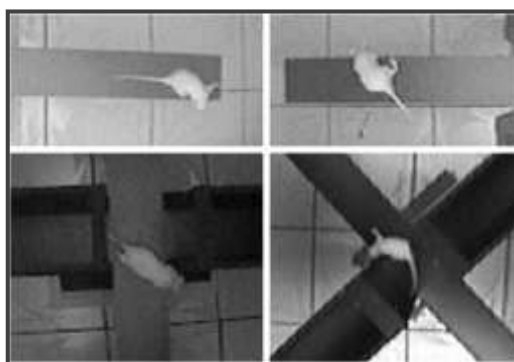


Fig. 4 Vista dorsal de la conducta de Head-dipping. Se aprecia que la conducta se puede ubicar en diferentes zonas del LEC.

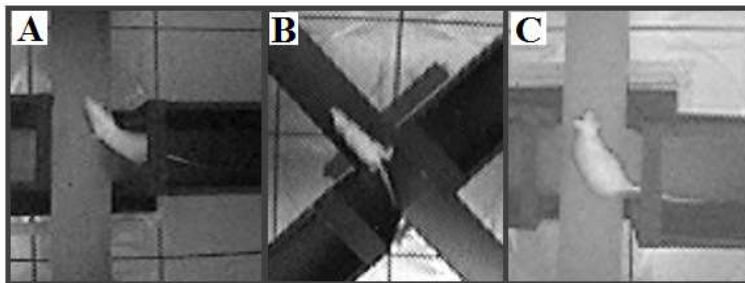


Fig.5 Conducta de estiramiento “Stretch-attempt” (SAP). En A) SAP en brazo cerrado, en B) SAP en el área central, en C) posición normal sin estiramiento, se observan curvas.

2.2.3 Nado Forzado:

Los animales se colocaron en un cilindro de plexiglás (47 cm de profundidad y 31 cm de diámetro), con agua hasta los 30 cm de altura, a $25^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}$, de manera que los animales no pudieran apoyarse en el fondo con la cola o las patas (Borsini y Meli 1998, Cryan *et al.* 2005_a). Se realizó la pre-prueba de nado forzado durante 15 minutos, y veinticuatro horas después los animales se evaluaron de nuevo en la prueba de nado pero durante 5 minutos. En ambos ensayos, un observador registró las siguientes conductas: nado (movimientos de las cuatro patas en posición horizontal, en dirección circular pero no hacia las paredes del cilindro, Fig.6A), escalamiento (movimientos del animal sobre las paredes del cilindro en posición vertical con las cuatro patas, incluidos los chapoteos de frente a las paredes, Fig.6B); buceo (frecuencia de los sumergimientos de todo el cuerpo, con la cabeza en dirección al fondo del cilindro, incluye el presionar con la nariz el fondo del cilindro) e inmovilidad (ausencia de nado, escalamiento y buceo, usualmente se observa en posición vertical, Fig.6C). Después de las pruebas los animales se sacaron del agua y se secaron con un paño, se colocaron en una caja con una lámpara para un secado más rápido antes de retornarlos al alojamiento estándar.

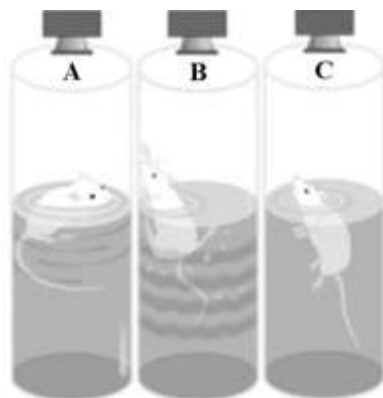


Fig. 6 Conductas en la prueba de nado forzado, En A) nado, en B) escalamiento y en C) inmovilidad. (modificado de Cryan *et al.* 2002)

2.3 Análisis Neuroquímicos:

2.3.1 Sacrificio

Uno a uno los individuos se trasladaron del bioterio al cuarto de cirugía, donde fueron sacrificados por decapitación, para evitar alteraciones de la neuroquímica cerebral (Olfert *et al.* 1998). Los cerebros fueron removidos rápidamente (5 minutos en promedio/cerebro) y se lavaron con solución salina (NaCl, 0.9%) para remover los excesos de sangre y se secaron con papel filtro. Se pesaron con una balanza analítica (OHAUS 200g ± 0.001 mg), y se midieron el ancho y largo (sin contar el cerebelo, Fig.7A) utilizando un calibrador “vernier” digital (Fisher Scientific. ± 0.0003 mm).



Fig.7 Anatomía del cerebro de rata, en Vista Dorsal, a la izquierda fotografía en la que se indican los puntos de medición del largo y ancho cerebral (mm), las líneas azules marcan cortes de estructuras que no se incluyen en el pesado.

Dissección y almacenamiento de las áreas cerebrales

La corteza prefrontal (CP), el estriado ventral (EV) y el hipocampo (HP) fueron extraídos mediante disección. En estas dos últimas áreas, las disecciones se alternaron aleatoriamente entre los hemisferios, es decir de un animal se tomó el hemisferio derecho y del siguiente animal el hemisferio izquierdo. Primero se extrajo la CP (Ver coordenadas en la Fig.8A), para ello previamente se eliminaron los restos del bulbo olfatorio y el cerebelo. En una posición dorsal, el cerebro se cortó 1 mm hacia dentro del borde anterior en ambos hemisferios utilizando una navajilla quirúrgica (Fig. 8B). Luego se colocó el cerebro en posición ventral (Fig. 9B) y se cortó 2 mm antes del quiasma óptico. En el corte coronal obtenido (Fig.9D), se ubicaron las comisuras anteriores y la fisura rinal (Fig. 9C), para delimitar los límites dorsal y ventral de lo que se consideró como el estriado ventral. Finalmente, la porción restante del cerebro se dividió en medio de los hemisferios y en posición lateral de la parte interna del cerebro se extrajo el HP con espátulas finas de uno de los hemisferios (Fig. 10 A y B).

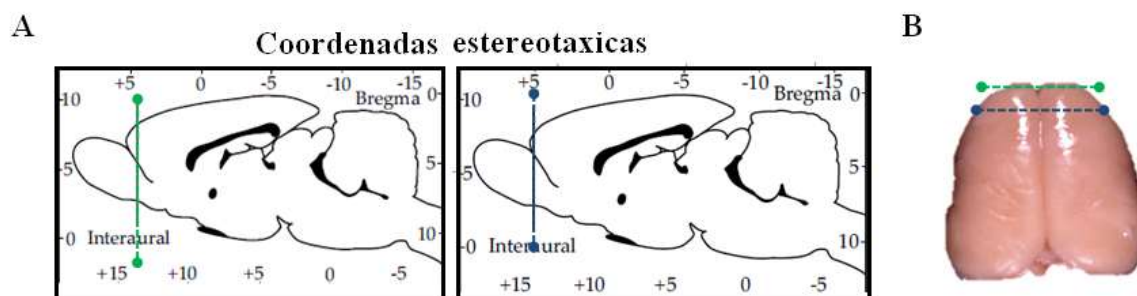


Fig. 8 Esquema utilizado para la disección del CP, figuras modificadas de Paxinos y Watson (1998). **En A)** las coordenadas estereotáxicas utilizadas, **en B)** Vista dorsal del cerebro que muestra el corte inicial (en verde) que elimina restos de los bulbos olfatorios y el segundo corte a 1 mm del borde anterior (en azul).

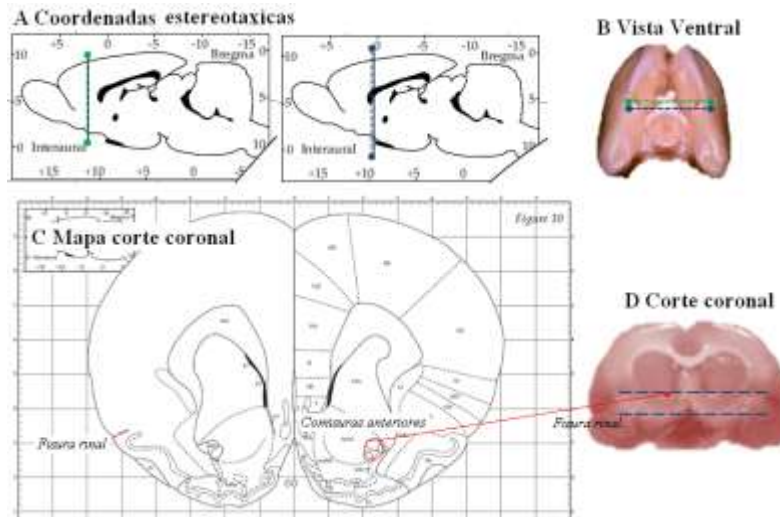


Fig. 9 Disección del EV (figuras modificadas de Paxinos y Watson 1998). En A) Coordenadas estereotáxicas para la extracción del EV. En B) Plano ventral del cerebro, la línea azul marca el quiasma óptico donde se realiza el primer corte y 2mm antes de este se hace el segundo corte (línea verde). En C) Corte coronal, se resaltan: las comisuras y la fisura rinal. En D) Se ubican las comisuras anteriores (puntos blancos), allí se delimita la parte anterior del EV, el segundo punto de ubicación es la fisura rinal para distinguir el límite inferior

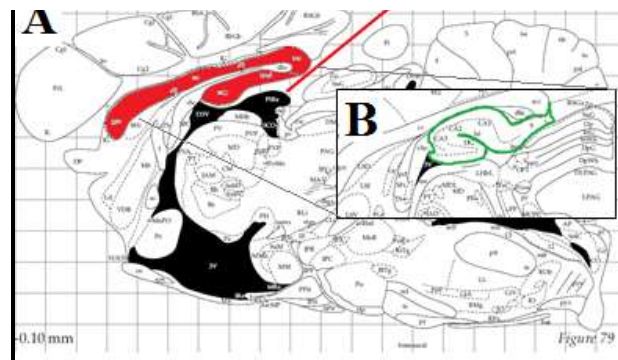


Fig. 10. Extracción del hipocampo. En A) Diagrama sagital de la parte interna de uno de los hemisferios cerebrales, se distinguen en rojo estructuras como el fornix, cuerpo calloso y área septal que deben ser retirados con cuidado, introduciendo una espátula fina de disección en el ángulo indicado (línea roja), para exponer el hipocampo. En B) se aprecia el diagrama sagital de un corte más interno que permite ver la parte inicial del hipocampo (resaltado en verde), la espátula sigue por debajo de este hasta que suavemente se libera del resto del tejido.

Cada muestra de tejido se colocó en un vial (Eppendorf de 1.5 ml) que contenía una solución de ácido perclórico (HClO_4^- al 0.05M) y ácido 2,3-Dihydroxybenzoico (DHBA, a 0.05 ng/ μL). El vial con la disolución (para CP se utilizaron 200 μL y para EV y HP 500 μL) fue previamente tarado y se pesaron los tejidos en una balanza analítica (OHAUS 200g \pm 0.001mg). Las muestras fueron almacenadas a -70°C hasta el momento de su análisis (rango de almacenamiento de 1 semana a 4 meses aproximadamente) por medio de cromatografía de alta resolución con detección electroquímica (HPLC-EC).

2.3.3 Preparación de las muestras para análisis

Previo al análisis de HPLC-EC, cada muestra de tejido fue homogenizada con un sonicador (Fisher Scientific. Mod.150) durante 20 segundos a una magnitud de 45%. Luego la muestra fue centrifugada a 10,000 rpm a una temperatura de 4°C durante 10 minutos (Micromax RF/IEC, Thermo Fisher Scientific, USA). Con una micropipeta se tomó el líquido supernadante del centrifugado, el cual fue micro-filtrado a través de una membrana de 0.22 μm de polifluoruro de vinilideno (PVDF, Millipore, USA). El producto del filtrado se utilizó en la inyección del HPLC-EC (50 μL).

