



Universidad Autónoma del Estado de México
Facultad de Ciencias

**Cambios en la conducta de interacción social y expresión
de c-Fos en el cerebro social de ratas adultas Wistar
inducidos por la privación del cuidado materno**

TESIS

que para obtener el título de Bióloga presenta:

Sara Mejía Chávez

Director:

Dr. Arturo Venebra Muñoz

Toluca, Estado de México, junio 2020

La presente tesis fue financiada por el proyecto PRODEP UAEM-CA-264.



ÍNDICE

1	ABREVIACIONES.....	6
2	RESUMEN	8
3	ABSTRACT	10
4	INTRODUCCIÓN	12
5	ANTECEDENTES	15
5.1	EL CEREBRO SOCIAL.....	15
5.1.1	<i>Procesamiento de información social.....</i>	<i>15</i>
5.1.2	<i>Intersección del cerebro social con el sistema de recompensa</i>	<i>16</i>
5.1.3	<i>Memoria social.....</i>	<i>18</i>
5.1.4	<i>Sociabilidad.....</i>	<i>20</i>
5.2	NEUROENDOCRINOLOGÍA DEL ESTRÉS.....	22
5.3	ESTRÉS EN EL DESARROLLO TEMPRANO Y PROCESAMIENTO DE RECOMPENSAS.....	24
5.4	PRIVACIÓN DEL CUIDADO MATERNO	25
5.5	CONDUCTA SOCIAL Y PRIVACIÓN DEL CUIDADO MATERNO.....	27
5.6	ESTUDIO DE ACTIVIDAD NEURONAL.....	28
5.6.1	<i>c-fos como indicativo de actividad cerebral reciente.....</i>	<i>30</i>
5.6.2	<i>IHC: método para la detección de moléculas específicas.....</i>	<i>31</i>
6	JUSTIFICACIÓN	34
7	HIPÓTESIS	35
8	OBJETIVOS	35
8.1	GENERAL.....	35
8.1.1	<i>Específicos</i>	<i>35</i>
9	MATERIALES Y MÉTODOS	36
9.1	ANIMALES EXPERIMENTALES: ALOJAMIENTO Y MANIPULACIÓN.....	36
9.1.1	<i>Grupos experimentales</i>	<i>37</i>
9.2	ESTÍMULOS Y PRUEBAS	37
9.2.1	<i>Privación del cuidado materno</i>	<i>37</i>
9.2.2	<i>Área de prueba.....</i>	<i>38</i>
9.2.3	<i>Habitación al área de prueba.....</i>	<i>38</i>
9.2.4	<i>Prueba de investigación social</i>	<i>39</i>
9.2.5	<i>Registro de peso</i>	<i>39</i>
9.3	PROCEDIMIENTO PARA LOS GRUPOS EXPERIMENTALES.....	40
9.3.1	<i>Cuidado Materno – Ninguna Prueba.....</i>	<i>40</i>
9.3.2	<i>Cuidado Materno–Novedad Social</i>	<i>40</i>
9.3.3	<i>Separación Materna–Ninguna Prueba.....</i>	<i>41</i>
9.3.4	<i>Separación Materna–Novedad Social.....</i>	<i>41</i>

9.4	ANÁLISIS DE CONDUCTA	42
9.5	PREPARACIÓN DE TEJIDO HISTOLÓGICO	44
9.5.1	<i>Perfusión transcardial y extracción del cerebro</i>	44
9.5.2	<i>Crioprotección de tejido nervioso</i>	44
9.5.3	<i>Obtención de cortes coronales de cerebro</i>	45
9.5.4	<i>Inmunohistoquímica</i>	47
9.5.5	<i>Montaje de cortes en laminillas</i>	47
9.6	CUANTIFICACIÓN DE NEURONAS INMUNOREACTIVAS A C-FOS	48
10	RESULTADOS	51
10.1	CONDUCTA.....	52
10.2	INMUNORREACTIVIDAD DE C-FOS EN EL CEREBRO SOCIAL.....	53
10.2.1	<i>Amígdala</i>	53
10.2.2	<i>Núcleo paraventricular del hipotálamo</i>	54
10.2.3	<i>Septum lateral</i>	55
10.2.4	<i>Núcleo accumbens</i>	56
10.2.5	<i>Corteza prefrontal medial</i>	57
11	DISCUSIÓN.....	58
11.1	CONDUCTA.....	58
11.1.1	<i>Investigación social</i>	58
11.1.2	<i>Acicalamiento</i>	59
11.2	INMUNOREACTIVIDAD A C-FOS EN EL CEREBRO SOCIAL.....	59
11.2.1	<i>Amígdala</i>	59
11.2.2	<i>Septum lateral</i>	60
11.2.3	<i>Núcleo paraventricular del hipotálamo</i>	61
11.2.4	<i>Núcleo accumbens</i>	61
11.2.5	<i>Corteza prefrontal medial</i>	62
12	CONCLUSIONES.....	64
13	REFERENCIAS.....	65

1 ABBREVIACIONES

- ☞ **ACTH** (*adrenocorticotropic hormone*): hormona adrenocorticotrópica.
- ☞ **AO** (*anterior olfactory nucleus*): núcleo olfatorio anterior.
- ☞ **AOB** (*accessory olfactory bulb*): bulbo olfatorio accesorio.
- ☞ **AVP** (*arginine vasopressin*): vasopresina.
- ☞ **BDNF** (*brain derived neurotrophic factor*): factor neurotrófico derivado del cerebro.
- ☞ **BLA** (*basolateral amygdala*): amígdala basolateral.
- ☞ **BNST** (*bed nucleus of the stria terminalis*): núcleo cama de la estría terminalis.
- ☞ **CA1, CA2, CA3** (*cornu Ammonis 1, 2 or 3*): cuerno de Amón 1, 2 o 3 del hipocampo.
- ☞ **CeA** (*central amygdala*): amígdala central.
- ☞ **CRH** (*corticotropin releasing hormone*): hormona liberadora de corticotropina.
- ☞ **DNA** (*deoxyribonucleic acid*): ácido desoxirribonucleico.
- ☞ **EC** (*entorhinal cortex*): corteza entorrinal.
- ☞ **ELS** (*early life stress*): estrés durante la vida temprana.
- ☞ **GPCR** (*G protein coupled receptors*): receptores acoplados a proteínas G.
- ☞ **GR** (*glucocorticoid receptor*): receptor a glucocorticoides.
- ☞ **HPA** (*hypothalamic-adrenomedular axis*): eje hipotalámico-hipofisiario-adrenal.
- ☞ **IEG** (*immediate early genes*): genes de expresión inmediata.
- ☞ **IHC** (*immunohistochemistry*): inmunohistoquímica.
- ☞ **LS** (*lateral septum*): septum lateral.
- ☞ **MeA** (*medial amygdala*): amígdala medial.
- ☞ **MeApd** (*posterodorsal medial amygdala*): amígdala medial posterodorsal.
- ☞ **MeApv** (*posteroventral medial amygdala*): amígdala medial posteroventral.
- ☞ **MOB** (*main olfactory bulb*): bulbo olfatorio principal.
- ☞ **MOE** (*main olfactory epithelium*): epitelio olfatorio principal.
- ☞ **mPFC** (*medial prefrontal cortex*): corteza prefrontal medial.
- ☞ **MR** (*mineralocorticoid receptor*): receptor a mineralocorticoides.
- ☞ **NAc** (*nucleus accumbens*): núcleo accumbens.
- ☞ **NAcCo** (*nucleus accumbens core*): núcleo accumbens core.
- ☞ **NAcSh** (*nucleus accumbens shell*): núcleo accumbens shell.
- ☞ **NB** (*nucleus basalis*): núcleo basal.

- 🦉 **OB** (*olfactory bulb*): bulbo olfatorio.
- 🦉 **OXT** (*oxytocin*): oxitocina.
- 🦉 **PirC** (*piriform cortex*): corteza piriforme.
- 🦉 **PVN** (*paraventricular nucleus of the hypothalamus*): núcleo paraventricular del hipotálamo.
- 🦉 **SHRP** (*stress-hyporesponsive period*): periodo de hiporespuesta al estrés.
- 🦉 **VA** (*vomeronasal amygdala*): amígdala vomeronasal.
- 🦉 **VMH** (*ventromedial hypothalamus*): hipotálamo ventromedial.
- 🦉 **VNO** (*vomeronasal organ*): órgano vomeronasal.
- 🦉 **VP** (*ventral pallidum*): pálido ventral.
- 🦉 **VTA** (*ventral tegmental area*): área tegmental ventral.

2 RESUMEN

Numerosas especies animales dependen de las interacciones sociales entre conespecíficos para su desarrollo adecuado y sobrevivencia. Además, deben procesar correctamente la información social y exhibir las conductas adecuadas para todos los contextos sociales. Se ha demostrado que la exposición a un entorno adverso durante la vida temprana aumenta el riesgo de desarrollar trastornos con déficits en el dominio social. En roedores, el ambiente postnatal temprano está fuertemente determinado por las interacciones entre la madre y sus crías, y la privación del cuidado materno es un evento adverso en la vida temprana ya que induce estrés en las crías.

Estudios han demostrado que la privación del cuidado materno interrumpe con el desarrollo adecuado del cerebro y modifica la conducta social de los individuos en la edad adulta. Sin embargo, existe la necesidad de una mayor comprensión de los mecanismos neuronales que subyacen los cambios en la conducta social inducidos por la privación del cuidado materno. En un estudio previo observamos que, durante la juventud, las interacciones sociales novedosas son un estímulo más recompensante que otros estímulos como la novedad ambiental y la familiaridad social, ya que induce un aumento en la expresión de c-Fos en algunos núcleos del sistema dopaminérgico como el VP y NAc, y en el PVN.

Con base en las observaciones anteriores, se diseñó un experimento que consistió privar a ratas del cuidado materno y exponerlas a la novedad social en la edad adulta para evaluar la expresión de c-Fos en áreas cerebrales involucradas en el procesamiento de información social y núcleos del sistema de recompensa. Las áreas cerebrales evaluadas fueron la BLA, MeA, LS, PVN, NAc y mPFC. Además del análisis histológico, también se evaluó la conducta de los individuos durante la exposición a la novedad social.

Las ratas privadas del cuidado materno pasaron menos tiempo investigando al conespecífico desconocido, lo que sugiere que la separación maternal reduce la motivación por la socialización. Con respecto a la inmunoreactividad de c-Fos en el cerebro social y los núcleos del sistema de recompensa, se observó una reducida expresión de c-Fos en la MeA, BLA, LS, NAc y mPFC en los individuos privados del cuidado materno. No se encontraron diferencias en la actividad del PVN entre individuos privados y no privados del cuidado materno expuestas a la novedad social.

Los resultados del presente trabajo demuestran que, en la edad adulta, la privación del cuidado materno reduce la motivación por socializar con individuos novedosos, y que reduce la actividad de áreas cerebrales involucradas en procesamiento de información social y recompensas. Para explicar la igualdad de la actividad del PVN de ratas privadas y no privadas del cuidado materno, se requeriría un análisis más detallado en cual se distingan las diferentes poblaciones neuronales de este núcleo.

3 ABSTRACT

Numerous animal species depend on social interactions between conspecifics for their proper development and survival. Furthermore, they must correctly process social information and exhibit the appropriate behaviors for all social contexts. The exposure to an adverse environment during early life has been shown to increase the risk of developing disorders with deficits in the social domain. In rodents, the early postnatal environment is strongly determined by interactions between the mother and her offspring, and deprivation of maternal care is an adverse event in early life since it induces stress in the offspring.

Studies have shown that maternal separation interrupts the proper development of the brain and modifies social behavior of individuals later in life. However, there is a need for a further understanding of the neural mechanisms underlying changes in social behavior induced by maternal care separation. In a previous study, we observed that during youth, novel social interactions are a more rewarding stimulus compared with other stimuli such as environmental novelty and social familiarity, since it induces an increase in the expression of c-Fos in some nuclei of the dopaminergic system, such as the VP and NAc, and PVN.

Based on the previous observations, an experiment that consisted of depriving rats of maternal care and exposing them to social novelty in adulthood to evaluate the expression of c-Fos in brain areas involved in the processing of social information and nuclei of the reward system was designed. The evaluated brain regions were the BLA, MeA, LS, PVN, NAc and mPFC. In addition to the histological analysis, the behavior of individuals during social novelty exposure also was evaluated.

Maternally separated rats exposed to social novelty spent less time investigating the novel peer, suggesting that maternal care separation reduces social approach motivation. Regarding the immunoreactivity of c-Fos in the social brain and nuclei of the reward system, there was a blunted expression of c-Fos in the MeA, BLA, LS, NAc and mPFC of maternally separated individuals. No differences in the activity of the PVN were found between maternally and non-maternally separated rats exposed to social novelty.

The results of the present work show that, in adulthood, maternal care separation reduces social approach motivation and reduces the activity of brain areas involved in social information processing and reward. To explain the equality of the activity of the PVN of maternally and non-maternally separated rats, a more detailed analysis would be required in which the different neuronal populations of this nucleus are distinguished.

4 INTRODUCCIÓN

El cuidado materno juega un papel importante en el desarrollo adecuado del cerebro (Champagne et al., 2003). Estudios han demostrado que el modelo animal llamado *privación o separación materna*, que consiste en separar a las crías de su madre por un determinado tiempo durante los primeros días postnatales, tiene un profundo impacto en el desarrollo del cerebro, de tal manera que afecta la maduración de regiones cerebrales involucradas en funciones cognitivas y afectivas (McEwan, 2000; Becker et al., 2007). El cerebro de los roedores es particularmente sensible al estrés postnatal, particularmente durante los días 1 a 14, ya que durante este periodo maduran los sistemas encargados de la regulación de las respuestas al estrés, denominado periodo SHRP (Levine, 1994; Schmidt et al., 2003; Schmidt et al., 2005). Durante este período, existe una mínima capacidad de respuesta al estrés que conduce a una ventana para la poda sináptica y la formación de una red funcional de regiones cerebrales críticas que median y regulan la respuesta al estrés en la edad adulta (Levine, 2002).

La madre despliega hacia su descendencia conductas como la estimulación táctil, el amamantamiento y el contacto pasivo madre-cría, que son esenciales para mantener la corteza adrenal inactiva y reducir su sensibilidad a los corticoides, y así reducen o inhiben la actividad de las estructuras involucradas en la activación de las respuestas al estrés (Levine, 2001; Vetulani, 2013). Algunos estudios han demostrado que estrés por privación del cuidado materno, especialmente durante el período SHRP, conduce al aumento de los niveles de corticoides en la sangre y a la hiperactividad de los sistemas encargados de la regulación de la respuesta al estrés durante la edad adulta (Lui et al., 1997; Liu et al., 2000), como consecuencias de cambios sinápticos en las redes neuronales que afectan la maduración de regiones cerebrales que forman parte de los sistemas de estrés y áreas críticas para las funciones cognitivas (Brock et al., 2005).

El estrés durante etapas de desarrollo temprano conduce a una alta densidad dendrítica en la mPFC (Ovtscharoff y Braun, 2001) y al aumento en el volumen de la amígdala (Lupien et al., 2011; Koe et al., 2016). Por otra parte, existe evidencia que indica que ratas adultas privadas del cuidado materno presentan una disminución en la expresión de BDNF en la mPFC, en el NAcc y en la región CA1 del hipocampo, y es a través de los cambios en la expresión del BDNF que la

privación materna induce cambios en la densidad dendrítica y número de espinas dendríticas en la mPFC y amígdala (Wang et al., 2015).

Estos resultados implican que la privación de la madre puede tener efectos a largo plazo en regiones involucradas en la toma de decisiones y en la maduración del sistema dopaminérgico; dos regiones cuyo funcionamiento puede influir considerablemente en la expresión conductual, ya que conductas complejas que involucran un determinado grado de control cognitivo o regulación emocional requieren de la actividad coordinada de múltiples regiones cerebrales. Por lo tanto, los cambios en las redes neuronales inducidos por privación materna podrían manifestarse como trastornos del estado de ánimo y deficiencias cognitivas en la edad adulta (Newport et al., 2002). Se ha demostrado que ratas privadas del cuidado materno muestran deficiencias en las funciones afectivas, aumento de conductas relacionadas a la ansiedad, (Aisa et al., 2007; Huot et al., 2001; Salm et al., 2004; Wigger y Neumann, 1999) depresión (Ladd et al., 2000; Asia et al., 2007) y aumento de conductas anhedónicas (Huot et al., 2001), también se han reportado déficits cognitivos en tareas de memoria y reconocimiento (Asia et al., 2007; Garcia et al., 2013).

En relación con la conducta social, específicamente en el juego, se ha reportado que por privación del cuidado materno induce un incremento en las conductas agresivas en las peleas de juego, tanto en jóvenes como adultas (Veneema y Neumann, 2009), lo que sugiere que las experiencias negativas durante el desarrollo temprano tienen consecuencias negativas sobre la forma en la que los individuos socializan en la edad adulta. Por otra parte, algunos trabajos han reportado que la privación del cuidado materno reduce el tiempo en el cual los individuos socializan con un conoespecífico desconocido (Lukas et al., 2011; Girardi et al., 2014; Lee et al., 2019; Houwing et al., 2019). Sin embargo, los trabajos mencionados se han enfocado únicamente a la conducta, por lo que existe la necesidad de una mayor comprensión de los cambios neuronales que subyacen los cambios en la conducta social inducidos por la privación del cuidado materno.

En un trabajo previo realizado por nuestro grupo de investigación, se observó que existe un aumento en la actividad de núcleos hipotalámicos y del sistema dopaminérgico tras la exposición a la novedad social en individuos jóvenes (Gómez-Gómez et al., 2019). Debido a que el cuidado materno juega un rol primordial en la maduración de estas regiones, este estudio se centró en

evaluar la actividad de las regiones cerebrales involucradas en el procesamiento de la información social durante un encuentro social novedoso en ratas adultas privadas del cuidado materno.

5 ANTECEDENTES

5.1 El cerebro social

Brothers (1990) propuso que existen áreas cerebrales encargadas de procesar información de tipo social. La evidencia para esta proposición provino de estudios en animales en los cuales manipuló algunas áreas del cerebro y cuyas consecuencias fueron alteraciones en la conducta social. Investigadores en el campo de la neurociencia que pretenden comprender las bases neuronales la conducta social, desde la detección y el procesamiento de la información social hasta su integración y regulación, han denominado al conjunto de áreas involucradas en este proceso como *cerebro social* (Insel y Fernald, 2004). En esta red el procesamiento de información social pasa por diversas etapas en las cuales están involucradas diversas áreas cerebrales y neurotransmisores (O'Connell y Hoffman 2011; Love, 2013).

5.1.1 *Procesamiento de información social*

En roedores, y en la gran mayoría de los mamíferos, la información social es detectada y procesada por el sistema olfatorio, que está compuesto por diferentes subsistemas, de los cuales resaltan el MOE y el VNO (Shepard, 2006; Kobayakawa et al., 2007) (*figura 1*). El MOE detecta moléculas volátiles por medio de GPCR en neuronas sensoriales que proyectan a las células mitrales del MOB (Vassar et al., 1994). De esta área la información es enviada a través de las células mitrales que extienden sus axones por el trayecto olfatorio lateral al AO, amígdala, tubérculo olfatorio, PirC y EC (Baum y Kelliher, 2009).

Moléculas odoríferas emitidas por otros conespecíficos, como las feromonas, son disueltas en la mucosa nasal y detectadas por receptores V1 y V2 expresados por neuronas sensoriales que se encuentran en el epitelio del VNO (Thorne y Amrein, 2003), que proyectan a las células mitrales del AOB, de ahí estas células extienden sus axones a la VA y BNST, y de estas áreas, la información es enviada al hipotálamo (Mohedano-Moriano et al., 2008). Se ha sugerido que las interacciones entre los subnúcleos de la amígdala y el VMH son cruciales para la regulación diferencial entre conductas agresivas y reproductivas (Choi et al., 2005).

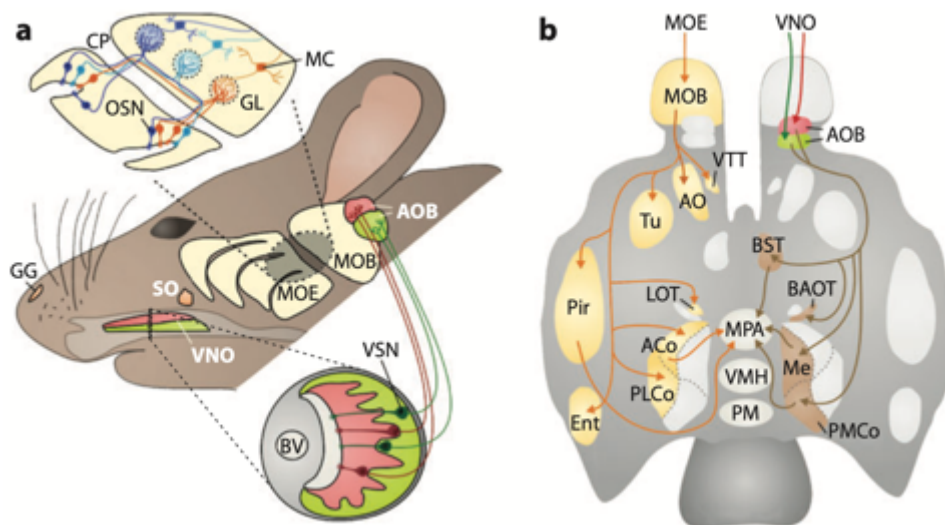


Figura 1. Proyecciones MOE y VNO. a) Neuronas olfatorias sensoriales (OSN) en el MOE proyectan a través del plato cribiforme (CP) a los glomérulos (GL) del MOB; OSN's (morado, azul y naranja) que expresan los mismos receptores convergen en un solo glomérulo en el MOB; células mitrales (MC) del MOB extienden dendritas apicales a los GL y extienden sus axones al cerebro anterior. Las neuronas sensoriales vomeronasales (VSN) proyectan al AOB; VSN's en la zona apical del VNO (rojo, izquierda) proyectan al AOB rostral; VSN's en la zona basal del VNO (verde, derecha) proyectan al AOB caudal. BV, vaso sanguíneo; GG, ganglio de Brueneberg; SO, órgano septal. b) Proyecciones del MOB (naranja, izquierda) y el AOB (marrón, derecha) al cerebro anterior. VTT, venia tectal ventral; AO, núcleo olfatorio anterior; Tu, tubérculo olfatorio; Pir, corteza piriforme; Ent, corteza entorrinal; LOTE, núcleo del tracto olfatorio lateral; ACo, amígdala cortical anterior; PLCo, amígdala cortical posterolateral; BST, núcleo cama de la estría terminal; BAOT, núcleo del lecho del tracto olfatorio accesorio; Me, amígdala medial; PMCo, amígdala cortical posteromedial; MPA, área preóptica medial; VMH, hipotálamo ventromedial; PM, núcleo premammilar. Tomado de Baum y Kelliher (2009).

