



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

---

**INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA**

**LABORATORIO DE NEUROFISIOLOGÍA DE LA CONDUCTA Y CONTROL  
MOTOR**

**EFFECTO DEL CUIDADO MATERNO SOBRE LAS RESPUESTAS DE ESTRÉS  
DE LA DESCENDENCIA DE LAS SUBLÍNEAS HY Y LY DE LA CEPA  
SPRAGUE-DAWLEY**

Tesis para la obtención del título de  
Doctor en Ciencias Fisiológicas

Presenta:

M. en C. Carlos Alberto Uribe Pacheco

Director de tesis: Dr. José Ramón Eguibar Cuenca

**Junio, 2015**

La presente tesis se realizó con el apoyo de CONACYT, beca para Doctorado No. 254861.

También se contó con apoyos vía proyectos de la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado de la DES, área de la salud 2011, 2012, 2013, 2014 y 2015 y; y CONACyT No. 243247 y 243333 a favor de los Dres. José Ramón Eguibar Cuenca y Ma. del Carmen Cortés Sánchez.

# Agradecimientos

A mi tutor, el Dr. José Ramón Eguibar Cuenca, por su dedicación, responsabilidad y asertividad.

A la Dra. María del Carmen Cortés Sánchez, a la M. en C. Araceli Ugarte y al M.V.Z. Omar Isidro Maldonado, integrantes del Laboratorio de Neurofisiología de la Conducta y Control Motor, quienes más allá de su trabajo, me brindaron su amistad y apoyo desinteresado para la realización de esta tesis.

Al Dr. Eduardo Monjaraz Guzmán, en cuyo laboratorio se realizaron parte de los experimentos que se reportan en esta tesis.

Al Dr. Ángel I. Melo, quien me apoyó con el diseño experimental.

A mis revisores: Dr. Elías Manjarrez, Dr. Gonzalo Flores, Dra. Gabriela González-Mariscal y Dr. Kurt Hoffman, por las atinadas observaciones que permitieron mejorar y enriquecer todos los aspectos de la tesis.

A mis compañeros de laboratorio.

# Índice general

|                                                          |    |
|----------------------------------------------------------|----|
| <b>Resumen</b>                                           | 1  |
| <b>Introducción</b>                                      | 5  |
| <b>Bostezo</b>                                           | 5  |
| <b>Estrés</b>                                            | 9  |
| <b>Conducta materna en las ratas</b>                     | 13 |
| <b>Conducta materna y las respuestas de estrés</b>       | 15 |
| <b>Estrés, emocionalidad y ansiedad</b>                  | 19 |
| <b>Evaluación de la conducta semejante a la ansiedad</b> | 22 |
| <b>Tigmotaxis</b>                                        | 24 |
| <b>Antecedentes</b>                                      | 26 |
| <b>Justificación</b>                                     | 32 |
| <b>Hipótesis</b>                                         | 32 |
| <b>Objetivo general</b>                                  | 32 |
| <b>Objetivos específicos</b>                             | 33 |

## Experimento 1: conducta de la descendencia del intercambio de camadas entre las sublíneas HY y LY.

|                                                                                                 |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Objetivo</b>                                                                                 | 34 |
| <b>Metodología</b>                                                                              | 34 |
| Animales                                                                                        | 34 |
| Citología vaginal y apareamiento                                                                | 35 |
| Intercambio de camadas                                                                          | 35 |
| Evaluación frecuencia de bostezo espontáneo de la descendencia                                  | 36 |
| Aparatos para pruebas de conducta semejante a la ansiedad                                       | 37 |
| Campo abierto                                                                                   | 37 |
| Caja luz-oscuridad                                                                              | 37 |
| Laberinto en cruz elevado                                                                       | 38 |
| Procedimiento                                                                                   | 38 |
| Evaluación de la conducta de la descendencia en las pruebas de conducta semejante a la ansiedad | 38 |
| Procedimiento para la prueba de campo abierto                                                   | 39 |
| Procedimiento para la prueba de caja luz-oscuridad                                              | 39 |
| Procedimiento para la prueba del laberinto en cruz elevado                                      | 40 |

|                                                          |    |
|----------------------------------------------------------|----|
| Análisis estadístico-----                                | 40 |
| <b>Resultados del Experimento 1</b> -----                | 40 |
| Frecuencia de bostezo espontáneo en cristalizadores----- | 40 |
| Conducta en la prueba de campo abierto-----              | 41 |
| Conducta en la prueba de caja luz-oscuridad-----         | 44 |
| Conducta en la prueba del laberinto en cruz elevado----- | 46 |
| <b>Discusión del Experimento 1</b> -----                 | 48 |

## **Experimento 2: conducta de la descendencia de la hibridación entre las sublíneas HY y LY.**

|                                                                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Introducción</b> -----                                                                                         | 54 |
| <b>Objetivo</b> -----                                                                                             | 55 |
| <b>Metodología</b> -----                                                                                          | 55 |
| Animales-----                                                                                                     | 55 |
| Evaluación frecuencia de bostezo espontáneo de la descendencia y pruebas de conducta semejante a la ansiedad----- | 56 |
| Análisis estadístico-----                                                                                         | 57 |
| <b>Resultados del Experimento 2</b> -----                                                                         | 57 |
| Frecuencia de bostezo espontáneo en cristalizadores-----                                                          | 57 |
| Conducta en la prueba de campo abierto-----                                                                       | 59 |
| Conducta en la prueba de caja luz-oscuridad-----                                                                  | 62 |
| Conducta en la prueba de laberinto en cruz elevado-----                                                           | 63 |
| <b>Discusión del Experimento 2</b> -----                                                                          | 64 |

## **Experimento 3: conducta materna del intercambio de camadas entre la sublínea HY y la cepa SD**

|                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------|----|
| <b>Introducción</b> -----                                 | 68 |
| <b>Objetivo</b> -----                                     | 72 |
| <b>Metodología</b> -----                                  | 72 |
| Animales-----                                             | 72 |
| Procedimiento de adopción cruzada (cross- fostering)----- | 72 |
| Procedimiento de observación-----                         | 72 |
| Análisis estadístico-----                                 | 74 |
| <b>Resultados del Experimento 3</b> -----                 | 74 |
| <b>Discusión del Experimento 3</b> -----                  | 79 |

## **Experimento 4: conducta de la descendencia del intercambio de camadas entre la sublínea HY y la cepa SD.**

|                                                                                                                           |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Introducción</b> -----                                                                                                 | 85  |
| <b>Objetivo</b> -----                                                                                                     | 86  |
| <b>Metodología</b> -----                                                                                                  | 86  |
| Sujetos-----                                                                                                              | 86  |
| Aparatos y procedimiento-----                                                                                             | 87  |
| Análisis estadístico-----                                                                                                 | 88  |
| <b>Resultados del Experimento 4</b> -----                                                                                 | 88  |
| Frecuencia de bostezo espontáneo en cristalizadores-----                                                                  | 88  |
| Conducta en la prueba de campo abierto-----                                                                               | 88  |
| Conducta en la prueba de caja luz-oscuridad-----                                                                          | 92  |
| Conducta en la prueba del laberinto en cruz elevado-----                                                                  | 93  |
| Concentraciones plasmáticas de las hormona ACTH y de corticosterona previos y posteriores a las pruebas conductuales----- | 95  |
| <b>Discusión del Experimento 4</b> -----                                                                                  | 99  |
| <b>Discusión general</b> -----                                                                                            | 106 |
| <b>Conclusiones</b> -----                                                                                                 | 112 |
| <b>Perspectivas</b> -----                                                                                                 | 113 |
| <b>Referencias</b> -----                                                                                                  | 114 |

## **Índice de figuras**

|                                                                                                                                                                                                                                                   |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Bostezo en las ratas-----                                                                                                                                                                                                        | 6  |
| <b>Figura 2.</b> Frecuencia de bostezo espontáneo después de 15 minutos de estrés por restricción-----                                                                                                                                            | 7  |
| <b>Figura 3.</b> Frecuencia de bostezo espontáneo de las ratas HY a lo largo del día-----                                                                                                                                                         | 9  |
| <b>Figura 4.</b> Efecto del lamido ano-genital y corporal materno y el amamantamiento en cefosis en la concentración plasmática de corticosterona y ACTH posteriores al estresor-----                                                             | 11 |
| <b>Figura 5.</b> Efecto del tipo de cuidado materno en la conducta dentro del campo abierto y su reversión por medio de inhibidor de la desacetilasa de histona tricostatina A (TSA) y por el aminoácido donador de grupos metilo, metionina----- | 20 |
| <b>Figura 6.</b> Porcentaje de madres de la cepa SD y de las sublíneas HY y LY que presentan acarreo atípico de más de tres crías durante más de tres días-----                                                                                   | 29 |
| <b>Figura 7.</b> Ratitas dentro de los cristalizadores para la observación de bostezo-----                                                                                                                                                        | 37 |

|                                                                                                                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 8.</b> Frecuencia de bostezo espontáneo de la descendencia de la adopción cruzada entre la sublínea HY y la LY-----                                            | 41 |
| <b>Figura 9.</b> Conducta de tigmotaxis en la prueba de campo abierto de la descendencia de la adopción cruzada entre la sublínea HY y la LY-----                        | 43 |
| <b>Figura 10.</b> Locomoción durante la prueba de campo abierto de la descendencia de la adopción cruzada entre la sublínea HY y la LY-----                              | 44 |
| <b>Figura 11.</b> Latencia de salida de la caja de inicio durante la prueba de campo abierto de la descendencia de la adopción cruzada entre la sublínea HY y la LY----- | 45 |
| <b>Figura 12.</b> Conducta en la prueba de caja luz-oscuridad de la descendencia de la adopción cruzada entre la sublínea HY y la LY-----                                | 45 |
| <b>Figura 13.</b> Conducta en los brazos abiertos del laberinto en cruz elevado de la descendencia de la adopción cruzada entre la sublínea HY y la LY-----              | 46 |
| <b>Figura 14.</b> Número de asomos en la prueba del laberinto en cruz elevado de la descendencia de la adopción cruzada entre la sublínea HY y la LY-----                | 47 |
| <b>Figura 15.</b> Frecuencia de bostezo espontáneo de los híbridos respecto de las sublíneas HY y LY-----                                                                | 59 |
| <b>Figura 16.</b> Conducta de tigmotaxis en la prueba de campo abierto de los híbridos respecto de las sublíneas HY y LY-----                                            | 60 |
| <b>Figura 17.</b> Locomoción durante la prueba de campo abierto de los híbridos respecto de las sublíneas HY y LY-----                                                   | 61 |
| <b>Figura 18.</b> Latencia de salida de la caja de inicio en la prueba de campo abierto de los híbridos respecto de las sublíneas HY y LY-----                           | 62 |
| <b>Figura 19.</b> Conducta en la prueba de caja luz-oscuridad de los híbridos respecto de las sublíneas HY y LY-----                                                     | 63 |
| <b>Figura 20.</b> Conducta en los brazos abiertos del laberinto en cruz elevado de los híbridos respecto de las sublíneas HY y LY-----                                   | 64 |
| <b>Figura 21.</b> Número de asomos en la prueba del laberinto en cruz elevado de los híbridos respecto de las sublíneas HY y LY-----                                     | 64 |
| <b>Figura 22.</b> Conductas maternas que dependieron del tipo de madre independientemente del tipo de crías que se encontraban cuidando-----                             | 78 |
| <b>Figura 23.</b> Conductas maternas que dependen del tipo de cría adoptiva-----                                                                                         | 79 |
| <b>Figura 24.</b> Frecuencia de bostezo espontáneo de la descendencia de la adopción cruzada entre la sublínea HY y la cepa SD-----                                      | 89 |
| <b>Figura 25.</b> Tigmotaxis en el campo abierto de la descendencia de la adopción cruzada entre la sublínea HY y la cepa SD-----                                        | 90 |
| <b>Figura 26.</b> Latencia de salida de la caja de inicio del campo abierto de la descendencia de la adopción cruzada entre la sublínea HY y la cepa SD-----             | 91 |

|                                                                                                                                                                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 27.</b> Locomoción dentro del campo abierto de la descendencia de la adopción cruzada entre la sublínea HY y la cepa SD-----                                                                    | 92 |
| <b>Figura 28.</b> Desempeño en caja luz-oscuridad de los individuos producto de la adopción cruzada entre la sublínea HY y la cepa SD-----                                                                | 94 |
| <b>Figura 29.</b> Conducta en laberinto en cruz elevado de los individuos producto de adopción cruzada entre la sublínea HY y la cepa SD-----                                                             | 94 |
| <b>Figura 30.</b> Número de asomos realizados durante la prueba del laberinto en cruz elevado de los individuos producto de intercambio de camadas entre la sublínea HY y la cepa SD-----                 | 95 |
| <b>Figura 31.</b> Niveles basales, sin previas maniobras, de las hormonas ACTH y corticosterona de los individuos producto de la adopción cruzada entre la sublínea HY y la cepa SD-----                  | 96 |
| <b>Figura 32.</b> Niveles plasmáticos de las hormonas ACTH y corticosterona posteriores a la prueba de campo abierto en la descendencia del intercambio de camadas entre la sublínea HY y la cepa SD----- | 97 |
| <b>Figura 33.</b> Niveles plasmáticos de ACTH y corticosterona posteriores a la prueba de caja luz-oscuridad de los descendientes de la adopción cruzada entre la sublínea HY y la cepa SD-----           | 98 |
| <b>Figura 34.</b> Niveles plasmáticos de ACTH y corticosterona posteriores a la prueba del laberinto en cruz elevado de la descendencia de adopción cruzada entre la sublínea HY y la cepa SD-----        | 99 |

## Índice de tablas

|                                                                                                                                                 |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabla 1.</b> Cepas de ratas en las que la conducta materna tiene un efecto en las respuestas---                                              | 16 |
| <b>Tabla 2.</b> Conducta de los híbridos de madre HY respecto de la conducta de los híbridos provenientes de madre LY-----                      | 58 |
| <b>Tabla 3.</b> Conductas maternas y no maternas desplegadas por madres HY y SD en función del tipo de crías, durante la prueba de acarreo----- | 77 |



## Resumen

En nuestro laboratorio se cuenta con dos sublíneas endogámicas seleccionadas en base a su frecuencia de bostezo espontáneo, las ratas de alto y bajo bostezo, HY y LY (de sus siglas en inglés, respectivamente). Estos animales muestran diferencias en la organización de la conducta de aseo, en sus respuestas ante distintos estresores, y también en el despliegue de las conductas sexual masculina y materna. Estas diferencias entre las sublíneas pueden estar, al menos parcialmente, originadas por la calidad e intensidad de cuidado que proveen las madres HY, el cual pudiera condicionar mayores respuestas ante estresores. En este trabajo exploramos en detalle el efecto del cuidado materno en la conducta de bostezo y en las respuestas conductuales y hormonales ante varios tipos de estresores en su descendencia. Para este fin realizamos intercambio de camadas, para conocer el efecto de distintos patrones de cuidados maternos en ambos genotipos y se evaluó también la conducta de los híbridos HY/LY como un complemento a la maniobra de intercambio de camadas, para considerar las interacciones que pueden deberse al ambiente uterino.

En el Experimento 1 se realizó intercambio de camadas (cross-fostering) entre las sublíneas HY y LY. A la descendencia en la edad adulta se le evaluó la frecuencia de bostezo espontáneo y las respuestas en las pruebas de conducta semejante a la ansiedad de caja luz-oscuridad, campo abierto y laberinto en cruz elevado.

Los machos de la sublínea HY criados por madres LY mostraron una menor frecuencia de bostezo espontáneo respecto de los criados por madres HY. En cuanto a las pruebas que evalúan conducta semejante a la ansiedad, se observó

que los machos HY fueron más ansiosos que los LY, independientemente del tipo de madre que los crio. Sin embargo la diferencia entre HY y LY fue menor cuando los primeros fueron criados por una madre LY. La duración de la tigmotaxis en el campo abierto es un importante índice de conducta semejante a la ansiedad. Los hijos HY criados por madres LY pasaron menos tiempo en tigmotaxis que los criados por madres HY, demostrándose así un importante componente materno en las diferencias de las respuestas conductuales entre ambas sublíneas.

En el Experimento 2 se obtuvieron híbridos de la cruce entre las sublíneas HY y LY. Estos híbridos fueron divididos en dos grupos: los que fueron producto de una madre HY con un padre LY y los que fueron hijos de una madre LY con un padre HY. La frecuencia de bostezo espontáneo de los híbridos fue intermedia respecto de lo obtenido en las sublíneas HY y LY, sin diferencia significativa entre los híbridos de madre HY respecto de los de madre LY. En la prueba de campo abierto la conducta de los híbridos fue diferente de la sublínea HY y muy similar a lo mostrado en las LY colocando a los híbridos en esta prueba con los mismos niveles de conducta semejante a la ansiedad que caracterizan a la sublínea LY. En la prueba de caja luz-oscuridad el número de transiciones entre el compartimento oscuro y el iluminado fue también un valor intermedio en los híbridos respecto de las sublíneas.

En los Experimentos 3 y 4 realizamos intercambio de camadas entre la sublínea HY y ratas de la cepa exogámica Sprague-Dawley (SD). En el Experimento 3 evaluamos la conducta materna respecto al tipo de hijos adoptados y en el 4 evaluamos la frecuencia de bostezo espontáneo de la descendencia del Experimento 3, así como su desempeño en las pruebas de conducta semejante a

la ansiedad y después de estas se midieron los niveles plasmáticos de la hormona adrenocorticotropa (ACTH, de sus siglas en inglés) y de corticosterona.

Las siguientes conductas maternas dependieron del tipo de madre: duración total del lamido ano-genital y corporal, duración total del amamantamiento en posición de cifosis (también conocido como amamantamiento con la espalda arqueada, “arched-back nursing”, o amamantamiento de alta intensidad) y tiempo que pasaron dentro del nido, estas variables fueron mayores en las madres SD respecto de las madres HY. Las siguientes conductas maternas dependieron del tipo de hijo: latencia de acarreo (menor para hijos HY), número de reacarros y reacomodos dentro del nido que producen vocalizaciones audibles (mayor con los hijos HY).

La frecuencia de bostezo espontáneo de la descendencia del intercambio de camadas entre HY y SD dependió tanto del hijo como de la madre. Siendo mayor la frecuencia de bostezo espontáneo tanto en hijos SD como hijos HY criados por madres HY. Se observó además una mayor frecuencia de bostezo espontáneo en los hijos HY respecto de los SD independientemente del tipo de madre que los crio. En las pruebas de conducta semejante a la ansiedad se observó que tanto en la prueba de caja luz-oscuridad, como en la de campo abierto los machos SD criados por madres HY tuvieron mayores niveles de conducta semejante a la ansiedad respecto de los SD criados por madres SD. Los niveles de ACTH no difirieron entre los grupos después de las distintas pruebas conductuales, sin embargo los niveles de corticosterona después de la prueba de campo abierto fueron mayores en los sujetos SD criados por madres HY respecto de los SD

criados por madres SD, por lo que fueron más sensibles al estrés causado por esta prueba.

Los resultados anteriores nos llevan a concluir que tanto el bostezo como las respuestas conductuales y hormonales en los ambientes novedosos en la sublínea HY tienen un componente genético y también uno epigenético (ambiente maternal). Por otro lado, las diferencias conductuales de las madres HY afectaron las respuestas de estrés de la cepa SD, pero no las de la sublínea LY por lo que esta última debe contar con factores de resistencia de origen genético o epigenético que la previenen del efecto que induce la madre HY. Finalmente, las crías HY fueron capaces de alterar algunas conductas maternas tanto de madres SD como de las HY. Por lo que las crías juegan un rol central en el perfil ansioso que muestran conductual y neuroendócrinamente.

Los resultados muestran que:

- 1) La elevada frecuencia de bostezo espontáneo de la sublínea HY cuenta tanto con un componente genético como con un epigenético ligado al tipo de cuidado materno.
- 2) La sublínea LY es resistente a los efectos epigenéticos que provee el cuidado materno de la sublínea HY.
- 3) La cepa Sprague-Dawley es susceptible a los efectos epigenéticos debidos al cuidado materno de la sublínea HY elevando su frecuencia de bostezo espontáneo, respuestas de conducta semejante a la ansiedad y respuestas neuroendócrinas diferenciales.

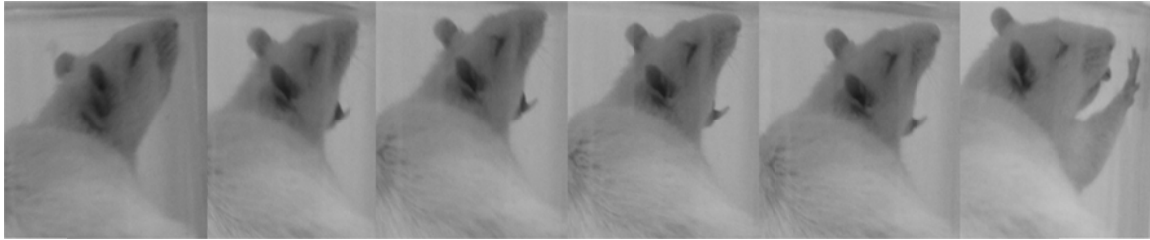
# Introducción

La conducta es el conjunto de pautas motoras que se observan en los animales en respuesta a estímulos tanto internos como externos con la finalidad de mantener la homeostasis y resolver sus problemas ecológicos. Los principales sistemas orgánicos que participan en la conducta son el sistema nervioso y el osteomuscular (Slater, 2000). El primero controla y el segundo ejecuta los patrones de movimiento innatos y adquiridos. En los vertebrados superiores (aves y mamíferos) estos sistemas son tan importantes que el sistema nervioso es el principal consumidor de energía en proporción con el peso del sujeto y el sistema osteomuscular es el que tiene mayor masa respecto al resto del organismo (Curtis y Barnes, 1989).

El repertorio de comportamiento de un animal contiene conductas innatas y adquiridas. Las primeras se heredan, en tanto que las segundas requieren de un proceso de desarrollo dependiente del aprendizaje (Curtis y Barnes, 1989).

## Bostezo

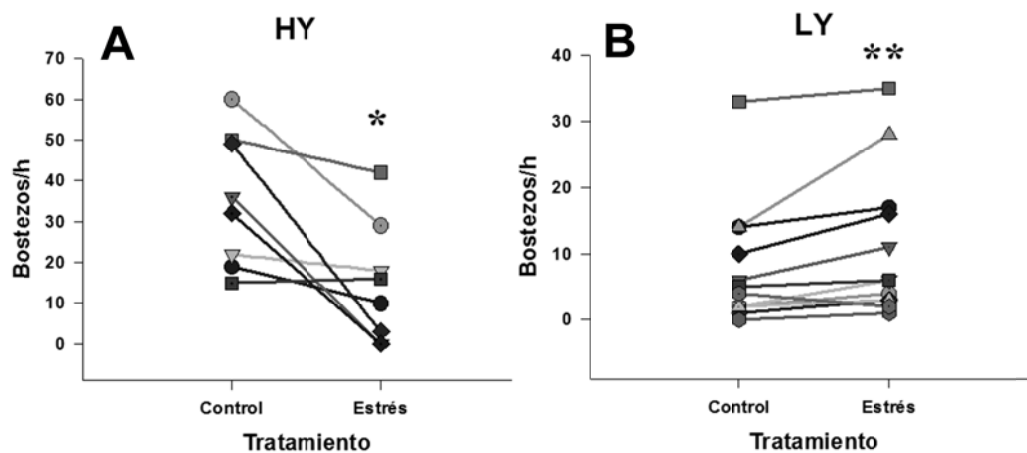
Entre las conductas innatas, el bostezo destaca porque se ha descrito en todos los grupos de vertebrados, en los cuales su patrón motor es prácticamente el mismo (Walusinsky, 2009). El bostezo consiste en una inspiración profunda que se realiza con una amplia apertura de la boca laringe y faringe, seguida por un breve acmé y una espiración fuerte y corta (Barbizet, 1958; Collins y Eguibar, 2010; véase la Figura 1).



**Figura 1. Bostezo en las ratas.** Secuencia fotográfica en la que se observa un bostezo de una rata. El bostezo se define como un apertura amplia y progresiva de la boca con una profunda inspiración hasta un acmé durante el cual los músculos de la cara y cuerpo se contraen fuertemente seguido de una espiración breve, generalmente acompañado con el cierre de los ojos, lagrimeo y salivación, así como el estiramiento de los miembros anteriores y en ocasiones también los posteriores (Uribe y cols., 2015).

La función del bostezo no ha sido completamente elucidada. Se ha descartado que tenga como principal función contrarrestar la hipoxia o la hipercapnia puesto que los cambios en la composición de los gases que se respiran no cambian su frecuencia de ocurrencia. En humanos se demostró que no varía la frecuencia de bostezo cuando se les expone a una atmosfera de oxígeno al 100% o de bióxido de carbono al 5% (Provine y cols., 1987). De igual forma se ha descartado que el bostezo tenga un papel en la activación cerebral puesto que el análisis electroencefalográfico del efecto del bostezo en la actividad cerebral no muestra un aumento de los patrones de actividad eléctrica propios de la vigilia (Guggisberg y cols., 2007). Una hipótesis que ha cobrado auge en los últimos ocho años es que la función del bostezo es la termorregulación cerebral, ya que los incrementos en la temperatura cerebral causados por el ambiente, el estrés, el sueño y algunos estados patológicos, se asocian con un incremento en la frecuencia de bostezo; adicionalmente, la ocurrencia de un bostezo en las ratas está precedida por un incremento en la temperatura de la corteza prefrontal (Gallup y Eldakar, 2012). El aumento de la frecuencia de bostezo durante el estrés o durante la recuperación del mismo, ha hecho del bostezo un útil indicador conductual que permite junto

con otras conductas tales como el acicalamiento, el rascado y el estiramiento, establecer el grado de estrés al que un sujeto está sometido (Uribe y cols., 2015). En los siguientes animales se han descrito cambios en la frecuencia de bostezo en relación con estrés: en ratas, mediante estrés térmico (Gallup y cols., 2011), estrés por toques eléctricos (Tufik y cols., 1995), estrés por expectación en la restricción alimenticia (Holmgren y cols., 1991) y estrés por restricción de movimiento (Uribe, 2010, véase la Figura 2).