2.3.4 Calibración

Previo a la cuantificación de las muestras se preparó un patrón de medida para el equipo de detección. Este procedimiento consiste en inyectar una cantidad conocida de cada analito (0.05 ng/ μL), para indicar en el sistema de registro el tiempo de retención en el que se identifica y cuantifica cada sustancia (Ho *et al.* 2000). Para elaborar un patrón se preparó una disolución madre disolviendo 5mg de cada analito en HClO_4^- (0.05M) aforando en un balón de 50 mL. Luego de cada solución madre se tomaron 5 μL que se disolvieron nuevamente en HClO_4^- , aforando en un balón de 10 mL para obtener la solución patrón. Al final de este proceso se inyectaron 50 μL de la solución patrón en el HPLC-EC para obtener el cromatograma patrón. Adicionalmente, se contó con un estándar interno, el DHBA. Este es un compuesto que sirve de referencia sobre los cambios que puede sufrir la muestra en el proceso de extracción, filtración y almacenamiento (Ho *et al.* 2000).

2.3.5 Inyección y análisis de la muestra

Las muestras se inyectaron en el HPLC-EC (Waters Spherisorb® Milford U.S.A) utilizando una bomba de inyección (Waters 515) a un flujo de 0.8 mL/min. Se usó una precolumna de seguridad (Agilent technologies) y una columna de 4.6 x 75 mm, con un poro de 3.5 μ m (Agilent Zorbax SB-C8, Agilent Technologies). En la detección electroquímica se usó un equipo Waters 464 (Waters Co, MA, USA), con un electrodo de carbón combinado con un electrodo de referencia de Ag/AgCl, operando el proceso a 600 mV. Se utilizó el software Data Apex (CSW32-Chromatography Station para Windows, Hungary) para integrar y calcular las concentraciones de cada neurotransmisor y de sus metabolitos. Se cuantificaron las siguientes monoaminas: dopamina (DA), serotonina (5-HT) y norepinefrina (NE) y los metabolitos del Ácido 3,4-Dihidroxifenilacético (DOPAC) y el ácido 5-Hidroxiindolacético (5-HIAA). Adicionalmente, se calculó la tasa de recambio metabólico para dopamina (DOPAC/DA) y para serotonina (5HIAA)/5-HT), que son un indicador de la medida en que se está utilizando el neurotransmisor respectivo.

2.4 Análisis estadístico

Debido a que la mayoría de los datos en campo abierto no alcanzaron la normalidad, probada con la prueba de Shapiro-Wilk se eligió utilizar estadística no paramétrica. Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para comparar los tres grupos y la prueba U de Mann-Whitney cuando en los análisis a priori se eligió comparar entre el grupo de alto y bajo lamido solamente. Las comparaciones entre pre-test y test en la prueba de nado forzado se realizaron con la prueba de Wilcoxon. Las relaciones entre parámetros conductuales y neuroquímicos se evaluaron calculando el coeficiente de correlación de Spearman. Todos los análisis se realizaron con el software SPSS. Versión 19.0.

3. RESULTADOS

3.1 Efectos del cuidado materno sobre la conducta de la progenie

Prueba de Campo abierto

No se observaron diferencias significativas entre los grupos de lamido en el número de entradas y tiempo de permanencia en el área central o periférica (Cuadro 1). Adicionalmente, se analizó el primer minuto de la prueba pero tampoco se encontraron diferencias significativas en ninguno de los parámetros mencionados (Fig.11A y B, Cuadro 1). Tampoco en los parámetros relacionados con la locomoción, como el número de cruces totales (Fig.11 C), la frecuencia de rearing (Fig. 11 D), la distancia recorrida (Fig.11E) y la velocidad del desplazamiento del animal (Fig.11 F) se observaron diferencias significativas (Cuadro 1). Sobre los cruces, se utilizó el número total de cruces ya que en análisis previos no se encontró distinción en el área central ($U=158.0$, $p=0.408$, $r=-0.13$) o área periférica ($U=161.5$, $p=0.469$, $r=-0.11$) entre los grupos extremos.

Cuadro 1 Comparación de grupos de lamido en los parámetros de la prueba de CA
(Prueba de Kruskal-Wallis)

Conductas	Chi-Square	gl	P
Entradas totales al área central	0.427	2	0.808
Tiempo de permanencia en el área central	0.064	2	0.969
Entradas al área central, en el primer minuto	0.699	2	0.705
Tiempo de permanencia, en el primer minuto	0.269	2	0.874
Frecuencia total de cruces durante la prueba	0.148	2	0.929
Número de cruces durante el primer minuto	3.814	2	0.149
Frecuencia total de rearing	2.724	2	0.256
Frecuencia de rearing, en el primer minuto	2.988	2	0.224

En contraste se observaron diferencias en la conducta de acicalamiento, los animales de AL ($X=54.6\pm 6$) pasaron significativamente más tiempo acicalándose que los de BL ($X=37.7\pm 5$, $U=110.0$, $p=0.029$, $r=0.35$), el grupo ML ($X=50.9\pm 5$) se comportó similar al grupo AL. Análisis más detallados sobre esta conducta se llevaron a cabo solo con los grupos extremos.

Para estos análisis, cada evento de acicalamiento se clasificó en dos tipos: unitario o secuencial. En ambos grupos, el acicalamiento de tipo secuencial se realizó durante más tiempo que el acicalamiento unitario (Fig.12A). Las diferencias observadas en el acicalamiento total entre los grupos de lamido se deben a la cantidad de acicalamiento secuencial, ya que no se observaron diferencias significativas en la duración del acicalamiento unitario (Fig.12A). En ambos grupos se presenta primero el acicalamiento unitario y luego el acicalamiento secuencial (Fig.12B), pero no se observaron diferencias significativas entre los grupos.

Con respecto a la distribución temporal de los tipos de acicalamiento, en el primer minuto para ambos grupos solo está presente el acicalamiento unitario, que decrece a través del tiempo en los animales de AL, mientras que en los animales de BL parece tener frecuencias similares a lo largo del tiempo, mostrando solo pequeñas variaciones (Fig. 13 A). El acicalamiento secuencial se observa a partir del minuto dos y muestra gran variación a través del tiempo, pero en términos generales aumenta en ambos grupos (Fig. 13 B). Finalmente cabe mencionar que todos los eventos de acicalamiento que se han descrito se realizaron en el área periférica del campo abierto y nunca en el área central

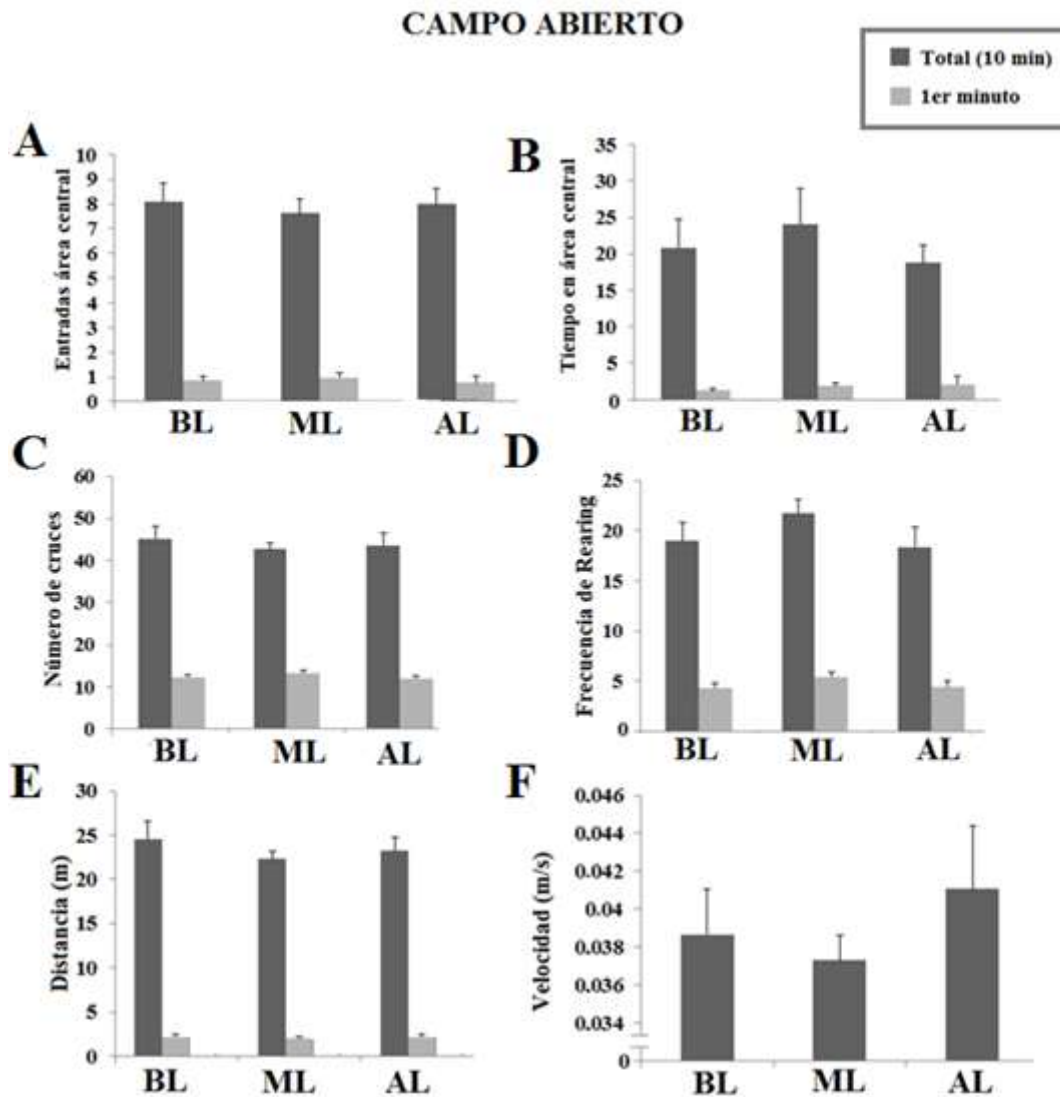


Fig. 11. Parámetros conductuales en CA (Promedio \pm error estándar) entre los grupos de lamido (BL N=17, ML=45 y AL N=22). En A) Entradas al área central, B) Tiempo de permanencia en el área central, en C) número de cruces totales, en D) Frecuencia de rearing, en E) Distancia recorrida (m) y en F) Velocidad promedio total.