5.1.2 Intersección del cerebro social con el sistema de recompensa

El circuito de conducta social comparte múltiples conexiones con núcleos que pertenecen al sistema de recompensa, por lo que la información puede ser fácilmente transferida entre estas redes, de tal manera que forman otra red encargada de la toma de decisiones y motivación social (O'Connel y Hoffman, 2011) (*figura 2*). Dos nodos entre el circuito de conducta social y el sistema mesocorticolímbico de recompensa BNST, VTA y LS. El BNST que está implicado en conductas reproductivas, la agresión y el cuidado materno, comparte conexiones con la amígdala y el hipotálamo, y puede generar efectos excitatorios de larga duración sobre neuronas dopaminérgicas del VTA (Love, 2013).

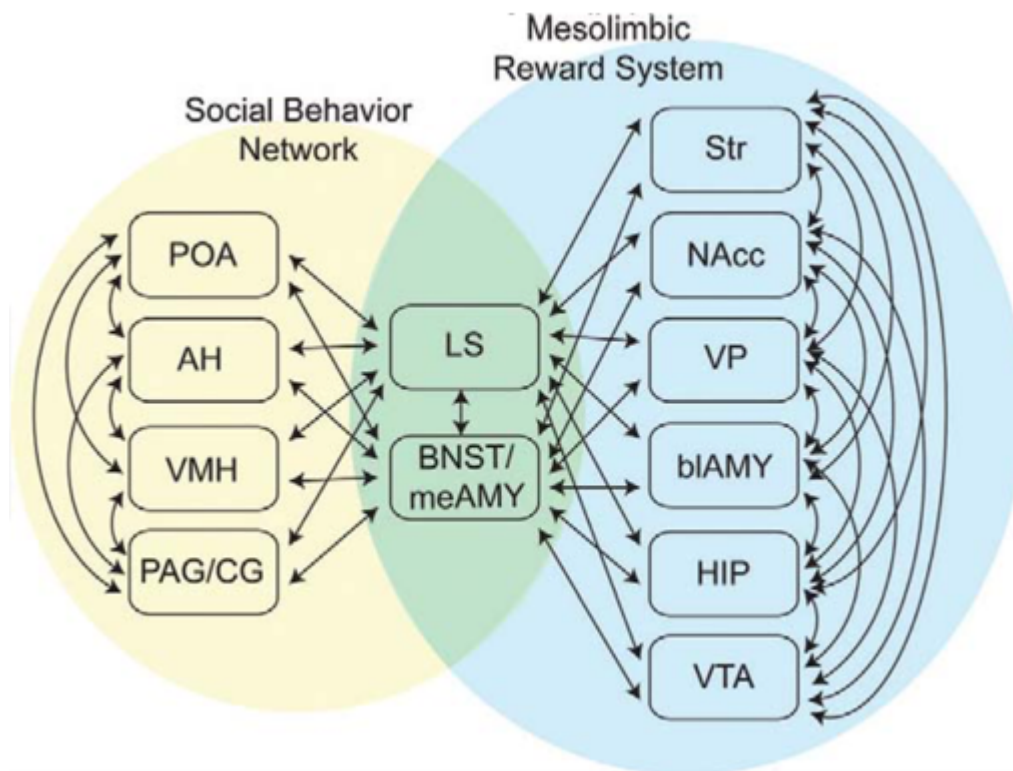


Figura 2. Nodos que conectan el circuito de conducta social y el sistema mesolímbico de recompensa. A la izquierda se muestran las áreas cerebrales que forman parte de la red de conducta social, y a la derecha las áreas cerebrales que forman parte del sistema mesolímbico de recompensa. Al centro se muestran algunos de los núcleos que conectan el circuito de conducta social y el sistema mesolímbico de recompensa. Las flechas indican conexiones anatómicas entre estas regiones del cerebro dentro de cada sistema en mamíferos. Área preóptica (POA); hipotálamo anterior (AH); sustancia gris periacueductal (PAG/CG); amígdala medial (meAMY); Str (estriado); amígdala basolateral (blAMY); hipocampo (HIP); núcleo accumbens (NAcc). Tomada de O'Connell y Hoffman (2011).

Las neuronas dopaminérgicas del VTA tienen un papel importante en la evaluación de la prominencia de señales provenientes del ambiente y en la señalización de eventos motivacionales, proyectan al NAc y liberan dopamina en esta área en respuesta a estímulos específicos (O'Connell y Hoffman, 2011; Love, 2013). El hecho de que la información social también sea procesada por el sistema de recompensa implica que se les otorga valores emocionales a los estímulos sociales.

5.1.3 Memoria social

Todas las relaciones sociales dependen de la habilidad de un organismo para recordar a conespecíficos, por lo tanto, la memoria social es esencial para la reproducción, defensa y el establecimiento de jerarquías entre individuos (Ferguson et al., 2001). La memoria social refleja diferentes procesos cognitivos y conductuales, como la capacidad de reconocer un conspecífico familiar o novedoso, conocido como reconocimiento o memoria social, o la capacidad de aprender de otros, conocido como aprendizaje social (van der Kooij y Sandi, 2012). En el laboratorio, la memoria social en roedores puede ser evaluada midiendo la reducción en el tiempo de investigación entre conespecíficos familiares en relación con conespecíficos novedosos (Ferguson et al., 2001), y ha demostrado que los individuos son capaces de distinguir entre conespecíficos familiares y novedosos.

Los neuropéptidos OXT y AVP juegan un papel importante en la expresión de diferentes conductas sociales como el establecimiento de lazos afectivos, memoria social, la agresión, y reproducción (Ferguson et al., 2001; Lukas et al., 2011). En relación a la memoria social, estudios han demostrado que la liberación de AVP en el LS y OXT en la MeA es esencial para su consolidación (Lukas et al., 2011; Veneema et al., 2012; Ferguson et al., 2001); cuando se bloquean los receptores a AVP en el LS y ratas *knock out* a OXT son incapaces de discriminar entre un individuo familiar y desconocido, y cuando se administra OXT y AVP en la MeA y LS respectivamente, se restaura la memoria social (Lukas et al., 2011; Veneema et al., 2012; Ferguson et al., 2001).

El hipocampo es la principal área relacionada a la memoria, donde la información es procesada por la vía trisináptica clásica; señales procedentes de la corteza entorrinal son enviadas al giro dentado, y de ahí la información es enviada a CA3 y luego a CA1 (Kandel et al., 2000). Hasta hace pocos años se desconocía acerca del rol de CA2, incluso era considerada como extensión de CA3; sin embargo, investigaciones recientes la han definido como una región distinta a CA1 y CA3, ya que posee sets únicos de aferencias y eferencias corticales, además de que participa en diferentes procesos cognitivos (Tzakis y Holahan, 2019).

En un estudio en el cual se realizaron hibridación *in situ* en cerebros de roedores para detectar la expresión del gen *Avpr1b* en el hipocampo, reportó que había una mayor expresión de *Avpr1b* en células piramidales de CA2, por lo que sugieren que CA2 desempeña un papel en la formación o recuperación de memoria social, de manera similar en que las células piramidales de CA1 y CA3 establecen recuerdos sobre el espacio (Young et al., 2006). Para conocer más acerca del rol de CA2 en la memoria social, Smith et al. (2016) emplearon optogenética para excitar terminales de neuronas vasopresinérgicas del PVN en CA2 durante la adquisición de memoria social, y observaron que los roedores presentaban una mejor memoria social cuando se produjo la estimulación óptica durante la adquisición de la memoria. Estos resultados sugieren que la estimulación de las terminales de neuronas vasopresinérgicas del PVN que inervan CA2 juegan un rol importante en el establecimiento de memoria social (Smith et al 2016), y que la vía hipotalámica-CA2 depende de la señalización por AVPR1b (Young et al., 2006).

La idea de que la región CA2 puede integrar señales olfativas con encuentros sociales para crear una respuesta apropiada se hace evidente al considerar las entradas directas que recibe CA2. Por un lado, CA2 recibe información no espacial de la EC (Chevalleyre y Siegelbaum, 2010; Kohara et al., 2014; Dudek et al., 2016). La EC recibe información del OB y la PirC, ambas áreas que procesan información olfatoria (Boeijinga y van Groen, 1984). Además, CA2 es la única región del hipocampo que recibe inputs vasopresinérgicos del PVN y LS, que parecen ser cruciales para mediar la conducta social (Cui et al., 2013; Zhang y Hernández, 2013). Por lo tanto, se piensa que CA2 incorpora la información procedente de las áreas mencionadas, para crear trazos de memoria que dependen del olor del individuo.

Aunque se le ha prestado más atención a CA2 en el establecimiento de memoria social, se ha reportado que esta área no es la única responsable del establecimiento de este tipo de memoria, ya que CA1 y CA3 también juegan un rol en la consolidación de la memoria social (Okumaya et al., 2016; Chiang et al., 2018; Meira et al., 2018). Interesantemente Okumaya et al. 2016, demostraron que un set de neuronas de CA1 ventral proyectan al NAc y son importantes para la memoria social. El hecho de que la información social es transmitida al NAc, un área importante en el circuito neuronal de recompensa sugiere que se le otorga un valor hedónico a la información social que puede reforzar la motivación por las interacciones sociales.

5.1.4 Sociabilidad

La sociabilidad o motivación social es definida como la disposición por interactuar con otro conespecífico (Chevallier et al., 2012). Los roedores tienen un repertorio amplio de conductas sociales y demuestran una fuerte sociabilidad. Se han establecido varios métodos para medir la sociabilidad de los roedores de manera sencilla, que incluye la interacción social recíproca, el juego social juvenil y las pruebas de interacciones sociales de tres cámaras (Kim et al., 2019). Estudios han mostrado que los roedores prefieren los estímulos sociales en comparación con objetos y ambientes novedosos ya que pasan más tiempo con los conespecíficos, y que los roedores jóvenes pasan más tiempo socializando y buscan interacciones sociales novedosas con más frecuencia que los individuos adultos (Smith et al., 2015).

La mayoría de los estudios enfocados al estudio de interacciones sociales novedosas evalúan el juego o agresión social. En relación con el juego social, se ha demostrado que el NAc tiene un rol importante durante el despliegue de esta conducta, y que su actividad es influenciada por dopamina, serotonina, AVP, OXT y opiodes (Dölen et al., 2003; Trezza et al., 2011). La dopamina en este núcleo juega un papel importante en los procesos de recompensa, como la motivación de incentivos. Manduca et al. (2016) investigaron el rol de la dopamina en el NAc en el juego social en ratas, y reportaron que la administración del liberador de dopamina en el NAc aumentó la conducta social, mientras que el bloqueo de receptores a dopamina redujo la conducta social e impidió los efectos potenciadores del juego por la estimulación de receptores a endocannabinoides y opioides. Estos hallazgos demuestran un importante papel modulador de la dopamina en el NAc en el juego social. Por lo tanto, la actividad funcional de dopamina en la vía mesolímbica juega un papel importante en el desarrollo social adaptativo, mientras que la función anormal de dopamina en el NAc puede ser la base de los impedimentos sociales (Manduca et al., 2016).

Existen pocos estudios que han evaluado la actividad del cerebro ante la novedad social (Varlinskaya et al., 2013; Dölen et al., 2013; Kim et al., 2015). En un estudio reciente (Gómez-Gómez et al., 2019) reportamos que la novedad social durante la juventud es más recompensante en comparación con otros estímulos, como la familiaridad social y la exposición ambiental novedosa, ya que induce la activación de un mayor número de neuronas en el NAc y en otros núcleos como el VP y PVN que forman parte del sistema de recompensa (*figura 3*). Otros Estudios

sugieren que neuronas oxitocinérgicas y vasopresinérgicas del PVN que proyectan directamente al NAc pueden regular la actividad de este núcleo, por medio de receptores a OXT y/o AVP cuya activación puede inducir plasticidad en sinapsis excitatorias para regular la actividad del NAc durante encuentros sociales para establecer vínculos sociales entre individuos (Dölen et al., 2013).

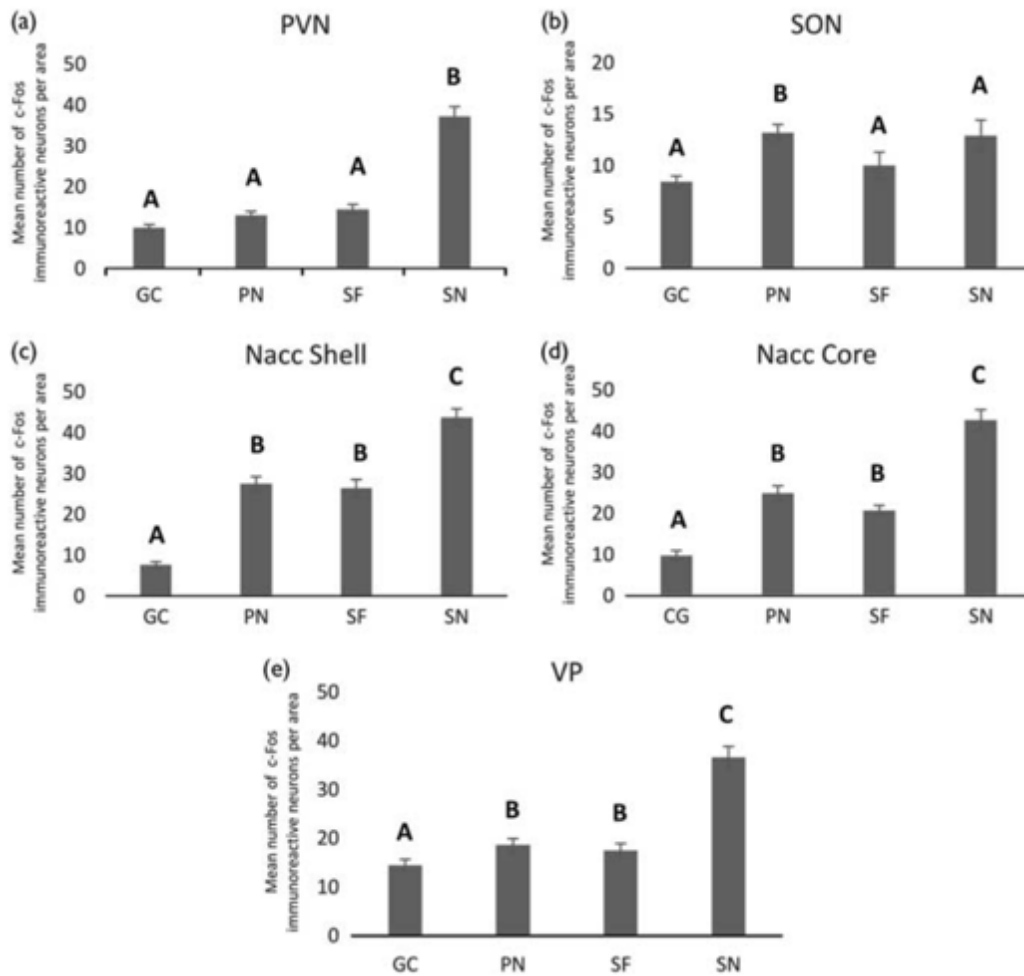


Figura 3. Las gráficas muestran el promedio de neuronas inmunoreactivas a c-Fos en el núcleo paraventricular (PVN), núcleo supraóptico (SON), núcleo accumbens shell y core (Nacc Shell y Nacc Core) y pálido ventral (VP) de ratas expuestas a diferentes estímulos: grupo control (CG), novedad ambiental (PN), familiaridad social (SF) y novedad social (SN). Letras indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos. Tomada de Gómez-Gómez et al. (2019).

5.2 Neuroendocrinología del estrés

Se conoce como estrés a cualquier estímulo intrínseco o extrínseco que evoca una respuesta biológica producida por la alteración de la homeostasis celular, teniendo consecuencias fisiológicas y psicológicas en el individuo (Yaribeygi et al., 2017; Cibrian et al., 2018). El término “estrés” fue acuñado por Hans Selye (Szabo et al., 2012) quien postuló una hipótesis conocida como la hipótesis del balance del receptor a corticosteroides (en inglés conocida como “*CoRe Balance Hypothesis*”) la cual explica la actividad balanceada de glucocorticoides y sus receptores en la adaptación al estrés y mantenimiento de la homeostasis (de Kloet, 2016).

La activación de la respuesta biológica al estrés, conocida como “*fight and flight response*”, lleva al organismo fuera de su balance homeostático por un determinado tiempo, e involucra la activación de tres sistemas interrelacionados. Primero, el estresor debe ser percibido por sistemas sensoriales que dependen de varios circuitos neurales que involucran a la amígdala, tálamo, hipotálamo, neocorteza, corteza límbica, y algunos núcleos del tronco encefálico como el locus caeruleus. Segundo, cuando un desafío estresante es detectado, se activa el sistema nervioso autónomo que a través del sistema simpático adrenomedular desencadena la liberación de catecolaminas, noradrenalina y adrenalina; y tercero, se activa el HPA que resulta en la liberación de glucocorticoides, cortisol y corticosterona. Una vez que el organismo ya no detecta la amenaza o estresor, regresará a su condición homeostática (de Kloet, 2016; Phillips et al., 2006; Lupien et al., 2015).

La activación del eje HPA, comienza cuando el PVN libera la hormona liberadora de CRH y AVP. Esto provoca la liberación de ACTH de la adenohipófisis, lo cual lleva a la producción de glucocorticoides por la corteza adrenal. La activación de este sistema es, en parte, determinada por los glucocorticoides que regulan la liberación de ACTH y CRH mediante la unión de dos receptores a corticosteroides. Una vez que el estresor percibido ha disminuido, se activan mecanismos de retroalimentación en varios niveles del sistema con el fin de regresar el HPA a su punto de partida homeostático (Lupien et al., 2015) (*figura 4*).

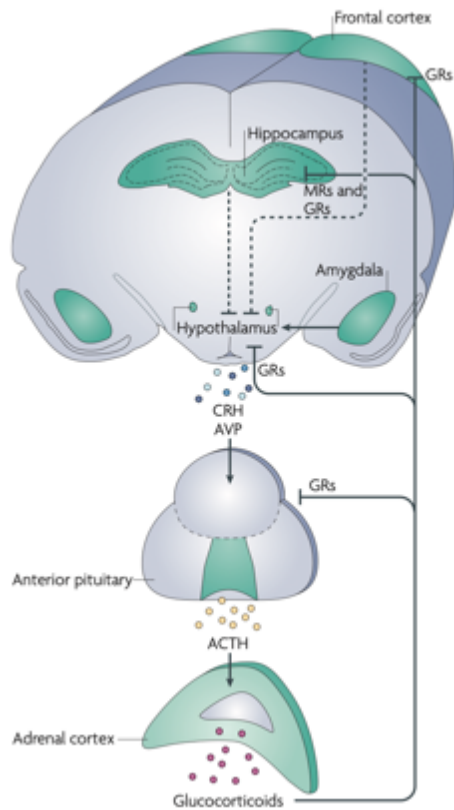


Figura 4. Activación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal. El HPA se activa cuando el cerebro detecta una amenaza; las neuronas parvocelulares del núcleo paraventricular del hipotálamo liberan CRH y AVP. Esto desencadena la subsecuente secreción de ACTH de la glándula pituitaria, lo que conduce a la producción de glucocorticoides por la corteza suprarrenal. La capacidad de respuesta del eje HPA al estrés está determinada en parte por la capacidad de los glucocorticoides para regular la liberación de ACTH y CRH mediante la unión a dos receptores de corticosteroides, el GR y MR. Después de la activación del sistema, y una vez que el estresante percibido ha disminuido, se activan bucles de retroalimentación en varios niveles del sistema como la amígdala, hipocampo y corteza. Tomada de Lupien et al. (2015).

Por otra parte, el hipocampo, el hipotálamo y la amígdala, también están involucrados en la regulación de la respuesta biológica al estrés. El hipocampo, por exhibir una alta densidad de receptores a glucocorticoides, juega un papel prominente en la regulación de la activación del HPA; mediante un mecanismo de retroalimentación negativa inhibe la actividad del PVN y por lo tanto regula la liberación de CRH y AVP. En contraste, la amígdala, principal área involucrada en el procesamiento del miedo, activa el HPA para activar la respuesta conocida como estrés (Phillips et al., 2006).

Además de regular la actividad del HPA, la amígdala también altera el procesamiento de información en sistemas corticales involucrados en la atención y percepción, por lo que influye en funciones cognitivas (Silveira et al., 2018). Esto lo hace por medio de proyecciones directas a la corteza sensorial y por medio del NB que recibe aferencias CeA y proyecta a regiones en la corteza encargadas de procesar información sensorial. Así, la amígdala permite el procesamiento preferencial de estímulos emocionales asegurando que la información relevante para el organismo pueda influir sobre su comportamiento (Walker y Davis, 2008).

En relación con lo anterior, el BNST que recibe proyecciones de la BLA, proyecta al hipotálamo y áreas del tallo cerebral encargadas de la modulación de respuestas autónomas ante estímulos nocivos (Walker et al., 2003). Si bien, son distintas áreas cerebrales involucradas en la regulación de la respuesta biológica al estrés, son la naturaleza y el contexto de la experiencia lo que determina la conectividad del circuito neuronal para llevar a cabo el procesamiento de la información en situaciones adversas (Chaaya et al., 2018).

5.3 Estrés en el desarrollo temprano y procesamiento de recompensas

René Árpád Spitz (1887-1974) fue un psicoanalista austriaco-americano reconocido por sus observaciones y experimentos basados en los hallazgos psicoanalíticos de Freud, los cuales aplicó para la investigación empírica en infantes (Spitz y Wolf, 1946). Sus contribuciones más reconocidas en el campo del psicoanálisis provienen de sus estudios en los que evaluó los efectos de la privación materna y emocional. Spitz describió el fenómeno de *depresión anaclítica* en niños institucionalizados; los niños privados del contacto social eventualmente aparecerían retraídos emocionalmente y mostrarían un desarrollo físico y emocional deteriorado (Spitz y Wolf, 1946; Sapolsky, 2004). Desde ese entonces se han realizado numerosos estudios que han evaluado las consecuencias de las experiencias adversas durante etapas de desarrollo temprano sobre la salud.