**Figura 2. Frecuencia de bostezo espontáneo después de 15 minutos de estrés por restricción. A)** Después de 15 minutos de estrés por restricción la frecuencia de bostezo espontáneo disminuye en la sublínea HY (\* $P < 0.05$ ). **B)** En la sublínea LY la frecuencia de bostezo aumenta significativamente después del estrés (\*\* $P < 0.01$ ). Este efecto se relaciona con la capacidad de recuperarse del estrés la cual es mayor en la sublínea LY (tomada de Uribe, 2010).

En primates no humanos, se registran aumentos en la frecuencia de bostezo relacionados con estados de estrés. En chimpancés, se incrementa en estados de tensión social, encuentros agresivos o ante la proximidad de humanos en los chimpancés silvestres (Vick y Paukner, 2010). En los monos capuchinos aumenta ante el estrés térmico cuando las temperaturas ambientales alcanzan los 37° C (Gallup, 2010). En humanos se ha mostrado aumentos en la frecuencia de bostezo asociados al estrés provocado por la expectación tal como en las

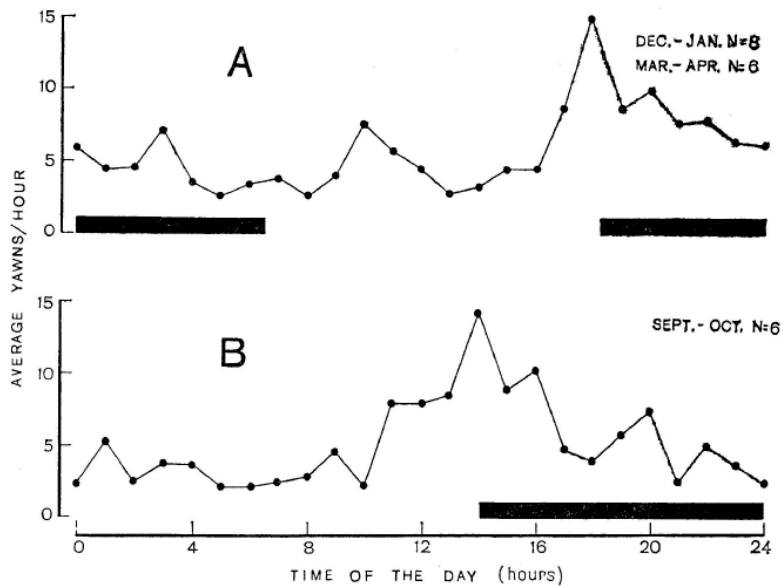
siguientes situaciones: estar esperando en una fila para donar sangre, antes de una competencia olímpica, a punto de dar el primer salto en paracaídas, músicos antes de dar un concierto (Provine, 2005).

El papel del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal en la expresión del bostezo es determinante: las ratas adrenalectomizadas no bostezan y la inyección de dexametasona restituye la frecuencia normal de bostezo (Anías-Calderón y cols., 2004). Por otro lado, la inyección intracerebroventricular de la hormona ACTH o de factor liberador de corticotropina aumentan la frecuencia de bostezo (Collins y Eguibar, 2010).

En la transición sueño-vigilia, cuando ocurren los cambios más acentuados en la frecuencia de bostezo espontáneo en los roedores (acrofase del ciclo circadiano del bostezo, Anías y cols., 1984, véase la Figura 3), también es el momento del día en el cual se presenta el pico de liberación de corticosterona (acrofase del ciclo circadiano de la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, Dixit y Buckley, 1967). Por lo anterior se puede notar que estrés, termorregulación y ciclo sueño vigilia, lejos de ser tópicos independientes del fenómeno del bostezo, son aspectos complementarios de una teoría que lo explica.

Todo lo anterior nos hace suponer que los cambios metabólicos asociados a la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal desencadenan el bostezo como un mecanismo homeostático para regular la temperatura y aumentar los niveles de  $O_2$ , como un mecanismo de proalimentación.





**Figura 3. Frecuencia de bostezo espontáneo de las ratas HY a lo largo del día. A)** Cambios en la frecuencia de bostezo espontáneo a lo largo del día cuando las ratas se encuentran bajo iluminación natural. **B)** Cambios en la frecuencia de bostezo a lo largo del día cuando los animales se encuentran bajo un ciclo luz-oscuridad artificial, incluye encendido o apagado total de la luz. La frecuencia de bostezo espontáneo en ambos casos se incrementa significativamente cuando se aproxima el cambio de luz a oscuridad, lo que en roedores se relaciona con un incremento en la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (tomada de Anías y cols., 1984).

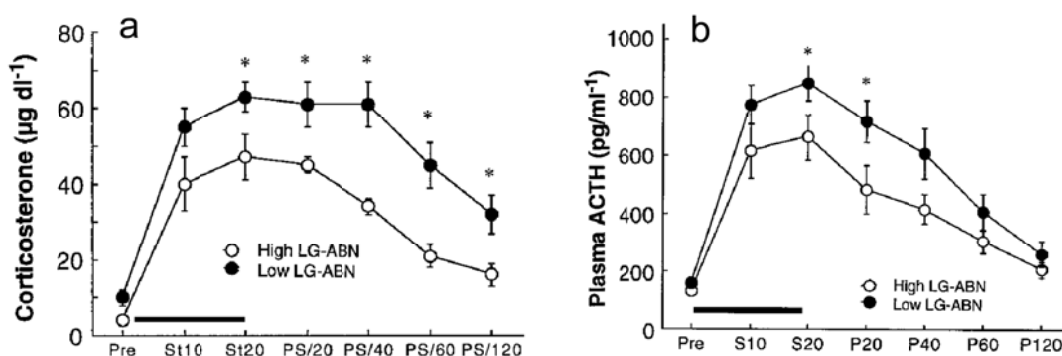
## Estrés

Se considera que el estrés es el conjunto de respuestas fisiológicas y conductuales que se desencadenan como consecuencia de un estímulo que amenaza la integridad fisiológica o psicológica del individuo (McEwen, 2000). Entre ellas, destaca la activación del sistema simpático que libera catecolaminas y del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal con la liberación al torrente sanguíneo, en forma secuencial de las hormonas: factor liberador de corticotropina, hormona ACTH y glucocorticoides, cortisol en humanos y corticosterona en ratas (Sapolsky y cols., 2000). Estas hormonas tienen importantes efectos a nivel del sistema nervioso central y de todo el organismo. El factor liberador de corticotropina actúa además, como neurotransmisor para regular las respuestas conductuales provocadas por el estrés (Korte y De Boer, 2003).

Cuando las respuestas de estrés se prolongan, se ocasionan distintos trastornos orgánicos y conductuales que pueden afectar la salud del individuo, ocasionando distintas enfermedades (Ulrich-Lai y Herman, 2009). Por ejemplo, el estrés crónico causa exceso de síntesis y liberación del factor liberador de corticotropina en estructuras como la amígdala y el núcleo paraventricular del hipotálamo ante un estresor (Ostrander y cols., 2006). Este exceso de factor liberador de corticotropina ha sido involucrado en el desarrollo de patologías tales como la ansiedad y/o la depresión (Meaney, 2001). La obesidad, el síndrome metabólico y la hipertensión arterial, enfermedades que se han catalogado como epidemias en distintas regiones del mundo, se relacionan con el estrés prolongado en los humanos (Chrousos, 2009).

El desarrollo de los trastornos de ansiedad y/o depresión está determinado por factores genéticos y epigenéticos. Estos últimos consisten en modificaciones tempranas y prolongadas en la expresión del ácido desoxirribonucleico (ADN) producidas por factores medio ambientales (Meaney, 2009). Un ejemplo de factores genéticos es una variación en el gen del transportador a serotonina en humanos favorece un incremento en la ansiedad. Otro ejemplo es una variación de baja actividad del promotor del gen de la enzima monoaminoxidasa que metaboliza a serotonina, dopamina y noradrenalina, y que ha sido involucrado en el trastorno depresivo en humanos (Gross y Hen, 2004). Respecto a los determinantes epigenéticos, el tipo de cuidado materno influye en las respuestas conductuales y neuroendócrinas. Un cuidado materno deficiente, con poco contacto entre la madre y las crías, así como el maltrato a estos últimos, causa

respuestas exageradas a los estresores en la edad adulta de la descendencia, esto se ha constatado en ratas, primates no humanos y humanos (Meaney, 2001). Los individuos con cuidado materno deficiente sintetizan y liberan una mayor cantidad de factor liberador de corticotropina el cual a su vez aumenta la liberación de ACTH y glucocorticoides, adicionalmente el mecanismo de retroalimentación negativa que modula la liberación de glucocorticoides está disminuido por lo que sus altos niveles se mantienen durante más tiempo (Liu y cols., 1997, véase la Figura 4). Las respuestas exageradas a los estresores se correlacionan con la metilación del gen promotor del receptor a glucocorticoides en el hipocampo en humanos así como en roedores (Meaney, 2009). La metilación de este gen disminuye la expresión del receptor, lo que retarda la disminución de los niveles de glucocorticoides posterior al estresor, facilitando las enfermedades relacionadas con el mismo (Meaney, 2009).



**Figura 4. Efecto del lamido ano-genital y corporal materno y el amamantamiento en cifras en la concentración plasmática de corticosterona y ACTH posteriores al estresor.** Los individuos de la cepa Long-Evans que fueron adoptados por una madre que les proporcionó mayor cantidad de lamido y amamantamiento durante la lactancia presentan menores concentraciones de la hormona corticosterona **(a)** y de la hormona ACTH **(b)** inmediatamente después de 20 minutos de estrés por restricción de movimiento y durante 100 minutos después de iniciado éste respecto de los individuos que fueron adoptados por madres de menor duración del lamido y amamantamiento en cefosis (\* $P < 0.05$ ; tomada de Liu y cols, 1997).

Los roedores han sido ampliamente utilizados como modelos para entender los trastornos relacionados con el estrés ya que comparten con los humanos el desarrollo de patologías fisiológicas y conductuales.

Al igual que en los humanos, en los roedores el estrés genera úlceras estomacales, hipertrofia de las glándulas adrenales, trastornos cardiovasculares, deficiencias inmunológicas entre otros trastornos orgánicos. Por otro lado los cambios conductuales producidos por el estrés tienen paralelo con los humanos. Los roedores al igual que los humanos, cuando son sometidos a estrés crónico presentan conductas de evitación propias de los trastornos de ansiedad y conductas apáticas y anhedónicas propias de los trastornos depresivos. Más aún los roedores responden a fármacos ansiolíticos y antidepresivos de manera dosis dependiente mejorando sus conductas de evitación. Las homologías entre las respuestas de estrés en humanos y roedores han generado importantes contribuciones al entendimiento de la neurobiología del estrés, empezando por la comprensión del papel de la activación del eje hipotálamo-hipófisis adrenal y sus alteraciones debidas al tipo de crianza.

El eje hipotálamo-hipófisis-adrenal no es el único elemento regulador de las respuestas conductuales que se modifica debido al cuidado materno deficiente. En el modelo de Meaney y cols. (2001), los adultos que durante la lactancia recibieron poco lamido ano-genital y corporal y amamantamiento en cifosis tienen otras alteraciones en los sistemas de neurotransmisión. Entre las más importantes se encuentra una menor expresión del receptor a benzodiazepinas en el núcleo central y lateral de la amígdala, locus coeruleus y tracto solitario y de los receptores alfa dos adrenérgicos en el locus coeruleus y en el tracto solitario, los

niveles de estos receptores son muy importantes para regular las respuestas de ansiedad por lo que una menor expresión facilita que la conducta ansiosa sea más exagerada y que el estado de ansiedad y la activación simpática sean de mayor duración (Caldji y cols., 1998). De igual forma, la baja estimulación por parte de la madre provoca, mayor expresión de factor liberador de corticotropina en otras regiones no directamente relacionadas con la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal que producen mayores niveles del receptor para factor liberador de corticotropina en el locus coeruleus y amígdala, lo que se correlaciona con mayores respuestas conductuales en pruebas de conducta semejante de ansiedad tal como la prueba de campo abierto y la de laberinto en cruz elevado (Caldji y cols., 1998).

## **Conducta materna en las ratas**

Los cambios conductuales de una rata hembra preñada inician alrededor de una semana antes del parto cuando disminuye la actividad, aumenta el aislamiento e inicia la construcción del nido (Rees y cols., 2004). Al igual que otros mamíferos, durante el parto la rata ayuda a sus crías a salir del conducto vaginal y una vez fuera de este, ingiere la placenta, el cordón umbilical y las membranas fetales y los lame para limpiar la sangre y líquido amniótico. Una vez que han nacido todas las crías inicia con un patrón conductual que incluye actividades dirigidas a las crías y otras dirigidas a sí misma. Las primeras se agrupan dentro de un episodio de amamantamiento: la madre ingresa al nido, lo reconstruye acarreado paja con la boca, amontonando la que ya se encuentra en este, acomoda a las crías que se han dispersado por sus movimientos, se coloca encima de ellos dejando un

espacio para que estos accedan a los pezones, se lame y acicala a sí misma y lame a las crías (Rees y cols., 2004). El lamido ano-genital y corporal proporcionado a las crías puede ser ano-genital o corporal, el ano-genital está enfocado a la limpieza de los genitales pero también este es un estímulo necesario para el reflejo de la micción y defecación de las crías. Así mismo, la madre ingiere las excretas tanto para mantener la limpieza del nido como para recuperar los nutrientes y agua perdidos durante la lactancia, también se sabe que una adecuada estimulación sensorial a los genitales determina que los descendientes tengan un adecuado desempeño sexual en la etapa adulta (Moore, 1984). El lamido hacia el cuerpo de las crías, lamido corporal, proporciona limpieza y estimulación sensorial a las crías para un desarrollo adecuado de esta especie atricial. Una vez que ha lamido corporal y ano-genitalmente a la mayoría de las crías, éstos empiezan a buscar los pezones de la madre para iniciar un episodio de amamantamiento. Cuando las crías alcanzan a estimular lo suficiente a la madre, ésta adopta una posición de amamantamiento en cifosis, durante la cual estira las patas delanteras y traseras facilitando el acceso a los pezones, se encuentra prácticamente inmóvil y la cantidad de leche eyectada es mayor (Stern, 1997). Conforme las crías se sacian, la dejan de estimular por medio de sus movimientos y la succión y se quedan dormidos, generalmente la madre también se queda dormida. Posterior al episodio de amamantamiento, la madre sale del nido para realizar ingesta de comida y agua, así como acicalarse y patrullar el ambiente que la rodea, descansa fuera del nido, para posteriormente iniciar un nuevo episodio de amamantamiento. Estas conductas maternas varían en su cantidad y duración ampliamente dentro de esta especie (Rees y cols., 2004).

## **Conducta materna y las respuestas de estrés**

Ciertas maniobras modifican la conducta materna en las ratas, una de las más estudiadas es la manipulación temprana o del inglés, “handling”, la cual consiste en una separación breve (Deneberg y Smith, 1963). Cuando se separa 15 minutos a las crías de sus madres y se les vuelve a reunir nuevamente, las madres proporcionan más lamido ano-genital y corporal y amamantamiento en cifosis a las crías respecto las que no son sometidas a esta maniobra (Pryce y cols., 2001). En las crías que pasaron por este tratamiento se observan conductas menos ansiosas en la etapa adulta en las pruebas de conducta semejante a la ansiedad y respuesta fisiológicas de estrés de menor intensidad y duración (Valleé y cols.,1997). La estimulación de la conducta materna durante el “handling” depende tanto de cambios conductuales en las crías como en la madre, causados por este lapso de separación. La conducta materna de amamantamiento en cifosis y la duración del lamido corporal y ano-genital presentan una correlación positiva con las respuestas conductuales y hormonales de estrés de las crías en la etapa adulta (Meaney y cols., 1985). Otras conductas relacionadas con las respuestas de estrés en los hijos son el tiempo que las madres permanecen en contacto con las crías y el tiempo que tardan en acarrearlos y juntarlos en el nido cuando estos han sido dispersados (Franks y cols., 2011).

Las deficiencias en la conducta materna tales como una menor calidad del nido, un menor tiempo en contacto con las crías, un menor tiempo de lamido ano-genital y corporal y de amamantamiento en cifosis se relacionan con una mayor conducta semejante a la ansiedad en la descendencia en la prueba de campo abierto,

consistente en un menor tiempo pasado en el centro del mismo (Weaver y cols., 2006), y también es el caso en el laberinto en cruz elevado con un menor tiempo pasado en los brazos abiertos (Huot y cols., 2001). Adicionalmente, la descendencia de madres deficientes en tiempo de lamido ano-genital y corporal a las crías y amamantamiento en cefosis, presentan ante la exposición a estresores, mayores respuestas neuroendócrinas, como son: una mayor secreción de factor liberador de corticotropina, hormona ACTH y corticosterona, esto es, cambios en la operación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (Liu y cols., 1997). La conducta materna deficiente se encuentra en cierta proporción de las poblaciones de distintas cepas de ratas, tales como las Long-Evans, Sprague-Dawley o Wistar (Meaney, 2001). En estas cepas se encuentra una correlación entre el grado de lamido ano-genital y corporal y amamantamiento en cefosis y las respuestas conductuales y hormonales de estrés en las crías (Meaney, 2001). En la Tabla 1 se muestran ejemplos de grupo de ratas en las que se ha estudiado el efecto de la conducta materna en el desempeño de la descendencia en pruebas de que involucran estrés, mediante el modelo de intercambio de camadas.

**Tabla 1. Cepas de ratas en las que la conducta materna tiene un efecto en las respuestas conductuales y fisiológicas.**

| <b>Cepa de rata</b>                   | <b>Conducta de la madre</b>                                            | <b>Efecto en la descendencia</b>                                                                  | <b>Autores</b>                            |
|---------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| Fisher 344 respecto ratas Long Evans. | Bajo porcentaje de lamido ano-genital, menor tiempo de amamantamiento. | Las criadas por Fisher 344 tienen menor desempeño copulatorio, crías de menor peso.               | Moore y cols., 1996.                      |
| Low LG-ABN respecto high LG-ABN.      | Menor duración del lamido y amamantamiento en cefosis.                 | Las criadas por low LG-ABN tienen mayores respuestas conductuales y neuroendócrinas a estresores. | Liu y cols., 1997; Francis y Meaney 1999. |



|                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                              |
|----------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| Hatano LAA respecto de Hatano HAA.                             | Mayor latencia de acarreo de toda la camada y bajo cantidad de lamido corporal y ano-genital a las crías.                                                                                                                                                                            | Las criadas por Hatano LAA tienen bajo desempeño en la tarea de baja evitación y mayores respuestas ante estresores.                                                                                                                                                                                                                      | Otha y cols., 2002.                          |
| Flinders sensibles respecto Sprague-Dawley.                    | Menor cantidad de episodios de lamido mayor duración del acarreo de las crías.                                                                                                                                                                                                       | Las Flinders sensibles cuidadas por Flinders sensibles muestran mayores niveles basales de corticosterona, respecto de las Flinders sensibles cuidadas por madres SD.                                                                                                                                                                     | Malkesman y cols., 2008.                     |
| Espontánea-mente hipertensa (SHR) respecto Wistar-Kyoto (WKY). | Mayor duración del amamantamiento, lamido corporal y ano-genital de las crías y tiempo en el nido.                                                                                                                                                                                   | A las SHR les disminuye la presión, frecuencia cardíaca y su conducta en campo abierto es más ansiosa, así como las respuestas medulares adrenales simpáticas cuando son adoptadas por WKY.                                                                                                                                               | McCarty y Lee, 1996; Cierpial y cols., 1990. |
| Wistar-Kyoto respecto de Fisher 344.                           | La conducta materna de las WKY puede ser cuantitativamente caracterizada por menor contacto y más periodos de abandono de sus crías. En contraste las F344 que realizan durante mayor tiempo comportamientos más activos tales como el lamido y aseo y el amamantamiento en cefosis. | Las ratas criadas por la línea WKY presentan más peso que las criadas por F344 a los 21 días pero no hay diferencias a los cuatro meses. Los F344 criados por las WKY entierran significativamente menos y las criadas por WKY realizan más aproximaciones al electrodo. Por lo tanto la crianza de F344 genera una estrategia proactiva. | Ahmadiyeh y cols., 2004.                     |

LG-ABN: Licking-Grooming and Arched-Back-Nursing

La contraparte de la maniobra de “*handling*” se llama privación materna y esta consiste en separar a las crías de las madres durante tres horas o más diariamente durante los primeros 21 días de vida (Valleé y cols., 1997). Esta

separación estimula también el lamido ano-genital y corporal y amamantamiento por parte de las madres, sin embargo el cuidado neto recibido por día es menor, lo que genera hijos con mayores respuestas conductuales y fisiológicas de estrés (Rees y cols., 2006).

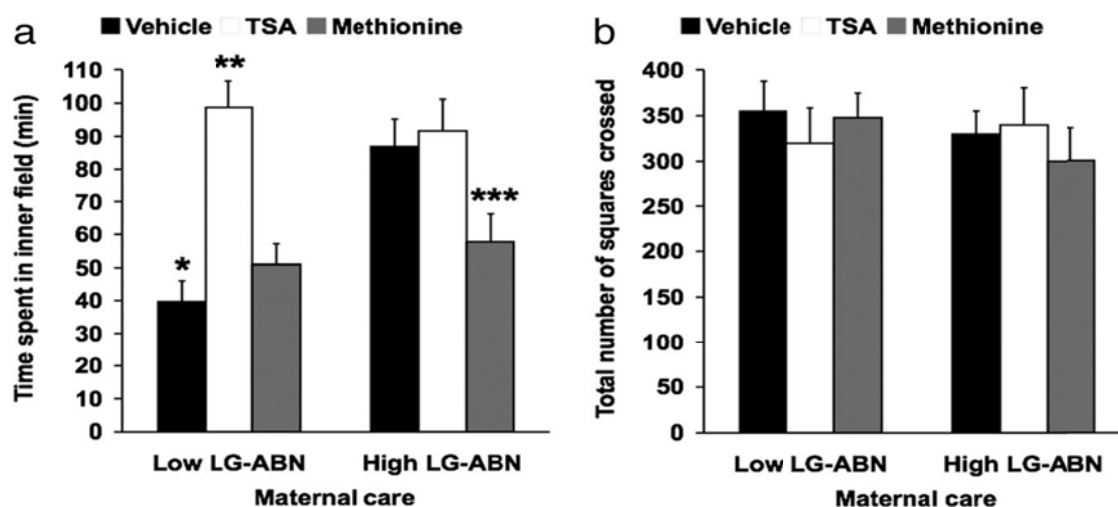
El estrés prenatal es también un factor del ambiente temprano que modifica las respuestas de estrés en la etapa adulta. Las ratas preñadas han sido sujetas a distintos tipos de estresores: entrenamiento de evitación condicionada, suspensión de la cola, hacinamiento, toques eléctricos, ruido, inyecciones salinas, estrés por restricción de movimiento 45 minutos, tres veces al día, entre los días del 15 al 21 de gestación. De adultos los descendientes prenatalmente estresados presentan un incremento en los niveles de la conducta semejante a la ansiedad, mayor susceptibilidad a drogadicción, emocionalidad, conducta depresiva y alteraciones de la memoria así como alteraciones del ritmo circadiano (Weinstock, 2008). El estrés prenatal también causa una mayor respuesta del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal a los estresores, los niveles de receptores a glucocorticoides tipo I y II son reducidos en el hipocampo a los 90 días de edad, hiperglucemia, propensión a la hipertensión arterial, mayor activación de la médula suprarrenal con más liberación de noradrenalina e incremento de la serotonina en el hipotálamo y corteza cerebral (Meaney, 2001). Este conjunto de características se pueden revertir cuando las crías prenatalmente estresados son adoptados por una madre que no fue estresada durante la etapa prenatal, lo que indica que al igual que con el estrés por privación materna, las características desarrolladas por los descendientes dependen del tipo de cuidado materno (Maccari y cols., 2003). Como se mencionó anteriormente, las modificaciones que causa la madre a sus crías por medio de su

patrón de cuidado materno quedan impresas en el ADN, esto ocurre por medio de modificaciones de metilación y acetilación de genes específicos, los cuales regulan las respuestas conductuales y fisiológicas de estrés (Meaney 2009). Estas modificaciones ocurren en el hipocampo e influyen en al menos 900 genes, la mayoría de ellos relacionados con la reproducción celular y con la formación de sinapsis y espinas dendríticas (Weaver y cols., 2006). Sin embargo, los efectos del bajo lamido y el amamantamiento en cifosis en las respuestas conductuales y fisiológicas de los adultos se han podido revertir mediante la infusión de sustancias que previenen la desacetilación de las histonas o que promueven la metilación del ADN. Weaver y cols., (2006) aplicaron a adultos que habían sido cuidados por madres de alto lamido y bajo lamido por vía intracerebroventricular el inhibidor de la desacetilasa de histona trichostatina A y el aminoácido metionina (promotor de la metilación). El inhibidor de la desacetilasa revirtió el efecto de las madres de bajo lamido y amamantamiento en cifosis y el aminoácido metionina revirtió el efecto de las madres de alto lamido y amamantamiento en cifosis, en la conducta semejante a la ansiedad en la prueba de campo abierto (véase la Figura 5).