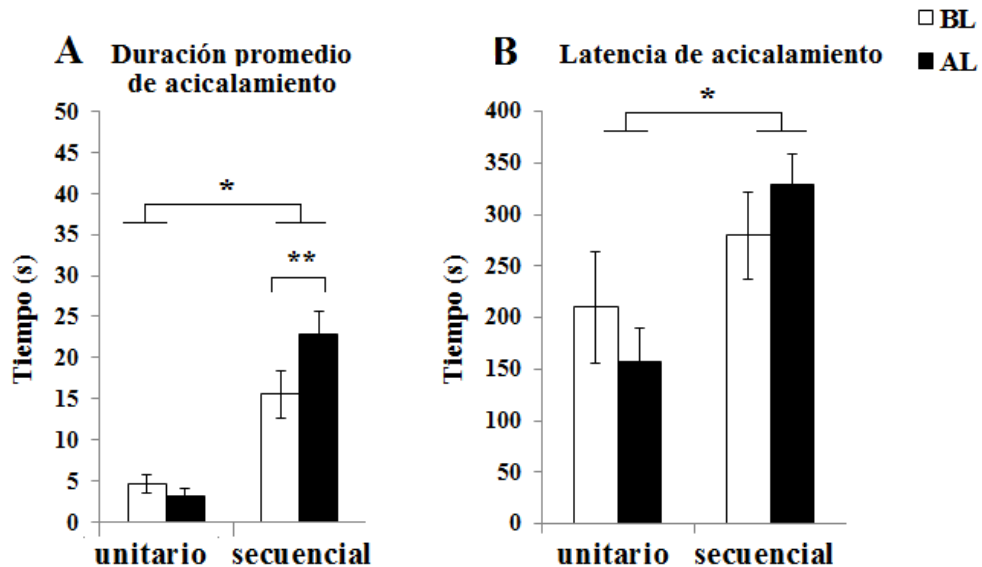


Fig.12 Acicalamiento por grupo de lamido en el campo abierto (BL: N=17 y AL: N=22), en A) promedio de la duración (\pm error estándar) y en B) promedio de la latencia de inicio (\pm error estándar). Diferencias significativas entre grupos de lamido** y entre tipos de acicalamiento* con $p < 0.05$.

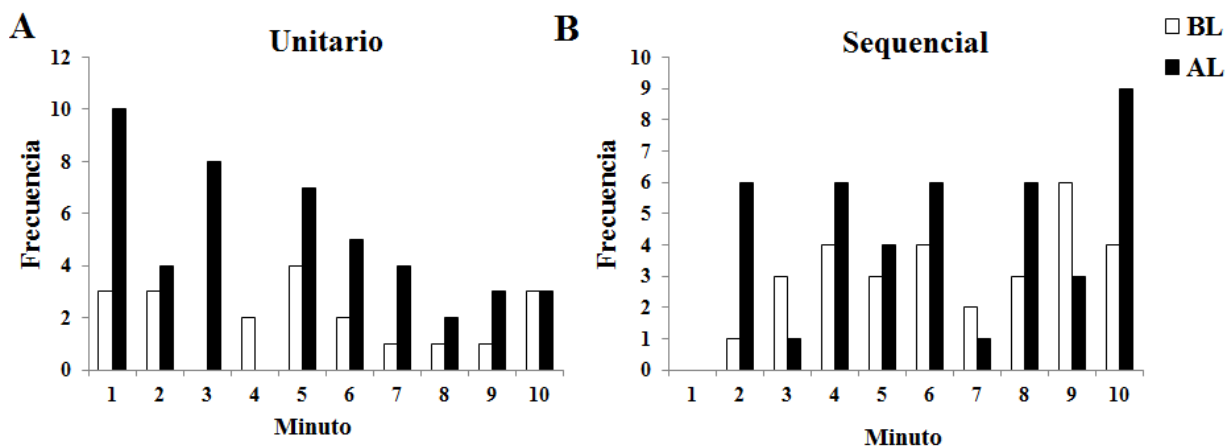


Fig.13. Distribución temporal de la frecuencia de acicalamiento entre los grupos de alto (N=22) y bajo (N=17) lamido en la prueba de CA. En A) acicalamiento unitario y en B) acicalamiento secuencial.

Prueba de laberinto elevado en cruz

El grupo ML difirió significativamente de BL pero no de AL, mostrando las mismas tendencias en todos los parámetros del LEC (Fig.14 A y B), por lo que a continuación se describen las comparaciones solo entre AL y BL. Los animales de AL pasaron significativamente más tiempo en el área central ($U = 66.0, p = 0.001, r = 0.55$) y en los brazos abiertos ($U = 59.9, p < 0.01, r = 0.58$) que los animales de BL (Fig.14B). Por el contrario, los animales de BL permanecieron más tiempo en los brazos cerrados que los AL ($U = 48.0, p < 0.01, r = 0.63$, Fig. 14 B). Con respecto al número de entradas en las áreas, el grupo de AL mostró más entradas en los brazos abiertos ($U = 53.0, p = 0.000, r = 0.62$) y cerrados ($U = 90.5, p = 0.005, r = 0.44$) que el grupo de BL (Fig.14 A). Adicionalmente, se evaluaron otras conductas en LEC (Cuadro 2), y solo la frecuencia de heap-dipping mostró diferencias significativas entre los grupos de lamido (Cuadro 3). Análisis *a posteriori* mostraron que la frecuencia de head-dipping fue mayor en animales de AL que en los de BL ($U = 103.5, p = 0.017, r = -0.38$), los ML no difirieron de AL y BL (datos no mostrados).

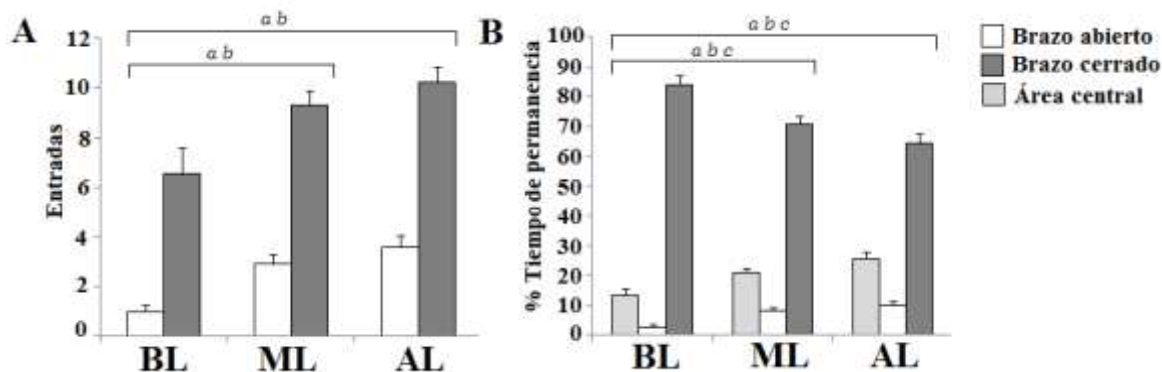


Fig. 14 Preferencia entre áreas del LEC en grupos de lamido (BL N=17, ML=45 y AL N=22). En A) Entradas promedio (\pm error estándar) a cada área, en B) Porcentaje promedio de tiempo invertido (\pm error estándar) en cada área. Las letras en minúscula sobre las barras indican diferencias significativas entre los grupos de lamido para ^a brazo abierto, ^b brazo cerrado y ^c área central, con una $p < 0.05$ en todos los casos.

Cuadro 2 Conductas (promedio \pm error estándar) por grupo de lamido desplegadas en el LEC

	Head-dipping		SAP frecuencia en						Rearing		Acicalamiento			
	Frecuencia		brazo cerrado		brazo abierto		área central		Frecuencia		Frecuencia		tiempo	
BL	4.41	± 3.37	1.24	± 1.44	0.06	± 0.24	0.94	± 1.03	9.35	± 2.94	1.65	± 2.09	18.63	± 26.81
ML	5.33	± 3.20	1.31	± 1.56	0.33	± 1.28	1.20	± 1.70	9.78	± 4.28	0.69	± 1.04	7.70	± 13.93
AL	6.86	± 3.38	1.55	± 1.82	0.05	± 0.21	1.77	± 1.66	10.00	± 4.01	0.86	± 0.83	5.77	± 7.60

Cuadro 3 Comparación entre grupos de lamido para las conductas de exploración y acicalamiento (Prueba de Kruskal-Wallis)

Conductas	<i>Chi-cuadrado</i>	<i>P</i>
Head-dipping	6.12	0.047
SAP	brazo cerrado	0.01
	brazo abierto	1.72
	área central	3.14
Rearing	0.02	0.988
Acicalamiento	frecuencia	4.64
	tiempo	3.43

Prueba de nado forzado

No se observaron diferencias entre los grupos de lamido en la pre-prueba de 15 minutos en los tiempos de inmovilidad, escalamiento y nado ($p > 0.05$). Con el fin de comparar proporcionalmente la pre-prueba y la prueba (de 5 minutos), se analizaron los primeros 5 minutos de pre-prueba únicamente. Tampoco se observaron diferencias significativas entre los grupos de lamido en la pre-prueba como en la prueba a excepción del tiempo de escalamiento en la pre-prueba (Cuadro 4). Donde el escalamiento decrece al aumentar el lamido materno (Fig.15C). Análisis a posteriori mostraron que estas diferencias se encontraban entre el grupo ML y AL ($U=312$, $p=0.014$), el grupo BL no difirió del AL ($U=141$, $p=0.184$) ni del ML ($U=339$, $p=0.492$). Adicionalmente, dentro de cada grupo se comparó el desempeño en la pre-prueba con el de la prueba, en ambos grupos se observó la misma tendencia a incrementar significativamente la inmovilidad y disminuir los comportamientos activos como: el nado y el escalamiento (Fig. 15A-C)

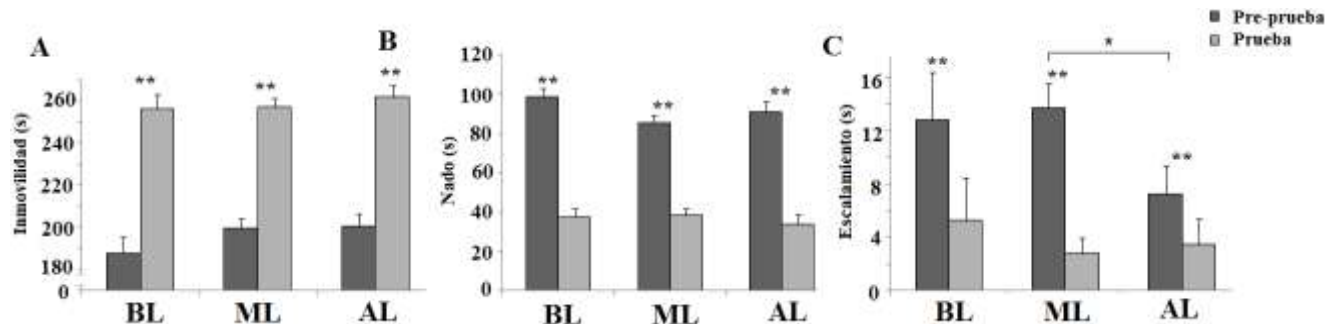


Fig. 15. Duración promedio (\pm error estándar) de las conductas en la prueba de nado forzado entre los grupos de lamido (BL N=17, ML=45 y AL N=22). En A) Inmovilidad. B) Nado y C) Escalamiento. * Comparación en Pre-prueba entre grupos de lamido, **Comparación de Wilcoxon PRE-TEST y TEST a nivel intra-grupos de lamido, $p < 0.01$.

Cuadro 4. Comparación entre grupos de lamido en la pre-prueba (5 minutos) y prueba de nado forzado (Prueba de Kruskal-Wallis).

	PRE-PRUEBA			PRUEBA		
	Chi-cuadrado	gl	p	Chi-cuadrado	gl	p
Inmovilidad	1.234	2	0.540	0.937	2	0.626
Nado	4.082	2	0.130	1.189	2	0.552
Escalamiento	5.992	2	0.050	0.054	2	0.974

3.2 Neuroquímica en grupos de lamido

No se encontraron diferencias entre los grupos para ninguno de los neurotransmisores en la CP (Fig.16), ni para los metabolitos estudiados, con excepción del DOPAC (Fig.16A, Cuadro 5), en el que el grupo de BL presentó mayor concentración de DOPAC que el AL ($U=59.0$, $p=0.001$) y que el grupo de ML ($U=239.0$, $p=0.024$). AL y ML no se diferenciaron entre sí ($U=385.5$, $p=0.144$). Adicionalmente, la tasa de recambio metabólico de 5-HT en la CP mostró diferencias significativas (Cuadro 5). El grupo BL mostró mayor tasa de recambio de 5-HT comparado con el grupo de AL ($U=110.0$, $p=0.029$) y ML ($U=208.0$, $p=0.006$). No hay diferencias entre el grupo AL y ML ($U=469.0$,

p=0.728) (Fig.17). Esto refleja una mayor actividad serotoninérgica que libera mucha serotonina lo que produce un aumento de su principal metabolito 5HIAA (Fig.16B).