Desde la perspectiva neurobiológica, uno de los efectos más conocidos sobre las experiencias adversas durante etapas de desarrollo, como la exposición al ELS, es la alteración del HPA (Stüber et al., 2014). Numerosos estudios han demostrado que la exposición al ELS induce cambios en los sistemas neuroendócrinos responsables de la regulación de la respuesta al estrés (Lupien et al., 2015), incrementando la probabilidad de los individuos de presentar alguna psicopatología como el trastorno depresivo mayor (Heim y Binder, 2012), ansiedad (Phillips et al., 2005), abuso de drogas (Andersen y Teicher, 2008), trastornos psicóticos (Varese et al., 2012) y de personalidad (Ball and Links, 2009), déficit de atención o hiperactividad (Harold et al., 2013). Sin embargo, la psicopatología puede depender del tipo del ELS (Dennison et al., 2017), la ventana de desarrollo en la que el individuo fue expuesto al ELS (Andersen et al., 2008), así como la carga genética y cambios epigenéticos y los factores de protección (Caspi et al., 2003; Palma-Gudiel y Fañanás, 2016).

Se ha hipotetizado que interrupciones en el procesamiento de recompensas puede ser afectado por la exposición al ELS (Luking et al., 2016), dado que induce cambios en las propiedades microestructurales de las regiones relacionadas con la recompensa dentro del cerebro en desarrollo (Dennison et al., 2017), además de que los receptores para glucocorticoides se encuentran a lo largo del sistema de recompensa del cerebro, y su activación o bloqueo afecta la neurotransmisión y por ende conductas sensibles a la recompensa (Bryce y Floresco, 2016; Craenenbroeck et al., 2005; Walsh et al., 2014). Esta superposición entre los sistemas encargados de la regulación de la respuesta al estrés y el sistema de recompensa sugiere que cualquier cambio en la neurobiología del estrés probablemente influya en el procesamiento de recompensas.

5.4 Privación del cuidado materno

Durante su vida temprana los mamíferos pasan gran parte del tiempo con su madre y la separación de la madre es un evento que induce estrés y afecta su conducta y fenotipo neuroquímico en la adultez. El modelo animal llamado privación o separación materna consiste en separar a las crías de su madre por un determinado tiempo durante etapas de desarrollo temprano, tiene un profundo impacto en el desarrollo del cerebro, de tal manera que afecta la maduración de regiones cerebrales involucradas en funciones cognitivas y afectivas (McEwan, 2000, Wang et al., 2004 Becker et al., 2007). El cerebro de los roedores es particularmente sensible al estrés postnatal, en particular de los días 1 a 14, ya que durante este periodo se da la ontogenia de los sistemas encargados de la regulación de las respuestas al estrés, conocido como SHRP (Levine, 1994; Schmidt et al., 2003; Schmidt et al., 2005). Durante este período, existe una mínima capacidad de respuesta al estrés que conduce a una ventana para la poda sináptica y la formación de una red funcional de regiones cerebrales críticas que median y regulan la respuesta al estrés en la edad adulta (Levine, 2002).

Durante el periodo SHRP, la madre despliega hacia su descendencia algunas conductas como: la estimulación táctil, que es capaz de revertir la mayoría de los cambios que ocurrieron en el cerebro después de un período de privación materna; la alimentación, que es esencial para mantener la corteza adrenal inactiva y reducir su sensibilidad a los corticoides; y el contacto pasivo madre-cría, que suprime la respuesta del HPA ante una situación de estrés. Estas conductas juegan un

papel importante en la regulación de la respuesta al estrés, de tal manera que reducen o inhiben la actividad de las estructuras involucradas en su generación (Levine, 2001; Vetulani, 2013).

Algunos estudios han demostrado que estrés por privación del cuidado materno, especialmente durante el período SHRP, conduce al aumento de los niveles de corticoides en la sangre y a la hiperactividad de los sistemas encargados de la regulación de la respuesta al estrés durante la edad adulta (Liu et al., 2000). Estos cambios son principalmente las consecuencias de cambios sinápticos en las redes neuronales que afectan la maduración de regiones cerebrales críticas para las funciones cognitivas (Brock et al., 2005). El estrés durante etapas de desarrollo temprano conduce a una alta densidad dendrítica en la mPFC (Ovtscharoff y Braun, 2001) y al aumento en el volumen de la amígdala (Lupien et al., 2011; Koe et al., 2016). Por otra parte, existe evidencia que indica que ratas adultas privadas del cuidado materno presentan una disminución en la expresión del BDNF en la mPFC, en el NAc y en CA1, y es a través de los cambios en la expresión del BDNF que la privación materna induce cambios en la densidad dendrítica y número de espinas dendríticas en la mPFC y amígdala (Wang et al., 2015).

Estos resultados implican que la privación de la madre puede tener efectos a largo plazo en regiones involucradas en la toma de decisiones y en la maduración del sistema dopaminérgico; dos regiones cuyo funcionamiento puede influir considerablemente en la expresión conductual, ya que conductas complejas que involucran un determinado grado de control cognitivo o regulación emocional requieren de la actividad coordinada de múltiples regiones cerebrales. Por lo tanto, los cambios en las redes neuronales inducidos por privación materna podrían manifestarse como trastornos del estado de ánimo y deficiencias cognitivas en la edad adulta (Newport et al., 2002). Se ha demostrado que ratas privadas del cuidado materno muestran deficiencias en las funciones afectivas, aumento de conductas relacionadas a la ansiedad, (Aisa et al., 2007; Huot et al., 2001; Salm et al., 2004; Wigger y Neumann, 1999) depresión (Ladd et al., 2000; Asia et al., 2007) y aumento de conductas anhedónicas (Huot et al., 2001), también se han reportado déficits cognitivos en tareas de memoria y reconocimiento (Asia et al., 2007; Garcia et al., 2013).

5.5 Conducta social y privación del cuidado materno

Existen pocos estudios que han evaluado los efectos de la privación del cuidado materno y la conducta social, y los trabajos que se han realizado han sido sobre el juego, memoria e investigación social (Veneema y Neumann, 2009; Lukas et al., 2001; Veneema et al., 2012). En relación con el juego social, es decir, aquel dirigido a conespecíficos, se ha observado que ratas jóvenes y adultas privadas del cuidado materno presentan un incremento en las conductas agresivas en las *peleas de juego*, tales como aumento en el número de ataques hacia la nuca del oponente, mayor frecuencia de mordidas hacia el oponente y exhiben en menor frecuencia conductas características del *juego sumiso* (Veneema y Neumann, 2009) (*figura 5*). Este estudio sugiere que las experiencias negativas como la exposición al estrés durante etapas de desarrollo temprano alteran la forma en la cual los individuos enfrentan conflictos sociales en distintas etapas de la vida.

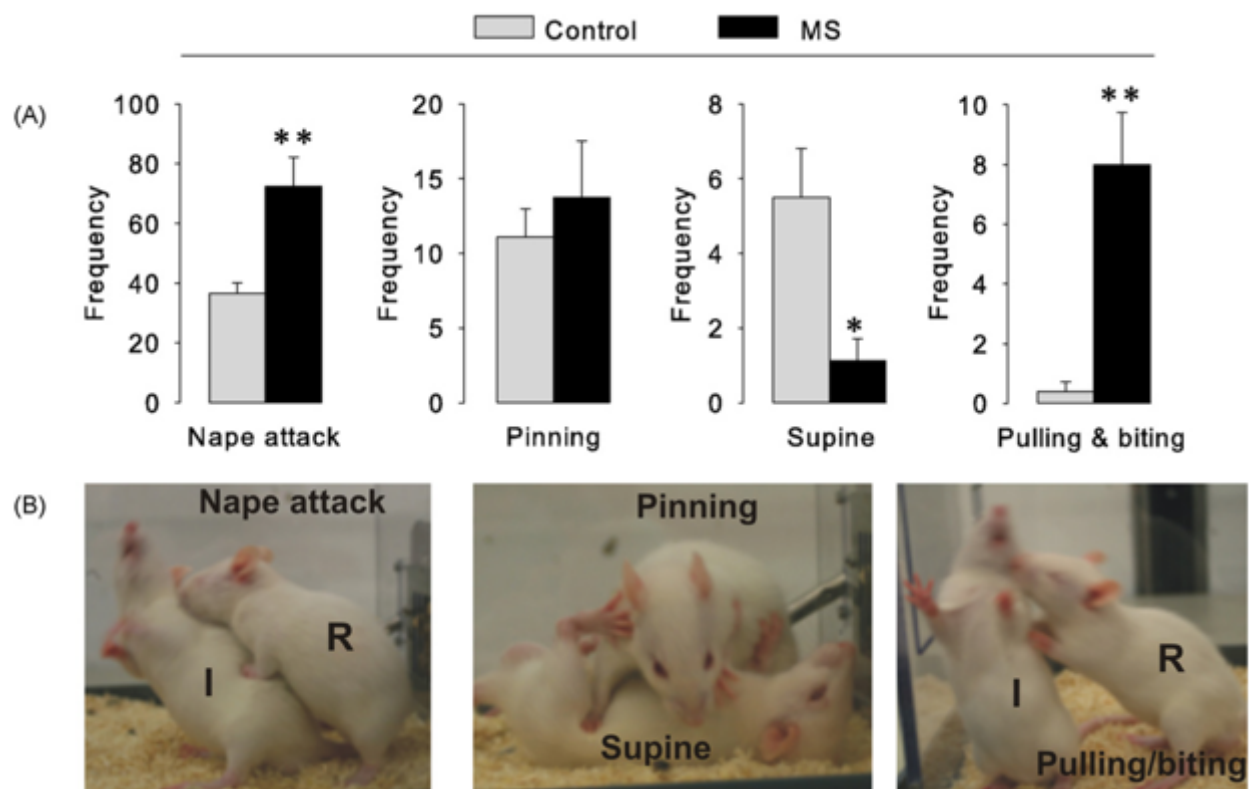


Figura 5. Efectos de la separación materna (MS) sobre la frecuencia de ataques a la nuca del oponente (nape attack), mordidas hacia el oponente (pulling/biting), tacleo del oponente (pinning) y posturas sumisas (supine) de ratas jóvenes durante el juego. Tomado de Veneema y Neumann (2009).

Por otra parte, existe controversia sobre los efectos de la privación del cuidado materno y la investigación social; algunos reportan que no modifica la conducta de interacción social (Kentrop et al., 2018; Kambali et al., 2019), mientras otros estudios reportan que reduce la conducta de interacción social (Lukas et al., 2011; Girardi et al., 2014; Lee et al., 2019; Houwing et al., 2019). Estos diferentes hallazgos podrían deberse al procedimiento de separación materna utilizado y la edad de los individuos. Aunque la mayoría de los estudios muestran que la separación materna reduce la investigación social, existe la necesidad de una mayor comprensión de los mecanismos neuronales subyacentes a los cambios en la conducta social por la privación del cuidado materno. En trabajos recientes que se han realizado en nuestro grupo de investigación se observó que existe una actividad diferencial de regiones hipotálamicas y también del sistema dopaminérgico (Gómez-Gómez et al., 2019).

5.6 Estudio de actividad neuronal

La actividad eléctrica de las neuronas permite conducir y transmitir señales, y a pesar de que las señales transmitidas por las diferentes clases de neuronas puedan ser muy distintas, la señal generalmente es transmitida por un cambio en el potencial eléctrico de la membrana, y para transmitirla a una larga distancia, las neuronas emplean un mecanismo de señalización activo que permite que la actividad eléctrica se propague rápidamente a lo largo de la membrana (Alberts et al., 2016).

Numerosos estudios han demostrado que la actividad neuronal juega un papel importante en la regulación de la fuerza sináptica, las propiedades de la membrana y el refinamiento circuitos neuronales. En particular, las experiencias sensoriales influyen continuamente en el desarrollo del cerebro a niveles sinápticos, de circuitos y de organismos. Los efectos de la experiencia sensorial se manifiestan por la liberación de neurotransmisores en las terminales presinápticas, su recepción en las membranas postsinápticas y la despolarización de las neuronas postsinápticas por el aumento de la concentración de calcio citoplásmico. Este aumento en el calcio citoplásmico activa programas de expresión génica en el núcleo, incluyendo los IEG como Fos y Jun, que han sido ampliamente estudiados (Kim et al., 2018).

Los IEG responden a la actividad trans-sináptica y actividad eléctrica en las células nerviosas, y su transcripción es rápidamente inducida después de la estimulación extracelular para regular la expresión de genes de expresión tardía, cuyos productos tienen funciones efectoras en las respuestas neuronales (Jaworski et al., 2018). Los estudios sobre IEG han llevado a la formulación de una hipótesis importante que indica que la regulación transcripcional es un mecanismo clave por el cual la actividad neuronal puede desencadenar cambios sinápticos y maduración dependientes de la experiencia de los circuitos neuronales.

Muchos de los IEG codifican para factores de transcripción, cuya expresión es rápidamente inducida después de la estimulación extracelular, como es el caso de *c-fos* y *c-jun*, los cuales son proto-oncogenes cuyos productos interactúan uno con el otro para formar heterodímeros que actúan como un complejo de factor de transcripción (figura 6). La interacción entre estas dos proteínas ocurre a través de un dominio de dimerización conocido como cremallera de leucina que está presente en proteínas Fos y Jun. El heterodímero resultante de la interacción entre estas dos proteínas se une con alta afinidad y especificidad a los elementos del DNA de la secuencia consenso TGACTCA para la transcripción de la proteína activadora 1 (AP-1) (Sheng y Greenberg, 1990) que regula la expresión de genes de expresión tardía implicados en procesos cognitivos, motores y de aprendizaje (Morgan et al., 1987).

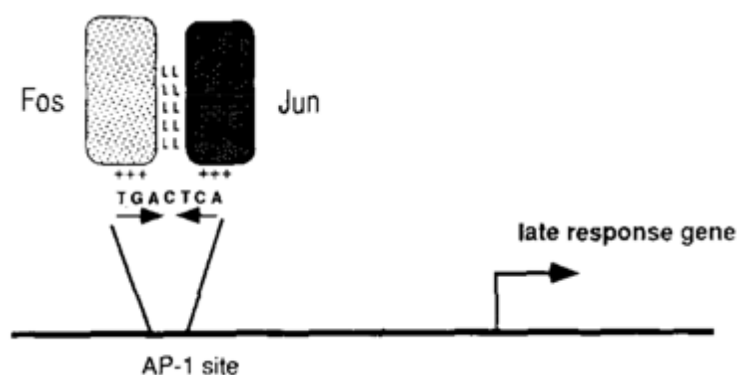


Figura 6. Heterodímero Fos-Jun. Fos interactúa con Jun a través de la cremallera de leucina formando un heterodímero que actúa como factor de transcripción que regula la expresión de un gen de expresión tardía. El complejo Fos-Jun se une a los elementos del DNA de la secuencia consenso TGACTCA y regula promotores cercanos. Fos puede estimular o reprimir la transcripción de genes dependiendo del miembro de la familia Jun a la cual se acople. Tomada de Sheng y Greenberg (1990).

5.6.1 *c-fos* como indicativo de actividad cerebral reciente

Uno de los IEG más estudiados es *c-fos*, que codifica para la proteína c-Fos cuya expresión ha sido relacionada a la novedad, es decir, que es expresada en mayor medida en respuesta a estímulos novedosos ya que juega un rol importante en la integración de información sensorial y plasticidad cerebral (Hoffman y Lyo, 2002; Jaworski et al., 2018), es inducida rápidamente tras la activación intensa de neuronas, y degradada dentro de unas horas después un determinado estímulo.

La expresión de c-Fos requiere de la despolarización de la membrana que provoca la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje, de manera que entra calcio a la célula y se activan segundos mensajeros como el adenosin monofosfato cíclico que a su vez activará a la proteína efectora CREB para la producción de c-Fos (figura 7) (Morgan y Curran, 1986). El nivel basal de la expresión de *c-fos* es relativamente baja pero su transcripción puede ser rápidamente inducida en el cerebro por una amplia gama de estímulos externos y de manera específica en una región determinada en respuesta un estímulo determinado (Barros *et al.*, 2015).

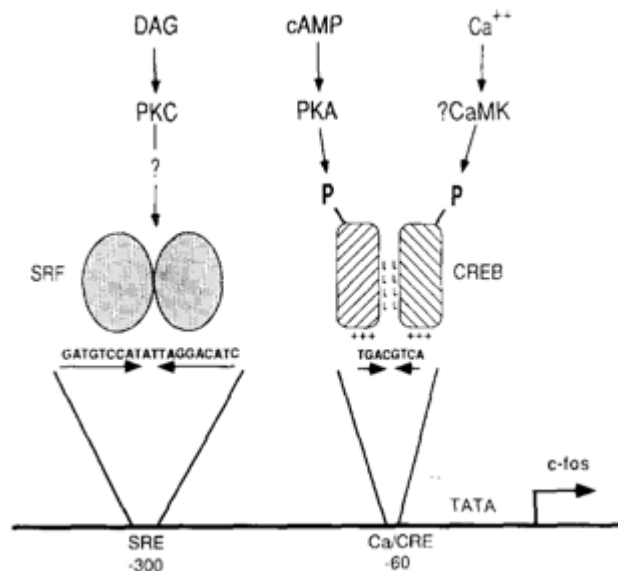


Figura 7. La expresión de c-Fos es inducida por múltiples segundos mensajeros para regular la expresión de genes de expresión tardía. Tomada de Sheng y Greenberg (1990).

Diferentes IEG exhiben una ventana temporal distinta con diferentes cinéticas de activación (Kim et al., 2018). En pruebas de IHC, se ha observado que la expresión de c-Fos en roedores se encuentra por encima de los niveles basales pasando los 15 minutos y comienza a ser evidente a los 30 minutos, y su máxima expresión está entre 1 y 2 horas después de la exposición a un estímulo agudo, y regresa a sus niveles basales a las 6 horas (*figura 8*) (Szyndler *et al.*, 2009; Barros *et al.*, 2015).

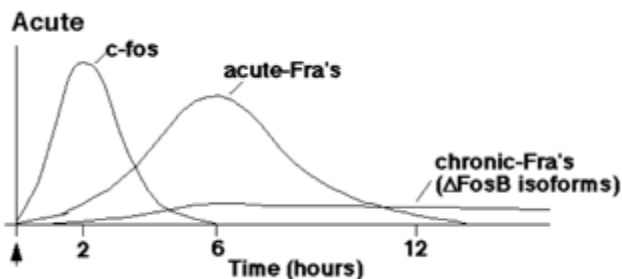


Figura 8. La expresión máxima de c-Fos está entre 1 y 2 horas después de la exposición a un estímulo agudo y es degradada dentro de unas horas después. Tomada de Nestler et al. (1999).

Después de un estímulo inicial, se ha reportado que la expresión de c-Fos en neuronas presenta un periodo refractario a la estimulación subsecuente de la misma naturaleza (Barros et al., 2015), y por esta razón es relacionada a la novedad, por lo que también es un indicador de plasticidad cerebral y actividad neuronal reciente (Hoffman y Lyo, 2002). El mapeo basado en c-fos de activación neuronal es una técnica que ha sido comúnmente utilizada por investigadores en el campo de las neurociencias durante los últimos 30 años, y su estudio ha permitido el desarrollo de herramientas para rastrear y manipular la actividad de neuronas activadas por la expresión de conducta, además de establecer estrategias para la manipulación de genes, sugerir y verificar plasticidad, además de observar modificaciones en la estructura del comportamiento a partir de la actividad neuronal inducida o espontánea, o bien a partir de estímulos meramente sensoriales (Jaworski et al., 2018).

5.6.2 IHC: método para la detección de moléculas específicas

Una manera de detectar moléculas específicas a partir de la inducción o exposición a un estímulo en particular es mediante el uso de *anticuerpos*, los cuales son proteínas producidas por el sistema inmune cuya función es defender al cuerpo de agentes extraños conocidos como *antígenos*. Existe una amplia gama de formas de anticuerpos y cada uno tiene un sitio de unión específico para un

antígeno (Alberts et al., 2016). En mamíferos, los anticuerpos están agrupados en cinco clases o *isotipos*, los IgG, IgM, IgD, IgA e IgE, y en inmunoensayos resaltan los IgG e IgM (Buchwalow y Bocker, 2010).

Debido a la especificidad de los anticuerpos para acoplarse a determinados antígenos, son utilizados para localizar moléculas específicas en células con técnicas de microscopía. Los anticuerpos empleados en microscopía generalmente son purificados a partir un antisuero con la finalidad de eliminar todos los anticuerpos no específicos, o se utilizan anticuerpos monoclonales específicos molécula diana determinada (Alberts et al., 2016). La IHC es una técnica que permite la localización de antígenos específicos en un determinado tejido mediante el uso de marcadores. Los tres principales métodos de IHC son las técnicas directas, indirectas y enzimáticas (Buchwalow y Bocker, 2010).

Para la IHC indirecta, los marcadores se encuentran en el anticuerpo secundario que se acopla al anticuerpo primario en un segundo paso de incubación (*figura 9*). Los anticuerpos secundarios son producidos inyectando IgG purificado de una determinada especie como el antígeno. Estos anticuerpos se acoplan al anticuerpo primario, el cual es común a todos IgG de una sola especie. Así, un anticuerpo secundario es generado contra todos los IgG de una especie. En un procedimiento de inmunohistoquímica indirecta, el anticuerpo primario no marcado se acopla al antígeno, y el anticuerpo secundario que lleva un marcador; por ejemplo, un cromógeno o fluorocromo, se acopla al anticuerpo primario (Alberts et al., 2016).

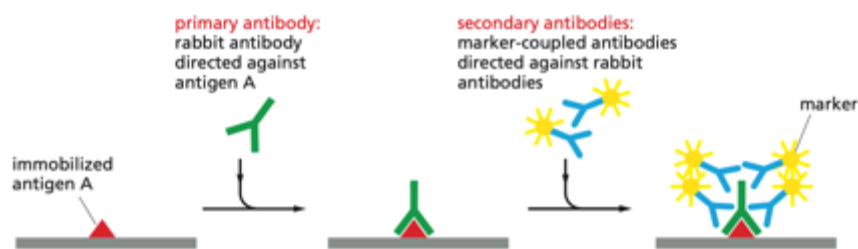


Figura 9. Inmunohistoquímica indirecta. En una primera incubación, un anticuerpo primario no marcado se acopla a un antígeno; en una segunda incubación un anticuerpo secundario que está covalentemente unido a un marcador se acopla al anticuerpo primario. El marcador hace a la molécula fácilmente detectable. Modificado de Alberts et al. (2016).