## **Estrés, emocionalidad y ansiedad.**

A lo largo del presente trabajo se manejarán estos tres términos por lo que es necesario precisar el sentido en el que se están empleando.

El término **estrés** se utiliza para referirse al estado fisiológico que caracteriza al organismo se está enfrentando a situaciones que amenazan su homeostasis llamadas estresores durante el estrés ocurren respuestas generalizadas de activa-



**Figura 5. Efecto del tipo de cuidado materno en la conducta dentro del campo abierto y su reversión por medio de inhibidor de la desacetilasa de histona tricostatina A (TSA) y por el aminoácido donador de grupos metilo, metionina. a)** El cuidado materno con baja cantidad de lamido y amamantamiento en cifosis provoca que los individuos tengan una conducta más ansiosa la cual se manifiesta por la evitación del centro de campo abierto respecto de los individuos que reciben mayor cantidad de lamido y amamantamiento en cifosis. El efecto del bajo lamido se revierte por la aplicación intracerebroventricular de tricostatina A. El efecto del alto lamido se revierte con el aminoácido metionina, el cual provoca que los individuos de alto lamido y amamantamiento en cifosis eviten el centro del campo abierto ( $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ). **b)** Las variables anteriormente mencionadas no tienen efecto en el total de cuadros cruzados en la prueba (tomada de Weaver y cols., 2006).

ción autonómica y del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal. El estrés ocurre ante amenazas reales o imaginarias y puede estar acompañado de toda una gama de emociones tales como el miedo, ansiedad, ira o tristeza. La respuesta de estrés facilita el despertar, la alerta, la vigilancia, la cognición, atención y agresión, se inhiben las funciones vegetativas tales como la reproducción y la alimentación. Se incrementa la oxigenación y nutrición al cerebro, músculos esqueléticos y corazón; aumenta el tono cardiovascular, la frecuencia respiratoria, el catabolismo y la destoxificación de productos metabólicos y sustancias extrañas (Chrousos, 2009). El término **emocionalidad** surgió para estudiar la relación entre la conducta y las respuestas fisiológicas de estrés. Alrededor de los años 30's del siglo veinte se crearon pruebas para roedores en las que se buscó correlacionar estas dos

variables. Patrones de conducta, tal como el congelamiento, la locomoción, la evitación de lugares iluminados o abiertos; y la inhibición del apetito están correlacionados con la magnitud de respuestas fisiológicas de estrés tales como la activación simpática y del eje hipotálamo-hipófisis adrenal. Así surgió el término emocionalidad, que se refiere a la magnitud con la que se presentan estas conductas (Ramos y Mormède, 1997).

El término **ansiedad** se refiere a la experiencia subjetiva que ocurre ante un peligro real o imaginario, consistente en sensación de daño o muerte inminente, acompañada de hipervigilancia, irritabilidad y aumento en la capacidad de sobresalto se parece al miedo excepto porque la ansiedad se refiere a un peligro inespecífico en tanto que el miedo es una emoción respecto a algo concreto. (Steimer, 2002).

Para el estudio de la neurobiología y farmacología de la ansiedad, el miedo y el estrés, se han creado pruebas conductuales para roedores en las que se relaciona la conducta de los roedores con reacciones fisiológicas, conductuales y farmacológicas. De esta forma, los fármacos que en los humanos provocan ansiedad, tales como los antagonistas alfa dos adrenérgicos o los antagonistas de ácido gama-amino-butírico (GABA), al ser aplicados a los roedores de manera dosis dependiente aumentan las respuestas de evitación hacia el olor de sus predadores, los espacios iluminados, abiertos y novedosos, así como a conespecíficos desconocidos, o algún contexto al que haya sido condicionado mediante un castigo. De manera inversa la aplicación de fármacos que en humanos son ansiolíticos, estos han probado disminuir las respuestas de evitación en roedores. Es por lo anterior que también se habla de ansiedad en roedores

aunque, por supuesto, se desconoce el estado subjetivo que experimentan. Dado esto último, es común que en el lenguaje científico se utilice la expresión **“semejante a la ansiedad”** (anxiety-like), para designar aquellas conductas animales que semejan neurobiológica, farmacológica y conductualmente a la ansiedad en humanos (Gómez y cols., 2002).

De lo anteriormente dicho se infiere que la conducta semejante a la ansiedad son aquellos aspectos de la emocionalidad que son sensibles de manera dosis dependiente a fármacos ansiolíticos y ansiogénicos.

## **Evaluación de la conducta semejante a la ansiedad**

Existe una amplia gama de pruebas que evalúan la conducta ante estresores en roedores. Se les puede clasificar en aquellas que provocan estrés físico y psicológico y aquellas que solo provocan estrés psicológico. Estas últimas se consideran un mejor modelo para la comprensión de los trastornos conductuales relacionados con el estrés tales como los de ansiedad y depresión, ya que en los humanos los desencadenantes, sobre todo en las patologías psiquiátricas, son más bien de carácter psicológico (Millan, 2003).

Es por lo anterior que pruebas de conducta semejante a la ansiedad para roedores que se basan en el estrés que experimentan los roedores ante los lugares novedosos, abiertos, iluminados y elevados tienen un valor práctico y heurístico, puesto que únicamente están afectando el lado psicológico del animal. En el presente trabajo seleccionamos las pruebas de campo abierto, caja luz-oscuridad y laberinto en cruz elevado dado su amplio uso y que las respuestas son consistentes en el tiempo y condiciones. La ventaja de estas pruebas es que son

relativamente rápidas y no suponen un proceso de aprendizaje. Estas pruebas además han sido validadas mediante maniobras farmacológicas, psicológicas y neurobiológicas en las que se han relacionado distintos estados internos con las distintas conductas que se pueden observar dentro de las pruebas. Las conductas que principalmente se evalúan en estas pruebas son la locomoción (vertical y horizontal), el lugar en el que pasa el tiempo y las conductas de desplazamiento, tal como el aseo. El efecto del estrés en estas conductas es el siguiente: mayores niveles de estrés disminuyen la locomoción y la exploración de la zona aversiva del aparato y aumentan las conductas de desplazamiento. El efecto de los fármacos es el siguiente: los ansiolíticos aumentan el tiempo dedicado a la exploración de la zona aversiva y en el caso de la locomoción y las conductas de desplazamiento el efecto no es del todo claro, puesto que hay trabajos donde se reporta un aumento y otros donde se reporta una disminución. Para aclarar esta controversia (Ramos y Mormède, 1997) hicieron un estudio en el que realizaron mediciones conductuales de seis líneas de ratas en la pruebas de laberinto en cruz elevado, campo abierto y caja luz-oscuridad y correlacionaron lo obtenido por cada línea en cada una de las conductas en cada una de las pruebas. Mediante el análisis de componentes principales, descubrieron que hay dos principales grupos de variables que se correlacionan entre sí. El primer grupo de variables está formado por el tiempo en brazos abiertos del laberinto en cruz elevado, el número de entradas a los brazos abiertos, el tiempo en el centro del campo abierto, el tiempo en tigmotaxis (en contacto con superficies verticales) y el tiempo en el espacio iluminado así como el número de transiciones entre los compartimentos de la caja luz-oscuridad. El segundo grupo importante de variables está

correlacionado con la locomoción en el campo abierto, y el número de entradas a brazos cerrados en el laberinto en cruz elevado. De aquí se desprende que en estas pruebas hay un grupo de variables relacionadas con la evitación del sitio aversivo y un grupo de variables relacionadas con la locomoción y lo por lo tanto la emocionalidad es, al menos, bidimensional (Ramos y Mormède, 1997).

## **Tigmotaxis**

Dentro del primer grupo de variables, el tiempo pasado en los brazos abiertos y el tiempo pasado en el centro de la prueba de campo abierto representan el inverso de la cuantificación de la conducta de tigmotaxis; la tigmotaxis es la conducta que presentan los roedores de permanecer y moverse cerca de las superficies verticales, es decir, pegados a los muros, instinto importante para disminuir el riesgo de depredación. Treit y Fundytus (1988) mostraron que la tigmotaxis aumenta con los estresores y fármacos ansiogénicos y disminuye con fármacos ansiolíticos por lo que es una útil medida tanto de la emocionalidad y como de la conducta semejante a la ansiedad. Lamprea y cols., (2008) mostraron que las ratas prefieren estar en contacto con dos muros, a estar en contacto con uno y prefieren estar en contacto con tres muros respecto de las dos previas. Por lo tanto, es posible distinguir entre distintos grados de tigmotaxis y cuando se utiliza el campo abierto de forma cuadrangular el tiempo en las esquinas es una medida directa de tigmotaxis (Lamprea y cols., 2008). En nuestro laboratorio hallamos que el tiempo pasado en tigmotaxis en la prueba de campo abierto es mayor en los individuos machos de la sublínea HY respecto de los de la sublínea LY independientemente de las posibles variaciones en la iluminación y las maniobras



previas que causan estrés. A diferencia del tiempo pasado en tigmotaxis, otras variables como la duración del aseo o la deambulación solo son diferentes entre estas sublíneas en ciertos contextos, por lo que consideramos que la variable tiempo en tigmotaxis tiene mayor peso en el análisis de las pruebas de conducta semejante la ansiedad (Uribe, 2010).

Es por lo anteriormente expuesto que en lo sucesivo al tiempo pasado en las esquinas le llamaremos **tigmotaxis**.

## Antecedentes

En el Laboratorio de Neurofisiología de la Conducta y Control Motor se cuenta con dos sublíneas de la cepa Sprague-Dawley seleccionadas por su frecuencia de bostezo espontáneo. Las de alto bostezo, HY (del inglés, High-Yawning) con una frecuencia promedio de 20 bostezos por hora en machos, y las de bajo bostezo LY, (del inglés, Low Yawning) con alrededor de dos bostezos por hora en machos (Urbá-Holmgren y cols., 1990). En trabajos previos se ha mostrado que existen diferencias en las respuestas a estresores entre las sublíneas. Existe una correlación negativa entre la frecuencia de bostezo espontáneo y el tiempo pasado en los brazos abiertos en la prueba del laberinto en cruz elevado, lo que interpretamos como que las ratas que bostezan más muestran una mayor conducta semejante a la ansiedad (Uribe, 2010). Por otro lado, el patrón de aseo de las HY respecto de las LY tiene un mayor número de eventos de aseo caudal después de la inmersión en agua (Moyaho y cols., 1995), lo que se ha relacionado con un mayor grado de estrés (Kalueff y Tuohimaa, 2005; van Erp y cols., 1994). Las anteriores observaciones sugieren que el bostezo y el aseo que se han descrito en las HY forman parte de un conjunto de conductas que se observan en aquellas ratas que presentan mayores respuestas conductuales y endócrinas ante estresores.

Las HY ofrecen una ventaja importante dada su alta frecuencia de bostezo espontáneo ya que esta conducta puede ser usada como indicador del grado de estrés a lo largo de muchas observaciones; situación que no ocurre con las distintas pruebas de conducta semejante a la ansiedad como son la prueba de

campo abierto o la del laberinto en cruz elevado, pues en éstas los sujetos sólo pueden ser observados una vez debido a que hay un proceso de habituación que no permite evaluar la conducta semejante a la ansiedad una segunda vez en la misma prueba (Ramos, 2008). Es probable que la conducta de bostezo no se use como indicador de estrés en otras líneas de ratas debido a su baja frecuencia de bostezo espontáneo.

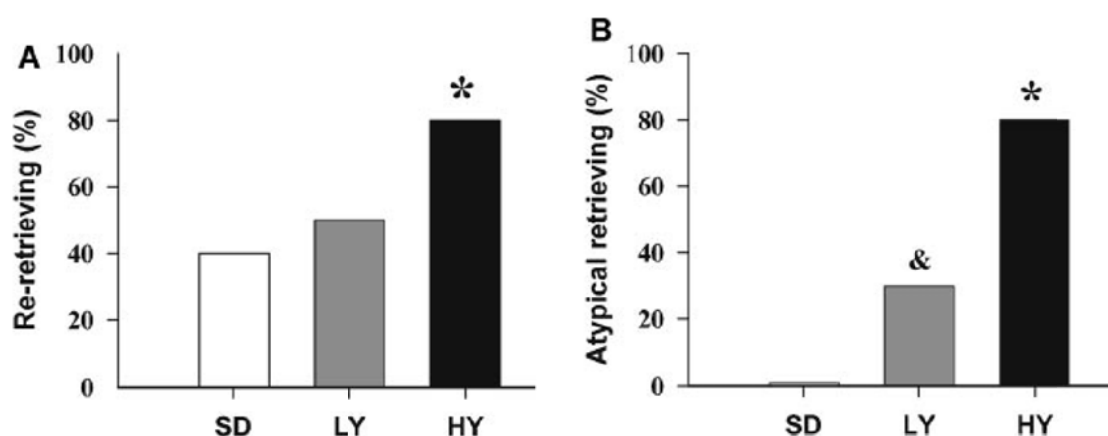
La diferencia entre las sublíneas HY y LY en su conducta en la prueba del laberinto en cruz elevado es comparable a la que existe entre las líneas de alta ansiedad y baja ansiedad (HAB y LAB, respectivamente de sus siglas en inglés), las cuales fueron seleccionadas a partir de la cepa Wistar en base a sus respuestas extremas en la distribución normal que se obtiene en esta prueba, es decir las HAB pasan menos tiempo en los brazos abiertos y las LAB pasan más tiempo (Landgraf y Wigger, 2002). La selección de nuestros animales en base a la frecuencia de bostezo espontáneo es un indicador adecuado de sus niveles de conducta semejante a la ansiedad en la etapa adulta. Sin embargo, a diferencia de las líneas de ratas mencionadas (HAB y LAB), en las cuales ya se descartó el componente materno (Wigger y cols., 2001); en las ratas HY y LY la causa de la diferencia en las respuestas de estrés parece estar correlacionada con el cuidado materno recibido en la lactancia, dadas las diferencias en la conducta materna entre ambas sublíneas (Ugarte y cols., 2011).

En la conducta materna de las sublíneas HY y LY están presentes todos los componentes que se observan en las cepas Sprague-Dawley y Wistar que fueron descritos en la introducción (Ugarte y cols., 2011). Sin embargo, las madres HY construyen nidos de menor calidad y pasan menos tiempo en el nido en

comparación con las madres LY y Sprague Dawley (Ugarte y cols., 2011). Por otra parte, las madres HY muestran una mayor latencia de lamido de las crías, así como una mayor cantidad de re-acarreos y acarreos atípicos (acarreos que se realizan por la cabeza, el abdomen y/o las extremidades y no de la piel del dorso del cuello como sucede normalmente, véase la Figura 6), este tipo de acarreos fueron relacionado por Salas y cols., (2002) con el estrés hacia las madres cuando estas eran lactantes. El procedimiento que realizaron Salas y cols., (2002) consistió en separar diariamente a las hembras de sus madres 12 horas diarias durante los primeros 21 días de vida, estas hembras que fueron privadas de sus madres durante los primeros días de vida fueron apareadas de adultas y su conducta materna se observó hallándose que presentaron prolongadas latencias para el acarreo y acarreos atípicos, así como también se observó que provocaban que en las crías aumentara la frecuencia vocalizaciones audibles.

Las crías HY presentan significativamente menor peso y lo mismo sucede en el caso de las crías LY que fueron criadas por madres HY, lo que implica un fuerte efecto materno sobre los parámetros alométricos (Ugarte, 2006). El bajo peso es una variable se ha relacionado con el estrés de las crías (Buhl y cols., 2007). Ugarte (2006) analizó también el efecto que tuvo el intercambio de camadas en la conducta materna de la descendencia: cuando fueron madres, las hijas HY que fueron criadas por una madre LY pasaron menos tiempo en posición de amamantamiento y menos tiempo dentro del nido, en comparación con las hembras HY criadas por madres HY. Sin embargo estas modificaciones en la conducta materna de la descendencia del intercambio de camadas entre HY y LY no apoya que el patrón diferente de conducta que presentan las madres HY se

deba a una transmisión epigenética puesto que estos cambios en los patrones de conducta no las acercaron al patrón de conducta materna de la sublínea LY. Cuando las hembras HY son criadas por LY, siguen presentando mayor cantidad de acarreo atípico (Ugarte, 2006) lo que indica de igual modo que el patrón conductual de las madres HY no es atribuible a la transmisión epigenética que ha sido ampliamente estudiado en la cepa Long-Evans por Meaney y su grupo de colaboradores (Meaney, 2001).



**Figura 6. Porcentaje de madres de la cepa SD y de las sublíneas HY y LY que presentan acarreo atípico además de tres crías durante más de tres días.** El número de madres que presentan re-acarreo (A) y acarreo atípico (B) es mayor en la sublínea HY seguida de la LY y las que menos presentan estas conductas fueron las de la cepa SD ( $^{&*}P < 0.05$ , tomada de Ugarte y cols., 2011).

Barajas (2002) realizó intercambio de camadas entre las sublíneas HY y LY para conocer el posible rol del cuidado materno en la emocionalidad, el patrón de aseo y la frecuencia de bostezo espontáneo, con sus respectivos controles de intercambio de camada entre la misma sublínea, sin realizar ajuste al tamaño de la camada ni a la proporción de sexos. A partir del destete, los individuos permanecieron en jaulas individuales (21 X 44 X 20cm) hasta el momento de la prueba a los 75 días. Las ratas cuidadas por madres adoptivas LY exhibieron una

mayor cantidad de aseo que las ratas cuidadas por las madres adoptivas HY, situación inesperada ya que las ratas HY son las que presentan mayor cantidad de aseo cuando se exponen a un ambiente novedoso (Eguibar y Moyaho, 1997). Las hembras HY cuidadas por madres LY incrementaron la frecuencia de episodios de aseo, por un aumento del aseo ano-genital y del rascado (Barajas, 2002). En la prueba de campo abierto las ratas LY cuidadas por madres adoptivas HY disminuyeron la frecuencia de apoyos, variable que se relaciona con una mayor emocionalidad, sin embargo no se observaron cambios en otras variables importantes dentro de esta prueba tales como el tiempo pasado en el centro y la distancia recorrida. En cuanto al bostezo, dentro de estos experimentos se observó un abatimiento del mismo en todos los grupos experimentales: en los machos HY la frecuencia no superó los 3.3 bostezos por hora y en los LY su frecuencia fue de tan sólo 0.7 bostezos por hora, y no se encontró un efecto del cuidado materno sobre la frecuencia de bostezo espontáneo (Moyaho y cols., 2009). Dado que el bostezo es una conducta altamente sensible al estrés, es muy probable que el aislamiento social tuviese un fuerte impacto en su frecuencia y esta sea la razón de que las frecuencias de bostezo en los experimentos de Barajas (2002) hayan sido bajas. Se sabe que el aislamiento social de las ratas modifica distintas vías de neurotransmisión (Ferdman y cols., 2007; Lukkes y cols., 2009; Serra y cols., 2000; Lapiz y cols., 2003), tales como un incremento en la recaptura basal de dopamina en la amígdala (Fone y Porkess, 2008) o también aumenta las respuestas conductuales a estresores (Fone y Porkess, 2008; Serra y cols., 2000; Lapiz y cols., 2003) por ejemplo, en la prueba de campo abierto los sujetos aislados tienen una menor proporción de entradas al cuadro central

(Ferdman y cols., 2007). Considerando en conjunto los efectos del aislamiento social en la emocionalidad, suponemos que estos pudieron encubrir diferencias más sutiles causadas por las diferencias en el patrón de conducta materno entre estas sublíneas, por lo que se estima pertinente realizar un experimento de intercambio de camadas entre ambas sublíneas, esta vez manteniendo a los individuos en jaulas colectivas y, adicionalmente, ajustando el tamaño de las camadas en el día postnatal 1 pues se sabe que esta variable afectan las respuestas de estrés en la etapa adulta (Spencer y Tilbrook, 2009). Spencer y Tilbrook (2009) usando la cepa Wistar compararon la conducta de los adultos que fueron criados en camadas de cuatro respecto de los que fueron criados en camadas de 16 hallando que los de camadas pequeñas presentaron menores niveles de conducta semejante a la ansiedad en la prueba del laberinto en cruz elevado.

Moyaho y cols., (2009) mostraron que el bostezo se correlaciona directamente con la proporción de sexos e inversamente con el tamaño de la camada. Las camadas más grandes generan adultos más ansiosos y con menor conducta de exploración (Seitz, 1954), son además las crías que realizan más vocalizaciones ultrasónicas co un pico alrededor de los 40kHz ante la separación (Hofer, 1993) así como individuos que en la edad adulta presentan mayores niveles plasmáticos de corticosterona y tienden a formar úlceras gástricas ante el estrés (Grotta y Ader, 1969). Por lo anterior se infiere que una causa posible de que exista una correlación entre la frecuencia de bostezo espontáneo y el tamaño y proporción de sexos de la camada esté relacionada con el cuidado materno temprano.

## **Justificación**

Dado que la conducta materna es diferente en la sublínea HY respecto de la LY y la SD, es factible que este sea un factor epigenético que determine la respuesta ante estresores en las sublíneas. El estudio de la relación entre la conducta materna y el tipo de respuestas ante situaciones que generan estrés en la etapa adulta en los tres grupos de ratas, permitirá la caracterización fenotípica de estas sublíneas dada su alta homogeneidad genética, para proponer a una de ellas (HY) como un modelo para el estudio de los estresores y sus consecuencias.

## **Hipótesis**

La frecuencia de bostezo espontáneo y las respuestas conductuales y fisiológicas ante estresores difieren entre las sublíneas HY, LY y SD dependen del cuidado materno.

## **Objetivo general**

Determinar el efecto del cuidado materno sobre la conducta de bostezo y las respuestas ante estresores en las ratas HY, LY y SD.

El propósito de este trabajo es conocer el grado de asociación entre la frecuencia de bostezo espontáneo, las respuestas de estrés y el cuidado materno, y medir si efectivamente estas variables presentan un correlato endócrino después de la exposición a diferentes estresores.



## Objetivos específicos

- 1.- Cuantificar y analizar el efecto que tiene en la sublínea HY un cuidado materno con mayor estimulación, proporcionado por las madres LY, en cuanto a la frecuencia de bostezo espontáneo y las respuestas conductuales en pruebas que evalúan la conducta semejante a la ansiedad. En forma recíproca conocer el efecto que tiene el patrón de conducta materna de la sublínea HY en la frecuencia de bostezo espontáneo y el desempeño en pruebas de conducta semejante a la ansiedad en la sublínea LY.
- 2.- Valorar el peso del componente materno (epigenético) y genético en la conducta de bostezo y en el desempeño de la descendencia en pruebas de conducta semejante a la ansiedad, por medio de la hibridación entre ambas sublíneas.
- 3.- Evaluar el efecto de las crías en el patrón de conducta materna de la sublínea HY, por medio del análisis del patrón de conducta de la sublínea HY y de la cepa Sprague-Dawley, cuando estas se encuentran cuidando crías del otro grupo respecto de cuando se encuentran cuidando crías del mismo grupo.
- 4.- Evaluar el efecto de la crianza en la frecuencia de bostezo espontáneo, el desempeño en pruebas de conducta semejante a la ansiedad y la liberación de ACTH y corticosterona posterior a un estresor ligero, el ambiente novedoso, en la descendencia del intercambio de camadas entre la sublínea HY y la cepa Sprague-Dawley.

# **Experimento 1**

## **Conducta de la descendencia del intercambio de camadas entre las sublíneas HY y LY.**

### **Objetivo**

Evaluar el efecto del cuidado materno de la sublínea LY y HY en la descendencia en la frecuencia de bostezo espontáneo, así como las respuestas conductuales ante estresores en base a tres pruebas estandarizadas: laberinto en cruz elevado, campo abierto y caja luz-oscuridad.

### **Metodología**

#### **Animales**

Se utilizaron los machos de la descendencia de hembras nulíparas de 80-90 días de edad de ambas sublíneas provenientes del bioterio de nuestro laboratorio. Estas hembras fueron mantenidas en jaulas de acrílico de 46X32X20 cm; cuatro ratas por jaula con ciclo de luz-oscuridad de 12:12 horas (la luz se enciende a las 0700 horas), con agua y alimento balanceado para roedores (Purina Mills, EUA) a libre demanda, con temperatura controlada de  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$  y humedad relativa de  $42.5 \pm 7.5\%$ . Fueron apareadas con machos sexualmente expertos de su misma sublínea, mantenidos en las mismas condiciones excepto porque solo cohabitaron con las hembras que estaban en turno de apareamiento, estas hembras cohabitaron en tríos durante una semana con los machos.

### **Citología vaginal y apareamiento**

Para programar adecuadamente el día del parto se realizaron frotis vaginales diariamente con la finalidad de establecer el ciclo estral y el momento de la preñez al observar de la presencia de espermatozoides en el frotis. Para realizar el frotis se tomaron muestras vaginales con una gota de solución fisiológica estéril en un asa bacteriológica, la cual fue distribuida homogéneamente en un portaobjetos de vidrio, teñida con hematoxilina-eosina y vista al microscopio óptico. Una vez identificadas las hembras en la etapa de proestro fueron puestas a cohabitar en tríos de dos hembras y un macho sexualmente experto. La citología vaginal se continuó realizando diariamente hasta encontrar espermatozoos en el frotis y se le asignó como el día uno de preñez. Una vez preñadas las hembras fueron puestas nuevamente con hembras en cajas colectivas de cuatro individuos hasta una semana antes del parto. Semana en la cual se les colocó individualmente en una caja de acrílico de 46X32X20 cm a la que se añadió alimento con un mayor contenido de proteína apto para la preñez y lactancia (Purina Mills No. 5012, E. U. A.) y, se le proveyó con virutas de madera características, para que la hembra pudiera construir su nido.