Cuadro 5 Comparación de las concentraciones de los metabolitos por área cerebral entre grupos de lamido (Prueba de Kruskal-Wallis).

	CP			HP			EV		
	<i>Chi-cuadrado</i>	<i>gl</i>	<i>p</i>	<i>Chi-cuadrado</i>	<i>Gl</i>	<i>P</i>	<i>Chi-cuadrado</i>	<i>gl</i>	<i>p</i>
NE	1.566	2	0.457	2.692	2	0.260	4.591	2	0.101
DA	2.168	2	0.338	1.839	2	0.399	1.061	2	0.588
DOPAC	9.749	2	0.008	.110	2	0.946	1.263	2	0.532
5HIAA	2.623	2	0.269	1.781	2	0.410	1.826	2	0.401
5-HT	2.895	2	0.235	1.906	2	0.386	1.745	2	0.418
DOPAC/DA	3.705	2	0.157	.711	2	0.701	1.948	2	0.378
5HIAA/5-HT	7.953	2	0.019	.086	2	0.958	2.376	2	0.305

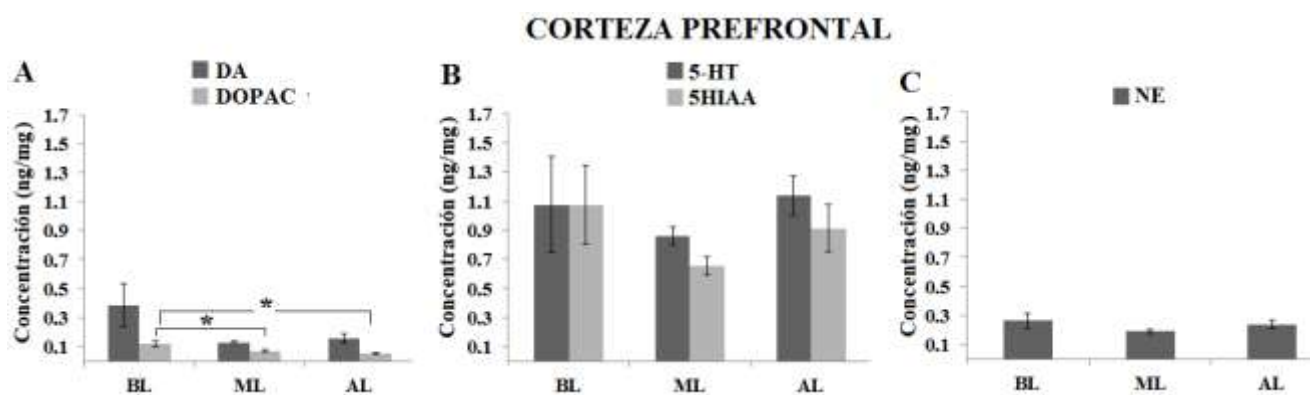


Fig. 16 Concentraciones promedio (\pm error estándar) de algunas monoaminas y sus metabolitos entre grupos de lamido (BL N=17, ML=45 y AL N=22) en la Corteza prefrontal, en A) DA y DOPAC B) 5-HT y 5HIAA y en C) NE. Todas las concentraciones se expresan en ng/mg de tejido húmedo, *p<0.05.

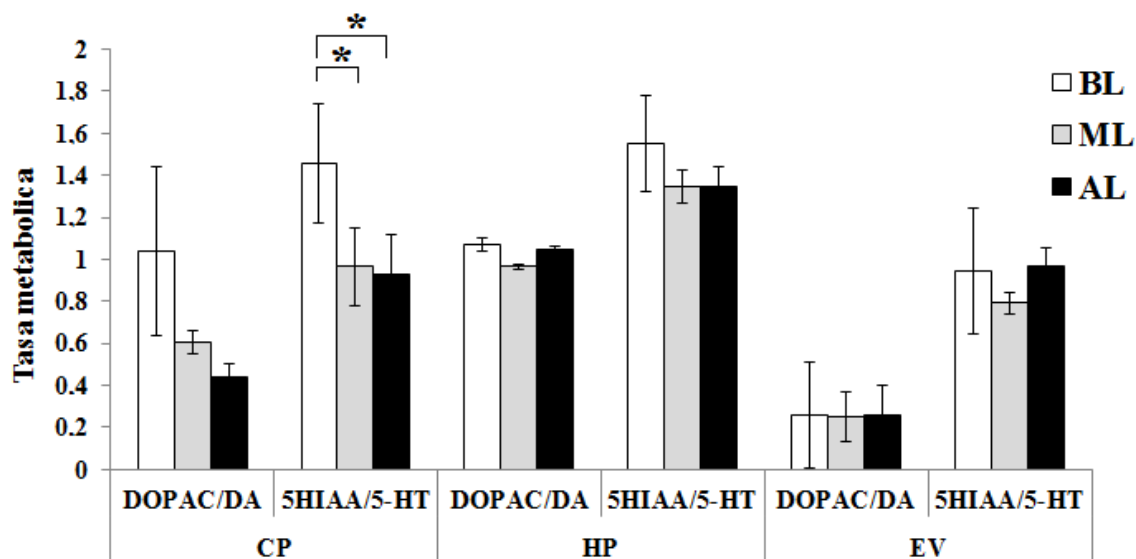


Fig. 17 Promedios (\pm error estándar) de la tasa de recambio metabólico de neurotransmisores, por área cerebral entre grupos de lamido (BL N=17, ML=45 y AL N=22). * $p < 0.05$.

En el HP y EV no se observaron diferencias significativas entre las medidas neuroquímicas de los hemisferios izquierdo y derecho (datos no mostrados), por lo que los datos de ambos hemisferios se agruparon para cada área respectivamente. En el HP como ya se mencionó no hay diferencias significativas, sin embargo hay algunas características interesantes de resaltar con respecto a las otras áreas cerebrales, por ejemplo, esta área tiene el mayor contenido de serotonina en comparación con el resto (Fig. 18B), en donde el metabolismo de dicho neurotransmisor se encuentra elevado en los tres grupos de lamido, con un mayor contenido de 5 HIAA que de 5-HT. Además se observa una reducción de la NE con respecto al aumento en el lamido materno (Fig.18 C), que a pesar de no alcanzar la significancia estadística revela semejanzas con lo que ocurre con este mismo neurotransmisor en EV (Fig.19C). No hay diferencias en las tasas de recambio de DA o 5-HT (Fig.17).

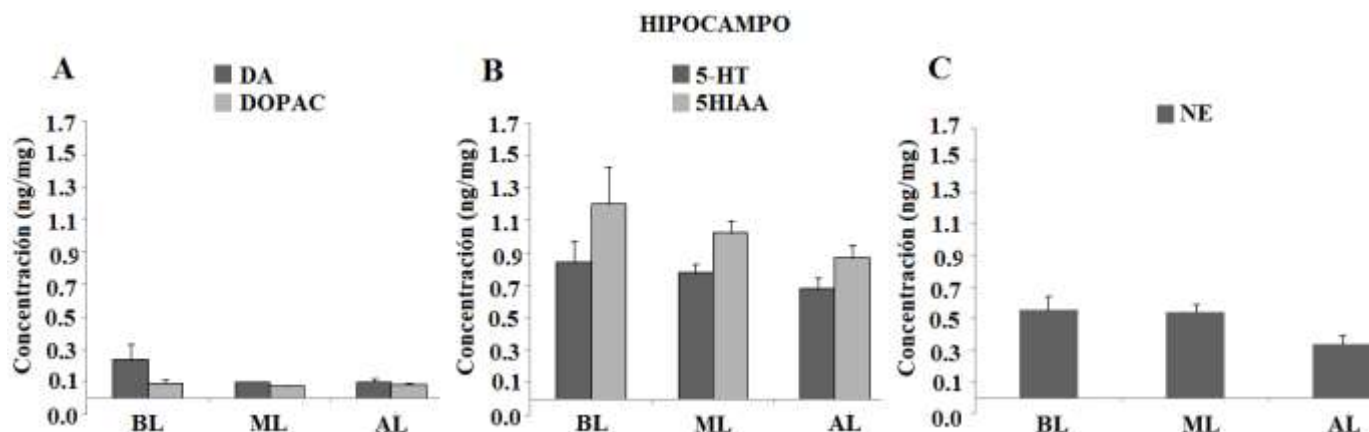


Fig. 18 Concentraciones promedio (\pm error estándar) de algunas monoaminas y sus metabolitos entre grupos de lamido en el hipocampo, en A) DA y DOPAC B) 5-HT y 5HIAA y en C) NE. Todas las concentraciones se expresan en ng/mg de tejido húmedo.

En el EV se observa que la dopamina es el neurotransmisor más concentrado y además esta región cerebral es la que presenta más contenido de DA comparándola con las otras dos regiones estudiadas (Fig.19A). En esta área se observa una mayor degradación de la dopamina en comparación con las otras áreas cerebrales reflejada en la mayor concentración de DOPAC (el metabolito producto de dicha degradación), pero no se encontraron diferencias entre los grupos de lamido (Cuadro 5). En el EV el metabolismo de la serotonina no muestra diferencias entre grupos, como si se observó en la CP (Fig. 19B). No se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de la serotonina ni en las de su metabolito el 5HIAA (Cuadro 5).

A pesar de que no se encontraron diferencias significativas en el contenido de NE (Cuadro 5), se realizaron comparaciones adicionales a una cola de probabilidad entre los grupos (Fig.19 C). Se encontró que los grupos BL y ML no difieren entre sí ($U=362.5$, $p=0.752$), así como el grupo BL y AL ($U=127$, $p=0.090$), a pesar de mostrar una tendencia similar a la observada entre los grupos ML y AL en el que sí se encontraron diferencias significativas ($U=346.0$, $p=0.047$).

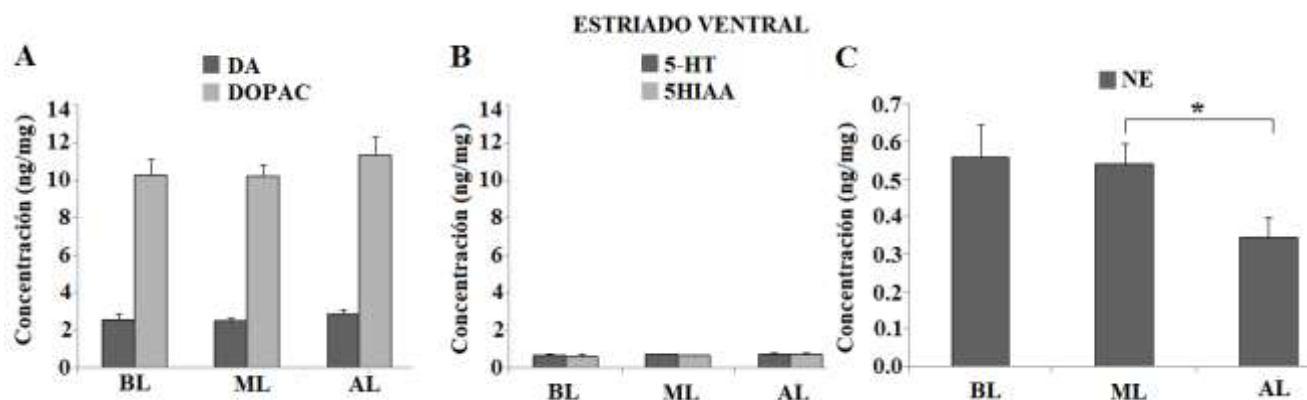


Fig. 19 Concentraciones promedio (\pm error estándar) de algunas monoaminas y sus metabolitos entre grupos de lamido en el estriado ventral, en A) DA y DOPAC B) 5-HT y 5HIAA y en C) NE. Todas las concentraciones se expresan en ng/mg de tejido húmedo, * $p < 0.05$.