La intensidad de tinción inmunohistoquímica va en función de la actividad enzimática, y se puede lograr una sensibilidad mejorada aumentando el número de moléculas enzimáticas unidas al tejido. Uno de los métodos más comunes para amplificar la señal del antígeno en la IHC es el ABC. Para este proceso, una enzima empleada para detectar antígenos es biotinilada que, en una solución, forma un complejo con avidina. La unión avidina-biotina es la interacción no covalente más fuerte conocida entre una proteína y un ligando. El enlace entre biotina y avidina se forma muy rápidamente, y una vez formado, no se ve afectado por los extremos en pH, temperatura, solventes orgánicos y otros agentes desnaturizantes. Estas características de la avidina hacen que la detección de proteínas marcadas con biotina u otras moléculas sean particularmente útiles para estudios histológicos (Fisher Scientific, 2009). Una vez formado el ABC, la solución vertida sobre tejido sobre el cual ya se realizó IHC con un anticuerpo secundario biotinilado, donde se une al anticuerpo secundario (Bratthauer, 2009) (*figura 10*). El resultado es una mayor concentración de enzimas en el sitio donde se encuentra el anticuerpo y, por lo tanto, hay un aumento en la intensidad de la señal (Fisher Scientific, 2009).

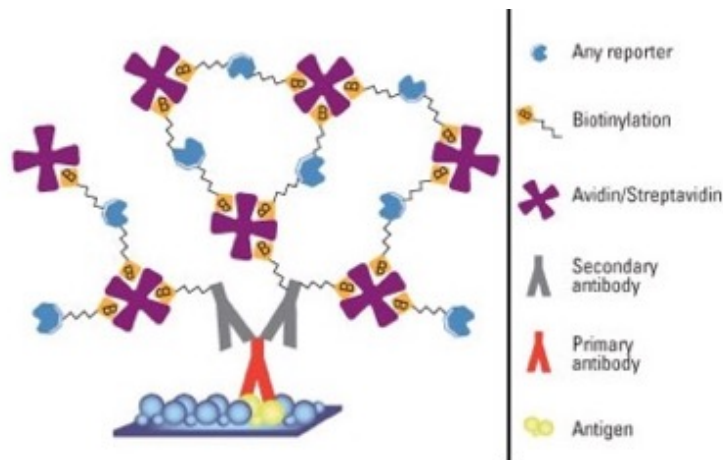


Figura 10. Representación esquemática del método de tinción ABC. Enzimas biotiniladas se unen con una molécula de avidina para formar el ABC. El ABC se une a los anticuerpos ya unidos al tejido. El resultado es una mayor concentración de enzimas en el sitio donde se encuentra el anticuerpo. Tomada de Fisher Scientific. (2009).

6 JUSTIFICACIÓN

Existen numerosos estudios que han reportado los efectos de la privación materna sobre la conducta social en diferentes especies. Sin embargo, existe la necesidad de una mayor comprensión de cómo las experiencias adversas durante etapas de desarrollo temprano influyen en la actividad de los circuitos neuronales encargados del procesamiento de información de tipo social y expresión de conducta social. Este trabajo pretende evaluar la actividad de núcleos cerebrales que forman parte de la red del circuito social, al igual que la conducta social de ratas adultas privadas del cuidado materno, ya que la mayoría de los estudios de conducta social y privación materna han sido realizados en individuos jóvenes. Estudiar como la privación del cuidado materno modifica la actividad del cerebro social ayudaría a entender las bases de los distintos desordenes psiquiátricos asociados a la exposición a un entorno adverso durante la edad temprana.

7 HIPÓTESIS

Si la privación del cuidado materno afecta el desarrollo de áreas que comprenden el cerebro social, entonces modificará la actividad del cerebro y la conducta social en la edad adulta.

8 OBJETIVOS

8.1 General

Evaluar los efectos de la privación del cuidado materno sobre la investigación social y la actividad del cerebro social en ratas adultas expuestas a la novedad social.

8.1.1 *Específicos*

- 🐭 Registrar la conducta de ratas adultas privadas del cuidado materno durante un encuentro social novedoso.

- 🐭 Detectar actividad neuronal mediante inmunomarcaje de c-Fos en el núcleo paraventricular del hipotálamo, amígdala, septum lateral, núcleo accumbens y corteza prefrontal medial de ratas adultas privadas del cuidado materno expuestas a un encuentro social novedoso. Además de relacionar la conducta registrada con el marcaje inmunohistoquímico.

9 MATERIALES Y MÉTODOS

9.1 Animales experimentales: alojamiento y manipulación

Se emplearon 16 ratas Wistar macho de 53 días de edad (adultez) divididas en 4 grupos de 4 individuos por grupo. Los animales se obtuvieron mediante cruzas controladas para tener conocimiento sobre la cama de procedencia de las crías. Se emplearon dos hembras y un macho para las cruzas. Todas las cruzas fueron realizadas por la misma persona. Los individuos fueron alojados en el bioterio de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMéx) en cajas de bioterio estándar (cajas individuales de polipropileno de 25 cm de ancho, 40 cm de largo y 15 cm de alto, y tapa de acero inoxidable) con cama de viruta de madera y agua y alimento *ad libitum*. El ciclo luz-oscuridad fue de 12:12; la luz se encendía a las 12:00 P.M. y se apagaba a las 12:00 A.M. De acuerdo con los estándares de la NOM-062-ZOO (1999) y a la guía “*Guide for the care and use for laboratory animals*” (2011), la temperatura se mantuvo entre los 20 y 26 °C y la humedad relativa sobre el 40%.

La limpieza de cajas se realizó cada tercer día desde el nacimiento de las ratas hasta el término del experimento. El día postnatal 1, las crías fueron divididas en dos grupos sin discriminar el sexo de los individuos; un grupo fue colocado en una caja de bioterio estándar con cama de viruta de madera por 4 horas, y el otro grupo fue dejado con su madre. Para distinguir entre los individuos que fueron separados de su madre y aquellos que no lo fueron, se utilizó un marcador de tinta indeleble, no tóxico o dañino para los animales, el marcaje fue revisado constantemente. A partir de ese momento, todos los animales que fueron separados de su madre en el día postnatal 1 fueron privados del cuidado materno por 20 días, el proceso se describe a continuación. Solo se emplearon las camadas que tuvieran 8 o más crías. El día 21 post-nacimiento todas las ratas macho fueron separados de su madre y alojados individualmente en cajas de bioterio estándar por 32 días. Las hembras fueron descartadas del experimento. Las pruebas se llevaron a cabo el día 53 post-nacimiento.

9.1.1 Grupos experimentales

Los animales experimentales fueron divididos en cuatro grupos y fueron expuestos a distintos estímulos y pruebas que se muestran en el *cuadro 1*. El requisito para colocar a un individuo en un grupo fue que procediera de la misma madre.

Cuadro 1. Grupos experimentales. Muestra el número de individuos por grupo, características de los grupos, prueba conductual aplicada y siglas asignadas.

Grupo	Número de individuos	Estimulación neonatal	Prueba	Siglas asignadas
Control 1	4	Cuidado maternal	Ninguna prueba	CM-NP
Control 2	4	Cuidado maternal	Novedad social	CM-NS
Experimental 1	4	Separación maternal	Ninguna prueba	SM-NP
Experimental 2	4	Separación maternal	Novedad social	SM-NS

Siglas que identifican a los diferentes grupos. CM-NP, Cuidado Maternal–Ninguna Prueba. CM-NS, Cuidado Maternal–Novedad Social. SM-NP, Separación Maternal–Ninguna Prueba. SM-NS, Separación Maternal–Novedad Social.

9.2 Estímulos y pruebas

Todas las pruebas de investigación social se llevaron a cabo el día 53 post-nacimiento, y fueron realizadas dentro del bioterio con iluminación roja. A continuación, se describe el área en la cual se realizaron las pruebas de investigación social y procedimiento para la privación del cuidado materno.

9.2.1 Privación del cuidado materno

El procedimiento para la privación del cuidado materno se realizó como describió Wang et al. (2015); las crías fueron separados de sus madres 4 h diarias durante la fase de luz del ciclo de luz (9: 00 h – 13: 00 h) desde el día postnatal 1 al 21. Durante la separación, las crías se colocaron en cajas de bioterio estándar que contenían cama de viruta de madera limpia, en grupos de mínimo de 4 individuos para que pudieran mantener su temperatura corporal. Después de la separación, las crías fueron devueltos a su jaula y se reunieron con su madre.

9.2.2 Área de prueba

Las pruebas de investigación social se llevaron a cabo en el área de prueba de novedad social descrita por Gómez-Gómez et al. (2019). El área de prueba fue una jaula de policarbonato (45 cm de largo, 25 cm de ancho y 20 cm de alto) con una malla metálica con celdas de 0,5 cm² como techo con celdas de 0,5 cm², y una malla metálica con células de 1,3 cm² en el medio de la jaula (Figura 11). El propósito de la malla fue evitar el contacto directo entre los cuerpos de los individuos, conductas agresivas y el juego, pero permitió el olfateo entre individuos y ligero contacto entre las patas y vibrisas de los individuos.

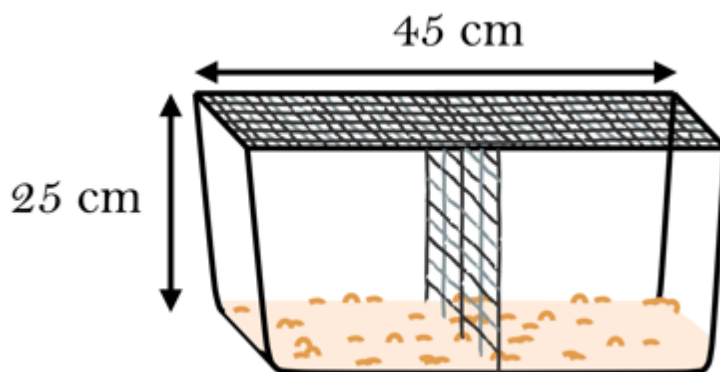


Figura 11. Ilustración del área de prueba. Ilustración por el autor.

9.2.3 Habitación al área de prueba

Para habitar a los individuos al área de prueba, un día anterior a las pruebas de investigación social, en el día postnatal 52, las ratas de los grupos CM-NS y SM-NS fueron colocadas en el área de prueba, una a la vez, por 30 minutos. Pasado este tiempo, las ratas fueron regresadas a sus respectivas jaulas. Entre cada habitación, la cama de viruta de madera del área de prueba era removida, la caja y las mallas eran limpiadas y desinfectadas con jabón neutro, cloro al 10% y alcohol al 70%, y se colocó cama de viruta de madera limpia para evitar que permanecieran olores de los individuos.

9.2.4 Prueba de investigación social

Para las pruebas de investigación social, las ratas fueron expuestas a un conoespecífico nuevo de la misma edad y sexo, criado en una camada diferente (*figura 12*). Una rata fue colocada en cada lado de la malla, y fueron dejadas a interactuar durante 15 minutos. Al finalizar cada prueba, la cama de viruta de madera del área de prueba era removida, la caja y las mallas eran limpiadas y desinfectadas con jabón neutro, cloro al 10% y alcohol al 70%, y se colocó cama de viruta de madera limpia para evitar que permanecieran olores de los individuos. Las pruebas de investigación social se realizaron el día 53 postnatal durante la fase oscura del ciclo de luz, bajo luz roja, entre las 10: 00 h y las 13: 00 h. Todas las pruebas fueron grabadas para el posterior análisis de conducta.

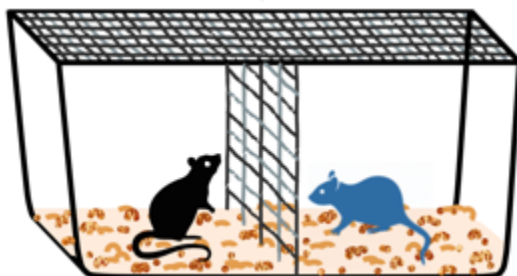


Figura 12. Ilustración de la prueba de investigación social. Figura por el autor.

9.2.5 Registro de peso

Se registró el peso corporal como una medida indirecta del déficit del cuidado materno. A partir del día postnatal 3, 10 ratas (5 control y 5 experimentales) fueron pesadas cada tercer día durante los primeros 21 días postnatales (días postnatales 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 y 21). Para pesar los individuos, las ratas se colocaron en un contenedor de plástico con tapa perforada sobre una balanza eléctrica. El contenedor fue limpiado con cloro al 10% y alcohol al 70% después de pesar cada individuo. Todas las ratas fueron pesadas a las 8:00 h.

9.3 Procedimiento para los grupos experimentales

9.3.1 Cuidado Materno – Ninguna Prueba

En el día 21 post-nacimiento, las ratas fueron alojadas en cajas individuales de bioterio estándar por 32 días con agua y alimento *ad libitum*. En el día postnatal 32, los individuos fueron sacrificados por medio de una perfusión transcardial para la extracción del cerebro (*figura 13*).

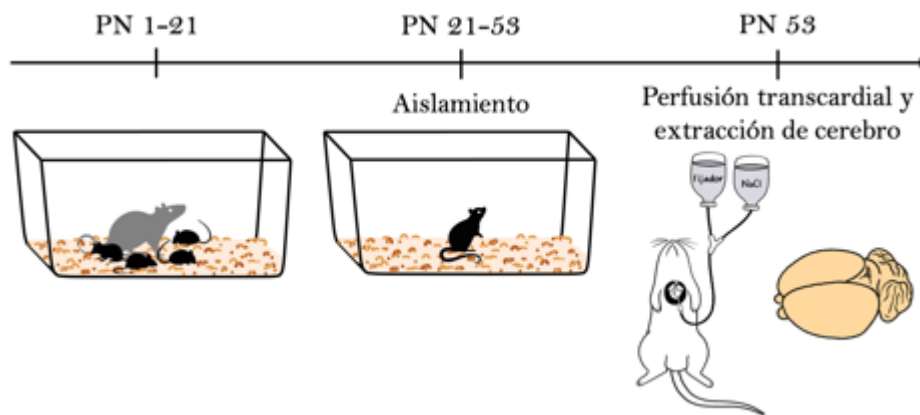


Figura 13. Ilustración del procedimiento para el grupo CM-NP. Figura por el autor.

9.3.2 Cuidado Materno–Novedad Social

En el día 21 post-nacimiento, las ratas fueron alojadas en cajas individuales de bioterio estándar por 32 días con agua y alimento *ad libitum*. Las pruebas de investigación social se llevaron a cabo en el día postnatal 53. Las pruebas se realizaron en parejas y fueron colocadas en el área de prueba colocando a una rata de cada lado de la caja durante 15 minutos y se registró la conducta. Al finalizar la prueba, los individuos fueron regresados a sus respectivas cajas durante 1 h. Pasando este tiempo, los individuos fueron sacrificados por medio de una perfusión transcardial para la extracción del cerebro (*figura 14*).

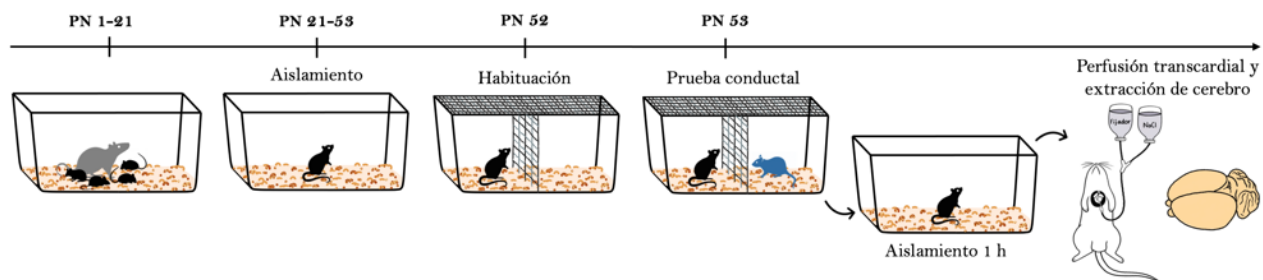


Figura 14. Ilustración del procedimiento para el grupo CM-NS. Figura por el autor.

9.3.3 Separación Materna-Ninguna Prueba

Las ratas fueron separados de la madre por 4 horas diarias (9:00 h – 13:00 h) desde día del nacimiento hasta el día veintiuno post-nacimiento. En el día 21 post-nacimiento, las ratas fueron alojadas en cajas individuales de bioterio estándar por 32 días con agua y alimento *ad libitum*. Posterior a esto, los individuos fueron sacrificados por medio de una perfusión transcárdial para la extracción del cerebro (figura 15).

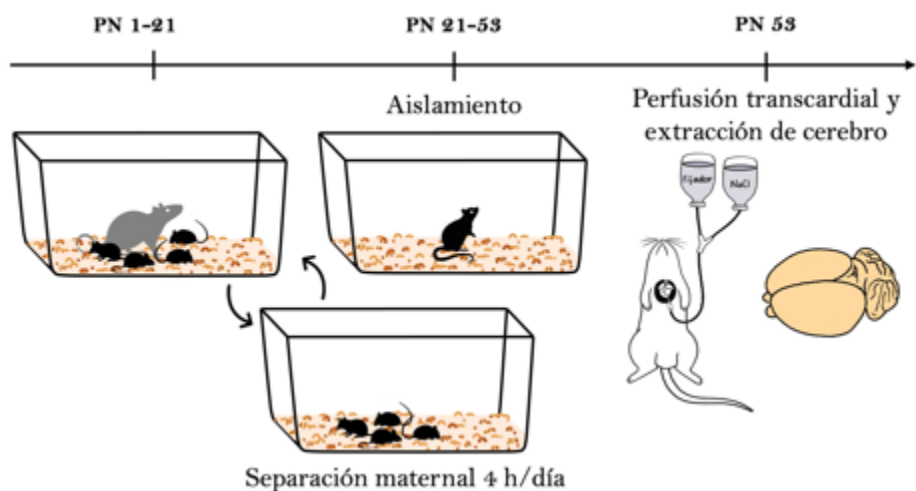


Figura 15. Ilustración del procedimiento para el grupo SM-NP. Figura por el autor.

9.3.4 Separación Materna-Novedad Social

Las ratas fueron separadas de la madre por 4 h diarias (9:00 h -13:00 h) desde día del nacimiento hasta el día veintiuno post-nacimiento. Las pruebas de investigación social se llevaron a cabo en el día postnatal 53. Las pruebas se realizaron en parejas y fueron colocadas en el área de prueba

colocando a una rata de cada lado de la caja durante 15 minutos y se registró la conducta. Al finalizar la prueba, los individuos fueron regresadas a sus respectivas cajas durante 1 h. Pasando este tiempo, los individuos fueron sacrificados por medio de una perfusión transcárdial para la extracción del cerebro (figura 16).

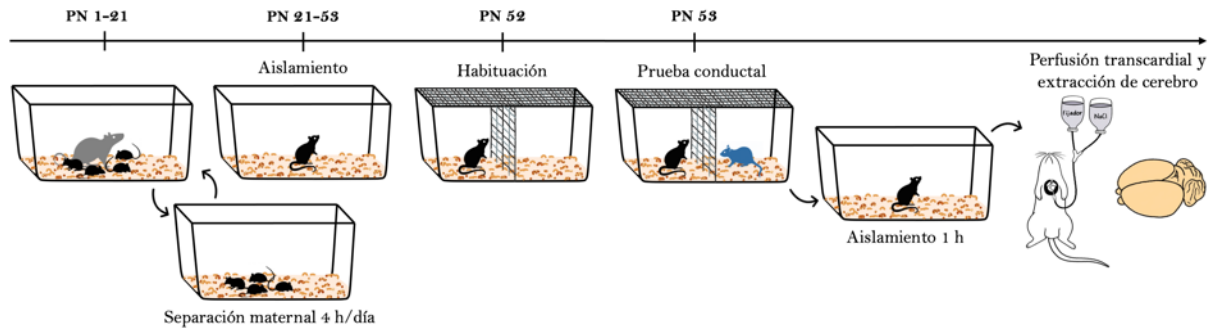

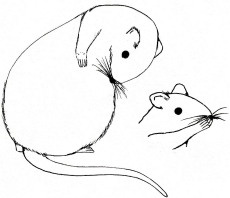

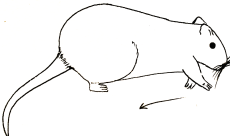


Figura 16. Ilustración del procedimiento para el grupo SM-NP. Figura por el autor.

9.4 Análisis de conducta

Se registró la duración de las conductas de investigación social, acicalamiento, *trespass attempt* (intento por traspasar la malla) y exploración ambiental/*rearing* de los primeros 5 minutos de la prueba de investigación social. Los parámetros que se establecieron para el análisis de las conductas se muestran en el cuadro 2. Los datos se evaluaron para la distribución normal utilizando la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov ($\alpha=0.05$). Los datos presentaron una distribución normal, por lo tanto, se aplicaron pruebas paramétricas para el análisis de datos. La prueba t de Student se empleó para comparar los datos entre los grupos CM-NS y SM-NS. Las diferencias estadísticamente significativas para todos los análisis se definieron como $p<0.05$. Todos los datos se presentan como media \pm error estándar de la media.

Cuadro 2. Etograma de las conductas que se analizaron en la prueba de novedad social.

Conducta	Resumen y significado	Descripción
<p>Investigación social</p> 	<p>La investigación es el último paso de la exploración, y sirve para proporcionar información a los individuos sobre el estímulo focal, que en este caso es el conespecífico novedoso.</p>	<p>En ratones, la investigación es típicamente multimodal y principalmente involucra sentidos olfativos y táctiles. Oler (investigación olfativa): el roedor realiza movimientos rápidos de contracción de la nariz, ya sea con la nariz en contacto con el estímulo, o mantenida en una posición elevada en el aire. <i>Whisking</i> (investigación táctil): con las vibrisas, el roedor establece contacto con el estímulo (conespecífico novedoso), el ratón roza rápidamente los bigotes y vibrisas a lo largo de la superficie del estímulo.</p>
<p>Acicalamiento</p> 	<p>Es una conducta de mantenimiento cuya función es mantener el estado fisiológico, la comodidad y apariencia, que también puede ser evocada como respuesta a diversos estímulos (Berridge et al., 2005).</p>	<p>Por lo general, los roedores se acicalan en una posición sentada, el ratón se lame el pelo, se arregla con las patas delanteras o se rasca con cualquier miembro. A menudo, los roedores combinan todos estos comportamientos de aseo (Berridge et al., 2005). La disminución de la expresión de esta conducta puede ser indicador de estrés o ansiedad (van Erp et al., 1994).</p>
<p>Exploración ambiental/<i>rearing</i></p> 	<p>La exploración se realiza para proporcionar al animal información de su entorno. La exploración generalmente ocurre en la siguiente secuencia: buscar, atender, acercarse e investigar. <i>Rearing</i> es una variante de la fase de búsqueda de la conducta exploratoria, cuando el animal se mueve por el entorno.</p>	<p>El roedor se mueve alrededor del área de prueba, pone su peso sobre sus patas traseras, levanta sus extremidades anteriores del suelo y extiende su cabeza hacia arriba, realiza movimientos con la cabeza, olfatea, trepa sobre los bordes de la caja.</p>
<p><i>Trespass attempt</i></p> 	<p>De acuerdo con la definición de motivación de Berridge (2004), esta conducta se consideró como medida del esfuerzo para cruzar la barrera.</p>	<p>El individuo exhibe intentos por pasar al lado opuesto de la malla, donde se encuentra el conespecífico novedoso. El individuo rasca la viruta de madera cerca de la malla, jala, empuja, muerde o se trepa sobre la malla.</p>

Muestra el nombre de la conducta y descripción de esta, al igual que los parámetros que se tomaron en cuenta para su análisis. La descripción de las conductas de investigación social y exploración ambiental/*rearing* se obtuvieron de Stanford's University Mouse Ethogram. Ilustraciones por el autor.