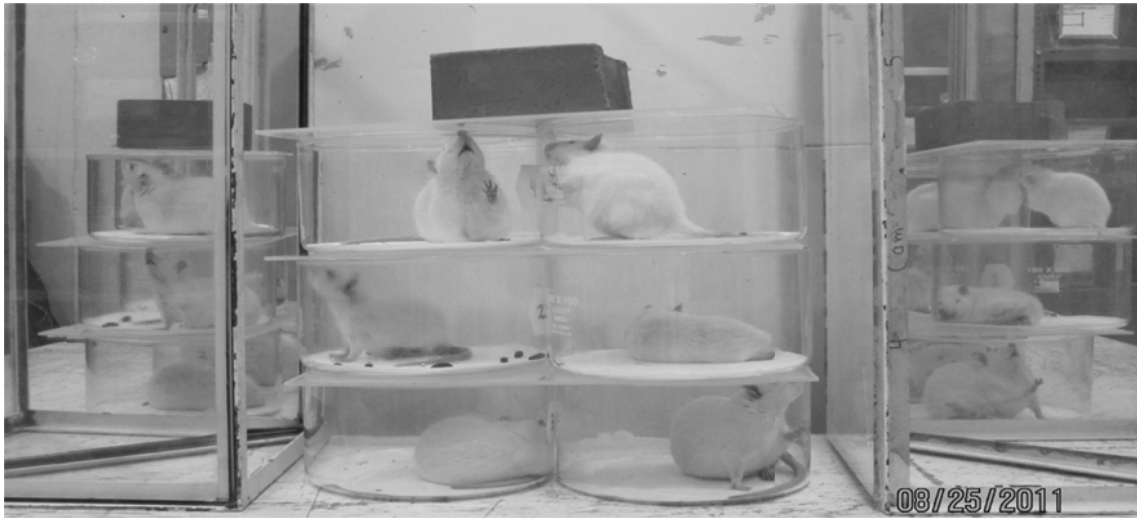
### **Intercambio de camadas**

Entre 12 y 24 horas después de concluido el parto las camadas enteras fueron intercambiadas. Para realizar el intercambio fueron retiradas las madres de su caja y puestas en una jaula individual. Una vez fuera la madre, dentro de cada caja las crías fueron sexadas y contadas para finalmente cambiarlas a la caja de la madre adoptiva con igual proporción de sexos y ajustar a ocho crías por camada. Cuando la camada fue colocada en el nido de la madre receptora se tomó el

aserrín y viruta de ésta y se distribuyó junto con algunas excretas a las crías adoptivas con la finalidad de que se impregnaran del aroma de la madre adoptiva. Posteriormente fueron regresadas las madres a sus respectivas cajas. Se realizaron intercambio de camadas entre madres de diferente sublínea (“cross-fostering”) como grupo tratamiento y entre madres de la misma sublínea como grupo control (“in-fostering”). Por lo anterior, se formaron entonces cuatro grupos experimentales: HY-HY, HY-LY, LY-HY y LY-LY (relación madre-hijos). A la edad de 23 días los machos de cada camada fueron puestos en jaulas colectivas con alimento estándar para crecimiento y mantenimiento (Purina Mills No. 5001, E. U. A.) y las hembras y la madre fueron sacrificadas. De cada grupo se obtuvieron siete camadas y se analizaron cuatro individuos por camada, por lo que fueron observados un total 112 sujetos (7X4X4).

### **Evaluación frecuencia de bostezo espontáneo de la descendencia**

A los 60 días de edad, a la descendencia le fue observada la frecuencia de bostezo espontáneo en cristalizadores de vidrio de 10X19 cm con un papel filtro en la base, durante 60 minutos a las 0900. Estos cristalizadores fueron apilados en dos columnas de tres alternando con piezas rectangulares de acrílico que permitieron taparlos para evitar que los animales se escapen y dejando una ranura para que pudiera ventilarse su interior. Al último trozo de acrílico se le colocaron ladrillos para evitar que los sujetos escaparan. A los lados de las columnas se colocaron espejos que permitieron ver a los animales cuando estos daban la espalda al observador (véase la Figura 7). Durante la observación se registró el minuto en que ocurrió cada bostezo de cada sujeto.



**Figura 7. Ratas dentro de los cristalizadores para la observación de bostezo.** Los individuos son colocados en cristalizadores de 19 X 10 mm con un papel filtro en la base y espejos a los lados que permiten mirarlos aun cuando le den la espalda al experimentador, todas las observaciones se hicieron de las 0900 a 1000 horas.

### **Aparatos para pruebas de conducta semejante a la ansiedad**

**Campo abierto:** consiste en una caja de 60X60 cm con muros de 50 cm y una caja cúbica de inicio de 20 cm de lado comunicadas por una puerta cuadrada de ocho centímetros de lado, con una compuerta corrediza, todo el campo abierto se encuentra pintado de negro, excepto por uno de los lados en el cual hay un vidrio oscuro que permite observar al sujeto sin interferencia. El piso de la caja de 60X60 cm está marcado con una cuadrícula de nueve cuadros de 20X20 cm, numerados, de los cuales uno es el cuadro central y cuatro cuadros son esquinas. El tiempo pasado en el cuadro central y en las esquinas son un importante de la tigmotaxis.

**Caja luz-oscuridad:** consiste en una caja con dos compartimientos cúbicos de 30 cm de lado y 30 de alto, comunicados por una puerta cuadrada de ocho centímetros de lado, un compartimiento pintado de blanco brillantemente iluminado (450 lux) y uno pintado de negro con baja iluminación ( 25 lux).

**Laberinto en cruz elevado:** consiste en una cruz de madera barnizada, impermeable al agua, con dos brazos abiertos y dos cerrados, de 12x70 cm, con muros de 20 cm de altura, elevado a 90 cm del piso.

## **Procedimiento**

Todas las maniobras experimentales se realizaron dentro del bioterio en el cual se encontraban viviendo los animales de tal manera que la única perturbación que recibían estos antes de las maniobras experimentales fue extraerlos de su jaula. Dado que no se tuvieron que habituar a ambientes diferentes a aquel en el que se encontraban, hubo un mínimo de variación en el ruido ambiental, temperatura, humedad y aromas, entre otras variables, que pueden perturbar la conducta de los roedores (Pawlak y cols., 2012). Particularmente en pruebas de estrés y en animales susceptibles como la sublínea HY.

## **Evaluación de la conducta de la descendencia en las pruebas de conducta semejante a la ansiedad**

A los 90 días se tomaron tres individuos al azar de cada camada y cada uno de ellos se utilizó para una prueba distinta: laberinto en cruz elevado, caja luz-oscuridad y campo abierto. El uso de estas tres diferentes pruebas permite evaluar distintos aspectos de la emocionalidad en roedores y al mismo tiempo corroborar mediciones equivalentes de la misma (Ramos, 2008). En las tres pruebas antes de colocar al sujeto, el aparato fue limpiado con solución limpiadora elaborada a base de alcohol iso-propílico (5%), alcohol etílico (15%), Extran® (10%), hidróxido de amonio (0.5%), agua destilada (59.5%) y Pinol® (10%), y secado con toallas de papel desechables (Sanitas®). La prueba fue video-filmada con una cámara

Samsung modelo SC-MX10A y posteriormente evaluada usando el programa The Observer XT v. 11, (Noldus, Países Bajos). Todas las pruebas se realizaron en orden aleatorio tanto de los sujetos como de los aparatos en la ventana de tiempo comprendida entre las 1600 y 1800 horas, con la presencia del experimentador a dos metros del aparato.

**Procedimiento para la prueba de campo abierto:** se colocó al animal en la caja de inicio durante dos minutos, se abrió la compuerta de guillotina, permitiendo la entrada del animal al campo abierto, una vez que entró se cerró la puerta y se evaluó la conducta durante 10 minutos. En el caso de los animales que después de cinco minutos no ingresaron al campo abierto desde la caja de salida la puerta de guillotina fue cerrada y puesto el animal al centro del campo abierto y de igual forma fue evaluada la conducta durante 10 minutos. Las variables a registrar fueron: cuadro en el que se encuentra el sujeto, número de erguidos (cuando el animal se para sobre sus patas traseras) y apoyos (cuando el animal se para en sus patas traseras y apoya las delanteras en un muro del campo abierto). A partir del registro de la primera variable se obtuvo, el número de cuadros cruzados (con las cuatro patas), lo que proporcionó una medida de la locomoción (distancia recorrida) y el tiempo pasado en el cuadro central y en las esquinas, lo que se denomina tigmotaxis.

**Procedimiento para la prueba de caja luz-oscuridad:** el animal fue tomado del cuerpo y puesto en el compartimiento iluminado de la caja luz-oscuridad. Las variables registradas fueron: tiempo que permanece en cada uno de los

compartimientos y el número de transiciones (número de veces que pasa del compartimiento iluminado al oscuro y viceversa, con las cuatro patas).

**Procedimiento para la prueba del laberinto en cruz elevado:** el sujeto de cada fue extraído de su caja de vida (tomado por el cuerpo) y puesto en el centro del laberinto en cruz elevado viendo hacia los brazos cerrados y registrando su conducta durante cinco minutos. Se tomaron en cuenta las siguientes variables: lugar en donde se encuentran las cuatro patas (brazos cerrados, centro o brazos abiertos) y el número de veces que asomó la cabeza por debajo del nivel de los brazos abiertos ("head dipping", del término en inglés) explorando el espacio que rodea a los mismos.

### **Análisis estadístico**

A los datos de cada prueba se les aplicó un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores (sublínea de la madre x sublínea del hijo) seguido de la prueba de Tukey, utilizando el programa Sigma Plot v. 11 para Windows 7, se consideró diferencia significativa cuando  $P < 0.05$ . Este mismo programa fue utilizado para la elaboración de las gráficas.

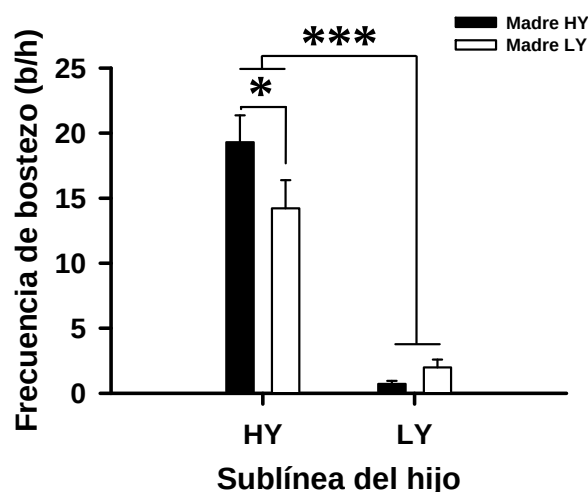
## **Resultados del Experimento 1**

### **Frecuencia de bostezo espontáneo en cristalizadores.**

El bostezo de la sublínea HY fue significativamente mayor que la de la sublínea LY ( $F_{(1)} = 101.1$ ,  $P < 0.001$ , seguida de Tukey,  $q = 14.2$ ,  $P < 0.001$ ), no se obtuvo diferencia significativa en cuanto al tipo de madre ( $F_{(1)} = 1.5$ ,  $P = 0.2$ ) con una interacción (madre x hijo,  $F_{(1)} = 4.3$ ,  $P < 0.05$ ), la prueba de Tukey mostró que, la frecuencia de bostezo espontáneo de los hijos HY que fueron adoptados por una



madre HY fue significativamente mayor que la de los HY adoptados por una madre LY (Tukey,  $q=3.3$ ,  $P= 0.03$ , véase la Figura 8). No se obtuvieron diferencias significativas en la comparación de los demás grupos experimentales. De cada camada se observó la frecuencia de bostezo espontáneo de todos los individuos, posteriormente se tomó el promedio de cada camada para realizar el ANOVA de dos factores, por lo que las gráficas de la Figura 8 corresponden a los promedios de los promedios de cada camada, lo que valida aún más el resultado.



**Figura 8. Frecuencia de bostezo espontáneo de la descendencia de la adopción cruzada entre la sublínea HY y la LY.** La frecuencia de bostezo espontáneo de la sublínea HY fue significativamente mayor que la de la sublínea LY ( $***P < 0.001$ ). Dentro de la sublínea HY la frecuencia de bostezo espontáneo fue significativamente menor cuando los hijos fueron criados por la madres LY que cuando fueron criados por madres HY ( $*P < 0.05$ ). Las barras son la media  $\pm$  el error estándar de la media.

## Conducta en la prueba de campo abierto.

Los hijos HY pasaron significativamente más tiempo en tigmotaxis que los LY ( $F_{(1)}= 6.6$ ,  $P= 0.02$ , seguido de Tukey,  $q=23.6$   $P= 0.02$ ). No se obtuvo diferencia significativa en cuanto al efecto producido por la madre en cuanto al tiempo pasado en tigmotaxis por los hijos ( $F_{(1)}=1.2$   $P= 0.3$ ) pero sí se obtuvo interacción (madre x

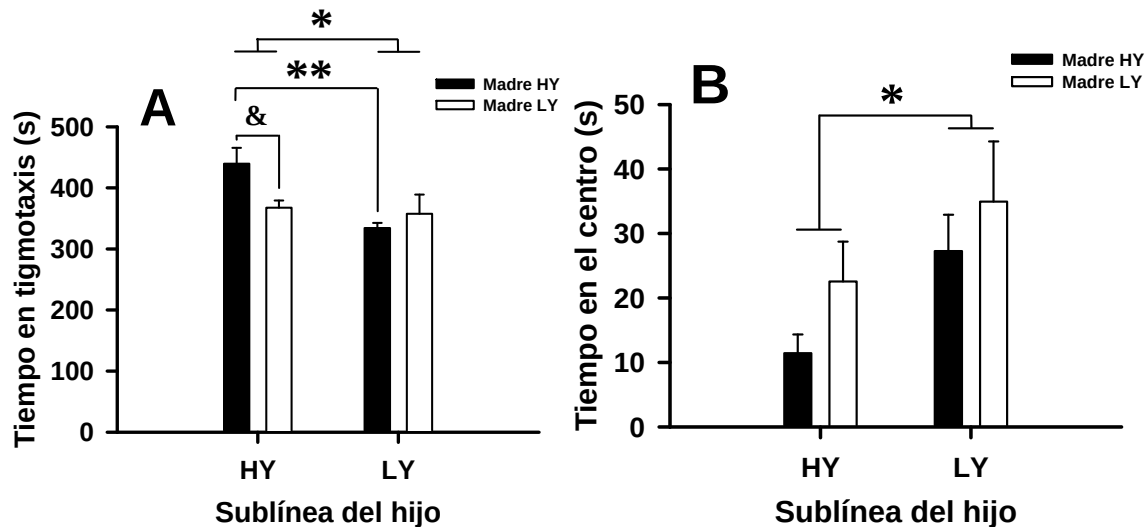
hijo,  $F_{(1)}=4.6$ ,  $P= 0.04$ ). Por lo que dentro de los hijos HY, los provenientes madre HY pasaron significativamente más tiempo en tigmotaxis que los de madre LY (Tukey,  $q= 23.2$ ,  $P= 0.04$ ); aunque en los hijos LY el tiempo que pasaron en tigmotaxis no fue influido por el tipo de madre (Tukey,  $q=21.1$ ,  $P= 0.5$ ). En las madres HY, los hijos HY pasaron significativamente más tiempo en tigmotaxis que los cuidados por madre LY (Tukey,  $q= 24.8$ ,  $P= 0.003$ ), pero no fue el caso para las madres LY, en las que no se obtuvo diferencia significativa en cuanto al tipo de hijo (Tukey,  $q= 20.4$ ,  $P= 0.8$ , véase la Figura 9 A).

El tiempo pasado en el centro del campo abierto fue significativamente menor en los hijos HY respecto de los LY ( $F_{(1)}=4.7$ ,  $P= 0.04$ , seguido de Tukey,  $q=23.1$ ,  $P= 0.04$ , véase la Figura 9 B) sin que se obtuvieran influencias significativas por el tipo de madre ( $F_{(1)}=2.1$ ,  $P= 0.2$ ), ni interacción (madre x hijo,  $F_{(1)}= 0.07$ ,  $P= 0.8$ ).

El porcentaje de visitas al centro no difiere significativamente entre los hijos de las dos sublíneas ( $F_{(1)}= 2.3$ ,  $P= 0.1$ ) ni entre los dos tipos de madre ( $F_{(1)}= 2.3$ ,  $P= 0.1$ ) ni tampoco se obtuvo interacción (madre x hijo,  $F_{(1)}=0.9$   $P= 0.4$ ).

La distancia recorrida por los hijos no dependió de la sublínea del hijo ( $F_{(1)}=1.8$ ,  $P= 0.2$ ), ni de la sublínea de la madre ( $F_{(1)}=0.7$ ,  $P= 0.4$ ) pero sí se obtuvo una interacción (madre x hijo,  $F_{(1)}=4.7$ ,  $P= 0.04$ ). Dentro de los hijos HY, los que fueron criados por madres LY recorrieron una distancia significativamente mayor que los criados por madres HY (Tukey,  $q=22.9$ ,  $P< 0.05$ ). Los hijos LY deambulan distancias similares independientemente de la sublínea de la madre (Tukey,  $q= 21.4$ ,  $P= 0.3$ ). Dentro de las madres HY, los hijos LY recorren significativamente más distancia que los HY (Tukey,  $q=23.6$ ,  $P= 0.02$ ). Dentro de las madres LY, no se obtuvo diferencia

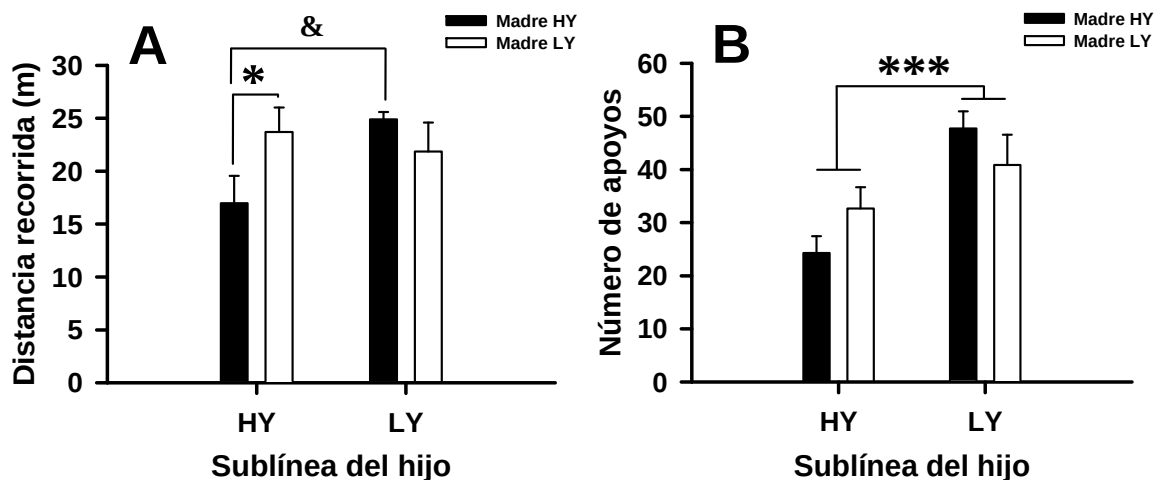
significativa en la distancia recorrida por los hijos HY respecto de los hijos LY (Tukey,  $q=20.8$ ,  $P= 0.6$ ; véase la Figura 10 A).



**Figura 9. Conducta de tigmotaxis en la prueba de campo abierto de la descendencia de la adopción cruzada entre la sublínea HY y la LY. A)** El tiempo pasado en tigmotaxis fue significativamente mayor en los individuos de la sublínea HY respecto la sublínea LY ( $*P < 0.05$ ). Dentro de los individuos HY, los que fueron criados por una madre HY significativamente pasaron significativamente más tiempo en tigmotaxis que los que fueron criados por una madre LY ( $*P < 0.05$ ). Dentro de los individuos criados por madres HY, los de la sublínea HY pasaron significativamente más tiempo en tigmotaxis que los de la LY ( $**P < 0.01$ ). **B)** El tiempo pasado en el centro fue significativamente menor en los individuos de la sublínea HY respecto de los de la LY independientemente de la madre que los crio ( $*P < 0.05$ ). Las barras son la media  $\pm$  el error estándar de la media.

El número de apoyos fue significativamente menor en los hijos HY respecto de los LY ( $F_{(1)}=14.3$   $P < 0.001$ , seguido de Tukey,  $q= 25.3$ ,  $P < 0.001$ ). Estas diferencias no se ven afectadas por la sublínea de las madres ( $F_{(1)}=0.03$   $P= 0.9$ ) ni interacción (madre x hijo,  $F_{(1)}=3.3$   $P= 0.08$ ; véase la Figura 10 B)

El número de erguidos fue significativamente menor en los hijos HY respecto de los LY ( $F_{(1)}= 9.3$ ,  $P= 0.006$ , seguido de Tukey,  $q= 24.3$   $P= 0.006$ ). Sin diferencias significativas relacionadas con el tipo de madre ( $F_{(1)}=0.004$   $P= 0.9$ ) ni interacción (madre x hijo,  $F_{(1)}=0.7$   $P= 0.4$ ).



**Figura 10. Locomoción durante la prueba de campo abierto de la descendencia de la adopción cruzada entre la sublínea HY y la LY.** **A)** La distancia recorrida por los individuos HY que fueron criados por madres HY fue significativamente menor que la de los HY criados por madres LY (\* $P < 0.05$ ). Dentro de los hijos criados por madres HY, los HY recorren significativamente una menor distancia que los LY (& $P < 0.05$ ). **B)** El número de apoyos realizados durante la prueba de campo abierto fue significativamente menor en la sublínea HY que en la sublínea LY (\*\*\* $P < 0.001$ ). Las barras son la media  $\pm$  el error estándar de la media.

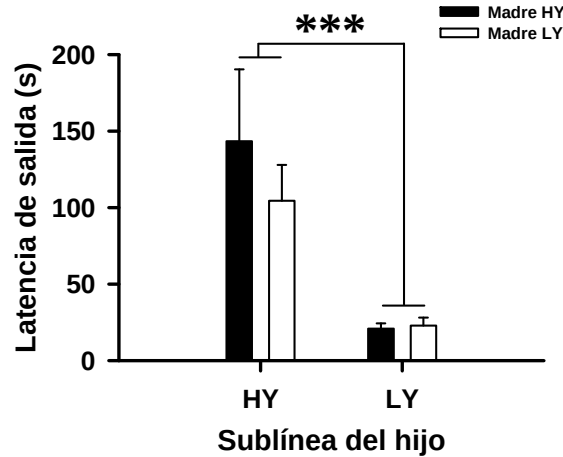
La latencia de salida de la caja de inicio fue significativamente mayor en los hijos de la sublínea HY respecto la sublínea LY ( $F_{(1)} = 14.5$   $P < 0.001$ , seguido de Tukey  $q = 25.4$   $P < 0.001$ ), sin diferencias significativas debidas al tipo de madre ( $F_{(1)} = 0.5$   $P = 0.5$ ), ni interacción (madre x hijo,  $F_{(1)} = 0.6$   $P = 0.5$ , véase la Figura 11).

### Conducta en la prueba de caja luz-oscuridad

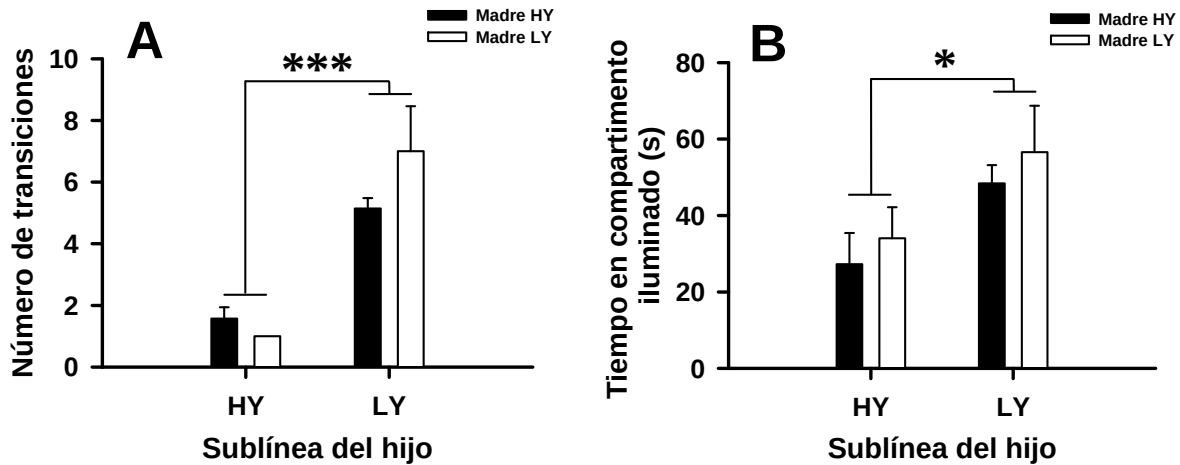
El número de transiciones del compartimento iluminado hacia el oscuro y viceversa fue significativamente menor en los hijos HY que en los LY ( $F_{(1)} = 43.7$ ,  $P < 0.001$ , seguido de Tukey,  $q = 29.3$ ,  $P < 0.001$ ). No se obtuvieron diferencias significativas debidas al tipo de madre adoptiva ( $F_{(1)} = 0.8$ ,  $P = 0.4$ ). Ni interacción (madre x hijo,  $F_{(1)} = 2.8$ ,  $P = 0.1$ ; véase la Figura 12 A).