Además de los parámetros neuroquímicos anteriormente detallados, se calculó la proporción del peso del cerebro sobre el peso corporal y se analizó su relación con la frecuencia de lamido. Sin embargo, no se observó ninguna correlación significativa entre esas variables ($r=0.17$, $R^2=0.03$, $F_{1,79}=2.491$, $p=0.119$).

3.3 Análisis de correlación entre los parámetros neuroquímicos y conductuales

Relación entre parámetros conductuales

Se analizaron los parámetros que fueron sensibles a las diferencias en el cuidado materno para determinar si existía alguna relación entre ellos, como el tiempo de acicalamiento total en el CA y algunos parámetros del LEC. Al respecto, se encontró una asociación positiva entre el tiempo de acicalamiento en el CA con el tiempo de permanencia en el brazo abierto y la frecuencia de head-dipping en el LEC (Cuadro 6). Además se halló una asociación negativa entre el tiempo de acicalamiento en el CA con el tiempo de permanencia en el brazo cerrado del LEC (Cuadro 6). Curiosamente, el tiempo acicalamiento en el CA también se encontró asociado negativamente con el tiempo de escalamiento en la pre-prueba de nado forzado, siendo la única relación significativa que se

presentó entre los parámetros de nado y el resto de las pruebas (tanto CA como de LEC, Anexo I, Cuadro 2).

Adicionalmente se evaluó en detalle la relación entre el tiempo de acicalamiento con otros parámetros de la prueba de CA como el rearing y el número de cruces. Se encontró una relación negativa y significativa con ambos parámetros (Cuadro 6). Al clasificar el acicalamiento por tipo: secuencial y unitario, se observó que es el acicalamiento de tipo unitario el que presenta una asociación con los parámetros de locomoción como rearing y el número de cruces en la prueba de CA, mientras que la asociación con los parámetros del LEC mencionados anteriormente se dio con el acicalamiento de tipo secuencial (Cuadro 6). En el caso del tiempo de escalamiento en la pre-prueba los dos tipos de acicalamiento presentan una relación significativa de la misma magnitud pero con dirección opuesta, negativa entre el escalamiento y el acicalamiento de tipo secuencial y positiva con el tipo unitario (Cuadro 6). En el anexo 1, Cuadro 1 y 2 se aprecia cómo se relacionan el resto de conductas entre las diferentes pruebas, estas conductas no fueron diferentes entre los grupos de lamido por lo que no se discuten a profundidad, pero fueron consignadas para mostrar los tipos de asociación.

Cuadro 6 Relación entre los tipos de acicalamiento y otros parámetros de las pruebas de CA y LEC (Coeficientes de Spearman, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

Acicalamiento	CA		LEC			Pre-prueba
	Cruces	Rearing(s)	Brazo Cerrado (s)	Brazo Abierto (s)	HEAD-DIPPING	NADO Escalamiento (s)
Secuencial (N=39)†	-0.13	-0.02	-0.28*	0.39**	0.39**	-0.264*
Unitario (N=39)†	-0.30*	-0.42**	-0.09	0.07	0.06	0.264*
Total (N=84)	-0.24*	-0.24*	-0.27**	0.30**	0.27**	-0.265**

†Nota: para el análisis según el tipo de acicalamiento solo habían datos disponibles para los grupos de alto y bajo lamido por eso el cambio en el N.

La relación entre estos parámetros también se evaluó en cada uno de los grupos de lamido para ver si había una asociación diferencial (anexo II). Se encontraron las mismas tendencias solo en ciertos parámetros: como la relación entre el tiempo de acicalamiento en el CA y el tiempo en el brazo abierto del LEC que fue marginalmente positiva en los grupos AL (anexo II: Cuadro 1) y BL (anexo II: Cuadro 3). También la relación entre

acicalamiento en CA y el tiempo de escalamiento en la pre-prueba de nado que solo se encontró en el grupo AL.

Relación entre conducta y neuroquímica

Sobre las conductas sensibles al cuidado se encontró una relación principalmente con el metabolismo de la 5-HT, por ejemplo, el tiempo de acicalamiento en el CA mostró una relación marginal negativa con el contenido de 5HIAA en CP y HP (Cuadro 7). En el caso de los parámetros de LEC se encontraron asociaciones negativas con el metabolito 5HIAA en el EV, con los tiempos y entradas en el brazo abierto y entradas en el brazo cerrado respectivamente (Cuadro 7). Las concentraciones de 5-HT en HP y EV también tuvieron relaciones negativas significativas con el tiempo en el brazo abierto. Curiosamente, la concentración de 5-HT presenta una relación significativa positiva en CP y pero negativa en HP con las entradas al brazo abierto (Cuadro 7). Finalmente, la tasa de recambio de la 5-HT en CP se relacionó de manera negativa con la mayoría de los parámetros de LEC, en HP la tasa de recambio de 5-HT solo se asoció con la frecuencia de head-dipping y en EV solo el tiempo y las entradas en el brazo abierto fueron significativas negativas en caso del primero y positivas con el segundo (Cuadro 7). En último lugar, la única relación que mostró la concentración de DOPAC, fue en la CP con el número de entradas en el brazo abierto del LEC ($r_{84}=-0.16$, $p=0.07$).

Cuadro 7 Coeficientes de Spearman (correlación unilateral) para asociaciones significativas entre las variables conductuales y neuroquímicas.

		5HIAA			5-HT			5HIAA/5-HT			
		CP	HP	EV	CP	HP	EV	CP	HP	EV	
CA	Acicalamiento (s)	-0.170 ^m	-0.164 ^m								
LEC	Área Central (s)									-0.157	
	Brazo cerrado (s)										
	Brazo abierto (s)			-0.287**		-0.207*	-0.207			-0.178	-0.202
	Entradas Brazo cerrado			-0.187							
	Entradas Brazo abierto			-0.280**	0.194	-0.203				-0.253	-0.265**
	Head-dipping									-0.237	0.250

Nota: todas los r en la tabla son significativos con una $p < 0.05$, con excepción de los que tengan un signo: ** $p < 0.01$ ó ^m $p \leq 0.07$. El valor exacto de p se puede encontrar en el anexo III Cuadro 1 y 2 para las pruebas CA y LEC respectivamente.

4. DISCUSIÓN

Para evaluar los efectos del cuidado materno sobre la progenie masculina de ratas Sprague-Dawley (SD) se utilizaron una serie de pruebas conductuales relacionadas con las respuestas ante situaciones de estrés. En la prueba del campo abierto ninguna de las conductas que tradicionalmente son indicadoras de estados ansiosos mostraron diferencias entre los grupos de lamido, como una disminución en el tiempo de permanencia en área central o un aumento en la locomoción. Resultados similares, se reportaron bajo las mismas condiciones previamente (Sequeira *et al.* 2013). De manera similar en ratas Wistar el cuidado materno no afecta la permanencia en el área central del CA (Uriarte *et al.* 2007). En contraste, en ratas Long Evans los grupos de AL presentan mayor tiempo de permanencia en el área central que los de BL (Caldji *et al.* 1998, Francis *et al.* 1999_b, Weaver *et al.* 2006). Esto sugiere, que los efectos del cuidado materno podrían estar afectando de manera diferente según la cepa de ratas estudiada.

Al analizar la locomoción no se encontraron diferencias en los cruces, lo que es poco consistente con lo que se ha reportado para SD, donde el cuidado y la locomoción (número de cruces) han presentado una relación negativa. Es decir a menor cuidado mayor locomoción, lo que ha sido interpretado como un índice de alta ansiedad (Clinton *et al.* 2007, Sequeira *et al.* 2013). Esta diferencia puede deberse a diferencias metodológicas. Por ejemplo, Clinton *et al.* (2007) midieron el cuidado materno en hembras provenientes de individuos seleccionados previamente por su locomoción lo que incrementa las posibles diferencias locomotoras con respecto a poblaciones sin selección sobre este rasgo. En el presente estudio se observó la misma relación negativa (los BL tuvieron más cruces) pero sin lograr alcanzar la significancia estadística que describe Sequeira *et al.* (2013). El que esta diferencia no sea tan clara puede deberse a la alta variabilidad que presenta la cepa SD por su carácter de cepa “exo-criada (outbreed), ya que incluso dentro de las cepa endogámicas se mantiene un alto porcentaje de varianza genética al que algunos investigadores atribuyen la variación entre laboratorios (Smits *et al.* 2004). Lo que presenta la necesidad de evaluar en el futuro la estabilidad de los efectos del cuidado materno en este parámetro.

Por otra parte, en la prueba de campo abierto los animales de AL mostraron mayor duración de acicalamiento que los animales de BL. Interpretar la relación entre el acicalamiento y el estado ansioso de un animal basado solamente en la duración total es difícil dada la complejidad del comportamiento (Bergner *et al.* 2010). Para distinguir entre estas dos hipótesis se hizo un análisis de la microestructura del acicalamiento (determinando las fases presentes y si existía una secuencia rostro-caudal de las fases). Además se analizó la distribución temporal de los eventos de acicalamiento. Se encontró que las diferencias en la duración total del acicalamiento se deben en particular al acicalamiento de tipo secuencial (Fig.12A). El cual aparece después del primer minuto de la sesión. Este tipo de acicalamiento correlacionó positivamente con conductas de poca ansiedad en el LEC y negativamente con el escalamiento que refleja una alta responsividad al estrés en la pre-prueba del nado forzado.

Más aún, según lo planteado anteriormente en la introducción, el que el acicalamiento rostro-caudal esté compuesto por varias fases parece concordar con la hipótesis de acicalamiento por habituación. En este sentido, como sugieren Brenes *et al.* (2006, 2009), acicalamientos con latencias cortas y de mayor duración podrían estar relacionados con un procesamiento más rápido de los ambientes novedosos, especialmente después del primer minuto de la prueba (Brenes *et al.* 2009). Estas diferencias de acicalamiento por habituación, no se ha reportado previamente entre los grupos de alto y bajo lamido.

En el LEC, las ratas de AL presentaron mayor tiempo en las áreas abiertas (brazo abierto y área central) que el grupo de BL, quienes permanecieron más tiempo en los brazos cerrados. Amplia evidencia muestra que existe una asociación positiva entre el tiempo de permanencia en los brazos cerrados y el estado ansioso del animal (Pellow *et al.* 1985, Ohl 2005), este estado ansioso se produce como respuesta a los estímulos estresantes que presenta la prueba como la novedad, los espacios abiertos con más iluminación y la altura (Litvin *et al.* 2008). El grupo de AL también mostró mayor exploración, con más entradas en los brazos abiertos y cerrados que los de BL, lo que de igual forma apoya la interpretación de baja ansiedad en el grupo de AL y que ha sido reportado para grupos de alto lamido en comparación con grupos de bajo utilizando otros protocolos de medición en ratas SD (Cavigelli *et al.* 2010). Resultados similares se han observado también en ratas SD

en estudios de separación maternal (condición similar a la de poco cuidado materno) con respecto a los grupos control (Daniels *et al.* 2004, Ress *et al.* 2006, Park *et al.* 2011).