9.5 Preparación de tejido histológico

9.5.1 Perfusión transcárdial y extracción del cerebro

Para fijar el cerebro de los animales experimentales, se siguió el procedimiento de Gage et al. (2012) para la perfusión y fijación de roedores, excepto que en lugar de una comba de perfusión se empleó un sistema de gravedad. Las ratas fueron anestesiadas con una dosis de pentobarbital sódico (60 mg/kg) intraperitonealmente. Una vez que los animales alcanzaron el plano quirúrgico de anestesia, se expuso el corazón y se abrió el ventrículo izquierdo para insertar la cánula del sistema hasta la aorta. Una vez colocada la cánula, se hizo una incisión en la aurícula derecha para drenar la sangre y las soluciones de la perfusión (figura 17). Primero se administró una solución limpiadora (NaCl al 0.9%) y después una solución fijadora (paraformaldehído al 4% en buffer fosfato 0.1 M y sacarosa). Se dejó que la solución limpiadora fluyera hasta que el hígado, los ojos y las extremidades se blanquearan. Después de esto, se dejó que la solución fijadora fluyera hasta que la columna vertebral y las extremidades endurecieran. Al finalizar la perfusión, se extrajeron los cerebros y fueron colocados en frascos rotulados que contenían solución fijadora por 24 h a 4 °C.



Figura 17. Ilustración de la cirugía para la perfusión transcárdial.

9.5.2 Crioprotección de tejido nervioso

Después de haber dejado los cerebros en la solución fijadora por 24 h, los cerebros fueron colocados en un tren de soluciones crioprotectoras de buffer fosfato con sacarosa al 10%, 20% y 30%. Esto se hizo para evitar dañar el tejido al momento de obtener los cortes. Los cerebros permanecieron 24 horas en cada solución a 4°C.

9.5.3 *Obtención de cortes coronales de cerebro*

Se obtuvieron secciones coronales de 40 μm de la corteza prefrontal medial (Bregma 4.20 mm a 3.20 mm); núcleo accumbens y septum lateral (Bregma 1.60 mm a 1.20 mm); núcleo paraventricular del hipotálamo (Bregma -1.30 mm a -1.60 mm) y amígdala (Bregma -2.70 mm a -3.20 mm) (*figura 18*). Estas regiones cerebrales fueron seleccionadas debido a que forman parte de la red de conducta social y sistema de recompensa (O'Connell y Hoffman, 2011; Love, 2013), y las coordenadas de las regiones cerebrales fueron localizadas con ayuda del atlas de Paxinos y Watson (2007). Los cortes fueron colocados en multiplatos con PB 0.1M. Se eligieron los mejores cortes y permanecieron a 4 °C hasta el día de la inmunohistoquímica.

Áreas Cerebrales Evaluadas

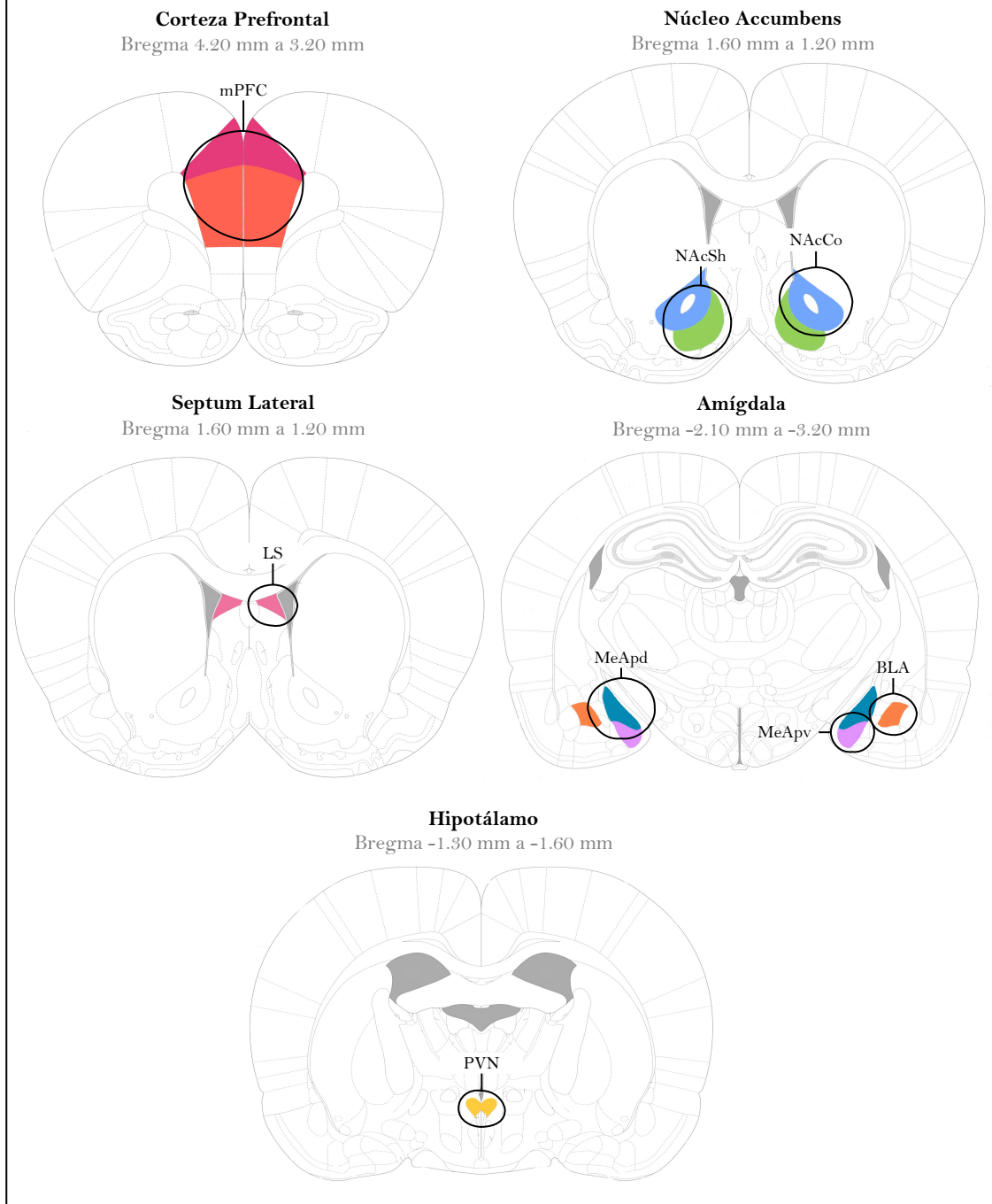


Figura 18. Ilustración de los cortes coronales de cerebro de rata que señalan las áreas evaluadas en este trabajo. Núcleo Accumbens Shell (NAcSh) y Núcleo Accumbens Core (NAcCo); Septum Lateral (LS); Corteza Prefrontal medial (mPFC); Amígdala Basolateral (BLA) y el Núcleo Paraventricular del Hipotálamo (PVN). Modificado de Paxinos y Watson (2007).

9.5.4 *Inmunohistoquímica*

La primera parte de la inmunohistoquímica consistió en lavar los cortes con PB 0.1M. Después, fueron colocados en peróxido de hidrógeno al 3% diluido en PB 0.1M por 10 minutos. Posteriormente fueron incubados en una solución de PB 0.1M, tritón y suero de cabra por una hora. Finalmente fueron incubados en una solución de PB 0.1M, tritón, suero de cabra más un anticuerpo primario para c-Fos hecho en rabbit (sc-52; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA) a una concentración de 1:250 durante 48 horas a 4 °C.

Para la segunda parte de la inmunohistoquímica los cortes fueron lavados con PB 0.1M e incubados en una solución de PB 0.1M y tritón más un anticuerpo secundario biotinilado goat anti-rabbit (sc-2040; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA) a una concentración de 1:250 durante una hora a temperatura ambiente. Después de la incubación con el anticuerpo secundario, los cortes fueron lavados con PB 0.1M, y fueron incubados en una solución del complejo Adivina-Biotina (PK-6100, Vectastain ABC kit, Vector Laboratories) durante una hora. Para visualizar el inmunomarcaje, los cortes fueron colocados en una solución de diaminobenzidina (DAB) 0.06%, nickel sulfato 1% y cloruro de cobalto 1% diluido en PB 0.1M, más peróxido de hidrógeno al 3% durante 10 min.

9.5.5 *Montaje de cortes en laminillas*

Para el montaje de tejido histológico en laminillas para microscopio, las secciones de tejido deben ser retenidos en los portaobjetos durante las etapas de tinción y lavado. Para ello, deben recubrirse con compuestos adhesivos. En este trabajo el compuesto adhesivo que se utilizó fue grenetina 0.5% y dodecahidrato de sulfato de potasio y cromo III (0.05%) disueltos en agua destilada. Los portaobjetos fueron sumergidos en la solución tres veces, en intervalos de 5 minutos, y dejados a secar por 48 h. Pasado este tiempo, los portaobjetos estaban listos para ser utilizados. Para la preparación de laminillas, los cortes de cerebro fueron montados en portaobjetos gelatinizados y fueron dejados a secar por 24 h. Después de esto, los cortes fueron tratados en un tren de alcoholes y xiloles para deshidratar y aclarar el tejido. Finalmente, se les colocó acritol y fueron cubiertos con un cubreobjetos (*figura 19*). Todas las laminillas fueron rotuladas.

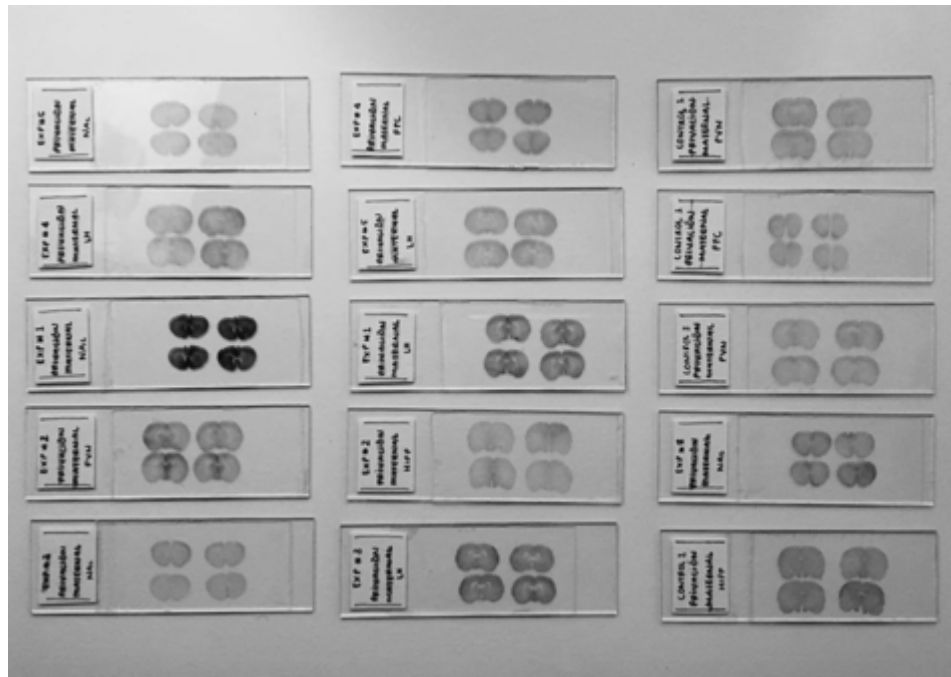


Figura 19. Fotografía de algunas de las preparaciones histológicas que se obtuvieron para este trabajo.

9.6 Cuantificación de neuronas inmunoreactivas a c-Fos

La inmunoreactividad a c-Fos fue identificada como un precipitado negro-púrpura, como resultado de la reacción DAB-níquel sulfato-cloruro de cobalto en el núcleo de la célula. Para el conteo de neuronas inmunoreactivas a c-Fos se tomaron fotografías empleando el objetivo 40x de un microscopio óptico. Se establecieron niveles de intensidad de inmunomarcaje, y solo se contaron las neuronas que presentaran mayor intensidad de inmunomarcaje. La intensidad de inmunomarcaje difería por área, por ello se establecieron diferentes parámetros por área. Para algunas áreas, el conteo se realizó directamente en el microscopio óptico, ya que fue difícil distinguir las neuronas inmunoreactivas en las fotografías. La *figura 20* muestra los niveles de inmunomarcaje que se establecieron para la mPFC. La *figura 21* muestra un corte de la mPFC bajo el objetivo 40x y las neuronas que fueron contadas. Se analizaron cuatro cortes por cerebro y área cerebral. Se contó el número de neuronas inmunoreactivas a c-Fos en ambos hemisferios de todas las laminillas, y por hemisferio, se contó el número de neuronas inmunoreactivas en $74,310 \mu\text{m}^2$.

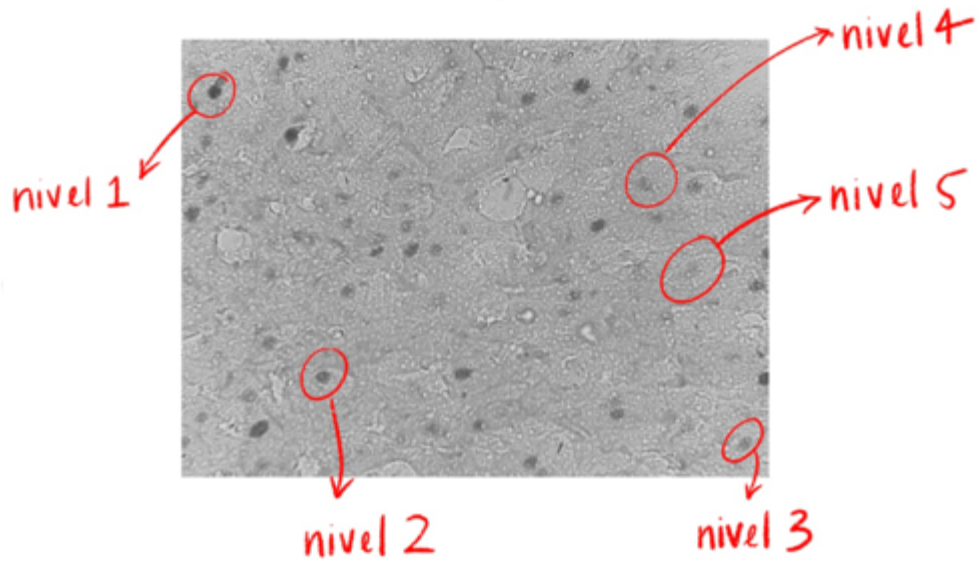


Figura 20. Fotografía de un corte de la mPFC bajo el objetivo 40x que muestra los diferentes niveles de marcaje de c-Fos. Los núcleos con marcaje más intenso fueron definidos como nivel 1. Para el caso de la mPFC solo se contaron los núcleos que presentaran marcaje correspondiente a los niveles 1, 2 y 3.

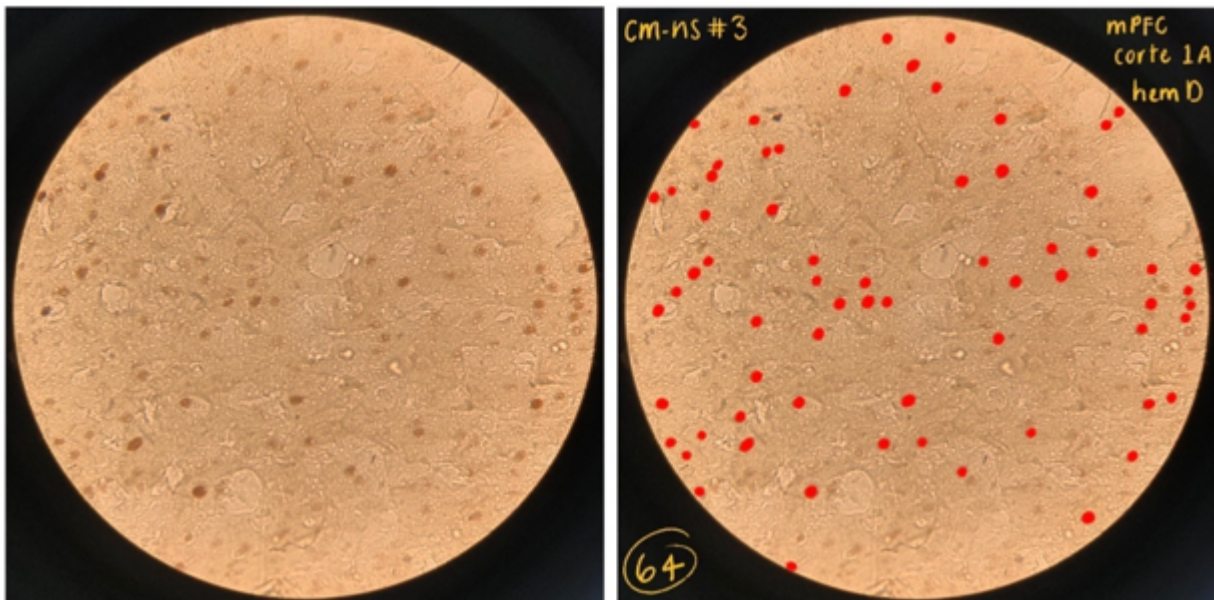


Figura 21. Fotografía del campo visual del objetivo 40x de un corte de la mPFC. La fotografía a la izquierda muestra la fotografía antes del conteo de neuronas inmunoreactivas. La fotografía a la derecha muestra el mismo corte, pero en rojo se muestran las neuronas que fueron tomadas en cuenta para el conteo de neuronas inmunoreactivas.

Todos los datos se evaluaron para la distribución normal utilizando la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov ($\alpha=0.05$). Los datos presentaron una distribución normal, por lo tanto, se aplicaron ANOVA's unidireccionales y pruebas de LSD por área para determinar cuáles grupos presentaron diferencias significativas en el número de neuronas inmunoreactivas a c-Fos. Las diferencias estadísticamente significativas para todos los análisis se definieron como $p<0.05$. Todos los datos se presentan como media \pm error estándar de la media.

10 RESULTADOS

Durante los 21 días de privación materna se observó que el peso corporal y tamaño de las ratas fue menor al de sus hermanos que no fueron privados del cuidado materno (*Cuadro 3*) (*figura 22*). Además, tardaron más tiempo en abrir los ojos, y presentaron menor movilidad durante los primeros días postnatales.

Cuadro 3. Peso corporal de las ratas experimentales de los primeros 21 días postnatales.

Peso corporal (g) de las ratas		
Día postnatal	Ratas control	Ratas privadas del cuidado materno
3	7.96 ± 0.09	7.94 ± 0.17
5	9.28 ± 0.12	9.08 ± 0.16
7	10.78 ± 0.10	10.38 ± 0.12
9	15.60 ± 0.06	12.3 ± 0.13
11	19.08 ± 0.10	14.42 ± 0.25
13	22.90 ± 0.13	17.1 ± 0.28
15	27.38 ± 0.15	19.42 ± 0.29
17	28.98 ± 0.08	21.6 ± 0.27
19	30.64 ± 0.14	22.66 ± 0.30
21	35.70 ± 0.06	26.2 ± 0.32

El cuadro muestra el peso promedio en gramos de las ratas experimentales ± el error estándar de la media (n=5 por grupo) durante los días postnatales 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 y 21.

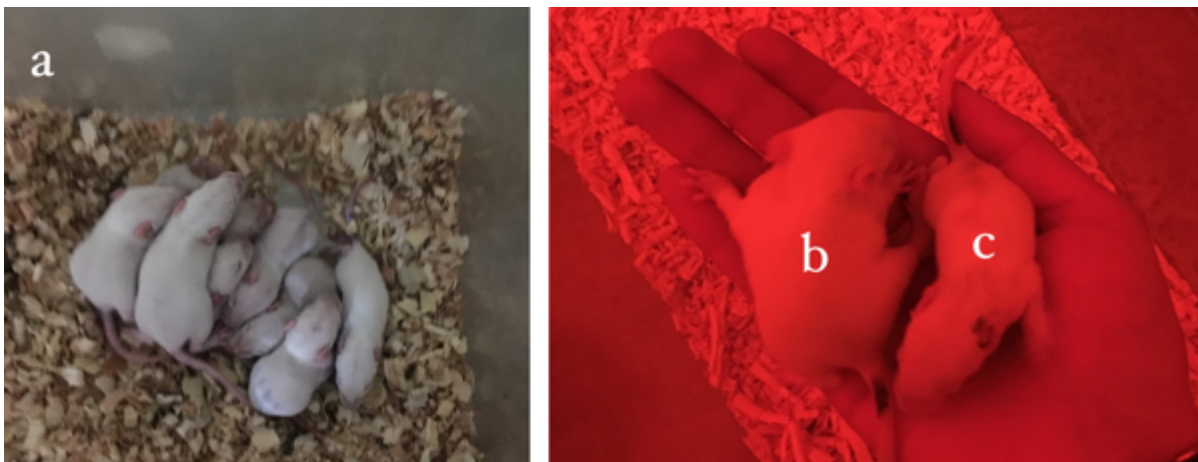


Figura 22. Fotografías de las ratas experimentales. a) camada de ratas privadas y no privadas del cuidado materno en el día postnatal 8. b) rata control en el día postnatal 9. c) rata privada del cuidado materno en el día postnatal 9.