El tiempo que permanecieron en el compartimento iluminado fue significativamente menor en los hijos HY que en los LY ( $F_{(1)} = 6.7$ ,  $P = 0.02$ , seguido de Tukey,  $q = 23.6$ ,

$P=0.02$ ). En cuanto al tipo de madre, no se obtuvieron diferencias significativas entre los criados por las madres HY y los criados por las madres LY ( $F_{(1)}=0.8$ ,  $P=0.4$ ) ni interacción (madre x hijo,  $F_{(1)}=0.007$ ,  $P=0.9$ ; véase la Figura 12 B).



**Figura 11. Latencia de salida de la caja de inicio durante la prueba de campo abierto de la descendencia de la adopción cruzada entre la sublínea HY y la LY.** La latencia de salida de los individuos HY fue significativamente mayor respecto de los individuos LY independientemente de la madre que los crio ( $***P<0.001$ ). Las barras son la media  $\pm$  el error estándar de la media.

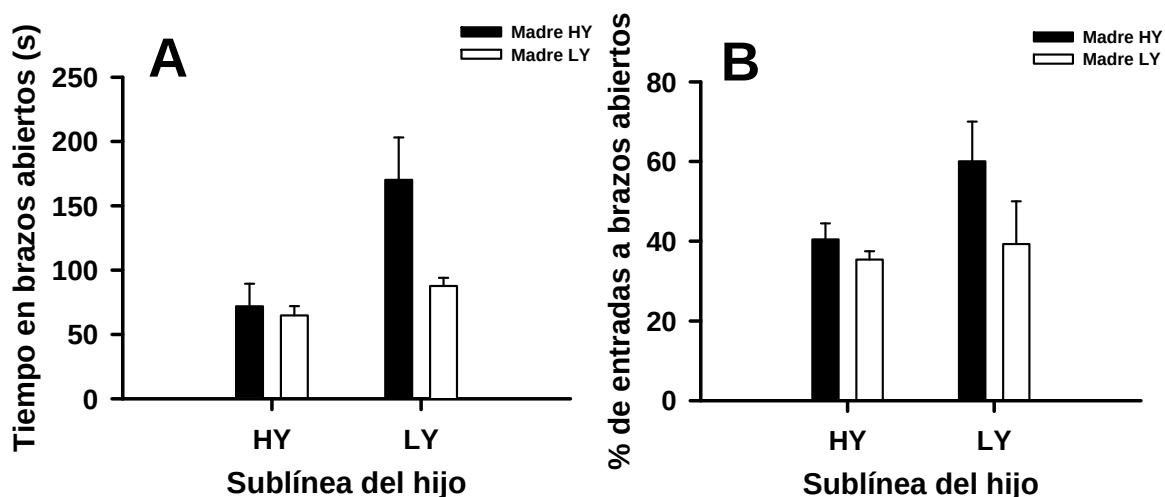


**Figura 12. Conducta en la prueba de caja luz-oscuridad de la descendencia de la adopción cruzada entre la sublínea HY y la LY.** A) El número de transiciones fue significativamente menor en la sublínea HY respecto de la LY independientemente del tipo de madre ( $***P<0.001$ ). B) El tiempo pasado en el compartimento iluminado fue significativamente menor en la sublínea HY respecto de la LY independientemente del tipo de madre adoptiva ( $*P<0.05$ ). Las barras son la media  $\pm$  el error estándar de la media.

## Conducta en la prueba del laberinto en cruz elevado

En la variable tiempo pasado en los brazos abiertos, no se obtuvo diferencia significativa entre los hijos HY y LY, solo una tendencia ( $F_{(1)} = 4.6$ ,  $P = 0.06$ ) a que los hijos HY pasaran menos tiempo en los brazos abiertos. No se obtuvo diferencia significativa debida al tipo de madre ( $F_{(1)} = 2.5$ ,  $P = 0.1$ ), ni se obtuvo una interacción (madre x hijo,  $F_{(1)} = 1.8$ ,  $P = 0.2$ , véase la Figura 13 A).

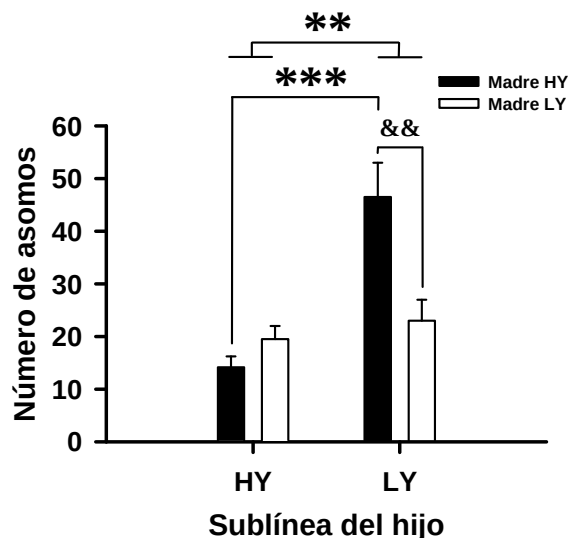
En cuanto al porcentaje de entradas a los brazos abiertos no se obtuvieron diferencias significativas en cuanto al tipo de hijos ( $F_{(1)} = 2.0$ ,  $P = 0.2$ ) ni por el tipo de madres que realizaron la crianza ( $F_{(1)} = 2.4$ ,  $P = 0.1$ ) o interacción (madre x hijo,  $F_{(1)} = 0.9$ ,  $P = 0.4$ , véase la Figura 13 B).



**Figura 13. Conducta en los brazos abiertos del laberinto en cruz elevado de la descendencia de la adopción cruzada entre la sublínea HY y la LY. A)** En el tiempo pasado en brazos abiertos no se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos experimentales. **B)** En el porcentaje de entradas a los brazos abiertos no se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos experimentales. Las barras son la media  $\pm$  el error estándar de la media.

El número de asomos fue significativamente menor en los hijos HY que en los LY independiente de del tipo de madre ( $F_{(1)} = 13.3$ ,  $P = 0.005$ , seguido de Tukey,  $q = 25.2$ ,  $P = 0.005$ ). No se obtuvo diferencia significativa en el número de asomos dependiente

del tipo de madre ( $F_{(1)} = 3.4$ ,  $P = 0.09$ ), pero sí se obtuvo una interacción (madre x hijo,  $F_{(1)} = 8.6$ ,  $P = 0.02$ ). No se obtuvo diferencia significativa en los hijos HY dependiente del tipo de madre (Tukey,  $q = 21.1$ ,  $P = 0.4$ ). Los hijos LY criados por madre HY realizaron un número de asomos significativamente mayor que los criados por madre LY (Tukey,  $q = 24.6$ ,  $P = 0.008$ ). Dentro los hijos criados por madre HY el número de asomos fue significativamente menor en los hijos HY que en los LY (Tukey,  $q = 28.6$ ,  $P < 0.001$ ), pero no se obtuvo diferencia significativa en el tipo de hijos cuidados por madre LY (Tukey,  $q = 20.6$ ,  $P = 0.7$ ; véase la Figura 14).



**Figura 14. Número de asomos en la prueba del laberinto en cruz elevado de la descendencia de la adopción cruzada entre la sublínea HY y la LY.** Dentro de los hijos criados por madre HY, el número de asomos fue significativamente menor en los hijos HY que en los LY ( $***P < 0.001$ ). Independientemente del tipo de madre, el número de asomos de los hijos LY fue significativamente mayor que el número de asomos de los hijos HY ( $**P < 0.01$ ). Dentro de los hijos LY, los que fueron criados por madre HY realizaron significativamente un mayor número de asomos que los que fueron criados por madre LY ( $\&\&P < 0.01$ ). Las barras son la media  $\pm$  el error estándar de la media.

Al analizar los datos de esta prueba fueron descartados los individuos que se cayeron del laberinto, los cuales fueron  $13/28 = 46.4\%$  individuos a los que se les realizó la prueba. A saber, se cayeron un hijo HY criado por madre HY, cinco hijos

HY criados por madre LY, tres hijos LY criados por madre HY y cinco hijos LY criados por madre LY.

## **Discusión del Experimento 1**

Los individuos de la sublínea HY, independiente de la madre que los cuidó, presentaron mayores respuestas conductuales que la LY ante un ambiente novedoso en la prueba de campo abierto (véase la Figura 9), caja luz-oscuridad (véase la Figura 12) y laberinto en cruz elevado (véase la Figura 14); así como una mayor frecuencia de bostezo espontáneo (véase la Figura 8). Los presentes resultados concuerdan con los de Moyaho y cols., (1995), Ugarte (2006), Uribe (2010) y Barajas (2002) quienes mostraron que en la prueba de campo abierto los individuos de la sublínea HY presenta más tigmotaxis que los de la sublínea LY, dado que en estos trabajos precedentes reportan que los machos HY permanecen menos tiempo en el centro del campo abierto respecto de los LY. Uribe (2010) también mostro que las sublínea HY es más ansiosa en la prueba del laberinto en cruz elevado, al pasar menos tiempo en los brazos abiertos del mismo. Sin embargo, la conducta de los hijos del intercambio de camadas muestra que el cuidado materno está contribuyendo con la expresión de respuestas de estrés (véanse figura 9 y 10), y la frecuencia de bostezo espontáneo en las sublínea HY (véase la Figura 8).

La frecuencia de bostezo espontáneo fue mayor en la sublínea HY y dentro de las HY, las que fueron adoptadas por madres HY presentaron la mayor frecuencia respecto de las criadas por madres LY (véase la Figura 8). Esto indica que cuando se obtuvo la sublínea HY por medio de 21 generaciones de cruas endogámicas usando como criterio la frecuencia de bostezo espontáneo (Urbá-Holmgren y cols.,



1990), se seleccionaron distintos grupos de genes que contribuyen tanto al bostezo como al tipo de cuidado materno proporcionado por las madres HY. Cabe destacar que este trabajo de tesis se realizó en las generaciones 78 a 82 de las HY y 72 a 76 de las LY. En el caso de las SD se renueva la base genética cada año con machos que se obtienen de Harlan, E. U. A., Harlan, UNAM y del Instituto de Neurobiología de la UNAM para garantizar sus características como Sprague-Dawley.

Cuando los roedores se encuentran en un ambiente novedoso como el campo abierto, la tendencia a permanecer en contacto con superficies verticales compite con la tendencia a explorar y dependiendo del grado de emocionalidad del individuo, se presentarán en diferente medida, las ratas más ansiosas permanecerán más tiempo en tigmotaxis y realizarán en menor medida la conducta exploratoria que se traduce en locomoción y por lo tanto distancia recorrida (Pruet y Belzung, 2003). En la prueba de campo abierto del presente experimento los hijos de la sublínea HY permanecen más tiempo en tigmotaxis y recorren menor distancia cuando son criados por una madre HY que cuando son criados por una madre LY (véanse Figuras 9 y 10), lo que indica que el cuidado proporcionado por la madre HY los hace más ansiosos. Estos resultados son apoyados por otros trabajos en los que se ha reportado que el cuidado materno deficiente aumenta las respuestas de estrés en la etapa adulta en la prueba de campo abierto (Weaver y cols., 2006). En la sublínea LY el cuidado de la madre HY no afecta el tiempo pasado en tigmotaxis ni la deambulación total, debido posiblemente a un factor de resistencia genética a pesar del cambio del ambiente postnatal (véanse Figuras 9 y 10). Gross y Hen, (2004) al realizar una revisión de cómo se origina la ansiedad a lo largo del desarrollo muestran que en muchos casos es necesario tanto el elemento genético como el

epigenético para que se desarrollen trastornos de ansiedad, pues por sí solo el ambiente temprano adverso no es suficiente. Por lo tanto es posible que las estructuras cerebrales de la LY la esté protegiendo contra el desarrollo de la susceptibilidad al estrés que podría ser provocado por el tipo de conducta materna que provee la sublínea HY.

La prueba de caja luz-oscuridad se basa también en la evaluación de conductas de los roedores motivadas por tendencias opuestas: el instinto de explorar los alrededores y el instinto de permanecer en el lugar más seguro. En la caja luz-oscuridad se evalúa la competencia entre la tendencia a permanecer en los espacios poco iluminados, lo cual dificulta la depredación, y la tendencia a explorar los espacios novedosos que pueden estar iluminados. Al igual en que la prueba de campo abierto, en la prueba de caja luz-oscuridad los individuos más ansiosos optarán por permanecer en la parte más segura del aparato, esto es el compartimento oscuro, y disminuirán el grado de exploración del mismo, teniendo como efecto un menor número de transiciones entre ambos compartimentos y por ende un menor tiempo de permanencia en el compartimento iluminado (Ohl, 2005; Bourin y Hascoët, 2003). Las ratas HY pasan significativamente menos tiempo en el compartimento iluminado y realizaron menos transiciones entre los dos compartimentos (véase la Figura 12) lo que indica que son más ansiosas que las LY. Sin embargo en la caja luz-oscuridad no se ve una influencia materna como en el caso de la prueba de campo abierto ya que en esta no se obtuvo que los sujetos HY cuidados por madres LY disminuyeran su emocionalidad, la cual es valorada en la caja luz-oscuridad y está dada por el tiempo pasado en el compartimento iluminado. Esto posiblemente se debe a que esta prueba no evalúa las mismas dimensiones de

emocionalidad que la prueba de campo abierto como claramente lo han demostrado Ramos y Mormède (1997). De tal forma que es posible que algunas de las dimensiones de emocionalidad que se encuentran como diferencia entre la sublínea HY y la LY no estén determinadas por el tipo de cuidado materno sino por factores genéticos o por factores epigenéticos anteriores a la lactancia es decir, in útero.

En la prueba del laberinto en cruz elevado al igual que las dos anteriores supone un conflicto entre la exploración completa del lugar novedoso y la permanencia en la zona segura, es decir los brazos cerrados, con la variante de que en este caso el sitio aversivo consiste en un lugar elevado que supone un lugar en el que puede ocurrir una caída (acrofobia), además de no contar con las superficies verticales que implican los brazos abiertos (Pellow y cols., 1985). En esta prueba las variables temporales en los brazos abiertos y el porcentaje de entradas a los mismos no fueron significativamente diferentes entre los grupos experimentales (véase la Figura 13) posiblemente debido a que el número de individuos descartados a causa de las caídas redujo bastante la muestra (se redujo de siete individuos a tan solo dos en los individuos de la sublínea LY cuidados por madre LY). Por lo que se esperaría que de ampliarse la muestra se obtuvieran al menos las diferencias mostradas por mí en los estudios de maestría (Uribe, 2010) que consisten en un menor tiempo pasado en los brazos abiertos así como un menor porcentaje de entradas a los mismos por parte de la sublínea HY respecto de LY. De manera relevante el número de asomos del brazo abierto hacia el piso fue menor sublínea HY (véase la Figura 14) tal como fue obtenido por Uribe (2010). Las LY que fueron criadas por madres HY presentaron un mayor número de asomos respecto de las que fueron criadas por las madres LY (véase la Figura 14). En este caso la interacción ocurrió en la dirección opuesta a la

sublínea HY en la que el cuidado materno diferente causó una disminución de la exploración. En la sublínea LY el cuidado materno diferente proporcionado por la madre de la sublínea HY, produjo un incremento de la exploración, esto puede deberse a una interacción entre el genotipo LY y el ambiente temprano que proporciona la madre HY. El tratamiento proporcionado por las madres HY, tiene efecto opuesto en la sublínea HY respecto a la LY es decir en las primeras estaría aumentando la emocionalidad y en las segundas disminuyéndola. Esta interacción en sentido opuesto, puede ser causada por la constitución genética diferente de ambas sublíneas. En apoyo a esta inferencia se encuentra que ante un mismo tratamiento, un reducción del tamaño de la camada a cuatro crías, en la cepa Wistar presenta una menor conducta semejante a la ansiedad en la prueba del laberinto en cruz elevado (Spencer y Tilbrook, 2009); en tanto un tratamiento semejante incrementa la conducta semejante a la ansiedad en la cepa Sprague-Dawley (Dimitsantos y cols., 2007). En los humanos se ha mostrado que un exceso de cuidado materno al igual que una deficiencia en el mismo puede ser el origen de mayores niveles de conducta semejante a la ansiedad (Chorpita y Barlow, 1998). Por lo que esta interacción entre madres HY e hijos LY puede ser la óptima para generar altos niveles de exploración del tipo asomos en la sublínea LY.

En el presente trabajo proponemos que es la conducta materna diferente que proveen las madres HY eleva las respuestas de estrés y las cuales causan a su vez un aumento en la frecuencia de bostezo espontáneo en la sublínea HY. En apoyo a esta propuesta está que el cuidado materno de la sublínea LY disminuyó simultáneamente la frecuencia de bostezo espontáneo y la conducta semejante a la ansiedad mostrada en el campo abierto. Por otro lado, se encuentran los trabajos

que muestran que el estrés puede aumentar la frecuencia de bostezo espontáneo que se mencionaron en la introducción (Dourish y Cooper, 1990; Tufik y cols., 1995; Uribe, 2010).

## **Experimento 2**

### **Conducta de la descendencia de la hibridación entre las sublíneas HY y LY.**

#### **Introducción**

En el Experimento 1 se pudo mostrar que algunas de las variables conductuales analizadas dentro de la sublínea HY dependen del cuidado materno. Sin embargo, se obtuvo que las características de bajo bostezo y menores respuestas de estrés de la sublínea LY no fueron alteradas cuando fueron criadas por las madres HY. Esto implica que la sublínea LY cuenta con genes que la pueden hacer insensible al tipo cuidados maternos que proporcionan las madres HY. La obtención de híbridos por cruce recíproco es una aproximación para conocer un posible efecto prenatal, así como las interacciones genéticas que regulan el bostezo y las respuestas de conducta semejante a la ansiedad en la edad adulta. Existen respuestas conductuales que pueden ser modificadas por la gestación tales como las altas respuestas de conducta semejante a la ansiedad de los ratones BALB/cJ respecto de los C57BL/6J en las que se ha mostrado mediante transferencia de embriones que es necesario tanto el ambiente uterino de la madre BALB/cJ como su estilo de crianza para que se desarrolle el fenotipo ansioso (Francis y cols., 2003). La generación de híbridos es una metodología más sencilla que ha permitido elucidar efectos maternos sobre el fenotipo tal como lo mostró Reinhold, (2002) a partir de una muestra de 34 trabajos en los que se estudian el efecto materno en características morfológicas y conductuales de los

híbridos entre razas de mamíferos tales como bueyes, ratones y ratas. Dentro de estas características podemos mencionar: edad de inicio de la pubertad, el peso corporal, respuestas a drogas, conducta de construcción del nido y ambulación (Reinhold, 2002).

Una ventaja adicional de la hibridación como complemento de los estudios de adopción cruzada es que la descendencia es genéticamente uniforme lo que permite aislar de mejor manera el componente materno. Por ejemplo, en los estudios de realizados para observar el componente materno en la hipertensión arterial con las ratas WKY y SHR. En los estudios de adopción cruzada se pudo observar que las crías de la línea WKY alteraron el patrón de conducta de las madres SHR y viceversa, sin embargo cuando realizaron el experimento con los híbridos pudieron establecer que el grado de lamido ano-genital y corporal y amamantamiento en cefosis son los determinantes en el componente materno de la hipertensión arterial (Myers y cols., 1989).

## **Objetivo**

Evaluar la frecuencia de bostezo espontáneo de la descendencia híbrida en la edad adulta, así como las respuestas conductuales ante estresores en base a tres pruebas estandarizadas: laberinto en cruz elevado, campo abierto y caja luz-oscuridad.

## **Metodología**

### **Animales**

Se utilizaron machos de la descendencia de hembras con las mismas características y mantenidas en las mismas condiciones que en el Experimento 1,

las cuales fueron apareadas con machos sexualmente expertos de la sublínea opuesta o de la misma sublínea. En el presente experimento, dado que no era importante que coincidieran las fechas de parto no se realizó la citología vaginal. Para estimar la fecha de parto y así aislar a la hembra una semana antes del parto el M. V. Z. Omar Isidro Maldonado, que maneja el bioterio determinó la fecha de parto para separar a la hembra preñada y que tuviera una semana de habituación y aislamiento en la caja de lactancia antes del parto.

A partir de los apareamientos se obtuvieron cuatro grupos experimentales, 1.- hijos HY controles de madre y padre de la sublínea HY, 2.- hijos LY controles de madre y padre de la sublínea LY, 3.- los híbridos producto de padre HY y madre LY y 3.- los híbridos producto de madre HY y padre LY. Entre las 12 a 24 horas posteriores al parto las camadas fueron ajustadas a 8 individuos con igual proporción de sexos. A la edad de 23 días los machos de cada camada fueron puestos en jaulas colectivas con alimento estándar para crecimiento y mantenimiento (Purina Mills No. 5001, E. U. A.) y las hembras y la madre fueron sacrificadas. Se obtuvieron siete camadas de las sublíneas HY y LY y seis de cada grupo de híbridos.

### **Evaluación frecuencia de bostezo espontáneo de la descendencia y pruebas de conducta semejante a la ansiedad**

La evaluación de la frecuencia de bostezo espontáneo y conducta en pruebas de ansiedad fue similar a lo desarrollado en el Experimento 1.



## **Análisis estadístico**

Para el análisis de los datos se realizó la prueba t de Student para comparar a los híbridos de madre HY con los híbridos de madre LY y posteriormente se realizó un ANOVA de dos factores (madre e hijo).

## **Resultados del Experimento 2**

En ninguno de los parámetros observados se obtuvo diferencia significativa entre los híbridos de madre HY y los de madre LY, al aplicar la prueba t de Student únicamente a estos dos grupos experimentales, véase la Tabla 2.

Adicionalmente, se realizó un análisis ANOVA de dos factores en el que se comparó la conducta de los híbridos con la de hijos de la sublínea HY y LY controles que fueron evaluados en las mismas condiciones y tiempo que los híbridos.

A continuación se presentan los valores obtenidos posteriores al análisis ANOVA de dos factores.

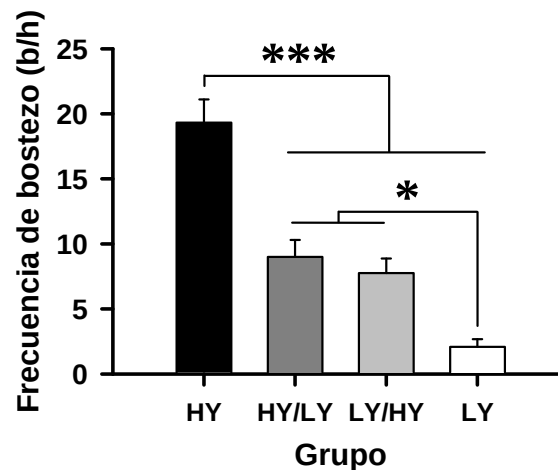
### **Frecuencia de bostezo espontáneo en cristalizadores.**

La frecuencia de bostezo espontáneo fue afectada por el genotipo de los hijos ( $F_{(2)} = 19.2$ ,  $P < 0.001$ ), siendo los hijos HY los de significativamente mayor frecuencia de bostezo espontáneo respecto de los LY (Tukey,  $q = 9.9$ ,  $P < 0.001$ ) y los híbridos (Tukey,  $q = 7.8$ ,  $P < 0.001$ ), y la de los híbridos fue significativamente mayor que la de los LY (Tukey,  $q = 4.2$ ,  $P = 0.02$ ). Sin diferencias significativas debidas al tipo de madre ( $F_{(1)} = 0.4$ ,  $P = 0.5$ ; véase la Figura 15).

**Tabla 2. Conducta de los híbridos de madre HY respecto de la conducta de los híbridos provenientes de madre LY.**

| <b>Variable</b>                                            | <b>Híbrido de madre HY</b> | <b>Híbrido de madre LY</b> | <b>Valor de t</b> | <b>Valor de P</b> |
|------------------------------------------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------|-------------------|
| <b>Frecuencia de bostezo espontáneo</b>                    | 9.0 ± 1.3                  | 7.8 ± 1.1                  | -1.2              | 0.5               |
| <b>Conducta en la prueba de campo abierto</b>              |                            |                            |                   |                   |
| Tiempo pasado en tigmotaxis (s)                            | 334.9 ± 24.9               | 334.4 ± 19.9               | -0.02             | 0.99              |
| Distancia recorrida (m)                                    | 26.8 ± 1.1                 | 22.2 ± 2.9                 | -1.4              | 0.2               |
| Tiempo pasado en el centro (s)                             | 34.1 ± 7.2                 | 29.9 ± 5.5                 | -0.5              | 0.6               |
| Número de apoyos                                           | 40.1 ± 4.1                 | 30.4 ± 4.2                 | -1.8              | 0.1               |
| Número de erguidos                                         | 22.3 ± 4.7                 | 18.4 ± 3.4                 | -0.7              | 0.5               |
| Proporción de entradas al cuadro central                   | 9.1 ± 2.3                  | 9.9 ± 1.3                  | 0.3               | 0.7               |
| Latencia de salida (s)                                     | 110.7 ± 59.9               | 27.0 ± 4.8                 | -1.5              | 0.2               |
| <b>Conducta en la prueba de caja luz-oscuridad</b>         |                            |                            |                   |                   |
| Número de transiciones                                     | 4.0 ± 0.9                  | 3.1 ± 1.4                  | -0.5              | 0.6               |
| Tiempo en el compartimento iluminado (s)                   | 53.4 ± 18.3                | 24.1 ± 8.5                 | -1.5              | 0.2               |
| <b>Conducta en la prueba del laberinto en cruz elevado</b> |                            |                            |                   |                   |
| Tiempo en los brazos abiertos (s)                          | 143.8 ± 39.4               | 112.0 ± 31.9               | -0.6              | 0.5               |
| Porcentaje de entradas a brazos abiertos                   | 57.7 ± 9.5                 | 42.8 ± 11.9                | -0.9              | 0.4               |
| Número de asomos en brazos abiertos                        | 25.8 ± 5.4                 | 27.2 ± 6.5                 | 0.2               | 0.9               |

Los datos son la media ± error estándar de la media de los híbridos respecto al tipo de madre que los gestó, parió y crió. Prueba t de Student y valor de P con once grados de libertad.