En este trabajo se evaluaron además otras conductas como el head-dipping, en donde los animales de AL presentaron una mayor frecuencia que los del grupo BL. El aumento de esta conducta se ha asociado tradicionalmente con la exploración del ambiente y bajos niveles de ansiedad del animal (Casarrubea *et al.* 2010, 2013). En general estos resultados apuntan a que el cuidado materno regula en parte la respuesta ansiosa de los animales. Hasta el momento no se habían reportado diferencias en estas conductas, solo se han utilizado medidas espacio-temporales para describir los niveles de ansiedad modulados por el cuidado materno.

Con respecto a la prueba de nado forzado, en los primeros 5 minutos de la pre-prueba el grupo de ML tuvo más escalamiento que el grupo AL, estas diferencias fueron desapareciendo con el tiempo, ya que los análisis de los 15 minutos de la pre-prueba no mostraron diferencias en esta conducta. Esto parece demostrar que podría existir una ventana temporal de sensibilidad en cuanto a los efectos del cuidado materno al analizar los datos de nado forzado en la pre-prueba. Otros estudios en nado han demostrado la sensibilidad de los primeros 5 minutos en diversos tratamientos (Cryan *et al.* 2005b). El mayor escalamiento observado en el grupo de BL puede estar relacionado con la respuesta inmediata al estrés, donde los animales de bajo cuidado son más reactivos que los de alto cuidado durante los primeros minutos frente al estímulo (Brenes y Rodríguez 2004).

Para determinar si el cuidado materno afecta comportamientos involucrados con la desesperanza aprendida, se analizó el segundo ensayo de nado forzado. Sin embargo no se observaron diferencias significativas entre los grupos de lamido en ninguna de las conductas evaluadas en la prueba específicamente. Esto concuerda con estudios en ratas SD (Sequeira *et al.* 2013). Parece ser que el cuidado materno no afecta comportamientos relacionados con la desesperanza aprendida en la cepa SD. Esto contrasta con lo reportado para ratas Long Evans, donde el grupo de AL despliega normalmente una menor inmovilidad en la prueba de nado que los animales de BL (Weaver *et al.* 2005).

Dos hipótesis pueden explicar ésta discrepancia, i) las diferencias genéticas que subyacen a las cepas (López-Rubalcava & Lucki 2000, Jacobson & Cryan 2007) como se viene argumentando y ii) las diferencias por edad, ya que Weaver *et al.* (2005) utilizaron

adultos (DPN-90) mientras que en este estudio se utilizaron juveniles (DNP-32). Hay datos que señalan que la edad es un factor importante que de alguna manera modifica la respuesta en la prueba de nado. En algunos ensayos farmacológicos (por ejemplo, antidepresivos tricíclicos) con sujetos adultos la predictibilidad de los resultados es alta, pero no así si se utilizan juveniles (Reed *et al.* 2008). Reed *et al.* (2008) señalan la importancia de estudiar estados juveniles del desarrollo para poder entender y adaptar la farmacología a casos de depresión en la adolescencia. Por lo anterior, es necesario evaluar a futuro la contribución de cada factor por separado: edad-cepa y la posible interacción entre ellos con el cuidado materno.

En cuanto al análisis neuroquímico en la CP se encontró que los niveles de DOPAC y la tasa de recambio metabólico de serotonina fueron significativamente mayores en el grupo BL que en los animales de AL. Esto sugiere un efecto del cuidado materno en el aumento del metabolismo de las vías de degradación de la dopamina, así como una modulación de la actividad serotoninérgica en esta área. En ratas Long Evans se ha reportado de manera similar, un aumento en los niveles de dopamina y de DOPAC en animales de bajo cuidado en la CP como respuesta a estímulos de estrés (como estímulos de sobresalto por tono) (Zhang *et al.* 2005). También se ha observado que en respuesta a condiciones estresantes el bajo cuidado materno modula aumentos en el sistema serotoninérgico en SD en la CP (Daniels *et al.* 2004, Rees *et al.* 2006) como se observó en la tasa de recambio de serotonina.

La activación de las proyecciones de serotonina a las áreas corticales (corteza prefrontal) y estructuras límbicas (como el hipocampo) se han relacionado con la respuesta ansiosa (ver revisión en Guimarães *et al.* 2008). Estos cambios podrían estar involucrados en la regulación de los comportamientos observados en la prueba de CA y LEC (Joëls & Baram 2009), como también sugieren los resultados de correlación. No obstante, el papel funcional de la neurotransmisión serotoninérgica en las respuestas conductuales es bastante especulativa si se tiene en cuenta la diversidad y la distribución heterogénea de los receptores 5-HT en la CP (Duton & Barnes 2008).

En conclusión, las variaciones del cuidado materno influyen la respuesta ansiosa ante estímulos estresantes pero no afectan los comportamientos de desesperanza aprendida en nado forzado en ratas SD. Relacionado con lo anterior se encontró un aumento de la

actividad serotoninérgica y una mayor degradación de la dopamina en la corteza prefrontal. El orden en particular en que los elementos (neuroquímica y conducta) son modulados por el cuidado, debe ser evaluada en futuros estudios.

Como señalan algunos autores el cuidado materno no es el único factor a considerar (Macri & Würbel 2006, Tang *et al.* 2006, Claessens *et al.* 2011). Como variables importantes que pueden estar interactuando con el cuidado materno en la modulación de los sistemas neuroquímicos y biológicos, se destacaron la edad y la cepa, ambos factores deben ser abordados con mayor sistematización, para determinar su contribución en la hipótesis de mediación del cuidado materno. Finalmente, dado que el cuidado materno influye sobre las respuestas de la progenie ante estímulos estresantes, podría decirse que las conductas maternas son un mecanismo “adaptativo” por el cual las madres pueden ajustar las respuestas de defensa de las crías a futuro (Meaney 2001, Würbel 2001, Macri & Würbel 2007, ver revisión en Cameron *et al.* 2005). Estudios en especies silvestres serían fundamentales para validar esta hipótesis.

REFERENCIAS

- Bagot RC, van Hasselt FN, Champagne DL, Meaney MJ, Krugers HJ, Joëls M. Maternal care determines rapid effects of stress mediators on synaptic plasticity in adult rat hippocampal dentate gyrus. *Neurobiol Learn Mem.* 2009; 92(3):292-300.
- Bakshi VP, Kalin NH. 2002. Animal models and endophenotypes of anxiety and stress disorders. In Davis KL, Charney D, Coyle JT, Nemeroff C (eds). *Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress: An Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology.* American college of neuropsychopharmacology. Lippincott, Williams, & Wilkins, Philadelphia, Pennsylvania, 2010 p.
- Barha C, Pawluski J, Galea L. 2007. Maternal care affects male and female offspring working memory and stress reactivity. *Physiol Behav.*; 92:939–950

- Blanchard, R.J, Blanchard D.C 2008. Defensive behaviors, fear, and anxiety. En Blanchard R.J, Blanchard D.C, Griebel G, Nutt D. Hanbook of anxiety and fear.Vol.17. Elsevier. 518p.
- Brenes JC. Y Rodríguez O. 2004. Estimulación Temprana como un factor de interferencia en el desarrollo de desesperanza conductual medido a través de la prueba de nado forzado, en ratas SDN. Tesis de grado para Licenciatura en Psicología. Universidad Católica de Costa Rica.
- Brenes JC, Rodríguez O, Fornaguera J, 2006. Factor analysis of Forced Swimming test, Sucrose Preference test and Open Field test on enriched, social and isolated reared rats *Behavioural Brain Research*;169: 57–65
- Brenes JC, Padilla M, Fornaguera J. A detailed analysis of open-field habituation and behavioral and neurochemical antidepressant-like effects in postweaning enriched rats. *Behav Brain Res.* 2009; 197(1):125-137.
- Brennan PA, Le Brocque R, Hammen C. 2003. Maternal depression, parent–child relationships, and resilient outcomes in adolescence. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*;42(12):1469–77.
- Burton C, Lovic V, Fleming AS. Early Adversity Alters Attention and Locomotion in Adult Sprague–Dawley Rats. *Behavioral Neuroscience* 2006; 120(3): 665–675
- Caldji C, Tannenbaum B, Sharma S, Francis D, Plotsky P, Meaney M.J. Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of behavioral fearfulness in adult in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998; 95: 5335-5340.
- Caldji C, Diorio J, Meaney M.J. 2000.Variations in maternal care in infancy regulate the development of stress reactivity. *Biol. Psychiatry.*; 48:1164–74.

- Cameron N, Champagne F A., Parent C, Fish E W., Ozaki-Kuroda K, Meaney MJ. 2005. The programming of individual differences in defensive responses and reproductive strategies in the rat through variations in maternal care. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*; 29: 843–865
- Casarrubea M, Sorbera F, Magnusson M, Crescimanno G.2010. Temporal patterns analysis of rat behavior in hole-board. *Behavioural Brain Research*; 208:124–131
- Casarrubea M., Roy V., Sorbera F., Magnusson M.S., Santangelo A., Arabo A., Crescimanno G.2013. Temporal structure of the rat's behavior in elevated plus maze test. *Behavioural Brain Research* 237:290– 299
- Cavigelli S.A, Ragan C.M, Barrett C.E, Michael K.C. 2010. Within-litter variance in rat maternal behavior. *Behav Processes.*; 84:696–704
- Champagne F, Francis F, Mar A, Meaney M.J. 2003. Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. *Physiol. Behav.*; 79: 359– 371.
- Champagne FA, Chretien P, Stevenson CW, Zhang TY, Gratton A, Meaney MJ. 2004. Variations in nucleus accumbens dopamine associated with individual differences in maternal behavior in the rat. *J Neurosci*;24(17):4113–23.
- Champagne, F.A., Meaney, M.J. 2006. Stress during gestation alters postpartum maternal care and the development of the offspring in a rodent model. *Biol. Psychiatry.*; 59, 1227–1235
- Champagne DL, Bagot RC, van Hasselt F, Ramakers G, Meaney MJ, de Kloet ER, ... 2008. Maternal care and hippocampal plasticity: evidence for experience-dependent

structural plasticity, altered synaptic functioning, and differential responsiveness to glucocorticoids and stress. *J Neurosci*;28(23):6037–45.

Champagne F. 2011. Review: Maternal imprints and the origins of variation. *Hormones and Behavior*.; 60: 4–11

Chatterjee D, Chatterjee-Chakraborty M, Rees S, Cauchi J, de Medeiros C.B., Fleming A.S. 2007. Maternal isolation alters the expression of neural proteins during development: „Stroking“ stimulation reverses these effects. *Brain Research*, 1158; 11-27

Claessens SEF, Daskalakis NP, van der Veen R, Oitzl MS, de Kloet ER, Champagne DL. 2011. Development of individual differences in stress responsiveness: an overview of factors mediating the outcome of early life experiences. *Psychopharmacology*;214:141–54.

Clinton SM., Vázquez DM., Kabbaj M, Kabbaj M, Watson SJ, Akil H. 2007. Individual differences in novelty-seeking and emotional reactivity correlate with variation in maternal behavior. *Hormones and Behavior*;51: 655–664

Cryan JF, Markou A and Lucki I. 2002. Assessing antidepressant activity in rodents: Recent developments and future needs. *Trends Pharmacol Sci* 23: 238–245.

Cryan JF, O’Leary OF, Jin SH, Friedland JC, Ouyang M, Hirsch BR, Page ME, Dalvi A, Thomas SA, Lucki I. 2004. Norepinephrine-deficient mice lack responses to antidepressant drugs, including selective serotonin reuptake inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 8186–8191.