10.1 Conducta

Los datos de las conductas de investigación ambiental, auto-aseo y exploración ambiental presentaron una distribución normal. No se analizaron los datos de la conducta de intento por traspasar la malla puesto que pocos individuos exhibieron esta conducta y, por lo tanto, los datos fueron insuficientes. La prueba de t-student mostró que, durante la exposición a la novedad social, las ratas privadas del cuidado materno pasaron menos tiempo investigando al conespecífico novedoso en comparación con las ratas no privadas del cuidado materno ($t=2.45561$, $P < 0.05$) (figura 23a). También se observó que el tiempo de acicalamiento fue menor en ratas privadas del cuidado materno ($t=2.78087$, $P < 0.05$) (figura 23b). En relación con la conducta de exploración ambiental, la prueba de t-student mostró que los individuos privados del cuidado materno pasaron más tiempo explorando el área de prueba con respecto a las ratas que no fueron privadas del cuidado materno ($t=1.36781$, $P < 0.05$) (figura 23c).

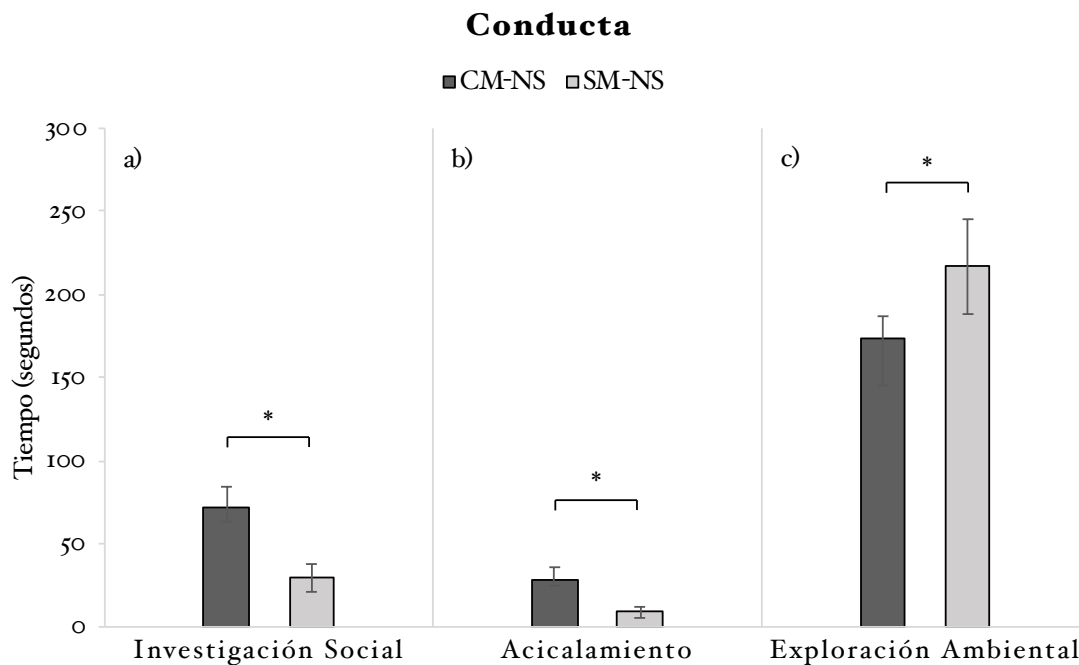


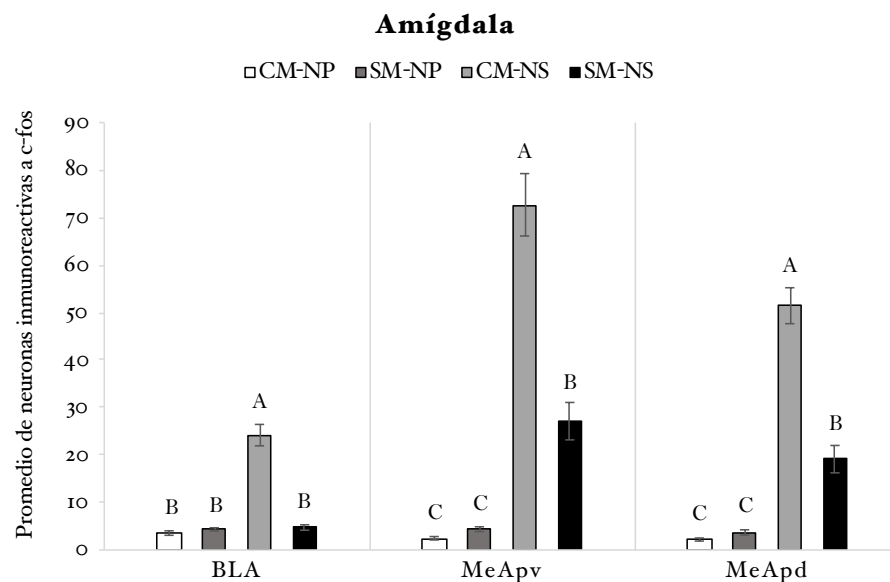
Figura 23. Las gráficas muestran el tiempo promedio en que los individuos exhibieron las conductas de a) investigación social, b) acicalamiento y c) exploración ambiental, durante los primeros 5 minutos de la prueba de novedad social. Cuidado Materno-Novedad Social (CM-NS), Separación Materna-Novedad Social (SM-NS). Las barras representan las medias \pm el error estándar de la media. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos.

10.2 Inmunorreactividad de c-Fos en el cerebro social

10.2.1 Amígdala

Para la BLA, la prueba de ANOVA indicó que existen diferencias significativas en el número de neuronas inmunoreactivas a c-Fos entre los grupos experimentales ($F(3,58)=67.27$; $P<0.05$). La prueba LSD mostró que el número de neuronas inmunoreactivas a c-Fos fue mayor en el grupo CM-NS, pero no se encontraron diferencias significativas entre los grupos CM-NP, SM-NP y SM-NS (figura 24). Se encontraron diferencias significativas en el número de neuronas inmunoreactivas a c-Fos en la MeA, tanto en su porción posterodorsal ($F(3,60)=88.15$; $P<0.05$) como en su porción posteroventral ($F(3,60)=70.21$; $P<0.05$). La prueba LSD mostró que en las dos porciones de la MeA, el número de neuronas inmunoreactivas fue mayor en los grupos expuestos a la novedad social CM-NS y SM-NS respecto a los grupos control CM-NP y SM-NP (figura 24), pero el grupo SM-NS fue menor que el grupo CM-NS.

A)



B)

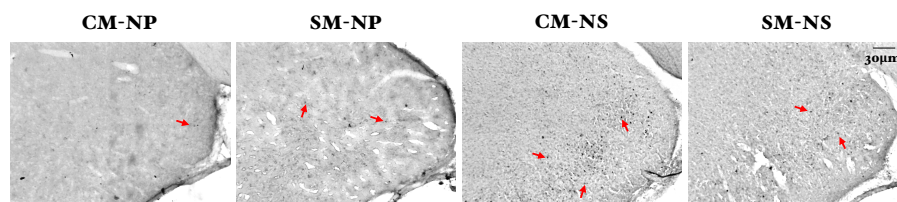
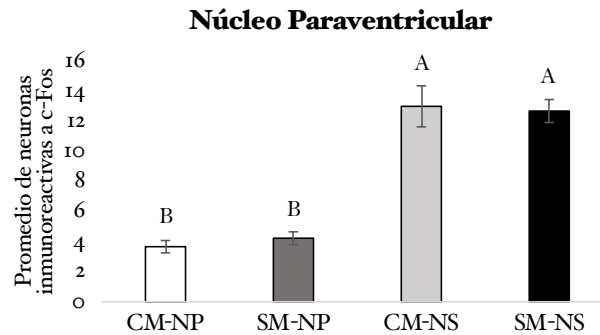


Figura 24. A) La gráfica muestra la media de las células c-Fos-ir en $148,620 \mu\text{m}^2$ en la Amígdala Basolateral (BLA), Amígdala Medial posteroventral (MeApv) y Amígdala Medial posterodorsal (MeApd) de los grupos Cuidado Materno-Ninguna Prueba (CM-NP), Separación Materna-Ninguna Prueba (SM-NP), Cuidado Materno-Novedad Social (CM-NS), Separación Materna-Novedad Social (SM-NS). Las barras representan las medias \pm el error estándar. Las letras indican diferencias significativas entre grupos, los grupos que comparten letras son estadísticamente similares. B) Microfotografías que muestran la inmunoreactividad de c-Fos en la MeApv de los distintos grupos. Las columnas indican el grupo experimental. Las flechas señalan neuronas inmunoreactivas a c-Fos.

10.2.2 Núcleo paraventricular del hipotálamo

La prueba de ANOVA indicó que existen diferencias significativas en el número de neuronas inmunoreactivas a c-Fos entre los grupos experimentales ($F(3,57)=25.3245$; $P<0.05$). No se encontraron diferencias entre los grupos expuestos a la novedad social CM-NS y SM-NS, pero estos fueron diferentes respecto a los grupos control CM-NP y SM-NP (figura 25).

A)



B)

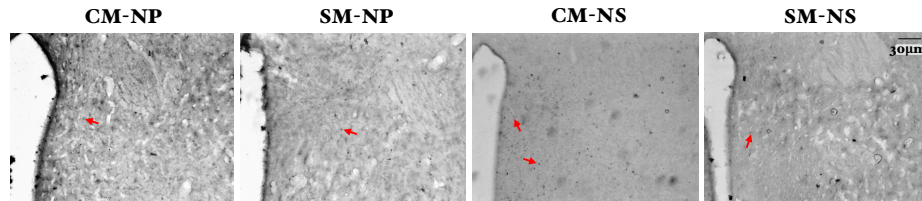


Figura 25. A) La gráfica muestra la media de las células c-Fos-ir en $148,620 \mu\text{m}^2$ en el núcleo paraventricular del hipotálamo de los grupos Cuidado Materno-Ninguna Prueba (CM-NP), Separación Materna-Ninguna Prueba (SM-NP), Cuidado Materno-Novedad Social (CM-NS), Separación Materna-Novedad Social (SM-NS). Las barras representan las medias \pm el error estándar. Las letras indican diferencias significativas entre grupos, los grupos que comparten letras son estadísticamente similares.

Figura 25 (continuación). B) Microfotografías que muestran la inmunoreactividad de c-Fos en el PVN de los distintos grupos. Las columnas indican el grupo experimental. Las flechas señalan neuronas inmunoreactivas a c-Fos.

10.2.3 Septum lateral

Para el septum lateral, la prueba de ANOVA indicó que existen diferencias significativas en el número de neuronas inmunoreactivas a c-Fos entre los grupos experimentales ($F(3,57)=35.75$, $P<0.05$). El número de neuronas inmunoreactivas fue mayor en los grupos expuestos a la novedad social, CM-SN y SM-NS, respecto a los grupos control CM-NP y SM-NP, pero el grupo SM-NS fue menor que el grupo CM-NS (figura 26).

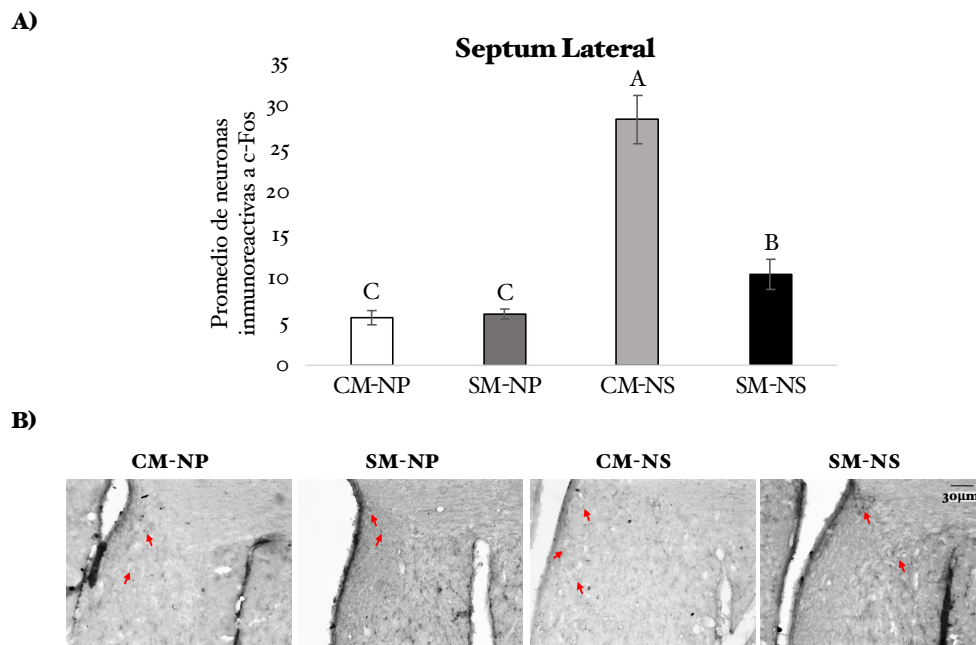
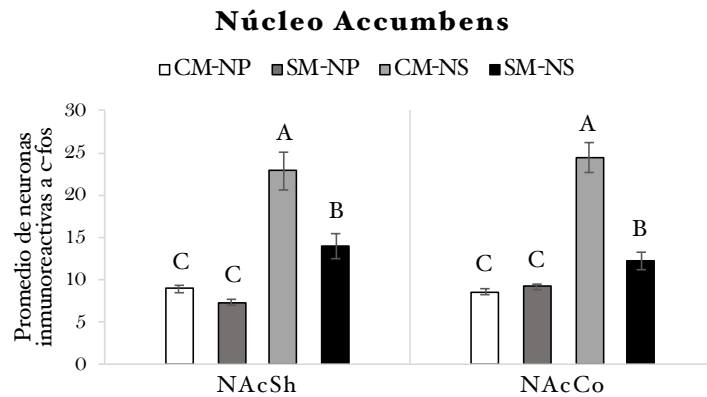


Figura 26. La gráfica muestra la media de las células c-Fos-ir en $148,620 \mu\text{m}^2$ en el Septum Lateral de los grupos Cuidado Materno-Ninguna Prueba (CM-NP), Separación Materna-Ninguna Prueba (SM-NP), Cuidado Materno-Novedad Social (CM-NS), Separación Materna-Novedad Social (SM-NS). Las barras representan las medias \pm el error estándar. Las letras indican diferencias significativas entre grupos, los grupos que comparten letras son estadísticamente similares. B) Microfotografías que muestran la inmunoreactividad de c-Fos en el LS de los distintos grupos. Las columnas indican el grupo experimental. Las flechas señalan neuronas inmunoreactivas a c-Fos.

10.2.4 Núcleo accumbens

La prueba de ANOVA indicó que existen diferencias significativas en número de neuronas inmunoreactivas a c-Fos en el núcleo accumbens, tanto en su porción shell ($F(3,60)=26.84$, $P<0.05$) como en su porción core ($F(3,60)=50.92$, $P<0.05$). La prueba LSD mostró que, para las dos áreas, el número de neuronas inmunoreactivas fue mayor en los grupos expuestos a la novedad social CM-SN y SM-NS respecto a los grupos control CM-NP y SM-NP (figura 27), pero el grupo SM-NS fue menor que el grupo CM-NS.

A)



B)

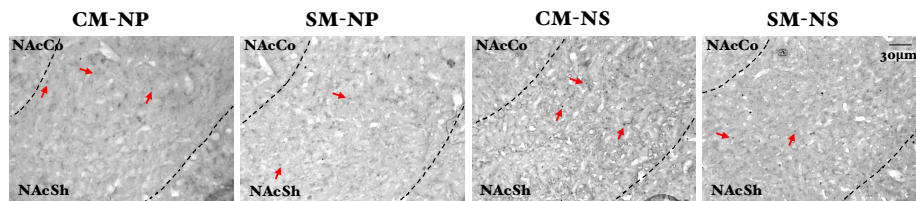
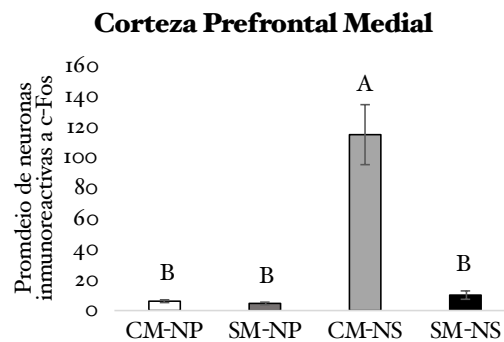


Figura 27. La gráfica muestra la media de las células c-Fos-ir en $148,620 \mu\text{m}^2$ en el a) Núcleo Accumbens Shell y b) Núcleo Accumbens Core de los grupos Cuidado Materno-Ninguna Prueba (CM-NP), Separación Materna-Ninguna Prueba (SM-NP), Cuidado Materno-Novedad Social (CM-NS), Separación Materna-Novedad Social (SM-NS). Las barras representan las medias \pm el error estándar. Las letras indican diferencias significativas entre grupos, los grupos que comparten letras son estadísticamente similares. B) Microfotografías que muestran la inmunoreactividad de c-Fos en el NAcSh y NAcCo de los distintos grupos. Las columnas indican el grupo experimental. Las flechas señalan neuronas inmunoreactivas a c-Fos.

10.2.5 Corteza prefrontal medial

La prueba de ANOVA indica que existen diferencias significativas entre en número de neuronas inmunoreactivas a c-Fos en la corteza prefrontal medial ($F(3,59)=88.15$, $P<0.05$), de manera que el número de neuronas inmunoreactivas fue mayor en el grupo CM-SN en comparación con los demás grupos, pero no se encontraron diferencias significativas entre los grupos CM-NP, SM-NP y SM-NS (*figura 28*).

A)



B)

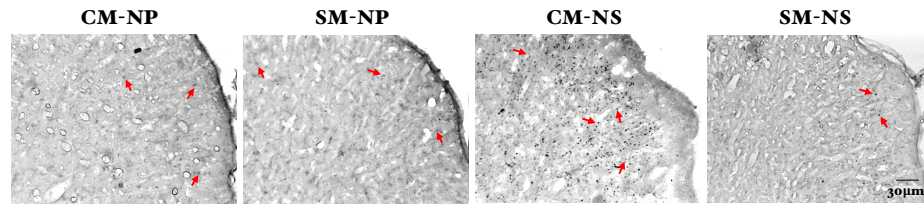


Figura 28. La gráfica muestra la media de las células c-Fos-ir en $148,620 \mu\text{m}^2$ en la Corteza Cingular de los grupos Cuidado Materno-Ninguna Prueba (CM-NP), Separación Materna-Ninguna Prueba (SM-NP), Cuidado Materno-Novedad Social (CM-NS), Separación Materna-Novedad Social (SM-NS). Las barras representan las medias \pm el error estándar. Las letras indican diferencias significativas entre grupos, los grupos que comparten letras son estadísticamente similares. B) Microfotografías que muestran la inmunoreactividad de c-Fos en la mPFC de los distintos grupos. Las columnas indican el grupo experimental. Las flechas señalan neuronas inmunoreactivas a c-Fos.

11 DISCUSIÓN

Se registró el peso corporal como una medida indirecta del déficit del cuidado materno. Se ha reportado que la privación del cuidado materno induce una reducción del peso corporal en ratas macho (Ogawa et al., 1994; McIntosh et al 1999; Kalinichev et al., 2002; Livtin et al., 2010), aunque hay algunos estudios que reportan que no tiene efectos sobre el peso corporal (Slotten et al., 2006). Los resultados del presente trabajo confirman los estudios que informan que la privación del cuidado materno reduce el peso corporal de los individuos, ya que el peso corporal de las ratas privados del cuidado materno, durante los días postnatales 1-21, fue menor que las ratas no privadas del cuidado materno.

11.1 Conducta

11.1.1 Investigación social

Durante la juventud, los individuos buscan las interacciones sociales con mayor frecuencia que los adultos ya que representan un estímulo altamente gratificante durante esta etapa de la vida (Smith et al., 2015; Gómez-Gómez et al., 2019). Por otra parte, se ha reportado que la exposición al estrés crónico, como la separación materna, suprime la motivación para participar en actividades placenteras (Birn et al., 2017; Dennison et al., 2019). Existen estudios controvertidos sobre los efectos de la privación del cuidado materno y la conducta social; algunos estudios reportan que no tiene ningún efecto, ya que roedores privados y no privados pasan el mismo tiempo socializando con un conespecífico novedoso (Kentrop et al., 2018; Kambali et al., 2019), mientras que otros estudios reportan que la privación del cuidado materno reduce la investigación social (Girardi et al., 2014; Lee et al., 2019; Houwing et al., 2019). Sin embargo, los distintos resultados podrían deberse al procedimiento de separación materna empleado y la edad de los individuos en la cual se realizaron las distintas pruebas de conducta social en cada estudio. Por ejemplo, 22 h de separación materna en el día postnatal 10 reduce el tiempo de investigación social en individuos jóvenes (Girardi et al, 2014), mientras que 24 h de separación materna en el día postnatal 3 y 6 h de separación materna durante los días postnatales 4-14 no modifica la conducta de interacción social en la edad adulta (Kentrop et al., 2018; Kambali et al., 2019). Los resultados encontrados concuerdan con aquellos estudios que reportan que la privación del

cuidado materno reduce la investigación social, y el hecho de que los individuos privados del cuidado materno hayan pasado menos tiempo socializando con el conoespecífico novedoso sugiere que la privación del cuidado materno modifica la expresión de conductas relacionadas con la recompensa social, posiblemente debido a alteraciones en áreas cerebrales involucradas en el procesamiento de recompensas inducidas por la privación del cuidado materno (Dennison et al., 2019).

11.1.2 Acicalamiento

La mayoría de los estudios han evaluado el acicalamiento en la prueba de campo abierto o en el laberinto elevado y la conducta social por separado (Bondar et al., 2017; Girardi et al., 2017). En el presente trabajo, se evaluó la expresión de la conducta de acicalamiento durante la exposición a la novedad social. El acicalamiento en roedores es una conducta que además de tener funciones de limpieza corporal, puede ser expresado por estímulos emocionalmente excitantes (Estanislau et al., 2019) o por la exposición a estresores (van Erp, 1994). Aunque esta conducta no puede entenderse simplemente como una respuesta inmediata a la exposición a los estresores, más bien parece ser explícitamente suprimida (van Erp, 1994). La novedad es considerada un estresor ya que induce la liberación de corticosteroides (Maccari et al., 1995; Kabbaj et al., 2000). Por otra parte, se ha demostrado que la separación materna induce una hiperactivación de los sistemas de estrés después de la exposición a un estresor (Levine, 2001; Levine, 2002; Vetulani, 2013). Por lo tanto, la reducción en el tiempo de acicalamiento en ratas privadas del cuidado materno (*figura 23b*) podría deberse a la hiperactivación de los sistemas de estrés inducida por la novedad social. Aunque para confirmar esto, se necesitaría evaluar los niveles de corticosteroides, en el plasma de los individuos después de la exposición a la novedad social.