**Figura 15. Frecuencia de bostezo espontáneo de los híbridos respecto de las sublíneas HY y LY.** La frecuencia de bostezo de los individuos de la sublínea HY fue significativamente mayor que la de los otros tres grupos ( $***P < 0.001$ ). La frecuencia de bostezo de los híbridos fue significativamente mayor que la de los individuos de la sublínea LY ( $*P < 0.05$ ). La frecuencia de bostezo espontáneo de los híbridos fue un 45% de la sublínea HY y un 311% de la sublínea LY. Las barras son la media  $\pm$  el error estándar de la media.

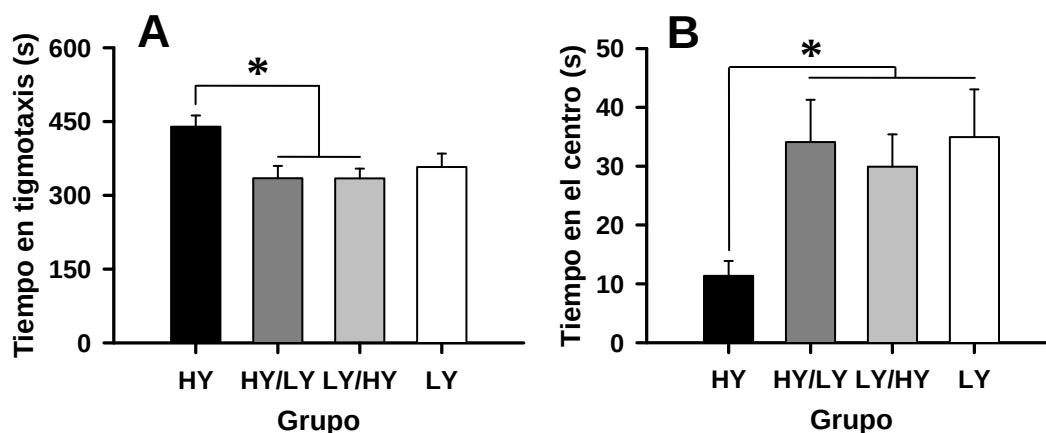
### Conducta en la prueba de campo abierto.

El tiempo pasado en tigmotaxis dependió del tipo de hijo ( $F_{(2)} = 4.7$ ,  $P = 0.02$ ), pero no del tipo de madre ( $F_{(1)} = 0.0003$ ,  $P = 0.99$ ). Los hijos HY pasaron significativamente más tiempo en tigmotaxis que los híbridos (Tukey,  $q = 4.3$ ,  $P < 0.01$ ) Sin diferencia significativa de HY respecto LY (Tukey,  $q = 2.8$ ,  $P = 0.1$ ) ni entre LY y los híbridos (Tukey,  $q = 1.0$ ,  $P = 0.8$ ; véase la Figura 16 A).

El tiempo que pasaron en el centro no difirió entre las madres ( $F_{(1)} = 0.2$ ,  $P = 0.7$ ), pero sí entre los hijos ( $F_{(2)} = 3.4$ ,  $P < 0.05$ ; véase la Figura 16 B).

La distancia recorrida depende del tipo de hijo ( $F_{(2)} = 4.1$ ,  $P = 0.03$ ) pero no del tipo de madre ( $F_{(1)} = 1.7$ ,  $P = 0.2$ ). Los hijos HY recorren significativamente menos distancia que los híbridos (Tukey,  $q = 4.2$ ,  $P = 0.02$ ) y se obtuvo una tendencia a que recorran menos distancia que los LY (Tukey,  $q = 3.3$ ,  $P = 0.07$ ). No se obtuvo

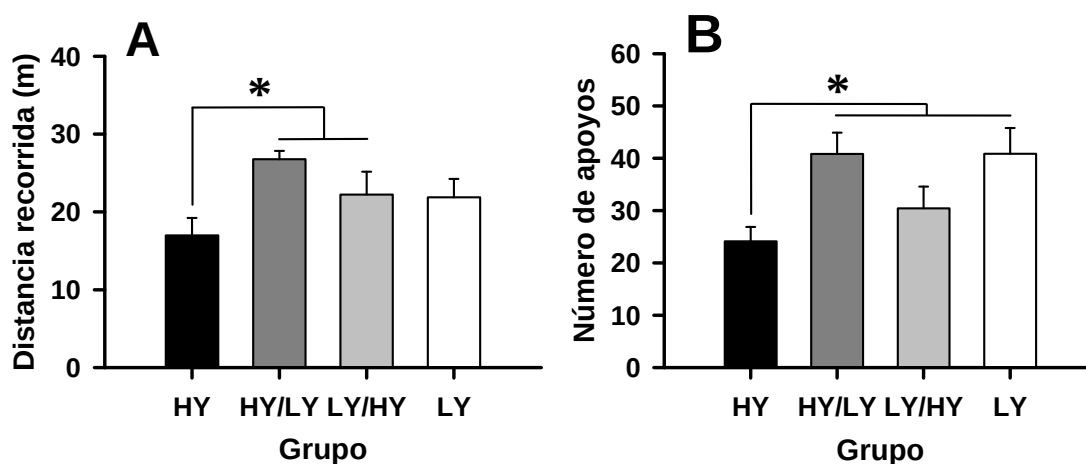
diferencia significativa entre los híbridos y la sublínea LY (Tukey,  $q = 0.2$ ,  $P = 0.99$ ; véase la Figura 17 A).



**Figura 16. Conducta de tigmotaxis en la prueba de campo abierto de los híbridos respecto de las sublíneas HY y LY. A)** Los híbridos pasaron significativamente menos tiempo en tigmotaxis respecto los individuos de la sublínea HY ( $*P < 0.05$ ), sin diferencia significativa respecto los individuos de la sublínea LY. **B)** Los híbridos y los individuos de la sublínea LY pasaron significativamente más tiempo en el centro respecto la sublínea HY ( $*P < 0.05$ ). Las barras son la media  $\pm$  el error estándar de la media.

El número de apoyos no difirió significativamente de acuerdo a la sublínea de la madre ( $F_{(1)} = 2.9$ ,  $P = 0.1$ ) pero sí de acuerdo al tipo de hijo ( $F_{(2)} = 5.7$ ,  $P = 0.009$ ). Las crías HY realizaron significativamente menos apoyos que los híbridos (Tukey,  $q = 4.1$ ,  $P = 0.02$ ) y que los LY (Tukey,  $q = 5.5$ ,  $P = 0.005$ ). No se obtuvo diferencia significativa entre el los híbridos y los LY (Tukey,  $q = 2.6$ ,  $P = 0.2$ ; véase la Figura 17 B).

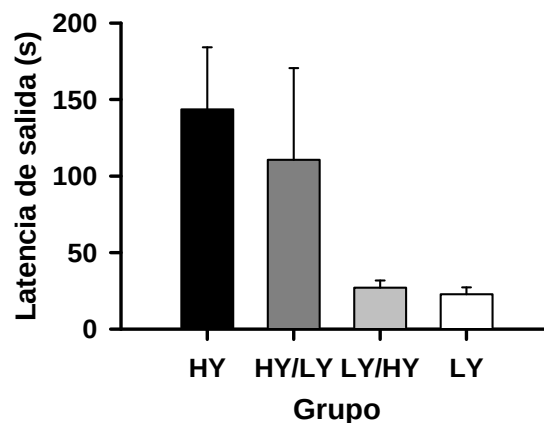
El número de erguidos no dependió del tipo de madre ( $F_{(1)} = 0.6$ ,  $P = 0.4$ ), pero sí del tipo de hijo ( $F_{(2)} = 3.6$ ,  $P = 0.04$ ). Los hijos HY realizaron significativamente menos erguidos que los LY (Tukey,  $q = 3.8$ ,  $P = 0.03$ ) y que los híbridos (Tukey,  $q = 3.8$ ,  $P = 0.03$ ), sin diferencias significativas entre híbridos y LY (Tukey,  $q = 0.8$ ,  $P = 0.8$ ).



**Figura 17. Locomoción durante la prueba de campo abierto de los híbridos respecto de las sublíneas HY y LY.** **A)** Los híbridos recorrieron significativamente mayor distancia respecto los individuos de la sublínea HY (\* $P < 0.05$ ) sin diferencia significativa respecto de los individuos LY. **B)** Los híbridos y los individuos de la sublínea LY realizaron significativamente un mayor número de apoyos respecto de los sujetos HY (\* $P < 0.05$ ). Las barras son la media  $\pm$  el error estándar de la media.

En la proporción de visitas al cuadro central no se obtuvo diferencia significativa entre los hijos de madres HY y los hijos de madres LY ( $F_{(1)} = 0.1$ ,  $P = 0.7$ ). Pero sí se obtuvieron diferencias significativas dependientes de los hijos ( $F_{(2)} = 4.1$ ,  $P = 0.03$ ). Los hijos HY visitan en proporción significativamente menos veces el centro del campo abierto respecto de lo mostrado por los híbridos (Tukey,  $q = 3.9$ ,  $P = 0.03$ ), pero no respecto de los LY (Tukey,  $q = 2.2$ ,  $P = 0.3$ ); ni tampoco se obtuvieron diferencias significativas entre estos últimos y los híbridos (Tukey,  $q = 1.2$ ,  $P = 0.7$ ).

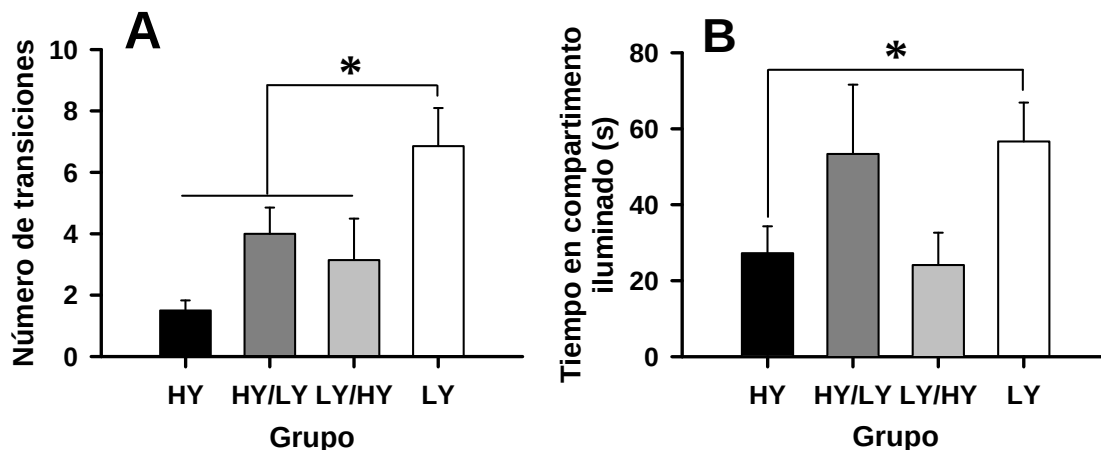
Respecto a la latencia de salida no se obtuvieron diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales probados (madre,  $F_{(1)} = 2.8$ ,  $P = 0.1$ ; hijo  $F_{(2)} = 0.2$ ,  $P = 0.8$ , véase la Figura 18).



**Figura 18. Latencia de salida de la caja de inicio en la prueba de campo abierto de los híbridos respecto de las sublíneas HY y LY.** En la latencia de salida no se obtuvieron diferencias entre los grupos experimentales aunque se obtuvo una tendencia ( $P < 0.1$ ) a que los hijos de madre LY, tanto híbridos como homocigotos, tuvieran una menor latencia de salida. Las barras son la media  $\pm$  el error estándar de la media.

## Conducta en la prueba de caja luz-oscuridad

El número de transiciones entre el compartimento iluminado dependió del hijo ( $F_{(2)} = 4.9$ ,  $P = 0.02$ ), pero no de la madre ( $F_{(1)} = 0.3$ ,  $P = 0.6$ ). Los hijos HY realizaron significativamente menos transiciones que los LY (Tukey,  $q = 5.1$ ,  $P = 0.004$ ). Los híbridos también realizaron significativamente menos transiciones que los individuos de la sublínea LY (Tukey,  $q = 3.6$ ,  $P = 0.04$ ) sin diferencias significativas entre los sujetos HY respecto de los híbridos (Tukey,  $q = 2.5$ ,  $P = 0.2$ ; véase la Figura 19 A). El tiempo pasado en el compartimento iluminado dependió de los hijos ( $F_{(2)} = 3.6$ ,  $P = 0.04$ ), pero no de la madre ( $F_{(1)} = 3.3$ ,  $P = 0.08$ ). Los hijos HY pasaron significativamente menos tiempo en el compartimento iluminado que los LY (Tukey,  $q = 4.4$ ,  $P < 0.01$ ). Los hijos híbridos no difirieron significativamente de los LY (Tukey,  $q = 2.9$ ,  $P = 0.1$ ), ni de los HY (Tukey,  $q = 2.4$ ,  $P = 0.2$ ; véase la Figura 19 B).

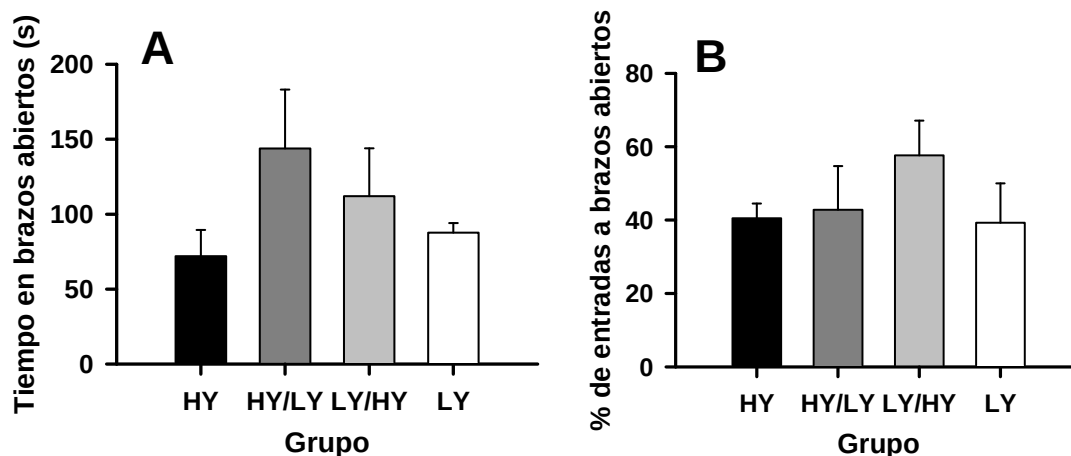


**Figura 19. Conducta en la prueba de caja luz-oscuridad de los híbridos respecto de las sublíneas HY y LY. A)** Los híbridos realizaron significativamente menos transiciones respecto los individuos de la sublínea LY ( $*P < 0.05$ ) sin diferencia significativa de los de la sublínea HY. **B)** Los híbridos no difirieron significativamente de los controles en el tiempo pasado en el compartimento iluminado, únicamente se obtuvo diferencia significativa entre los individuos de la sublínea HY y los de LY ( $*P < 0.05$ ). Las barras son la media  $\pm$  el error estándar de la media.

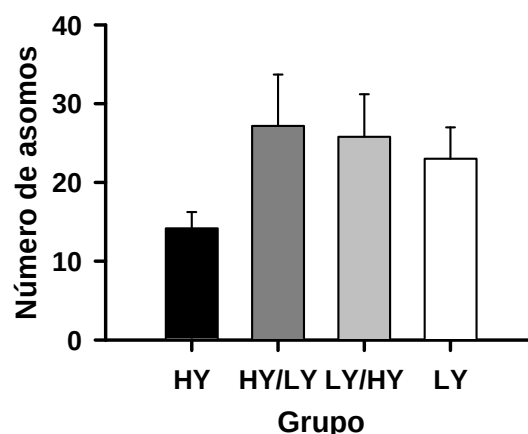
## Conducta en la prueba de laberinto en cruz elevado

En la prueba de laberinto en cruz elevado no se obtuvo diferencia significativa en el tiempo pasado en los brazos abiertos debida al tipo de madre ( $F_{(1)} = 0.6$ ,  $P = 0.5$ ), ni debida al tipo de hijo ( $F_{(2)} = 1.6$ ,  $P = 0.2$ , véase la Figura 20 A). El porcentaje de entradas a los brazos abiertos tampoco fue significativamente diferente dependiendo del tipo de madre ( $F_{(1)} = 1.3$ ,  $P = 0.3$ ) ni se obtuvo diferencia significativa entre los tres grupos experimentales de hijos ( $F_{(2)} = 0.9$ ,  $P = 0.4$ ; véase la Figura 20 B).

El número de asomos no varió de acuerdo al tipo de madre ( $F_{(1)} = 0.04$ ,  $P = 0.8$ ) ni al tipo de hijo ( $F_{(2)} = 1.5$ ,  $P = 0.3$ , véase la Figura 21).



**Figura 20. Conducta en los brazos abiertos del laberinto en cruz elevado de los híbridos respecto de las sublíneas HY y LY.** A) El tiempo que permanecieron los sujetos en los brazos abierto no difirió significativamente entre los grupos experimentales. B) El porcentaje de entradas a los brazos abiertos no difirió significativamente entre los grupos experimentales. Las barras son la media  $\pm$  el error estándar de la media.



**Figura 21. Número de asomos en la prueba del laberinto en cruz elevado de los híbridos respecto de las sublíneas HY y LY.** En el número de asomos hacia el piso, cuando el animal se encontraba en los brazos abiertos no se obtuvo diferencia significativa entre los grupos experimentales. Las barras son la media  $\pm$  el error estándar de la media.

## Discusión del Experimento 2

Este experimento nos permitió determinar el posible patrón de herencia de los genes que causan la diferencia en la frecuencia de bostezo espontáneo y los que causan las diferencias en las respuestas conductuales de estrés. En el caso de la



frecuencia de bostezo espontáneo (véase la Figura 15), en los híbridos los niveles de bostezo (8.4 bostezos por hora) se encontraron relativamente cerca de la media del número de bostezos por hora de las sublíneas HY y LY (10.7 bostezos por hora) lo que indica que los híbridos son heterocigotos para un gen semidominante que provoca una elevada frecuencia de bostezo espontáneo. Esta aseveración es apoyada por Urbá-Holmgren y cols., (1990) quienes concluyeron que el bostezo de la sublínea HY es causado por un par de alelos que muestran un patrón de expresión semidominante. Este cálculo fue realizado a partir de la ecuación de Bruell que involucra la varianza de la generación F2, la diferencia entre las líneas parentales, la desviación de los híbridos del punto medio entre las líneas parentales y la variación ambiental estimada como el promedio de la varianza de las líneas de progenitores homogéneos o de híbridos (Bruell, 1962).

El tiempo en tigmotaxis durante la prueba de campo abierto parece estar determinado por al menos un gen dominante puesto que fue mayor en la sublínea HY respecto las híbridas, sin diferencia significativa entre estas últimas y la sublínea LY (véase la Figura 16). Esto indica que los niveles de conducta semejante a la ansiedad de las híbridas son equiparables a los de la sublínea LY puesto que su grado de tigmotaxis es similar. En el caso de la distancia recorrida en la prueba campo abierto, ésta fue menor en la sublínea HY que en las híbridas sin diferencia significativa entre estas últimas y la sublínea LY, lo que también indica un patrón de herencia dominante (véase la Figura 17). Resultados semejantes se observan en las variables del campo abierto llamadas tiempo en el centro (véase Figura 16 B), número de apoyos (véase la Figura 17), número de erguidos y en el porcentaje de visitas al centro, así como número de transiciones

en la prueba de caja luz-oscuridad (véase la Figura 19), a saber, la sublínea HY presenta mayores niveles de conducta semejante a la ansiedad que los dos grupos de híbridos y la sublínea LY. Por lo tanto en los híbridos la característica de menores niveles de conducta semejante a la ansiedad se está comportando como aquellas causadas por un gen dominante es decir se parece completamente a una de las líneas parentales, dado que no presenta diferencia significativa respecto de la sublínea LY.

En ninguna variable conductual evaluada se obtuvo diferencia significativa entre los híbridos de madre HY y de madre LY (véase la Tabla 2). Más aún, llama la atención que en la frecuencia de bostezo espontáneo la diferencia fue apenas de un 15% entre un grupo de híbridos y el otro sin que sean estas significativas, cuando la diferencia entre ambas sublíneas fue de un 693%. En otra variable conductual importante, el tiempo en tigmotaxis, una importante medida de conducta semejante a la ansiedad (Prut y Belzun, 2003) la diferencia entre los híbridos fue de 0.17%, mientras que la diferencia entre ambas sublíneas alcanzó un 23%. Estos resultados nos muestran que mediante el experimento de hibridación no fue posible determinar el efecto materno en el bostezo y las respuestas conductuales de estrés debidas a la gestación y la lactancia. La hibridación diluye las diferencias entre ambas sublíneas independientemente del tipo de madre, lo que descarta el efecto óvulo y todo lo que esto implica, esto incluye al citoplasma del óvulo, las mitocondrias y su ADN.

Como la sublínea LY fue resistente a la influencia del cuidado materno, en los experimentos tres y cuatro decidimos emplear la cepa Sprague-Dawley de la cual se ha constatado que es susceptible a los efectos ambiente temprano que causa

mayores respuestas de estrés (Valleé y cols., 1997). Además esto permitió contar con resultados que sirvan de referencia para otros trabajos en los que se ha empleado la cepa Sprague-Dawley. Por otro lado, se decidió medir los niveles de ACTH y CORT para ver si las diferentes respuestas conductuales de estrés tenían también un correlato fisiológico que se ha observado en aquellos organismos deficientes de cuidados maternos (Meaney, 2001).

## **Experimento 3**

### **Conducta materna del intercambio de camadas entre la sublínea HY y la cepa SD**

#### **Introducción**

Las interacciones madre-cría son cruciales para determinar las respuestas conductuales y fisiológicas de los individuos en la edad adulta (Meaney, 2001). Se ha demostrado en ratas y primates no humanos que la calidad de la atención materna tiene efectos en el desarrollo neuroendocrino, las respuestas de estrés, la arquitectura del cerebro y los comportamientos cognitivos, afectivos y sociales (Nelson y Winslow, 2008).

Las respuestas de estrés en la edad adulta están fuertemente determinadas por la experiencia temprana, entendida ésta como el ambiente de la gestación y la lactancia (Meaney, 2001). El estudio de la calidad de la atención materna durante la lactancia en ratas es un modelo útil para entender la neurobiología del estrés debido a que la mala calidad del cuidado materno produce respuestas de estrés mayores y prolongadas (Meaney, 2007). La cantidad de lamido y de amamantamiento en cufosis determina la resistencia fisiológica y conductual de estrés en la edad adulta (Liu y cols., 1997). Sin embargo, hay muchas otras conductas maternas en ratas, que también afectan a las respuestas de estrés en la edad adulta, tales como la calidad y cantidad de acarreos y la construcción del nido que están relacionadas con el grado de motivación de la madre para cuidar a las crías (Rees y cols., 2004).

La expresión de la conducta materna adecuada a lo largo período de lactancia depende de las hormonas estradiol, progesterona, prolactina y oxitocina, principalmente y de la estimulación sensorial proporcionada por las crías (Rosenblatt, 1967; González-Mariscal y Melo, 2013). La estimulación de las madres por las crías lactantes tiene tal efecto en el cerebro adulto que incluso hembras vírgenes y machos pueden ser inducidos a expresar el comportamiento materno cuando están expuestos a las crías durante más de cinco días, el llamado proceso de sensibilización (Rosenblatt, 1967). Después de la sensibilización, los sujetos muestran acarreos, agrupamiento, lamido y postura de amamantamiento en cefosis a pesar de no tener la capacidad de producción de leche (Rosenblatt, 1967). Estos cambios de comportamiento ocurren junto con cambios plásticos en la amígdala, el hipocampo y la corteza prefrontal tales como neurogénesis, remodelación dendrítica, así como la formación y eliminación de las espinas dendríticas y por lo tanto la cantidad de sinapsis. Estos cambios ocurren junto con una elevación de los niveles de estrógenos incluso en los machos, así como un aumento en la secreción de glucocorticoides (Leuner y cols., 2010).

Para que existan adecuadas interacciones madre-crías, las crías necesitan emitir señales que afecten a los sentidos de sus madres tales como el oído, el olfato, la vista, el tacto y el gusto (Stern, 1997). Las crías emiten señales tales como vocalizaciones, movimientos, emiten calor y olores. Estas señales inducen la atención materna apropiada, que incluye alimentación, termorregulación y estimulación táctil a sus crías, lo que permite el desarrollo adecuado de la descendencia (Rees y cols., 2004). Las crías que no emiten vocalizaciones, y que no muestran niveles adecuados de movimientos reciben menos estimulación, ya

que inducen un pobre cuidado materno, impactando las deficiencias en la descendencia en su propio desarrollo, estableciendo así un círculo vicioso: la estimulación insuficiente de las crías hacia la madre, provoca a su vez estimulación insuficiente de la madre hacia las crías, generando un circuito de retroalimentación positiva que puede ser pernicioso (Stern, 1997).