Daniels WMU, Pietersen CY, Carstens ME, Stein DJ. 2004. Maternal Separation in Rats Leads to Anxiety-Like Behavior and a Blunted ACTH Response and Altered

Neurotransmitter Levels in Response to a Subsequent Stressor. *Metab Brain Dis*; 19:3-14

Daniels W. M. U, Fairbairn L. R., van Tilburg G., McEvoy C. R. E., Zigmond M. J., Russell V. A., Stein D. J. 2009. Maternal separation alters nerve growth factor and corticosterone levels but not the DNA methylation status of the exon 17 glucocorticoid receptor promoter region. *Metab Brain Dis*; 24:615–627. DOI 10.1007/s11011-009-9163-4

Dutton AC, Barnes NM. 5-Hydroxytryptamine in the Central Nervous System. In: Lajtha A, editor. *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology: Neurotransmitter Systems*, Springer Science Business Media; 2008, p. 171-212.

Engert V, Efanov SI, Dedovic K, Duchesne A, Dagher A, Pruessner JC. Perceived early-life maternal care and the cortisol response to repeated psychosocial stress. *J Psychiatry Neurosci* 2010; 35(6):370-377

Fleming, A.S., Kraemer, G.W., Gonzalez, A., Lovic, V., Rees, S., Melo, A. 2002. Mothering begets mothering: the transmission of behavior and its neurobiology across generations. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 73, 61–75.

Francis D, Caldji C, Champagne F, Plotsky PM, Meaney MJ. 1999a. The role of corticotropin-releasing factor-norepinephrine systems in mediating the effects of early experience on the development of behavioral and endocrine responses to stress. *Biological Psychiatry*;46(9):1153–66.

Francis D, Diorio J, Liu D., Meaney M J. 1999b. Nongenomic Transmission Across Generations of Maternal Behavior and Stress Responses in the Rat. *Science, New Series*;286 (5442): 1155-1158

Francis D.D 2000. Early environmental regulation of adult stress responses and maternal care. *Disertación de tesis doctoral*, McGill University, Montreal, Canadá.

- Francis D., J. Diorio, P.M. Plotsky & M.J. Meaney. 2002. Environmental Enrichment Reverses the Effects of Maternal Separation on Stress Reactivity. *J. Neurosci.* 22(18):7840–7843.
- Fulford A.J y Harbuz M.S. 2005. An introduction to the HPA axis. En T. Steckler, N.H. Kalin and J.M.H.M. Reul (Eds.), págs 43-66. *Handbook of Stress and the Brain*, Vol. 15. Elsevier.
- Guimarães FS, Padua-Carobrez A y Graeff FG. 2008. Modulation of anxiety behaviors by 5-HT-interacting drugs. In Blanchard R.J, Blanchard D.C, Griebel G, Nutt D. *Handbook of anxiety and fear*. Vol.17. Elsevier. 518p
- Hall C.S. 1934. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *J. Comp. Psychol.* 18: 385–403
- Harlow H.F, Harlow K.. 1966. La privación social en los monos. En *Selecciones de Scientific American:Psicobiología Evolutiva*. 129-137. Fontanela. España.
- Hascoët M. and Bourin M. The Mouse Light–Dark Box Test. En Gould T.D. (ed.), *Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice*, *Neuromethods*. 2009; 42. DOI 10.1007/978-1-60761-303-9_11, ^a Humana Press, a part of Springer ScienceþBusiness Media, LLC
- Ho, WF, Princhar E, Stuart B. 2000. *Training Guide: High Performance Liquid Chromatography*. LCG Teddington.UK.
- Holmes A, Rodgers RJ. 1999. Influence of spatial and temporal manipulations on the anxiolytic efficacy of chlordiazepoxide in mice previously exposed to the elevate plus- maze. *Neuroscience Behavioral Review*, 23:971-980.

- Jacobson L. H. Cryan J.F. Feeling Strained? Influence of Genetic Background on Depression-Related Behavior in Mice: A Review. *Behav Genet.* 2007; 37:171–213. DOI 10.1007/s10519-006-9106-3
- Joëls M, Baram T. The neuro-symphony of stress. *Nat Rev Neurosci.* 2009; 10(6): 459–466. DOI:10.1038/nrn2632.
- Kaplan L, Evans L, Monk C. 2008. Effects of mothers' prenatal psychiatric status and postnatal caregiving on infant biobehavioral regulation: can prenatal programming be modified? *Early Hum Dev*;84:249–56.
- Kalueff, A. & P. Tuohimaa. 2005. The grooming analysis algorithm discriminates between different levels of anxiety in rats: potential utility for neurobehavioural stress research. *Journal of Neuroscience Methods.* 143: 169-177.
- Kiernan J.A. 2013. En <http://instruct.uwo.ca/anatomy>. Visitada el 12 de julio de 2013.
- Komorowska, J. & W. Pisula. 2003. Does changing levels of stress affect the characteristics of grooming behavior in rats?. *International Journal of Comparative Psychology.* 16: 237-246.
- Levine S. 2005a. Stress" an historical perspective. En T. Steckler, N.H. Kalin and J.M.H.M. Reul (Eds.), págs 3-24. *Handbook of Stress and the Brain*, Vol. 15. Elsevier.
- Levine S. 2005b. Developmental determinants of sensitivity and resistance to stress. *Psychoneuroendocrinology*; 30:939–946
- Liu D, Diorio J, Tannenbaum B, Caldji C, Francis D, Freedman A, Sharma S, Pearson D, Plotsky PM, Meaney MJ. 1997. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science* 277:1659–1662

- Litvin Y, Pentkowski NS, Pobbe R, Blanchard DC, Blanchard R.J. 2008. Unconditioned models of fear and anxiety. In Blanchard R.J, Blanchard D.C, Griebel G, Nutt D. Handbook of anxiety and fear. Vol.17. Elsevier. 518p.
- López-Rubalcava, C, Lucki, I. Strain Differences in the Behavioral Effects of Antidepressant Drugs in the Rat Forced Swimming Test. *Neuropsychopharmacology*. 2000 Feb;22(2):191-9
- Macri S, Wurbel H. 2006. Developmental plasticity of HPA and fear responses in rats: a critical review of the maternal mediation hypothesis. *Horm Behav*;50:667–80.
- Malkesman O, Lavi-Avnon Y, Maayan R, Weizman A. 2008. A cross-fostering study in a genetic animal model of depression: Maternal behavior and depression-like symptoms. *Pharmacol. Biochem. Behav.*; 91: 1–8.
- Maximino C, Marques de Brito T, Gouveia A. Construct validity of behavioral models of anxiety where experimental psychopathology meets ecology and evolution. *Psychology & Neuroscience*. 2010; 3(1): 117-123.
- McEwen, B. 2000. Stress, definition and concepts of. In: Fink, G. (Ed.), *Encyclopedia of Stress* (508-509), Vol. 3. Academic Press, San Diego, USA.
- Meaney MJ, Aitken DH. 1985. The effects of early postnatal handling on hippocampal glucocorticoid receptor concentrations: temporal parameters. *Brain Res* 354:301–304
- Meaney, MJ, Diorio J, Francis D, Widdowson J, LaPlante P, Caldji C, Sharma S, Seckl J.R. Plostky PM. 1996. Early environmental regulation of forebrain glucocorticoid receptor gene expression: Implications for adrenocortical responses to stress. *Development Neuroscience*, 18:49-72

- Meaney MJ. 2001. Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Annual Review of Neuroscience*;24:1161–92.
- Meaney MJ, Brake W, Gratton A. Environmental regulation of the development of mesolimbic dopamine systems: a neurobiological mechanism for vulnerability to drug abuse? *Psychoneuroendocrinology* 2002; 27: 127–138
- Montgomery KC (1955) The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. *J Comp Physiol Psychol* 48:254–260
- Montgomery KC, Monkman JA (1955) The relation between fear and exploratory behavior. *J Comp Physiol Psychol* 48:132–136
- Myers M.M, Brunelli S.A, Squire J.M., Shindeldecker R.D, Hofer M.A. Maternal behaviour of SHR rats and its relationship to offspring blood pressure. *Develop. Psychobiol.* 1989; 22 (1): 29–53
- Ohl F. Animal models of anxiety. *Handb Exp Pharmacol.* 2005;169:35-69.
- Olfert ED, Cross BM, McWilliam AA, Estol L, Dugas R, Roach L, Demers G. 1998. Manual sobre el cuidado y uso de los animales de experimentación. Consejo Canadiense de Protección de los Animales.
- Otoni, E. EthoLog 2.2: A tool for the transcription and timing of behavior observation sessions. *Behavior Research Methods, Instruments, & Computers.* 2000. 32 (3): 446-449
- Parent C, Zhang T, Caldji C, Bagot R, Champagne F.A, Pruessner J, Meaney M. J.2005. Maternal Care and Individual Differences in Defensive Responses. *Current directions in Psychological Sciences*, 14(5):229-233

- Park HJ, Park HJ, Chae Y, Kim JW, Lee H, Chung JH. Effect of Acupuncture on Hypothalamic–Pituitary–Adrenal System in Maternal Separation Rats. *Cell Mol Neurobiol*, 2011; 31:1123–1127
- Pellow, S., P. Chopin, S.E.File, M. Briley. 1985. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*. 14 (3):149–167
- Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M. Depression: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*. 1977;266:730–2.
- Priebe K, Brake WG, Romeo RD, Sisti HM, Mueller A, McEwen BS, Brake WG. 2005. Maternal influences on adult stress and anxiety-like behavior in C57BL/6J and BALB/cJ mice: a cross-fostering study. *Dev Psychobiol*;47(4):398–407.
- Pryce C.R, Bettschen D, Feldon J. 2001. Comparison of the Effects of Early Handling and Early Deprivation on Maternal Care in the Rat. *Dev Psychobiol*.;38(4):239-251
- Pryce C.R, Feldon J. 2003. Long-term neurobehavioural impact of the postnatal environment in rats: manipulations, effects and mediating mechanisms. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*; 27: 57–71
- Ramos A and Mormede P. Stress and Emotionality: a Multidimensional and Genetic Approach. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 1998; 22 (1): 33–57
- Rodgers R.J, Johnson N.T. 1995. Factor analysis spatio temporal and ethological measures in the murine elevated plus maze test of anxiety. *Pharmacology Biochemical Behavior*; 52: 297-303

- Roy V, Chapillon P, Jeljeli M, Caston J, Belzung C. 2009. Free versus forced exposure to an elevated plus-maze: evidence for new behavioral interpretations during test and retest. *Psychopharmacology*; 203:131–141. DOI 10.1007/s00213-008-1378-2
- Reed A.L, Happe H. K, Petty F, Bylund D.B. Juvenile rats in the forced-swim test model the human response to antidepressant treatment for pediatric depression. *Psychopharmacology*. 2008; 197:433–441 DOI 10.1007/s00213-007-1052-0
- Rees SL, Steiner M, Fleming AS. Early deprivation, but not maternal separation, attenuates rise in corticosterone levels after exposure to a novel environment in both juvenile and adult female rats. *Behav Brain Res*. 2006; 175: 383–391
- Sequeira-Cordero A, Masís-Calvo M, Mora-Gallegos A, Fornaguera-Trías J. Maternal behavior as an early modulator of neurobehavioral offspring responses by Sprague-Dawley rats. *Behavioural Brain Research*, 2013; 237:63– 70.
- Smits B.M.G, van Zutphen B.F.M, Plasterk R.H.A. , Cuppen E. 2004. Genetic Variation in Coding Regions Between and Within Commonly Used Inbred Rat Strains. *Genome Research*, 14:1285–1290 <http://www.genome.org/cgi/doi/10.1101/gr.2155004>.
- Smit-Rigter L.A, Champagne D, van Hooft J.A. 2009. Lifelong Impact of Variations in Maternal Care on Dendritic Structure and Function of Cortical Layer 2/3 Pyramidal Neurons in Rat Offspring. *PLoS ONE* 4(4): e5167. doi:10.1371/journal.pone.0005167
- Tang AC, Akers KG, Reeb BC, Romeo RD, McEwen BS.2006. Programming social, cognitive, and neuroendocrine development by early exposure to novelty. *PNAS*; 103(42): 15716–21.