11.2 Inmunoreactividad a c-Fos en el cerebro social

11.2.1 Amígdala

Numerosos estudios han demostrado que la BLA juega un papel importante en el miedo, la ansiedad, en la conducta social y recompensa (Etkin et al., 2009; Wellman et al., 2016; Lichtenberg et al., 2017). Un estudio reportó que la exposición al estrés durante el desarrollo

temprano induce la hipertrofia de las neuronas y reduce el número de sinapsis excitatorias de la BLA (Koe et al., 2016). Dado que la expresión de c-Fos es inducida por señales excitatorias (Jaworski et al., 2018), la expresión reducida de c-Fos en la BLA de ratas privadas del cuidado materno podría deberse a la reducción de sinapsis excitatorias en la BLA inducido por la exposición al estrés durante el desarrollo temprano. Con respecto a la MeA, estudios han reportado que cuando ratones interactúan con un nuevo conespecífico, hay una inducción en la expresión de c-Fos dentro en esta área del cerebro (Ferguson et al., 2000; Kim et al., 2015), a excepción de ratones *knock-out* a OXT (Ferguson et al., 2000), lo que sugiere un suministro de OXT dentro de esta región del cerebro durante las interacciones sociales novedosas. Los resultados de este trabajo muestran que el número de células inmunorreactivas de c-Fos en la MeA fue significativamente menor en ratas privadas del cuidado materno expuestas a la novedad social, en comparación con ratas no privadas del cuidado materno. Estos resultados sugieren que la actividad neuronal reducida del MeA de sujetos focales podría deberse a la reducida liberación de OXT durante la exposición a la novedad social.

11.2.2 *Septum lateral*

Un sitio de proyección de la MeA relevante en el procesamiento de información y conducta social es el LS. Dentro de esta región del cerebro, el neuropéptido AVP, desempeña un papel importante en la adquisición de la memoria social (Bielsky et al., 2005). Por ejemplo, el suministro local de AVP en el LS facilita la memoria social en ratas macho adultas, mientras que la inyección local de antagonistas de AVP en el LS impiden la adquisición de la memoria social (Danzter et al., 1988; Everts y Koolhaas, 1999). Un estudio que evaluó la liberación endógena de AVP dentro del LS mostró que la privación del cuidado materno impide el reconocimiento social en ratas adultas al afectar la liberación de AVP durante un encuentro social novedoso, y que el reconocimiento social se puede restaurar en ratas privadas del cuidado materno administrando AVP en el LS (Lukas et al., 2011). Dado esto, la reducción en el número de células inmunorreactivas c-Fos en el LS de ratas privadas del cuidado materno expuestas a la novedad social podría deberse a una reducida liberación de AVP dentro del LS inducida por la exposición al estrés durante el desarrollo temprano por privación del cuidado materno.

11.2.3 Núcleo paraventricular del hipotálamo

En un estudio anterior, realizado por este equipo de trabajo se demostró que la expresión de c-Fos en el PVN de ratas jóvenes aumenta cuando los individuos son expuestos a un conoespecífico novedoso (Gómez-Gómez et al., 2019). Los resultados de este estudio muestran que la expresión de c-Fos en el PVN aumenta al exponer a ratas adultas a un conoespecífico novedoso, pero que su actividad no se ve modificada por la privación del cuidado materno. Una posible explicación del porqué no se observaron diferencias en el inmunomarcaje a c-Fos en el PVN podría deberse a la región analizada. El PVN es una región cerebral compuesta de distintos núcleos que presentan diferentes tipos de células que expresan numerosos péptidos, neurotransmisores y hormonas (Eliava et al., 2016). En este trabajo, no distinguimos entre la inmunoreactividad de las diferentes poblaciones del PVN; por lo tanto, para explicar el hecho de que no se encontraron diferencias en el número de neuronas inmunoractivas a c-Fos en el PVN, requeriríamos un análisis más detallado de las diferentes poblaciones celulares de este núcleo, como las neuronas oxitocinérgicas parvocelulares que tienen proyecciones directas al NAc, donde su actividad es necesaria para la conducta y recompensa social (Dölen et al., 2013; Love, 2013).

11.2.4 Núcleo accumbens

Como se mencionó, las neuronas parvocelulares en el PVN tienen proyecciones oxitocinérgicas directas al NAcc, donde la OXT activa los OXTR e induce la plasticidad en las sinapsis excitadoras necesarias para los vínculos sociales entre los miembros de un grupo (Dölen et al., 2013). En un trabajo previo, se demostró que el valor hedónico de la exposición a la novedad social durante la juventud es mayor en comparación con otros estímulos, como la familiaridad social y la exposición a un ambiente novedoso, ya que induce la activación de un mayor número de neuronas en el NAc (Gómez-Gómez et al., 2019). Estudios han demostrado que la actividad del NAc puede verse influenciada por dopamina, opioides, oxitocina y serotonina (Trezza et al., 2011; Dölen et al., 2013), y en contextos sociales no reproductivos, las acciones de la AVP y OXT en el Nac están involucradas en la recompensa social, especialmente durante encuentros sociales novedosos en individuos adultos (Ferguson et al., 2000; Bielsky et al., 2004; Dölen et al., 2013; Gómez-Gómez et al., 2019).

Se ha demostrado que la exposición a eventos adversos durante el desarrollo temprano induce cambios en las propiedades microestructurales de las regiones asociadas a la recompensa del cerebro en desarrollo (Dennison et al., 2019), como el NAc y mPFC (Wang et al., 2015), y han relacionado dichas modificaciones con alteraciones en el procesamiento de recompensas (Birn et al., 2017; Dennison et al., 2019). Los resultados de este trabajo muestran que el número de células c-Fos-ir aumenta en el NAc cuando los individuos adultos están expuestos a un nuevo conespecífico, pero que el número de células c-Fos-ir es significativamente menor en ratas privadas del cuidado materno. Estos resultados sugieren que la reducción en el número de neuronas inmunoreactivas en el NAc de ratas privadas del cuidado materno expuestas a novedad social podría deberse a la liberación de AVP y OXT dentro de esta región cerebral relacionada con la actividad de otros núcleos cerebrales como MeA y posiblemente VTA, ya que juega un papel importante en el procesamiento de recompensas sociales (Gundayin et al., 2014; Hung et al., 2017), que influyen en la actividad del NAc (Peris et al., 2017). Estudios han demostrado que la actividad de neuronas dopaminérgicas del VTA que proyectan al NAcSh, NAcCo y mPFC incrementa tras la exposición a la novedad social (de Leonibus et al., 2006; Gundayin et al., 2014; Takeuchi et al., 2016), y dicho incremento en la actividad de neuronas dopaminérgicas del VTA está asociado con el incremento de la investigación social hacia individuos desconocidos (Gundayin et al., 2014). No pudimos recolectar tejido del VTA para esta investigación; por lo tanto, esto deja abierta la posibilidad de estudiar la actividad de este núcleo ante la exposición a novedad social en ratas adultas privadas del cuidado materno.

11.2.5 Corteza prefrontal medial

Se ha postulado a la mPFC, junto con áreas que median los aspectos de recompensa de la interacción social como el NAc y VTA (Gunaydin et al., 2014; Kas et al., 2014; Kim et al., 2015), como el sustrato neuronal clave para la regulación de la conducta y motivación social en roedores (Lee et al., 2016). Por ejemplo, en un estudio en el cual emplearon la prueba de interacción social de tres cámaras, que es empleada para evaluar sociabilidad en general y la preferencia por la novedad social, demostraron que neuronas de la mPFC exhibían altas tasas de descarga mientras los roedores se acercaban a un conespecífico desconocido, pero no cuando los individuos se acercaban a un objeto o cámara vacía (Kaidanovich-Beilin et al., 2011). Por otra parte, se ha

sugerido que los déficits sociales en modelos de roedores podrían estar relacionados con el funcionamiento alterado de la mPFC (Holland et al., 2014; Bicks et al., 2015).

Se ha demostrado que la privación del cuidado materno induce cambios en la mPFC a nivel molecular en la edad adulta (Wang et al., 2015) e irrumpe sus funciones cognitivas (Yang et al., 2017). Los resultados de este trabajo muestran que la actividad neuronal de la mPFC incrementó al exponer a los individuos a un sujeto desconocido, lo que concuerda con lo reportado por (Kaidanovich-Beilin et al., 2011); sin embargo, se observó un aumento de la actividad neuronal en la mPFC de individuos privados del cuidado materno. Una posible explicación del porqué no se observó actividad en la mPFC de ratas privadas del cuidado expuestas a la novedad social podría deberse a que otras áreas como el NAc, y posiblemente el VTA, que comparte proyecciones directas a la mPFC tampoco se activaron. Como la actividad de la mPFC se correlaciona con la motivación social en roedores (Lee et al., 2016), la reducción en el tiempo de investigación social de ratas adultas privadas del cuidado materno podría atribuirse a que la mPFC de estos individuos tampoco se activó.

Las observaciones demuestran que la privación del cuidado materno reduce la motivación de individuos adultos por socializar con conespecíficos novedosos, ya que ratas privadas del cuidado materno pasaron menos tiempo investigando al sujeto desconocido, y que la privación del cuidado materno induce cambios en la actividad de áreas cerebrales que comprenden el cerebro social. Las áreas que fueron sensibles a la privación del cuidado materno fueron la BLA, MeA, LS, NAc y mPFC. Dado que no se encontraron diferencias en la actividad del PVN entre ratas privadas y no privadas del cuidado materno, los cambios en la actividad del Nac y mPFC podrían atribuirse a la reducida liberación de dopamina por parte del VTA al NAc. A pesar de que no se evaluó la actividad del VTA en este trabajo, no se descarta su participación en el sistema. Para explicar la igualdad en la expresión de c-Fos en el PVN, se requeriría un análisis más detallado de la actividad de las diferentes poblaciones celulares del núcleo.

12 CONCLUSIONES

- 🐭 La privación del cuidado materno redujo el tiempo de investigación social entre individuos novedosos.
- 🐭 Ante la exposición a la novedad social la actividad de la amígdala, septum lateral, núcleo accumbens, y corteza prefrontal medial se ve reducida por la privación del cuidado materno.
- 🐭 En la edad adulta, la actividad del PVN se ve incrementada tras la exposición a la novedad social.
- 🐭 La actividad del PVN ante la exposición a la novedad social no se ve modificada por la exposición al estrés crónico durante la edad temprana.
- 🐭 Los resultados sugieren que los cambios en la actividad provocados por la privación del cuidado materno pudieran ser la base de distintos trastornos conductuales en el dominio social.

13 REFERENCIAS

Aisa B, Tordera R, Lasheras B, Del Rio J, Ramirez MJ. 2007. Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats. *Psychoneuroendocrinology*. 32(3):256–266. doi: 10.1016 / j.psyneuen.2006.12.013.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P. 2016. Molecular biology of the cell. (6^a ed). United Kingdom: Garland Science.

Andersen SL, Teicher MH. 2008. Desperately driven and no brakes: developmental stress exposure and subsequent risk for substance abuse. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2008.09.009>.

Andersen SL, Tomada A, Vinchow ES, Valente E, Polcari A, Teicher MH. 2008. Preliminary evidence for sensitive periods in the effect of childhood sexual abuse on regional brain development. *The Journal of Neuropsychiatry Clinical Neurosciences*. 20:292–301. Doi: <http://dx.doi.org/10.1176/appi.neuropsych.20.3.292>.

Ball JS, Links PS. 2009. Borderline personality disorder and childhood trauma: evidence for a causal relationship. *Current Psychiatry Reports*. 11:63–68. <http://dx.doi.org/10.1007/s11920-009-0010-4>.

Barros VN, Mundim M, Galindo LT, Bittenourt S, Porcionatto M, Mello LE. 2015. The pattern of c-Fos expression and its refractory period in the brain of rats and monkeys. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 9:72. doi: <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00072>.

Baum MJ, Kelliher KR. 2009. Complementary roles of the main and accessory olfactory systems in mammalian mate recognition. *Annual Review of Physiology*. 71:141–160. doi: <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.010908.163137>.

Becker K, Abraham A, Kindler J, Helmeke C, Braun K. 2007. Exposure to neonatal separation stress alters exploratory behavior and corticotropin releasing factor expression in neurons in the amygdala and hippocampus. *Developmental Neurobiology*. 67(5):617–629. doi: 10.1002 / dneu.20372.

Berridge KC. 2004. Motivation concepts in behavioral neuroscience. *Physiology & Behavior*. 81:179-209. doi: 10.1016/j.physbeh.2004.02.004

Berridge KC, Aldridge JW, Houchards KR, Zhuang X. 2005. Sequential super-stereotypy of an instinctive fixed action pattern in hyper-dopaminergic mutant mice: a model of obsessive compulsive disorder and tourette's. *BMC Biology*. 3:4. doi: 10.1186/1741-7007-3-4.

Bicks LK, Koike H, Akbarian S, Morishita H. 2015. Prefrontal cortex and social cognition in mouse and man. *Frontiers in Psychology*. 6:1805. doi: 10.3389/fpsyg.2015.01805.

Birn RM, Roeber BJ, Pollak SD. 2017. Early childhood stress exposure, reward pathways, and adult decision making. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 114(51):13549–13554. doi: 10.1073/pnas.1708791114.

Boeijinga PH, van Groen T. 1984. Inputs from the olfactory bulb and olfactory cortex to the entorhinal cortex in the cat. II. Physiological studies. *Experimental Brain Research*. 57, 40–48. doi: <https://doi.org/10.1007/BF00231130>.

Bratthauer GL. 2009. Adivin-biotin Complex (ABC) method and other avidin-biotin binding methods. En: Oliver C, Jamur MC. (eds.) *Immunocytochemical Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. 588:257-270.

Brock J, Gruss M, Becker S, Braun K. 2005. Experience-induced changes of dendritic spine densities in the prefrontal and sensory cortex: correlation with developmental time windows. *Cerebral Cortex*. 15(6):802–808. doi: 10.1093 / cercor / bhh181.

Brothers L. 1990. The social brain: a project for integrating primate behavior and neurophysiology in new domain. *Concepts in Neuroscience*. 1:27-57. doi: 10.1146 / annurev.psych.60.110707.163514.

Bryce CA, Floresco SB. 2016. Perturbations in effort-related decision-making driven by acute stress and corticotropin-releasing factor. *Neuropsychopharmacology* 41:2147-2159. doi: <http://dx.doi.org/10.1038/npp.2016.15>.

Buchwalow IB, Bocker W. 2010. Antibody labeling and the choice of label immunohistochemistry basics and methods. United States of America: Springer.

Chaaya N, Battle AR, Johnson LR. 2018. An update on contextual fear memory mechanisms: transition between amygdala and hippocampus. *Neuroscience and Behavioral Reviews*. 05.013. doi: 10.1016 / j.neubiorev.2018.05.013.

Champagne FA, Francis DD, Mar A, Meaney MJ, 2003. Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. *Physiology and Behavior*. 79(3):359-371. doi: 10.1016 / s0031-9384 (03) 00149-5.

Chevaleyre V, Siegelbaum SA. 2010. Strong CA2 pyramidal neuron synapses define a powerful disinaptic cortico-hippocampal loop. *Neuron*. 66, 560-572. doi: 10.1016 / j.neuron.2010.04.013.

Chevallier C, Kohls G, Troiani V, Brodtkin ES, Schultz RT. 2012. The social motivation theory of autism. *Trends in Cognitive Sciences*. 16(4):231-9. doi: 10.1016/j.tics.2012.02.007.

Chiang MC, Huang AJY, Wintzer ME, Ohshima T, McHugh TJ. 2018. A role for CA3 in social recognition memory. *Brain Behavioral Research*. 15(354):22-30. doi: 10.1016 / j.bbr.2018.01.019.

Choi GB, Dong HW, Murphy AJ, Valenzuela DM, Yancopoulos GD, Swanson LW, Anderson DJ. 2005. Lhx6 delineates a pathway mediating innate reproductive behaviors from the amygdala to the hypothalamus. *Neuron*. 289:1569-1572. doi: 10.1016 / j.neuron.2005.04.011

Cibrian-Llenderal T, Melgarejo-Gutiérrez M, Hernández-Baltazar, D. 2018. Stress and cognition: psychological basis and support resources. En: Bernal-Morales B. ed. Health and Academic Achievement, IntechOpen. 11-29. doi: 10.5772 / intechopen.72566.

Committee for the update of the guide for the care and use of laboratory animals. 2011. Environment, housing and management, en: Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington DC. *The National Academic Press*. 8^oed.

Craenenbroeck KV, Bosscher KD, Berghe WV, Vanhoenacker P, Haegeman G. 2005. Role of glucocorticoids in dopamine-related neuropsychiatric disorders. *Molecular and Cell. Endocrinology*. 245:10–22. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2005.10.007.

Cui Z, Gerfen CR, Young WS 3rd. 2013. Hypothalamic and other connections with dorsal CA2 area of the mouse hippocampus. *Journal of Comparative Neurology*. 521:1844–1866. doi: 10.1002 / cne.23263.

de Kloet ER. 2016. Corticosteroid receptor balance hypothesis: implications for stress. En: Fink G. ed. Stress, cognition and behavior. Academic Press. 21-31.

de Leonibus E, Verheij MMM, Mele A, Cools A. 2006. Distinct kinds of memory processing differentially increase extracellular dopamine in different brain regions. *European Journal of Neuroscience*. 23 (5): 1332-1340. doi: 10.1111/j.1460-9568.2006.04658.x.

Holland FH, Ganguly P, Potter DN, Cartoff EH, Brenhpuse HC. 2014. Early life stress disrupts social behavior and prefrontal cortex parvalbumin interneurons at an earlier time-point in females than in males. *Neuroscience Letters*. 566:131–136. doi:10.1016/j.neulet.2014.02.023.

Dennison MJ, Rosen ML, Sambrook, KA, Jenness JL, Sheridan MA, McLaughlin KA. 2017. Differential associations or distinct forms of childhood adversity with neurobehavioral measures of reward processing: a developmental pathway to depression. *Society for Research in Child Development*. 90(1):e96-e113. doi: 10.1111/cdev.13011.

Dölen G, Darvishzadeh A, Huang KW, Malenka RC. 2013. Social reward requires coordinated activity of nucleus accumbens oxytocin and serotonin. *Nature*. 501:179–184. doi: 10.1038 / nature12518.

Dudek SM, Alexander GM, Farris S. 2016. Rediscovering area CA2: unique properties and function. *Nature Reviews Neuroscience*. 17:89–102. doi: 10.1038 / nrn.2015.22.

Eliava M, Melchior M, Knobloch-Bollman HS, Wahis J, da Silva Gouveia M, Tang Y, Ciobanu Ac, Triana del Rio R, Roth LC, Althammer F, Chavant V, Goumon Y, Gruber T, Petit-Demoulière N, Busnelli M, Chini B, Tan LL, Mitre M, Froemke RC, Chao MV, Giese G, Sprengel R, Kuner R, Poisbeau P, Seeburg PH, Stoop R, Charlet A, Grinevich V. 2016. A New Population of Parvocellular Oxytocin Neurons Controlling Magnocellular Neuron Activity and Inflammatory Pain Processing. *Neuron*. 89(6):1291–1304. doi: 10.1016/j.neuron.2016.01.041.

Estanislau C, Veloso AWN, Filgueiras GB, Maio TP, Dal-Cól MLC, Cunha DC, Klein R, Carmona LF, Fernández-Teruel A. 2019. Rat self-grooming and its relationships with anxiety, dearousal and preservation: evidence for a self-grooming trait. *Physiology & Behavior*. 1(209):112585. doi: 10.1016 / j.physbeh.2019.112585.

Etkin A, Prater KE, Schatzberg AF, Menon V, Greicius MD. 2009. Disrupted amygdala subregion functional connectivity and evidence of a compensatory network in generalized anxiety disorder. *Archives of General Psychiatry*. 66(12):1361–72. doi: 10.1001/archgenpsychiatry.2009.104.

Everts HG, Koolhaas JM. 1999. Differential modulation of lateral septal vasopressin receptor blockade in spatial learning, social recognition, and anxiety-related behaviors in rats. *Behavioral Brain Research*. 99(1):7–16. doi: 10.1016/s0166-4328(98)00004-7.

Ferguson JN, Aldag JM, Insel TR, Young LJ. 2001. Oxytocin in the medial amygdala is essential for social recognition in the mouse. *Journal of Neuroscience*. 21(20):8278–8285. doi: 10.1523 / JNEUROSCI.21-20-08278.2001.

Gage GJ, Kipke DR, Shain W. 2012. Whole animal perfusion for rodents. *Journal of Visualized Experiments*. 65:e3564. doi: 10.3791 / 3564.

Garcia VA, Hirotsu C, Matos G, Alvarenga T, Pires GN, Kapczinski F, Andersen ML. 2013. Modafinil ameliorates cognitive deficits induced by maternal separation and sleep deprivation. *Behavioral Brain Research*. 253:274–279. doi: 10.1016 / j.bbr.2013.07.029.

Girardi NCE, Zanta NC, Suchecki D. 2014. Neonatal stress induced affective changes in adolescent Wistar rats: early signs of schizophrenia-like behavior. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 8:319. doi: 10.3389 / fnbeh.2014.00319.

Gómez-Gómez YM, Sánchez-Aparicio P, Mejía-Chávez S, García-García F, Pascual-Mathey LI, Aguilera-Reyes U, Galicia O, Venebra-Muñoz A. 2019. c-Fos immunoreactivity in the hypothalamus and reward system of young rats after social novelty exposure. *NeuroReport*. 30:510-515. doi: 10.1097 / WNR.0000000000001236.

Gunaydin LA, Grosenick L, Finkelstein JC, Kauvar LV, Fenno LE, Adhikari A, Lammel S, Mirzabekov JJ, Airan RD, Zalocusky KA, Tye KM, Anikeeva P, Malenka, Deisseroth K. 2016. Natural neural projection dynamics underlying social behavior. *Cell*. 157:1535-1551. doi: 10.1016 / j.cell.2016.05.048. doi: 10.3791/2473.

Harold GT, Leve LD, Barrett D, Elam K, Neiderhiser JM, Natsuaki MN, Shaw DS, Reiss D, Thapar A. 2013. Biological and rearing mother influences on child ADHD symptoms: revisiting the developmental interface between nature and nurture. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*. 54:1038–1046. doi: <http://dx.doi.org/10.1111/jcpp.12100>.

Hitti FL, Siegelbaum SA. 2014. The hippocampal CA2 region is essential for social memory. *Nature*. 508: 88-92. doi: 10.1038 / nature13028.