Una descendencia poco estimulante puede provocar descuido materno que a su vez afecta el desarrollo de las crías al disminuir la interacción con sus madres (González-Mariscal y Melo, 2013). Las ratas madres lactantes que crían parejas de hijos alcohólicos e hijos desnutridos presentan una latencia de acarreo incrementada (Ness y Franchina, 1990). Aunque se ha establecido que la duración del lamido y el amamantamiento en cefalopodios dependen del tipo madre (Meaney, 2001), otros autores han hallado que estos comportamientos, tanto el amamantamiento en cefalopodios como el lamido hacia las crías, pueden ser influenciados por el tipo de descendencia que se encuentran criando (Clinton y cols., 2010; Walker y cols., 2003; Kurata y cols., 2009; Galler y Tonkiss, 1991; Moore y cols., 1997; Cierpial y cols., 1990). En los seres humanos, los bebés con bajo peso al nacer o con alguna deficiencia mental reciben menos atención de sus madres por lo que reciben menos estimulación, lo que provoca a su vez deficiencias en el desarrollo psicomotor y afectivo (Barrett y Fleming, 2011). Los bebés prematuros con bajo o muy bajo peso al nacer, son menos atractivos debido a sus características físicas, una disminución de los reflejos motores, dificultad para mantener niveles adecuados de atención, menor sensibilidad ante diferentes tipos de estímulos y de una comunicación inadecuada con sus madres (González-Mariscal y Melo, 2013).

Sabemos que la sublínea HY tiene diferente organización de la conducta materna, pero no sabemos aún cuáles de estos déficits son causados por las crías y cuales dependen de las madres.

En diferentes cepas de ratas obtenidas por proceso de selección para algunas de las características conductuales o fisiológicas influidas por el estrés, se ha observado que, en efecto, hay un impacto de la descendencia dependiente del comportamiento materno. Cuando las madres de la línea espontáneamente hipertensas (SHR) crían hijos de la línea control normotensa Wistar-Kyoto (las cuales se caracterizan por tener mayores niveles de conducta semejante a la ansiedad), el patrón de conducta materna termina pareciéndose a las madres Wistar-Kyoto, es decir las crías Wistar-Kyoto, modifican la conducta materna de la línea SHR. Esta situación también se ha mostrado para el caso de las madres de la línea Flinders resistente a colinérgicos (FRL, de sus siglas en inglés) crían hijos de la línea Flinders sensible a colinérgicos (FSL, de sus siglas en inglés, estos últimos son un modelo de la depresión). Las crías de ratas seleccionadas por su alta respuesta a ambientes novedosos (HR, de sus siglas en inglés) alteran el patrón de conducta de las madres de baja respuesta ante ambientes novedosos (LR, de sus siglas en inglés), la línea HR se ha propuesto como un modelo de adicción a drogas (Friedman y cols., 2006; Clinton y cols., 2010; Cierpial y cols., 1990). Por lo tanto, esto significa que algunas de las características del comportamiento materno están siendo reguladas por la descendencia, en estos grupos de ratas seleccionadas para el estudio de características relacionadas con respuestas de estrés, como la hipertensión, la depresión y las adicciones (Friedman y cols., 2006; Clinton y cols., 2010; Cierpial y cols., 1990).

## **Objetivo**

Analizar el papel de las crías en el desempeño conductual de las madres SD y HY.

## **Metodología**

### **Animales**

Diez hembras de la cepa SD y diez hembras de la sublínea HY de 90 días de edad, sin aplicación de pruebas previas, ni experiencia reproductiva fueron apareadas con machos del mismo grupo y mantenidas en un ciclo de luz-oscuridad de 12:12 (las luces se encienden a las 0700), con alimento balanceado para ratas (Purina Mills, No. 5012, USA) y agua purificada a libre demanda. Para lograr la sincronidad en los partos se realizó el procedimiento de citología vaginal tal como se describe en el Experimento 1. Durante la gestación se les mantuvo en grupos de cuatro hembras hasta entre cinco y siete días antes del parto cuando fueron colocadas individualmente en una caja de 46X32X20 cm, en la que se mantuvieron a lo largo del experimento.

### **Procedimiento de adopción cruzada (cross- fostering)**

Se realizó el mismo procedimiento descrito en el Experimento 1. Obteniendo los siguientes grupos experimentales: cinco madres HY y cinco madres SD que adoptaron crías de un su grupo (grupos de control); y cinco madres HY y cinco SD que adoptaron una camada del grupo contrario (grupos de tratamiento).

### **Procedimiento de observación**

La caja de vida se colocó en una mesa de observación, la madre fue extraída de su jaula tomada del tórax y se le mantuvo en una jaula individual por dos minutos



mientras las crías se dispersaron en la cama de aserrín y viruta en el lugar opuesto respecto a la zona de nido. Una vez que las madres fueron regresadas a su jaula por el experimentador, se observaron en vivo utilizando el programa The Observer XT, v. 11, (Noldus, Países Bajos) para el registro de la conducta. Las siguientes variables fueron cuantificadas como eventos: acarreo (lleva a la cría con la boca agarrada por la piel del cuello), re-acarreo (la madre extrae a la cría del nido), acarreo atípico (lleva a la cría tomada por otro lugar del cuerpo que no sea la piel del dorso del cuello), reacomodos (recoge a la cría del nido y la mueve a otra parte dentro del nido), y reacomodos con vocalizaciones (reacomodos durante los cuales la cría emite vocalizaciones audibles). Las siguientes variables se midieron como los estados conductuales, en los que fue cuantificada su duración: lugar donde la madre está (dentro o fuera del nido), lamido ano-genital (lame a una cría en la región ano-genital), lamido corporal (lame una cría en cualquier parte excepto la región ano-genital), auto-aseo corporal (la madre acicala su propio cuerpo), auto-aseo de la cabeza (la madre acicala su propia cabeza), exploración (olfateo, excavación, exploración del entorno), enterramiento (la madre avienta el aserrín y virutas directamente a sus crías), amamantamiento de baja intensidad (se sitúa sobre las crías para que mamen con un mínimo de cifosis) y amamantamiento en cifosis (arquea la espalda en cifosis para facilitar el acceso de las crías a los pezones). La duración total del periodo de observación fue de 30 min. Todas las observaciones se realizaron entre 1600 y 1800 horas. Cada madre se observó cinco veces a lo largo del período de lactancia a los 2, 4, 6, 8 y 10 días postnatales de sus crías.

## **Análisis estadístico**

Los datos fueron analizados utilizando análisis de varianza (ANOVA) de dos factores (tipo de madres y tipo de las crías), seguido de la prueba de Tukey, utilizando el programa Sigma Plot, v.11. para Windows 7  $P < 0.05$  fue considerado como significativo.

## **Resultados del Experimento 3**

Las madres SD pasaron significativamente más tiempo que las HY realizando las siguientes conductas, independientemente tipo de crías que estaban cuidando: lamido ano-genital ( $F_{(1)} = 7.1$ ;  $P = 0.02$ ) lamido corporal ( $F_{(1)} = 9.4$ ;  $P = 0.007$ ), y amamantamiento en cifosis ( $F_{(1)} = 5.4$ ;  $P = 0.03$ ), véase la Figura 22 A, B y C. En las conductas antes mencionadas no se obtuvieron diferencias significativas debidas a las crías, ni interacción (lamido ano-genital: crías,  $F_{(1)} = 0.3$ ,  $P = 0.6$ , madre x crías,  $F_{(1)} = 0.06$ ,  $P = 0.8$ ; lamido corporal: crías,  $F_{(1)} = 0.02$ ,  $P = 0.9$ , madre x crías,  $F_{(1)} = 0.3$ ;  $P = 0.6$ ; amamantamiento en cifosis: crías,  $F_{(1)} = 2.9$ ,  $P = 0.1$ , madre x cría,  $F_{(1)} = 0.5$ ,  $P = 0.5$ ). En amamantamiento de baja intensidad no se obtuvo diferencia significativa entre los grupos experimentales (madre,  $F_{(1)} = 3.8$ ;  $P = 0.07$ ; crías,  $F_{(1)} = 0.5$ ;  $P = 0.5$ ; madre x crías,  $F_{(1)} = 0.6$ ,  $P = 0.4$ , véase la Tabla 3). Las madres SD pasaron significativamente más tiempo en el nido, en contacto con sus crías, que las madres HY independientemente del tipo de crías que estaban cuidando (madre,  $F_{(1)} = 10.2$ ,  $P = 0.006$ , véase la Figura 22 D) y no se obtuvieron diferencias significativas entre las tipo de crías ni interacción (crías,  $F_{(1)} = 2.1$ ;  $P = 0.09$ , madre x crías,  $F_{(1)} = 0.0$ ;  $P = 1$ , véase la Figura 22 D). Se obtuvo una tendencia a pasar más tiempo en la construcción del nido cuando las madres SD

cuidaron crías HY (madre,  $F_{(1)} = 1.2$ ;  $P = 0.3$ ; crías,  $F_{(1)} = 3.4$ ;  $P = 0.08$ ; madre x crías,  $F_{(1)} = 3.9$ ;  $P = 0.07$ ; véase la Tabla 3).

Los siguientes parámetros dependen del tipo de las crías cuidadas independientemente del tipo de madre: cuando éstas cuidaron crías HY tuvieron una latencia significativamente menor para acarrear toda la camada ( $F_{(1)} = 5.3$ ;  $P = 0.04$ , véase la Figura 23 A), llevaron a cabo un número significativamente mayor de eventos de re-acarreos ( $F_{(1)} = 10.6$ ,  $P = 0.005$ , véase la Figura 23 B), y una vez que estuvieron en el nido, realizaron un número significativamente mayor de reacomodos de las crías ( $F_{(1)} = 7.4$ ,  $P = 0.02$ ), todo esto respecto las madres que cuidaron crías SD (véase la Figura 23 C).

No se obtuvieron diferencias significativas entre el tipo de madre ni interacción en las siguientes conductas: latencia de acarreo (madre,  $F_{(1)} = 3.3$ ;  $P = 0.09$ , madre x crías,  $F_{(1)} = 0.7$ ;  $P = 0.4$ ), número de re-acarreos (madre,  $F_{(1)} = 3.0$ ,  $P = 0.1$ , madre x crías,  $F_{(1)} = 2.5$ ,  $P = 0.1$ ), número de reacomodos (madre,  $F_{(1)} = 1.3$ ,  $P = 0.3$ ; madre x crías,  $F_{(1)} = 0.7$ ,  $P = 0.4$ ). Las madres HY realizaron significativamente más reacomodos que causaron vocalizaciones audibles respecto a las madres SD independientemente del tipo de las crías que se encontraban cuidando (madre,  $F_{(1)} = 8.3$ ;  $P < 0.01$ , véase la Figura 22 E). No se obtuvieron diferencias significativas entre el tipo de crías en el número de reacomodos con vocalizaciones audibles (hijos,  $F_{(1)} = 3$ ,  $P = 0.1$ ; madre x crías,  $F_{(1)} = 3.8$ ;  $P = 0.07$ ). No se obtuvo diferencia significativa en el número de acarreos atípicos entre los grupos experimentales (madre,  $F_{(1)} = 0.2$ ;  $P = 0.7$ ; crías,  $F_{(1)} = 1.6$ ;  $P = 0.2$ ; madre x crías  $F_{(1)} = 0.02$ ,  $P = 0.9$ , véase la Tabla 3).

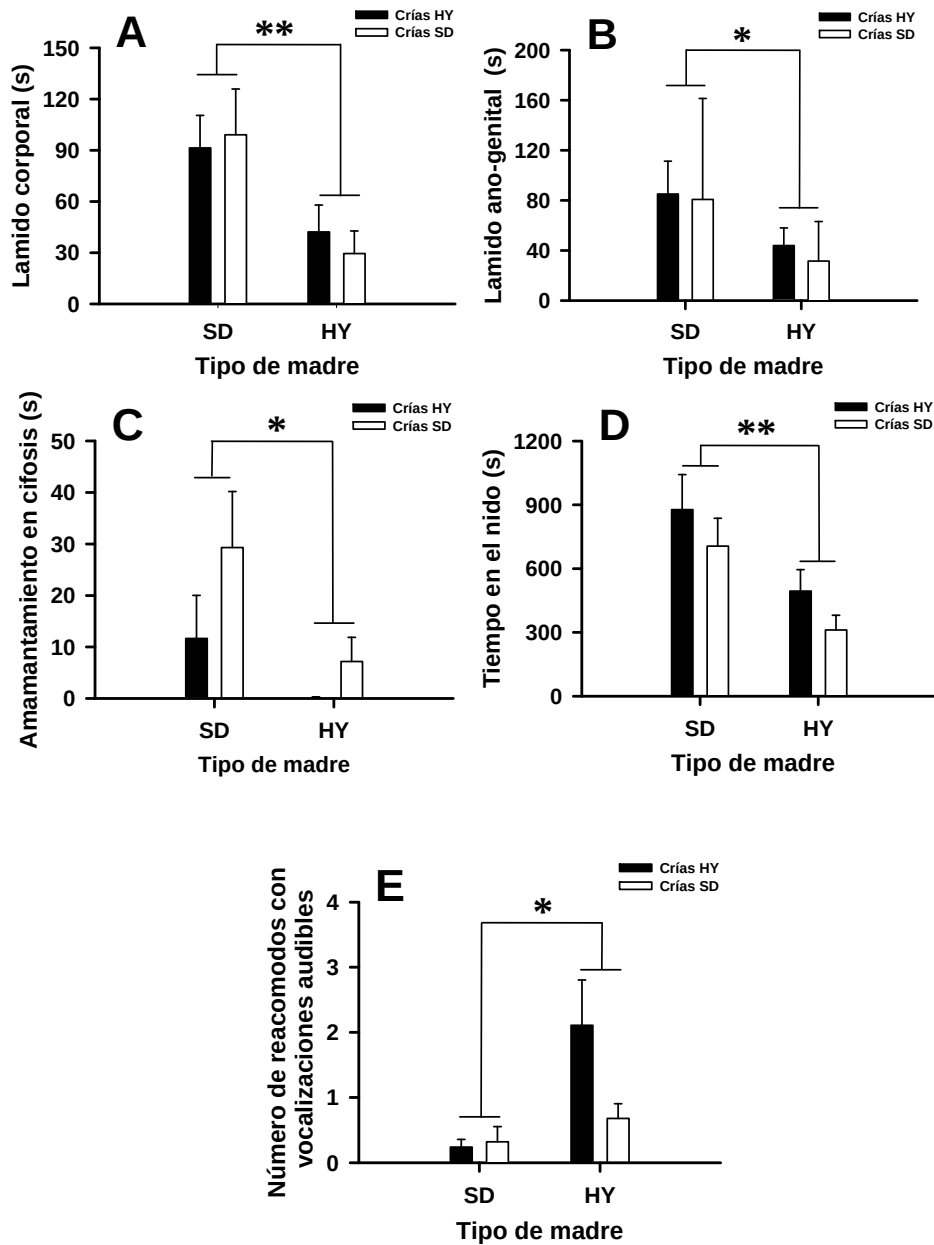
En las conductas no enfocadas hacia las crías la única diferencia significativa que se obtuvo fue respecto a la duración total del auto-aseo corporal, que fue significativamente mayor en las madres HY respecto las SD independientemente de las crías cuidadas (madre,  $F_{(1)} = 6.0$   $P = 0.03$ ; hijos,  $F_{(1)} = 0.8$ ,  $P = 0.4$ ; madre x crías,  $F_{(1)} = 0.01$ ,  $P = 0.9$ , véase la Tabla 3).

En las siguientes variables no se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos experimentales: duración del enterramiento (de las crías), duración de la exploración, número de transiciones, duración del auto-aseo de la cabeza, tiempo pasado en la ingestión de agua y tiempo dedicado a la ingestión de alimento (véase la Tabla 3)

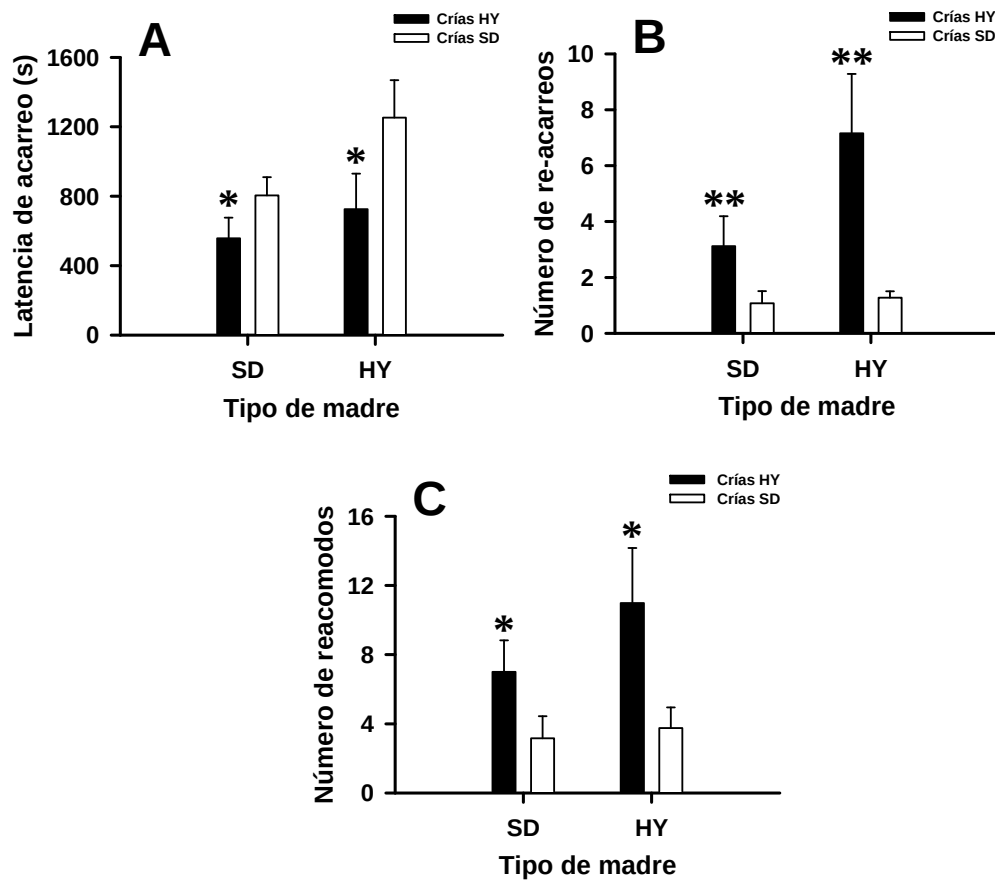
**Tabla 3. Conductas maternas y no maternas desplegadas por madres HY y SD en función del tipo de crías, durante la prueba de acarreo.**

| Conducta                              | Madre SD  |           | Madre HY  |           | Valor de <i>P</i> |             |             |
|---------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-------------------|-------------|-------------|
|                                       | Crías HY  | Crías SD  | Crías HY  | Crías SD  | Entre madres      | Entre crías | Interacción |
| Amamantamiento pasivo (s)             | 206 ± 79  | 202 ± 53  | 52 ± 34   | 137 ± 48  | 0.07              | 0.5         | 0.4         |
| Construcción del nido (s)             | 108 ± 32  | 28 ± 13   | 44 ± 15   | 47 ± 17   | 0.3               | 0.08        | 0.07        |
| Enterramiento (s)                     | 69 ± 40   | 42 ± 41   | 4.4 ± 2.2 | 2.0 ± 1.8 | 0.08              | 0.6         | 0.7         |
| Acarreos atípicos (Número de eventos) | 5.6 ± 0.7 | 4.6 ± 1   | 5.3 ± 1   | 4.0 ± 0.8 | 0.7               | 0.2         | 0.9         |
| Exploración (s)                       | 897 ± 111 | 798 ± 112 | 964 ± 63  | 775 ± 26  | 0.8               | 0.1         | 0.6         |
| Transiciones (Número de eventos)      | 14 ± 3    | 11 ± 3    | 13 ± 1    | 9 ± 0.5   | 0.4               | 0.1         | 0.9         |
| Auto-aseo corporal (s)*               | 90 ± 51   | 136 ± 34  | 230 ± 82  | 290 ± 61  | 0.03              | 0.4         | 0.9         |
| Auto-aseo de cabeza (s)               | 52 ± 23   | 80 ± 22   | 99 ± 6    | 64 ± 10   | 0.4               | 0.9         | 0.08        |
| Ingestión de agua (s)                 | 46 ± 8    | 93 ± 17   | 96 ± 23   | 99 ± 23   | 0.2               | 0.2         | 0.2         |
| Ingestión de comida (s)               | 205 ± 56  | 212 ± 34  | 269 ± 76  | 379 ± 75  | 0.08              | 0.4         | 0.4         |

Los datos son la media ± EEM de duración total (s) de conductas maternas se muestran durante la prueba de recuperación, y el número de veces (Número de eventos) se dio cuenta de los comportamientos anotado como eventos. El valor *P* fue el obtenido de la prueba ANOVA de por dos vías. \* Diferencia significativa entre la madre HY y la SD independientemente del tipo de crías.



**Figura 22. Conductas maternas que dependieron del tipo de madre independientemente del tipo de crías que se encontraban cuidando. A)** Duración total del lamido corporal. **B)** Duración total del lamido ano-genital. **C)** Duración total del amamantamiento en cifosis. **D)** Tiempo total pasado dentro del nido. **E)** Número total de reacomodos dentro del nido durante los cuales las crías emitieron vocalizaciones audibles. Las barras son la media  $\pm$  el error estándar de la media. (\*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$ , diferencia significativa entre las madres SD y HY).



**Figura 23. Conductas maternas que dependen del tipo de cría adoptiva.** A) Latencia de acarreo de toda la camada. B) Número de re-acarreo, veces que extrae las crías del nido. C) Número de reacomodos de las crías dentro del nido. Las barras son la media  $\pm$  el error estándar de la media (\*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$ , diferencia significativa entre el cuidado dirigido hacia crías HY respecto del proporcionado a las crías SD independientemente del tipo de madre).

## Discusión del Experimento 3

Las madres HY pasaron menos tiempo en el nido, efectuando lamido corporal y ano-genital, y desplegando amamantamiento en cifosis (véase la Figura 22). Por lo tanto, las madres HY proporcionan menos estimulación a sus crías, lo que podría producir respuestas de estrés más altas en la descendencia en la edad adulta (Meaney, 2001).

Las conductas maternas diferentes que se atribuyeron inicialmente a las madres HY (Ugarte y cols., 2011) dependieron de las crías HY independientemente de la madre adoptiva. Las crías HY causan que algunas de las conductas de las madres SD cambien hacia el patrón de conducta originalmente establecido en las madres HY, y las madres HY cuidando crías SD no las muestran. Estas conductas modificadas por las crías HY son: menor latencia para el acarreo de toda la camada y el número de re-acarreo y re-arreglos dentro del nido (véase la Figura 23). Tanto las madres SD como las HY acarreo a todas las crías HY en un 62% del tiempo empleado para recuperar a toda la camada SD, y realizan tres veces más re-acarreo y reacomodos con las crías HY que con las crías SD.

Los patrones diferentes de acarreo están vinculados con el estrés prenatal, a continuación mencionamos algunos ejemplos:

- Neumann y cols., (2005) expusieron a hembras gestantes de la línea HAB (de alta ansiedad) ante hembras lactantes, dado que las hembras lactantes agreden a las gestantes, esto constituye un estresor para las gestantes. Cuando estas gestantes tuvieron a sus crías, mostraron un patrón de acarreo más rápido el se atribuyó al estrés sufrido durante la gestación.
- Las madres que cuidan crías de la línea Flinders sensible a colinérgicos (FSL) muestran una mayor latencia de acarreo de toda la camada que aquellas madres que cuidan a crías de la línea Flinders resistente a colinérgicos (FRL). Además, la latencia de acarreo se correlaciona positivamente con los niveles de depresión de la descendencia medidos en la prueba de nado forzado. (Friedman y cols., 2006). La línea (FSL) es un modelo de depresión ya que muestra mayor inmovilidad en la prueba de



nado forzado, anhedonia y menor actividad locomotora entre otras características conductuales y neurobiológicas que se presentan en los humanos deprimidos.

- Cuando ratas gestantes fueron estresadas con períodos diarios en presencia de un gato en la misma caja, esto causó que las madres realizaran menos acarreos, proporcionaran menos lamido a sus crías y además pasan menos tiempo en el nido que los controles (Patin y cols., 2002).

Así, el patrón de acarreo alterado hacia las crías HY podría ser causado por que estas crías están modificando sus respuestas de estrés de las madres.