- Uriarte N, Breigeiron MK, Benetti F, Rosa XF, Lucion AB. Effects of maternal care on the development, emotionality, and reproductive function in male and female rats. *Dev Psychobiol* 2007; 49 (5):451–62.
- Van Erp, A.M., M. Kruk, W, Meelis & D. Willekens-Bramer. 1994. Effect of environmental stressors on time course, variability and form of self-grooming in the rat: handling, social contact, defeat, novelty, restraint and fur moistening. *Behavioural Brain Research*. 65: 47-55
- Vivinetto A.L, Suárez M.M, Rivarola M.A. Neurobiological effects of neonatal maternal separation and post-weaning environmental enrichment. *Behav Brain Res*. 2012: 1(240):110-118. DOI: 10.1016/j.bbr.2012.11.014.
- Wang L, Jiao J, Dulawa S. 2011. Infant maternal separation impairs adult cognitive performance in BALB/cJ mice. *Psychopharmacology*; 216:207–218. DOI 10.1007/s00213-011-2209-4
- Weaver I, La Plante P, Weaver S, Parent A, Sharma S, Diorio J, ... Meaney, M.J. 2001. Early environmental regulation of hippocampal glucocorticoid receptor gene expression: characterization of intracellular mediators and potential genomic target sites. *Mol Cell Endocrinol*; 185:205–18.
- Weaver IC, Cervoni N, Champagne FA, D'Alessio AC, Sharma S, Seckl JR, ..., Meaney M.J. 2004. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat Neurosci*; 7(8):847–54.
- Weaver IC, Champagne FA, Brown SE, Dymov S, Sharma S, Meaney MJ, Szyf M. 2005. Reversal of maternal programming of stress responses in adult offspring through methyl supplementation: altering epigenetic marking later in life. *J Neurosci*; 25(47): 11045–54.

- Weaver I.G.C, Meaney MJ, Szyf M. 2006. Maternal care effects on the hippocampal transcriptome and anxiety-mediated behaviors in the offspring that are reversible in adulthood. PNAS; 103(9): 3480–3485.
www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0507526103
- Weaver IC, D'Alessio AC, Brown SE, Hellstrom IC, Dymov S, Sharma S, Szyf M, Meaney MJ. 2007. The transcription factor nerve growth factor-inducible protein mediates epigenetic programming: altering epigenetic marks by immediate-early genes. *Journal of Neuroscience*; 27(7):1756–68.
- Zhang TY, Chrétien P, Meaney MJ, Gratton A. 2005. Influence of naturally occurring variations in maternal care on prepulse inhibition of acoustic startle and the medial prefrontal cortical dopamine response to stress in adult rats. *J Neurosci*; 25(6): 1493–502.
- Zhang TY, Hellstrom IC, Bagot RC, Wen X, Diorio J, Meaney MJ. 2010. Maternal care and DNA methylation of a glutamic acid decarboxylase 1 promoter in rat hippocampus. *Journal of Neuroscience*; 30(39):13130–7.

ANEXO I DESCRIPCIÓN DE LAS CONDUCTAS DE LA MADRE

Nota: ninguna de las conductas es excluyente entre sí.

Ubicación de la madre según el nido: Dentro y Fuera. El nido se define como acumulaciones de material (burucha autoclavada) en un mismo sitio, puede adquirir forma ovalada o ser irregular. Tiene una leve depresión en donde se encuentran las crías. En ocasiones se observa una especie de “pared” formada del mismo material. Algunas veces esta pared es muy evidente y rodea a una cavidad que puede ser lo suficientemente alta como para esconder a las crías (Rees *et al.* 2005). En el caso de existir dos o más acumulaciones de crías se tomarán mediciones con respecto a un “nido principal”, el cual es el que cumpla con las anteriores características y en el que se encuentre el mayor número de crías. Si no hay diferencia en el número de crías, se tomará la ubicación desde el primer nido donde se observó a la madre. En los casos donde la totalidad de las crías no estén visibles (es decir estén enterradas por la burucha) solo se tomará como nido si se observa a la madre seguir construyéndolo y se percibe movimiento de las crías bajo la burucha.

Contacto madre- crías Se considera en: momentos de lactancia, lamido hacia las crías y el colocarse sobre las crías para darles calor. Es independiente de la ubicación con respecto al nido.

Lamer (Licking): La madre lame a las crías, este puede ser corporal o anogenital.

Postura de Lactancia será registrada cuando las crías estén conectadas a los pezones de la madre y será anotado como alguna de estos tipos de posturas:

- *Arqueada* (Arched-nursing, Fig. A) será registrada cuando la madre se encuentre arqueada sobre las crías con las cuatro patas extendidas. Se observa un arco en la columna y se requiere de esfuerzo para mantener la posición. Esta posición permite a las crías lactar de forma más eficiente.
- *Cubriendo a las crías* (Blanket-nursing, Fig.B) será registrada cuando la madre esté sobre la camada, pero no presente un arco evidente en su espalda y no haya extensión obvia de sus patas.

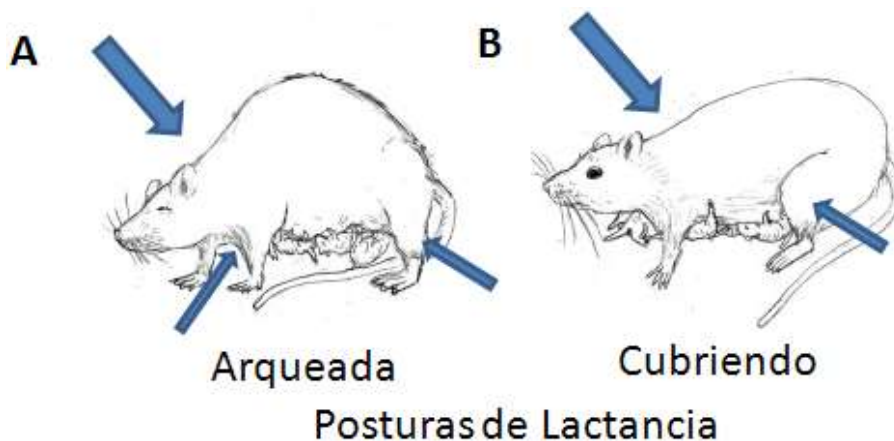


Fig. Posturas de lactancia en ratas, en A) Arqueada y en B) Cubriendo. Note las flechas superiores denotan el arco en la espalda o su ausencia, así como la posición de las extremidades, extendidas con espacio amplio entre las patas delanteras no así en la segunda. Modificado de Cummings *et al.* 2010.

- *Postura pasiva* será registrada cuando la madre sea observada recostada (de lado o de espaldas) con una o varias crías, las ocasiones en que la madre descansa boca abajo pegada al suelo y las crías se meten de lado bajo de ella. También cuando las crías estén lactando y la madre realice alguna de las conductas no dirigidas hacia las crías que se listan más adelante.

Número de crías fuera del nido: crías solas o grupos de crías fuera del nido.

Conductas de la madre Auto-dirigidas:

- *Comer o beber* la ingesta de alimento, agua.
- *Acicalarse (Grooming)* cuando la madre en cualquier ubicación dentro de la caja realiza cualquiera de las 4 fases de grooming morro, cabeza y orejas, torso y zona anogenital (referencia)
- *Explorar elevándose en dos patas (Rearing)*, elevación del torso y la cabeza en un ángulo mayor a los 30°, apoyando en ocasiones las patas delanteras contra alguna superficie vertical.
- *Explorar con olfateo sobre la superficie (Sniffing)*, el individuo se encuentra horizontal, el ángulo de la cabeza no se eleva por encima del eje corporal y realiza constantes olfateos con movimientos laterales de la cabeza sin desplazamiento alguno.
- *Descansar:* posición relajada, ojos cerrados, inmovilidad.

Cummings J.A., Clemens L.G., Nunez A.A. 2010. Mother counts: How effects of environmental contaminants on maternal care could affect the offspring and future generations. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 31(4): 440-451

Anexo II HOJA DE REGISTRO

Proyecto Cuidado materno Animal: _____ PND: _____ Periodo: _____ Fecha: _____ Temp: _____ °C _____ % Obs: _____

Conducta	✓	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	T
Ubicación madre, según nido	Dentro																										
	Fuera																										
Contacto madre con crías	Sí																										
	No																										
Lamer																											
Postura de Lactancia																											
Arqueada																											
Cubriendo																											
Pasiva																											
Madre come/bebe																											
Auto Acicalamiento																											
Rearing																											
Sniffing																											
Madre duerme																											
N° crías fuera dl nido																											
Comportamiento insólito																											
1) Sacar crías del nido																											
2) Retrieving																											
3) Construcción del nido																											
4) Destrucción del nido																											

Observaciones:

ANEXO III: Relación entre los parámetros conductuales de las diferentes pruebas.

Cuadro 1 Coeficiente de correlación de Spearman (correlación unilateral) entre las principales variables conductuales de CA y LEC (N=84)

		LEC						
		Tiempo de permanencia (s)			Entradas		Head-dipping	
		Área Central	Brazo cerrado	Brazo abierto	Brazo cerrado	Brazo abierto		
CA	Entradas AC	r	.266**	-.297**	.170	.216*	.171	.066
		p	.007	.003	.061	.024	.060	.275
	Tiempo de permanencia en AC	r	.130	-.182*	.144	.156	.171	.057
		p	.119	.049	.095	.079	.060	.304
	Cruces	r	-.162	.118	-.161	-.163	-.167	-.175
		p	.070	.143	.072	.069	.064	.055
	Rearing (frecuencia)	r	.072	-.106	-.037	.003	.007	.076
		p	.257	.169	.369	.488	.475	.247
	Rearing (tiempo)	r	.005	-.076	-.055	-.025	-.040	.020
		p	.482	.245	.311	.411	.360	.430

Cuadro 2 Coeficiente de correlación de Spearman entre las variables conductuales de la prueba de PNF con las prueba de CA y LEC respectivamente (N=84)

Tiempo conducta (s)		CA					LEC						
		Área Central (f)	Área Central (s)	Cruces	Rearing	Acicalam. (s)	Área Central	Brazo Cerrado (s)	Brazo Abierto (s)	Brazo Cerrado (f)	Brazo Abierto (f)	HEAD	
PRE-PRUEBA	Inmovilidad	r	-.052	-.131	-.144	-.167	.163	.019	.016	.108	.074	.093	.158
		p	.319	.118	.096	.064	.070	.431	.444	.163	.252	.199	.076
	Nado	r	.030	.084	.082	.108	-.054	-.007	-.021	-.088	-.089	-.063	-.158
		p	.392	.223	.230	.164	.314	.476	.426	.214	.210	.283	.076
	Escalamiento	r	.000	.110	.155	.153	-.265**	-.048	-.006	-.080	-.027	-.121	-.093
		p	.499	.159	.079	.082	.007	.332	.480	.236	.403	.137	.201
PRUEBA	Inmovilidad	r	.051	-.084	-.083	-.117	.006	.066	-.005	.073	.019	.021	.065
		p	.321	.224	.227	.146	.480	.276	.484	.255	.431	.424	.279
	Nado	r	-.043	.046	.093	.119	.015	-.055	-.018	-.021	-.063	.025	-.024
		p	.349	.340	.199	.141	.447	.310	.437	.425	.285	.411	.414
	Escalamiento	r	.099	.097	.049	.090	.102	.101	-.162	.026	.150	.083	.037
		p	.186	.189	.330	.209	.177	.180	.070	.407	.086	.227	.368