Hoffman GE, Lyo D. 2002. Anatomical markers of activity in neuroendocrinology systems: are we all 'fos-ed out'? *Journal of Neuroendocrinology*. 14(4):259-268. doi: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.2002.00775.x>.

Houwing DJ, Staal L, Swart JM, Ramsteijn AS, Wöhr M, de Boer SF, Olivier JDA. 2019. Subjecting dams to early life stress and perinatal fluoxetine treatment differentially alters social behavior in young and adult rat offspring. *Frontiers in Neuroscience*. 13:229. doi: <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00229>.

Huot RL, Thirivikraman KV, Meaney MJ, Plotsky PM. 2001. Development of adult ethanol preference and anxiety as a consequence of neonatal maternal separation in Long Evans rats and reversal with antidepressant treatment. *Psychopharmacology*. 158(4):366–373. doi: 10.1007 / s002130100701.

Insel TR, Fernald RD. 2004. How the brain processes social information: searching for the social brain. *Annual Review of Neuroscience*. 27: 697-722. doi: 10.1146 / annurev.neuro.27.070203.144148.

Jaworski J, Kalita K, Knapska E. 2018. c-Fos and neuronal plasticity: the aftermath of Kaczmarek's theory. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*. 78:287-296. doi: 10.21307 / ane - 2018-027.

Kabbaj M, Devine DP, Savage VR, Akil H. 2000. Neurobiological correlates of individual differences in novelty-seeking behavior in the rat: differential expression of stress-related molecules. *The Journal of Neuroscience*. 20(18):6983-8. PMID: PMC6772801.

Kaindanovich-Beilin O, Lipina T, Vukobradovic I, Roder J, Woodgett JR. Assessment of social interaction behaviors. *Journal of Visual Experiments*. 48:2473. doi: 10.3791/2473.

Kambali MY, Anshu K, Kutty BM, Muddashetty RS, Rao-Laxmi T. 2019. Effect of early maternal separation stress on attention, spatial learning and social interaction behaviour. *Experimental Brain Research*. 237:1993-2010. doi: 10.1007 / s00221-019-05567-2.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ. 2000. Principles of neural science. 5^a ed. United States of America: McGraw Hill.

Kas MJ, Modi ME, Saxe MD, Smith DG. 2014. Advancing the discovery of medications for autism spectrum disorder using new technologies to reveal social brain circuitry in rodents. *Pharmacology*. 231(6):1147-65. doi: 10.1007/s00213-014-3464-y.

Kentrop J, Smid CR, Achterberg EJM, van IJzendoorn MH, Bakermans-Kranenburg MJ, Joëls M, van der Veen R. 2018. Effects of maternal deprivation and complex housing on rat social behavior in adolescence and adulthood. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 12:193. doi: <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2018.00193>.

Kim DG, Gonzales EL, Kim S, Kim Y, Adil KJ, Jeon SJ, Cho KS, Kwon KJ, Shin CY. 2019. Social interaction test in home cage as a novel and ethological measure of social behavior in mice. *Experimental Neurobiology*. 28(2): 247-260. doi: 10.5607 / Jan. 2019.28.2.247.

Kim S, Kim H, Um JW. 2018. Synapse development organized by neuronal activity-regulated immediate-early genes. *Experimental & Molecular Medicine*. 50:11. doi: 10.1038 / s12276-018-0025-1.

Kim Y, Venkataraju KU, Pradhan K, Mende C, Taranda J, Turaga SC, Arganda-Carreras I, Ng L, Hawrylycz MJ, Rockland KS, Seung HS, Osten P. 2015. Mapping social behavior-induced brain activation at cellular resolution in the mouse. *Cell Reports*. 10, 292–305. doi: 10.1016/j.celrep.2014.12.014.

Koe AS, Ashokan A, Mitra R. 2016. Short environmental enrichment in adulthood reverses anxiety and basolateral amygdala hypertrophy induced by maternal separation. *Translational Psychiatry*. 6:e729. doi: 10.1038/tp.2015.217.

Kohara K, Pigatelli M, Rivest AJ, Jung HY, Kitamura T, Suh J, Frank D, Kajikawa K, Mise N, Obata Y, Wickersham IR, Tonegawa S. 2014. Cell type-specific genetic and optogenetic tools reveal hippocampal CA2 circuits. *Nature Neuroscience*. 17:269–279. doi: 10.1038/nn.3614.

Koyabakawa K, Koyabakawa R, Matsumoto H, Oka Y, Imai T, Ikawa M, Okabe M, Ikeda T, Itohara S, Kikusui T, Mori K, Sakano H. 2007. Innate versus learned odour processing in the olfactory bulb. *Nature*. 450:503-508. doi: <https://doi.org/10.1038/nature06281>.

Ladd CO, Huot RL, Thrivikraman KV, Nemeroff CB, Meaney MJ, Plotsky PM. 2000. Long-term behavioral and neuroendocrine adaptations to adverse early experience. *Progress in Brain Research*. 122:81-103. doi: 10.1016/s0079-6123(08)62132-9.

Lee E, Rhim I, Lee JW, Ghim JW, Lee S, Kim E, Jung MW. 2016. Enhanced neuronal activity in the medial prefrontal cortex during social approach behavior. *The Journal of Neuroscience*. 36:6926-6936. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0307-16.2016.

Lee Y, Han PL. 2019. Early-life stress in D2 heterozygous mice promotes autistic-like behaviors through the downregulation of the BDNF-TrkB pathway in the dorsal striatum. *Experimental neurobiology*. 28(3):337-351. doi: 10.5607/en.2019.28.3.337.

Levine S. 1994. The ontogeny of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. The influence of maternal factors. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 746:275-288. doi: 10.1111 / j.1749-6632.1994.tb39245.x.

Levine S. 2001. Primary social relationships influence the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. *Physiology and Behavior*. 73:255-260. doi: 10.1016 / s0031-9384(01) 00496-6.

Levine S. 2002. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the neonatal rat: the role of maternal behavior. *Neurotoxicity Research*. 4:557-564. doi: 10.1080 / 10298420290030569.

Livtin Y, Tovote P, Pentkowski NS, Zeyda T, King LB, Vasconcellos AJ, Dunlap C, Spies J, Blanchard DC, Blanchard RJ. 2010. Maternal separation modulated short-term behavioral and physiological indices of the stress response. *Hormones and Behavior*. 58:241-249. doi: 10.1016/j.yhbeh.2010.03.010

Liu D, Caldji C, Sharma S, Plotsky PM, Meaney MJ. 2000. Influence of neonatal rearing conditions on stress-induced adrenocorticotropin responses and norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Journal of Neuroendocrinology*. 12(1):5–12. doi: 10.1046 / j.1365-2826.2000.00422.x.

Love M. 2013. Oxytocin, motivation and the role of dopamine. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 119:49-60. doi: 10.1016 / j.pbb.2013.06.011.

Lui 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. doi: 10.1126 / science.277.5332.1659.

Lukas M, Bredewold R, Landgraf R, Neumann ID, Veneema AH. 2011. Early life stress impaired social recognition due to a blunted response of vasopressin release within the septum of adult male rats. *Psychoneuroendocrinology*. 36(6):843-853. doi: 10.1016 / j.yhbeh.2011.10.002.

Luking KR, Pagliaccio D, Luby JL, Barch DM. 2016. Reward processing and risk for depression across development. *Trends in Cognitive Sciences*. 20:456–468. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tics.2016.04.002>

Lupien SJ, McEwan BS, Gunnar MR, Heim C. 2015. Effects of stress throughout the lifespan of the brain, behavior and cognition. *Nature Reviews*. 2009; 10:434-445. doi: 10.1038 / nrn2639.

Lupien SJ, Parent S, Evans AC, Tremblay RE, Zelazo PD, Corbo V, Seguin JR. 2011. Larger amygdala but no change in hippocampal volume in 10-year-old children exposed to maternal depressive symptomatology since birth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108(34):14324–14329. doi: 10.1073 / pnas.1105371108.

Maccari S, Piazza PV, Kabbaj M, Barbazanges A, Simon H, Le Moal M. 1995. Adoption reverses the long-term impairment in glucocorticoid feedback induced by prenatal stress. *The Journal of Neuroscience*. 15:110-116. doi: 10.1523/JNEUROSCI.15-01-00110.1995.

Manduca A, Servadio M, Damsteegt R, Campolongo P, Vanderschuren JMJ, Trezza V. 2016. Dopaminergic neurotransmission in the nucleus accumbens modulates social play behavior in rats. *Neuropsychopharmacology*. 41:2215-2223. doi: 10.1038 / npp.2016.22.

McEwan BS. 2000. Effects of adverse experiences for brain structure and function. *Biological Psychiatry*. 48(8):721-731. doi: 10.1016 / s0006-3223 (00) 00964-1.

McIntosh J, Anisman H, Merali Z. 1999. Short- and long-periods of neonatal maternal separation differentially affect anxiety and feeding in adult rats: gender-dependent effects. *Developmental Brain Research*. 113:97-106. doi: [https://doi.org/10.1016/S0165-3806\(99\)00005-X](https://doi.org/10.1016/S0165-3806(99)00005-X)

Meira T, Leroy F, Buss EW, Oliva A, Park J, Siegelbaum SA. 2018. A hippocampal circuit linking dorsal CA2 to ventral CA1 for social memory dynamics. *Nature Communications*. 9:4163. doi: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06501-w>.

Mohedano-Moriano A, Pro-Sistiaga P, Ubeda-Bañon I, de la Rosa-Prieto C, Saiz-Sanchez D, Martinez-Marcos A. 2008. V1R and V2R segregated vomeronasal pathways to the hypothalamus. *NeuroReport*. 19(16):1623-1626. doi: 10.1097 / WNR.0b013e328314b8d4.

Morgan JI, Curran T. 1986. Role of ion flux in the control of c-fos expression. *Nature*. 322(6079):552-555. doi: 10.1038 / 322552a0.

Morgan JI, Cohen DR, Hempstead JL, Curran T. 1987. Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. *Science*. 237(4811):192-197. doi: 10.1126 / science.3037702.

Mouse ethogram: an ethogram for the laboratory mouse. Stanford University. <http://mousebehavior.org>. Visitado el 27 de mayo de 2020.

Nestler EJ, Kelz MB, Chen J. 1999. DeltaFosB: a molecular mediator of long-term neural and behavioral plasticity. *Brain Research*. 835(1):10-17. doi: 10.1016 / s0006-8993 (98) 01191-3.

Newport DJ, Wilcox MM, Stowe ZN. 2002. Maternal depression: a child's first adverse life event. *Seminars in Clinical Neuropsychiatry*. 7(2):113–119. doi: 10.1053 / scnp.2002.31789.

NORMA Oficial Mexicana-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203498> NOM-062-ZOO-1999_220801.pdf

O'Connel LA, Hoffman HA. 2011. The vertebrate mesolimbic reward system and social behavior network: a comparative synthesis. *Journal of Comparative Neurology*. 519:3559-3639. doi: 10.1002 / cne.22735.

Ogawa T, Mikuni M, Kuroda Y, Muneoka K, Mori KJ, Takahashi K. 1994. Periodic maternal deprivation alters stress response in adult offspring: potentiates the negative feedback regulation of restraint stress-induced adrenocortical response and reduces the frequencies of open field-induced behaviors. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 49:961-967. doi: 10.1016/0091-3057(94)90250-x

Okumaya T, Kitamura T, Roy DS, Itohara S, Tonegawa S. 2016. Ventral CA1 neurons store social memory. *Science*. 535(6307):1536-1541. doi: 10.1126 / science.aaf7003.

Ovtscharoff W Jr, Braun K. 2001. Maternal separation and social isolation modulate the postnatal development of synaptic composition in the infralimbic cortex of Octodon degus. *Neuroscience*. 104(1):33–40. doi: 10.1016 / s0306-4522 (01) 00059-8.

Palma-Gudiel H, Fañanás L. 2016. An integrative review of methylation at the serotonin transporter gene and its dialogue with environmental risk factors, psychopathology and 5-HTTLPR. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*. 72:190–209. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.11.011>.

Paxinos G, Watson C. 2007. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. (6^{ed}). United States of America: Academic Press.

Peris J, McFayden K, Smith JA, de Kloet AD, Wang L, Krause EG. 2017. Oxytocin Receptors Are Expressed on Dopamine and Glutamate Neurons in the Mouse Ventral Tegmental Area That Project to Nucleus Accumbens and Other Mesolimbic Targets. *The Journal of Comparative Neurology*. 525(5): 1094–1108. doi: 10.1002/cne.24116.

Phillips LJ, McGorry DP, Garner B, Thompson KN, Pantelis C, Wood SJ, Berger G. 2006. Stress, the hippocampus and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: implications for the development of psychotic disorders. *Australian and New Zealand Journal of Psychiatry*. 40:725-741. doi: 10.1080 / j.1440-1614.2006.01877.x.

Phillips NK1, Hammen CL, Brennan PA, Najman JM, Bor W. 2005. Early adversity and the prospective prediction of depressive and anxiety disorders in adolescents. *Journal of Abnormal Child Psychology*. 33(1):13-24. doi: 10.1007/s10802-005-0930-3.

Kalinichev M, Easterling KW, Plotsky PM, Holtzman SG. 2002b. Long lasting changes in stress-induced corticosterone response and anxiety-like behaviors as a consequence of neonatal maternal separation in Long-Evans rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 73:131-140. doi: 10.1016/s0091-3057(02)00781-5

Salm AK, Pavelko M, Krouse EM, Webster W, Kraszpulski M, Birkle DL. 2004. Lateral amygdaloid nucleus expansion in adult rats is associated with exposure to prenatal stress. *Developmental Brain Research*. 148(2):159–167. doi: 10.1016 / j.devbrainres.2003.11.005.

Schmidt MV, Enthoven L, van der Mark M, Levine S, de Kloet ER, Oitzl MS. 2003. The postnatal development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the mouse. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 21(3):125–132. doi: 10.1016 / s0736-5748 (03) 00030-3.

Schmidt MV, Levine S, Otzi MS, van der Mark MB, Holsboer F, de Kloet ER. 2005. Glucocorticoid receptor blockade disinhibits pituitary-adrenal activity during stress hyporesponsive period of the mouse. *Endocrinology*. 146(3):1458-1464. doi: 10.1210 / Jan. 2004-1042.

Sheng M, Greenberg ME. 1990. The regulation of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron*. 4(4):477-485. doi: 10.1016 / 0896-6273 (90) 90106-p.

Shepard GM. 2006. Behaviour: smells, brains and hormones. *Nature*. 439:149-151. doi: <https://doi.org/10.1038/439149a>.

Silveira Villarroel H, Bompolaki M, Mackay JP, Miranda Tapia AP, Michaelson SD, Leitermann R.J, Urban JH, Colmers WF. 2018. NPY induces stress resilience via downregulation of Ih in principal neurons of rat basolateral amygdala. *Journal of Neuroscience*. 38(19):4505-4520. doi: 10.1523 / JNEUROSCI.3528-17.2018.

Slotten HA, Kalinichev M, Hagan JJ, Mardsen CA, Fone KCF. 2006. Long-lasting changes in behavioral and neuroendocrine indices in the rat following neonatal maternal separation: gender dependent effects. *Brain Research*. 1097:123-132. doi: 10.1016/j.brainres.2006.04.066

Smith AS, Williams Avram, SK, Cymerbilt-Sabba A, Song J, Young WS. 2016. Targeted activation of the hippocampal CA2 area strongly enhances social memory. *Molecular Psychiatry*. 21:1137-1144. doi: 10.1038 / mp.2015.189.

Smith CJ, Wilkins KB, Mogavero JN, Veneema AH. 2015. Social novelty in the juvenile rat: modulation by the μ -opioid system. *Journal of Neuroendocrinology*. 27(10):752-764. doi: <https://doi.org/10.1111/jne.12301>.

Spitz RA, Wolf KM. 1946. Anaclitic depression; an inquiry into the genesis of psychiatric conditions in early childhood, II. *The Psychoanalytic Study of the Child*. 2:313-342.

Strüber N, Strüber D, Roth G. 2014. Impact of early adversity on glucocorticoid regulation and later mental disorders. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*. 38:17-37. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.10.015>.

Szabo S, Tache Y, Somogyi A. 2012. The legacy of Hans Selye and the origins of stress research: a retrospective 75 years after his landmark brief “letter” to the editor of nature. *Stress*. 15(5):472-478. doi: 10.3109 / 10253890.2012.710919.

Szyndler J, Maciejak P, Turzynska D, Sobolewska A, Taracha E, Skórzewska A, Lehner M, Bidzinski A, Hamed A, Wislowska-Stanek A, Krzascik P, Plaznik A. 2009. Mapping of c-Fos expression in the rat brain during the evolution of pentylenetetrazol-kindled seizures. *Epilepsy & Behavior*. 16(2):216-224. doi: 10.1016 / j.yebeh.2009.07.030.

Takeuchi T, Duzkiewicz AJ, Sonneborn A, Spooner PA, Yamasaki M, Watanebe M, Smith CC, Fernández G, Deisseroth K, Greene RW, Morris RG. 2016. Locus coeruleus and dopaminergic consolidation of everyday memory. *Nature*. 537(7620):357-362. doi: 10.1038/nature19325.

Thermo Fisher Scientific Inc. 2009. Thermo Scientific: avidin-biotin technical handbook. <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/1601675-Avidin-Biotin-Handbook.pdf>. Visitado el 22 septiembre 2019.

Thorne N, Amrein H. 2003. Vomeronasal organ: pheromone recognition with a twist. *Current Biology*. 13(6):R220-2. doi: 10.1016 / S0960-9822 (03) 00154-4.

Trezza V, Damsteegt R, Marijke-Achterberg EJ, Vanderschuren JMJ. 2012. Nucleus accumbens μ -opioid receptors mediate social reward. *The Journal of Neuroscience*. 31(17):6362-6370. doi: 10.1523 / JNEUROSCI.5492-10.2011.

Tzakis N, Holahan MR. 2019. Social memory and the role of the hippocampal CA2 region. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 13:233. doi: <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00233>.

Varlinskaya EI, Voght BA, Spear LP. 2013. Social context induces two unique patterns of c-Fos expression in adolescent and adult rats. *Developmental Psychobiology*. 55(7):684-697. doi: 10.1002/dev.21064

van der Kooij MA, Sandi C. 2012. Social memories in rodents: methods, mechanisms and modulation by stress. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. 36(7):1763-1772. doi: 10.1016 / j.neubiorev.2011.10.006.

van Erp AMM, Kruk MR, Meelis W, Willekens-Bramer DC. 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. *Behavioral Brain Research*. 65: 47-55. doi: [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(94\)90072-8](https://doi.org/10.1016/0166-4328(94)90072-8)

Varese F, Smeets F, Drukker M, Lieverse R, Lataster T, Viechtbauer W, Read J, van Os J, Bentall RP. 2012. Childhood adversities increase the risk of psychosis: a meta-analysis of patient-control, prospective- and cross-sectional cohort studies. *Schizophrenia Bulletin*. 38:661-671. doi: <http://dx.doi.org/10.1093/schbul/sbs050>.

Vassar R, Chao SK, Sitcheran R, Nunez JM, Vosshal LB, Axel R. 1994. Topographic organization of sensory projections to the olfactory bulb. *Cell*. 79:981-991. doi: 10.1016 / 0092-8674 (94) 90029-9.

Veneema AH, Neumann DN. 2009. Maternal separation enhances offensive play-fighting, basal corticosterone and hypothalamic vasopressin mRNA expression in juvenile male rats. *Psychoneuroendocrinology*. 34:463-467. doi: 10.3389 / fnbeh.2019.00143.

Veneema AH, Bredewold R, De Vries GJ. 2012 Vasopressin regulates social recognition in juvenile and adult rats of both sexes, but in sex- and age-specific ways. *Hormones and Behavior*. 61:50-56. doi: 10.1016 / j.yhbeh.2011.10.002.

Vetulani, J. 2013. Early maternal separation: a rodent model of depression and prevailing human condition. *Pharmacological Reports*. 65(6):1451-1461. doi: 10.1016 / s1734-1140 (13) 71505-6.

Walker DL, Davis M. 2008. Role of the extended amygdala in short-duration versus sustained fear: a tribute to Dr. Lennart Heimer. *Brain Structure and Function*. 213:29-42. doi: 10.1007 / s00429-008-0183-3.

Walsh JJ, Friedman AK, Sun H, Heller EA, Ku SM, Juarez B, Burnham VL, Mazei-Robison MS, Ferguson D, Golden SA, Koo JW, Chaudhury D, Christoffel DJ, Pomeranz L, Friedman JM,

Russo SJ, Nestler EJ, Han MH. 2014. Stress gates neural activation of BDNF in the mesolimbic reward pathway. *Nature Neuroscience*. doi: 17, 27–29. doi: <http://dx.doi.org/10.1038/nn.3591>.

Wang Q, Shao F, Wang W. 2015. Maternal separation produces alterations of forebrain brain-derived neurotrophic factor expression in differently aged rats. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 8:49. doi: 10.3389 / fnmol.2015.00049.

Wellman LL, Forcelli PA, Aguilar BL, Malkova L. 2016. Bidirectional control of social behavior by activity within basolateral and central amygdala of primates. *The Journal of Neuroscience*. 36(33):8746-8756. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0333-16.2016.

Wigger A, Neumann ID. 1999. Periodic maternal deprivation induces gender-dependent alterations in behavioral and neuroendocrine responses to emotional stress in adult rats. *Physiology and Behavior*. 66(2):293-302. doi: 10.1016 / s0031-9384 (98) 00300-x.

Yang Y, Cheng Z, Tang H, Jiao H, Sun X, Cui Q, Luo F, Pan H, Ma C, Li B. 2017. Neonatal maternal separation impairs prefrontal cortical myelination and cognitive functions in rats through activation of Wnt signaling. *Cerebral Cortex*. 27(5):2871-2884. doi: 10.1093/cercor/bhw121.

Yaribeygi H, Panahi Y, Sahraei H, Johnston PT, Sahebkar A. 2017. The impact of stress on body function: a review. *Experimental and Clinical Sciences*. 16:1057-1072. doi: 10.17179 / excli2017-480.

Young WS, Li J, Wersinger SR, Palkovits M. 2006. The vasopressin 1b receptor is prominent in the hippocampal area CA2 where it is unaffected by restraint stress or adrenalectomy. *Neuroscience*. 143:1031–1039. doi: 10.1016 / j.neuroscience.2006.08.040.

Zhang L, Hernandez VS. 2013. Synaptic innervation to rat hippocampus by vasopressin-immunopositive fibres from the hypothalamic supraoptic and paraventricular nuclei. *Neuroscience*. 228:139–162. doi: 10.1016 / j.neuroscience.2012.10.010.