Otro ejemplo de patrón de acarreo diferente es el provocado por las crías de la línea de ratas catalépticas, las madres Wistar normales que cuidan a crías de esta línea muestran una mayor latencia para acercarse a ellos, acarrear a la primera cría y a la camada completa, respecto de cuando están cuidando crías de la cepa Wistar normales (Petrenko y cols., 2004). Las madres que cuidan crías con depleción de dopamina (por inyección intraperitoneal de 6-hidroxidopamina) tardan más en acarrear a toda la camada y en establecerse en el nido (Wilkins y cols., 1997), acarrean además a sus crías con menos frecuencia y pasar menos tiempo en contacto con ellas, esto se asocia con una menor incidencia de vocalizaciones ultrasónicas emitidas por crías (Noirot, 1972). La depleción de dopamina provoca que las crías se muevan más, lo que puede ser la causa de latencias más largas para el acarreo; para probar si el exceso de movimiento está causando que las crías depletadas de dopamina sean menos atendidas, estas fueron anestesiadas y se observó que la latencia para reunir a la camada es más corta (Wilkins y cols.,

1997). Teniendo en cuenta las diferencias en las respuestas dopaminérgicas en HY sublínea respecto LY (Eguibar y cols., 2003; Urbá-Holmgren y cols., 1993), y las diferencias en la afinidad de la dopamina por los receptores D1 y D2 en la sublínea HY respecto de LY (Díaz-Romero y cols., 2005), es posible que el sistema dopaminérgico esté jugando un papel relevante tanto en las respuestas de estrés como en los patrones de conducta materna causados por las crías.

En este trabajo, se registra una conducta que no se considera en la mayoría de los experimentos de conducta materna: número de reacomodos dentro del nido. En nuestras observaciones clasificamos los reacomodos en dos tipos: con vocalizaciones audibles y sin vocalizaciones audibles, emitidas por las crías. El número de reacomodos con vocalizaciones audibles fue mayor en las madres HY independientemente del tipo de hijo que cuidasen (véase la Figura 22). Las vocalizaciones audibles se han relacionado con el manejo brusco que pueden dar los adultos que no son sus madres a las crías (Polan y Hofer, 1999), ya que las crías de ratas con una alta tasa de vocalizaciones audibles reciben menos agresiones de ratas vírgenes y de los machos no sensibilizados (Noirot, 1972). El manejo brusco por parte de la madre también causa vocalizaciones audibles, este manejo brusco con vocalizaciones audibles por parte de la madre se provocó en madres lactantes que fueron estresadas por hacinamiento con machos desconocidos durante la gestación (Moore y Power, 1986). Por lo tanto es posible que el cuidado materno diferente provoque estrés a las crías y que éste sea la causa de una mayor frecuencia de vocalizaciones audibles durante el acarreo.

La frecuencia de reacomodos sin vocalizaciones audibles su frecuencia fue mayor hacia crías de la sublínea HY independientemente de la madre (véase la Figura

23). El re-acarreo y la frecuencia de reacomodos así como la duración del lamido ano-genital y corporal aumenta cuando las crías han sido privadas de cuidados maternos durante 12 horas, aunque las madres no hayan sido privadas de sus crías, lo que implica que las señales que están enviando las crías privadas incrementan el cuidado materno (Pereira y cols., 2006). Es probable, entonces, que las crías HY sean más exigentes que las crías SD debido a que las madres HY ofrecen menos cantidad de lamido ano-genital y corporal y amamantamiento en cefosis. Aunque aún desconocemos la naturaleza del rasgo exigente, éste podría estar dado por vocalizaciones ultrasónicas, movimientos o la emisión de feromonas y pudo haber evolucionado como resultado de la crianza por parte de madres negligentes.

Dado que la conducta materna se determina por el tipo de interacción que se establece con la descendencia, una patología relacionada con el desarrollo temprano adverso no sólo está determinada por la predisposición materna sino también el tipo de interacción que se establece entre la madre y la descendencia. Esto amplía el abanico de posibilidades como resultado de la crianza recibida. En la vida real, la complejidad de las interacciones madre-hijos puede determinar un ajuste fino del comportamiento y en las respuestas fisiológicas en la edad adulta para obtener óptimas características fenotípicas para enfrentar el entorno social y natural, el tipo de búsqueda de alimento y las respuestas ante los depredadores, estableciendo un estilo de afrontamiento (coping style) que permita el aumento de su adecuación biológica.

Estos resultados anulan la visión del comportamiento de la madre como algo constante a través de las camadas y generaciones (Champagne y cols., 2003), ya

que las crías también pueden determinar el patrón conductual de la madre, el cuidado recibido y por lo tanto puede contrarrestar o sinergizar la dirección en la que la madre los lleva.

## **Experimento 4**

### **Conducta de la descendencia del intercambio de camadas entre la sublínea HY y la cepa SD.**

#### **Introducción**

La frecuencia de bostezo espontáneo está influida por el cuidado materno como se pudo mostrar en el Experimento 1. Sin embargo, en este mismo experimento no se observó efecto en la frecuencia de bostezo espontáneo de la sublínea LY cuando las crías son cuidadas por madre HY. Más aún, en la sublínea LY no alteraron significativamente los parámetros de respuestas conductuales de estrés aun cuando fueron cuidadas por madres que lamen menos a sus crías, realizan menos amamantamiento en cefosis como lo son las madres HY y están menos tiempo en contacto con ellas. Esta resistencia al cuidado materno diferente se observó también en los híbridos, los cuales no fueron influidos por el tipo de cuidado provisto por la madre HY. Esto nos ha hecho suponer que en la sublínea LY hay un gen que está proveyendo resistencia al efecto de las madres HY. La necesidad de genes susceptibles como condición para el desarrollo de mayores respuestas a estresores dadas por eventos del desarrollo temprano ha sido claramente establecida por Gross y Hen, (2004), quienes realizaron una revisión del importante componente genético que tienen los trastornos ligados al estrés tales como esquizofrenia, trastorno de estrés postraumático, trastorno de ansiedad generalizada y depresión. Estos trastornos necesitan un ambiente temprano

desfavorable o un evento traumático para poder establecerse, pero por sí solos no son suficientes el evento ambiental ni los genes desencadenan el trastorno.

De la cepa Sprague-Dawley (SD), se ha mostrado en distintos trabajos que el cuidado materno deficiente aumenta las respuestas fisiológicas y conductuales de estrés: los individuos de la cepa SD que durante la lactancia recibieron de sus madres SD menos tiempo de contacto, menos lamido ano-genital y corporal y amamantamiento en cifosis, presentan mayores respuestas conductuales de estrés, tales como una menor deambulación en el campo abierto y mayor grado de tigmotaxis (Bailoo, 2011; Masís-Calvo y cols., 2013) junto con mayores niveles de corticosterona posteriores al estrés y con una retroalimentación negativa del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal más prolongada (Bartha y cols., 2007). Esto implica que es posible que a diferencia de la sublínea LY, la cepa SD sí sea susceptible al cuidado diferente de la HY mostrado en el Experimento 3.

## **Objetivo**

Evaluar el efecto del cuidado materno de la sublínea HY y la cepa SD en la descendencia en la frecuencia de bostezo espontáneo, así como las respuestas conductuales y hormonales ante estresores en base a tres pruebas estandarizadas: laberinto en cruz elevado, campo abierto y caja luz-oscuridad.

## **Metodología**

### **Sujetos**

Los sujetos que fueron observados en el presente experimento fueron los machos de la descendencia del intercambio de camadas del Experimento 3, los cuales fueron destetados a los 23 días de edad y puestos en jaulas colectivas en grupos

de cuatro. 40 sujetos de la sublínea HY, de los cuales 20 fueron adoptados por una madre HY y 20 por una madre SD; y 40 de la cepa SD de los cuales 20 fueron adoptados por una madre HY y 20 por una SD.

### **Aparatos y procedimiento.**

Al igual que en los Experimentos 1 y 2 se evaluó el bostezo a los 60 días de edad y a los 90 se evaluaron respuestas conductuales en pruebas de conducta semejante a la ansiedad, sin embargo, en este experimento se cuantificaron los niveles plasmáticos de la hormonas ACTH y corticosterona, causados por la prueba de conducta semejante a la ansiedad. Una vez concluidas las pruebas de caja luz-oscuridad y de laberinto en cruz elevado, con duración de cinco minutos, los animales fueron dejados en el aparato durante 12 minutos más y después de esto fueron puestos en una jaula individual por tres minutos más, al tiempo que fueron trasladados a un cuarto contiguo para su sacrificio. Por lo que, a 20 minutos de iniciadas las pruebas conductuales, todos los animales fueron sacrificados por decapitación. En el caso de la prueba de campo abierto también se dejó a los sujetos hasta que cumplieron 17 minutos en total de estar en el aparato, para posteriormente ser puestos en la jaula individual durante tres minutos y sacrificados al cumplirse los 20 minutos. La muestra fue obtenida de sangre del tronco en tubos con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) como anticoagulante, fue centrifugada a 3,500 revoluciones por minuto durante diez minutos, posteriormente el plasma fue separado y conservado a -20°C, para su posterior análisis mediante ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas. Para tal efecto se

utilizaron kits comerciales que contenían todos los reactivos necesarios para el procedimiento (Corticosterone ELISA Kit Catalog No. ADI-900-097, Enzo®; ACTH Hormone ELISA Catalog No. 21-ACTHU-E01 ALPCO®).

## **Análisis estadístico**

Todos los datos fueron analizados mediante la prueba análisis de varianza ANOVA de dos factores seguidos de la prueba de Tukey. Los factores usados fueron madre e hijo. Para realizar el análisis fue empleado el programa Sigmaplot v. 11 para Windows.

## **Resultados del Experimento 4**

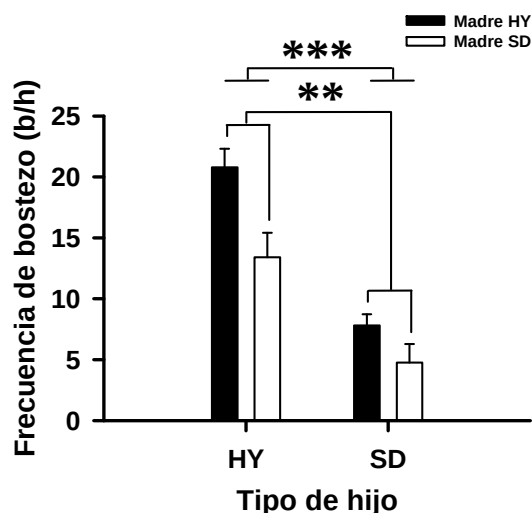
### **Frecuencia de bostezo espontáneo en cristalizadores**

La frecuencia de bostezo espontáneo de los individuos HY fue significativamente mayor que la de los SD independientemente de la madre adoptiva que los crio (hijo,  $F_{(1)} = 48.9$ ,  $P < 0.001$ , seguida de Tukey,  $q = 9.9$ ,  $P < 0.001$ , véase la Figura 24) los individuos que fueron criados por madre HY independientemente de su grupo tuvieron una frecuencia de bostezo espontáneo significativamente mayor que los criados por madre SD (madre,  $F_{(1)} = 11.4$ ,  $P = 0.005$ , seguida de Tukey,  $q = 4.8$ ,  $P = 0.005$ , véase la Figura 24), no se obtuvo interacción (madre x hijo,  $F_{(1)} = 2.0$ ,  $P = 0.2$ ).

### **Conducta en la prueba de campo abierto**

El tiempo pasado en tigmotaxis fue significativamente mayor en los individuos SD que en los HY, (hijo,  $F_{(1)} = 15.3$ ,  $P < 0.001$ , seguida de Tukey,  $q = 5.5$ ,  $P = 0.002$ ) no se obtuvo diferencia significativa debida al tipo de madre ( $F_{(1)} = 0.8$ ,  $P = 0.4$ ) pero sí



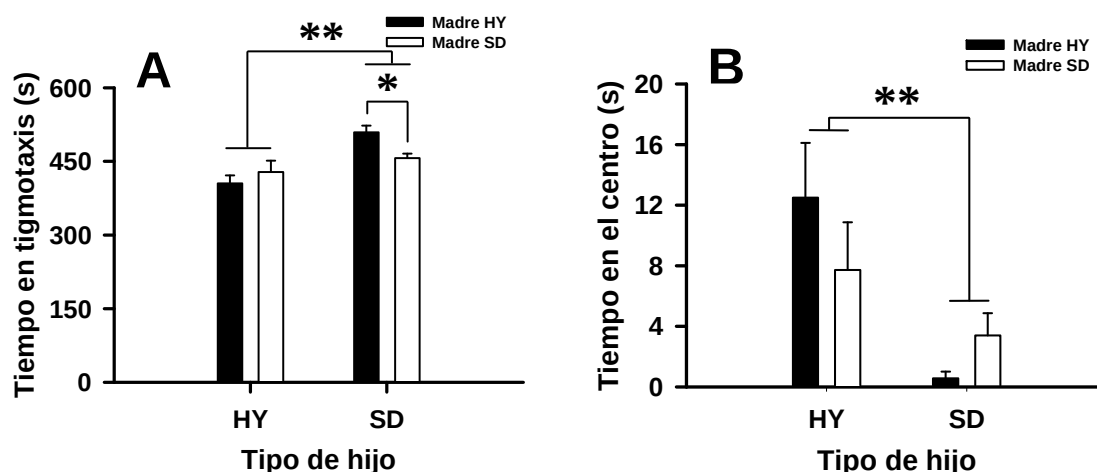


**Figura 24. Frecuencia de bostezo espontáneo de la descendencia de la adopción cruzada entre la sublínea HY y la cepa SD.** La frecuencia de bostezo espontáneo de los individuos HY fue significativamente mayor que la de los individuos SD independientemente de la madre que los crio ( $***P < 0.001$ ). La frecuencia de bostezo espontáneo de los individuos que fueron criados por madre HY fue significativamente mayor que la de los que fueron criados por madres SD ( $**P < 0.01$ ). Las barras son la media  $\pm$  el error estándar de la media.

una interacción, siendo significativamente mayor el tiempo en tigmotaxis de los hijos SD respecto de los HY cuando son cuidados por madre HY; y dentro de los hijos SD, los que fueron criados por madre HY pasaron más tiempo en tigmotaxis respecto de los que fueron cuidados por madre SD (madre x hijo,  $F_{(1)} = 5.0$ ,  $P < 0.05$ , seguida de Tukey, hijos cuidados por madre HY,  $q = 6.0$ ,  $P < 0.001$ , madre cuidando a hijos SD,  $q = 3.02$ ,  $P < 0.05$ , véase la Figura 25 A).

El tiempo pasado en el centro del campo abierto fue significativamente mayor en los individuos HY que en los SD (hijo,  $F_{(1)} = 9.2$ ,  $P = 0.009$ , seguida de Tukey,  $q = 4.3$ ,  $P = 0.009$ ) sin diferencia significativa debida al tipo de madre ni interacción (madre,  $F_{(1)} = 0.1$ ,  $P = 0.7$ , madre x hijo,  $F_{(1)} = 2.0$ ,  $P = 0.2$ , véase la Figura 25 B). Correspondientemente, el porcentaje de visitas al centro fue significativamente mayor por parte de los individuos HY independientemente de la madre que los

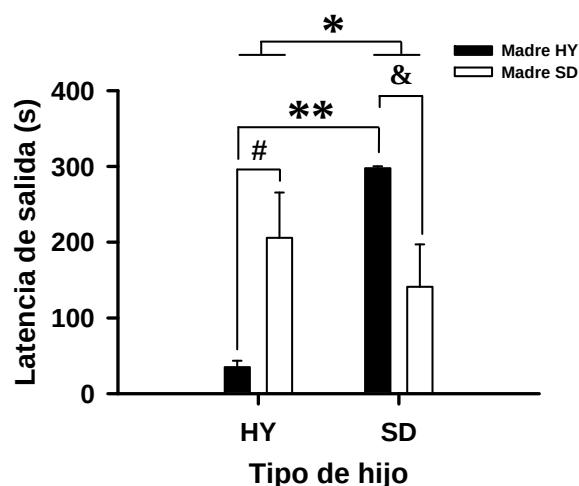
cuidó (hijo,  $F_{(1)} = 15.5$ ,  $P < 0.001$ , seguida de Tukey,  $q = 5.6$ ,  $P < 0.001$ ) sin que se obtuvieran diferencias significativas debidas a la madre ni interacción (madre,  $F_{(1)} = 0.0009$ ,  $P = 0.98$ , madre x hijo,  $F_{(1)} = 1.7$ ,  $P = 0.2$ ).



**Figura 25. Tigmotaxis en el campo abierto de la descendencia de la adopción cruzada entre la sublínea HY y la cepa SD. A)** El tiempo pasado por la sublínea HY en tigmotaxis del campo abierto fue significativamente menor que el de la sublínea SD (\*\* $P < 0.01$ ). Los individuos de la cepa SD que fueron criados por una madre HY pasaron significativamente más tiempo en tigmotaxis que los que fueron cuidados por una madre SD (\* $P < 0.05$ ). **B)** El tiempo pasado en el centro fue significativamente mayor en la sublínea HY respecto la SD (\*\* $P < 0.01$ ). Las barras son la media  $\pm$  el error estándar de la media.

La latencia para abandonar la caja de salida en la prueba de campo abierto fue significativamente mayor en los individuos SD que los HY (hijo,  $F_{(1)} = 5.1$ ,  $P = 0.04$ , seguida de Tukey,  $q = 3.2$ ,  $P = 0.04$ ) sin diferencias significativas debidas al factor madre ( $F_{(1)} = 0.03$ ,  $P = 0.9$ ) pero sí se obtuvo una interacción: dentro de las madres HY, los hijos SD tuvieron significativamente una mayor latencia que los HY; y dentro de los individuos SD, aquellos que fueron criados por madre HY tuvieron una latencia de salida significativamente mayor que los que fueron criados por

madres SD. Los hijos HY que fueron criados por madre SD tuvieron una significativamente mayor latencia de salida que los que fueron criados por madre HY (madre x hijo,  $F_{(1)} = 13.9$ ,  $P = 0.003$ , seguida de Tukey, hijos cuidados por madre HY,  $q = 5.8$ ,  $P < 0.001$ , madre cuidando a hijos SD,  $q = 3.5$ ,  $P = 0.03$ , madre cuidando a hijos HY,  $q = 4.0$ ,  $P = 0.02$ , véase la Figura 26).



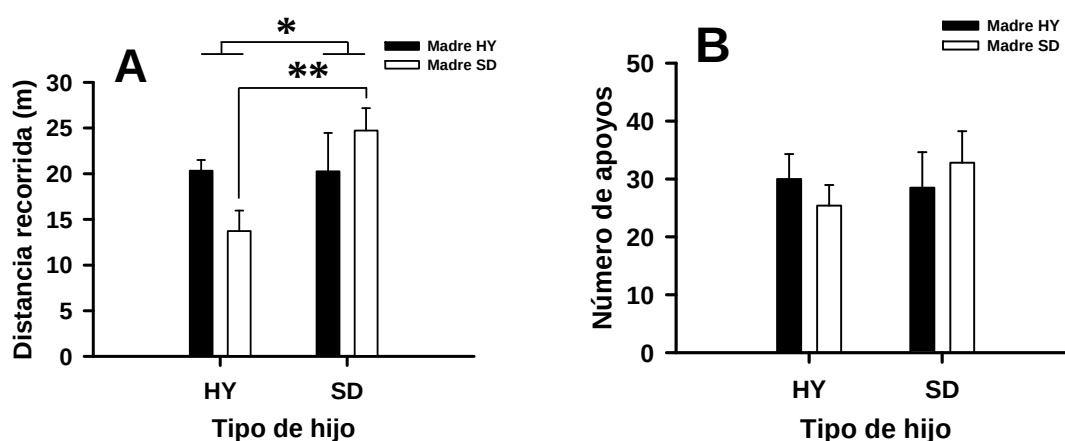
**Figura 26. Latencia de salida de la caja de inicio del campo abierto de la descendencia de la adopción cruzada entre la sublínea HY y la cepa SD.** Los individuos HY tardan menos en ingresar al campo abierto respecto los SD (\* $P < 0.05$ ). Dentro de los individuos cuidados por las madres HY, los sujetos HY tuvieron una latencia de salida significativamente menor respecto de los SD (\*\* $P < 0.01$ ). Dentro de los individuos SD los que fueron criados por una madre HY tuvieron una latencia de salida significativamente mayor que los criados por una madre SD (& $P < 0.05$ ). Dentro de los individuos HY, los que fueron criados por una madre SD tuvieron una latencia de salida significativamente mayor los que lo fueron criados por una madre HY (# $P < 0.05$ ). Las barras son la media  $\pm$  el error estándar de la media.

La distancia recorrida dentro del campo abierto fue significativamente menor en los individuos HY (hijo,  $F_{(1)} = 4.6$ ,  $P < 0.05$ , seguida de Tukey,  $q = 3.02$ ,  $P < 0.05$ ) no se obtuvo diferencia significativa debida al tipo de madre que los crio (madre,  $F_{(1)} = 0.2$ ,  $P = 0.7$ ) pero sí interacción, dentro de la madre SD los hijos HY deambularon significativamente menos que los SD y se obtuvo una tendencia a que los hijos HY tuvieran menor deambulación cuando fueron cuidados por una madre SD (madre x

hijo,  $F_{(1)} = 4.7$ ,  $P < 0.05$ , seguida de Tukey, hijos cuidados por madre SD,  $q = 4.4$ ,  $P = 0.008$ , madre cuidando a hijos HY  $q = 2.7$ ,  $P = 0.08$ , véase la Figura 27 A).

El número de apoyos no difirió entre los grupos experimentales (madre,  $F_{(1)} = 0.0009$ ,  $P = 0.98$ , hijo,  $F_{(1)} = 0.4$ ,  $P = 0.6$ , madre x hijo  $F_{(1)} = 0.8$ ,  $P = 0.4$ ).

No se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos experimentales debidas al número de erguidos (madre,  $F_{(1)} = 0.03$ ,  $P = 0.9$ ; hijo,  $F_{(1)} = 1.0$ ,  $P = 0.3$ ; madre x hijo,  $F_{(1)} = 1.8$ ,  $P = 0.2$ , véase la Figura 27 B).



**Figura 27. Locomoción dentro del campo abierto de la descendencia de la adopción cruzada entre la sublínea HY y la cepa SD. A)** La distancia recorrida fue significativamente menor por parte de los individuos HY independientemente de la madre que los cuidó ( $*P < 0.05$ ). Dentro de los individuos que fueron cuidados por madre SD, los HY recorrieron una significativamente menor distancia que los SD ( $**P < 0.01$ ). **B)** No se obtuvo diferencia significativa entre los grupos experimentales en cuanto al número de apoyos realizados. Las barras son la media  $\pm$  el error estándar de la media.

## Conducta en la prueba de caja luz-oscuridad

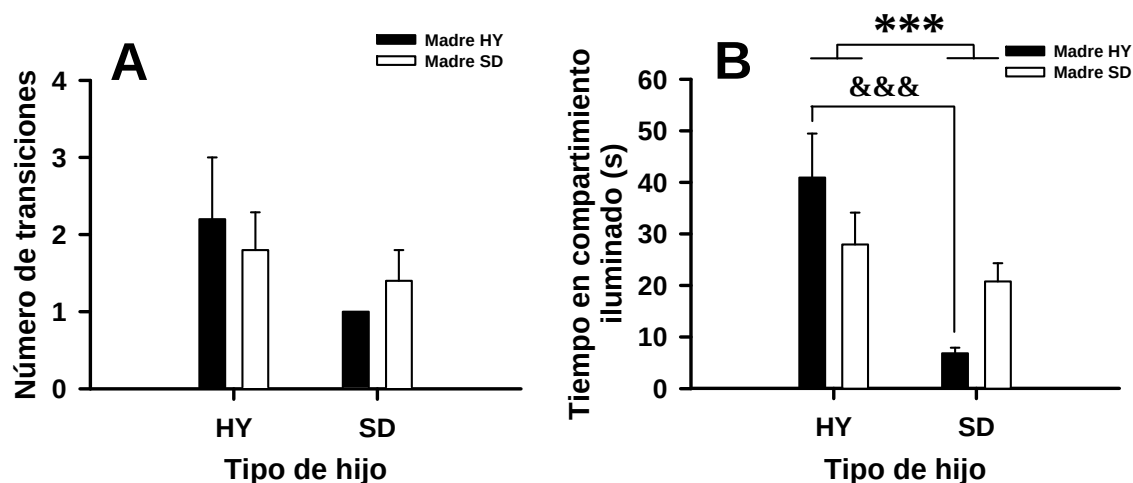
En la prueba de caja luz-oscuridad los individuos HY pasaron significativamente más tiempo en el compartimento iluminado que los individuos SD

independientemente del tipo de madre que los crio (madre,  $F_{(1)} = 0.007$ ,  $P = 0.9$ ; hijo,  $F_{(1)} = 13.7$ ,  $P = 0.002$ , seguida de Tukey,  $q = 25.2$ ,  $P = 0.002$ , véase la Figura 28 A). Se obtuvo una interacción que indica que solamente dentro los individuos criados por madre HY, los hijos HY pasaron significativamente más tiempo en el compartimento iluminado que los SD en tanto que en los individuos criados por madre SD no hay diferencia significativa (madre x hijo,  $F_{(1)} = 5.8$ ,  $P = 0.03$ , seguida de Tukey, hijos cuidados por madre HY,  $q = 26.1$ ,  $P < 0.001$ , véase la Figura 28 A). También se obtuvo una tendencia a que dentro de los individuos SD, los que fueron criados por madres HY pasaran menos tiempo en el compartimento iluminado que los que fueron criados por madre SD ( $F_{(1)} = 5.8$ ,  $P = 0.03$ , seguida de Tukey, madre cuidando a hijos SD,  $q = 22.5$ ,  $P = 0.096$ , véase la Figura 28 A) El número de transiciones entre el compartimento iluminado y el oscuro no fue diferente entre los grupos experimentales (madre,  $F_{(1)} = 0.009$ ,  $P = 0.9$ ; hijo,  $F_{(1)} = 1.9$ ,  $P = 0.2$ ; madre x hijo,  $F_{(1)} = 0.7$ ,  $P = 0.4$ , véase la Figura 28 B).

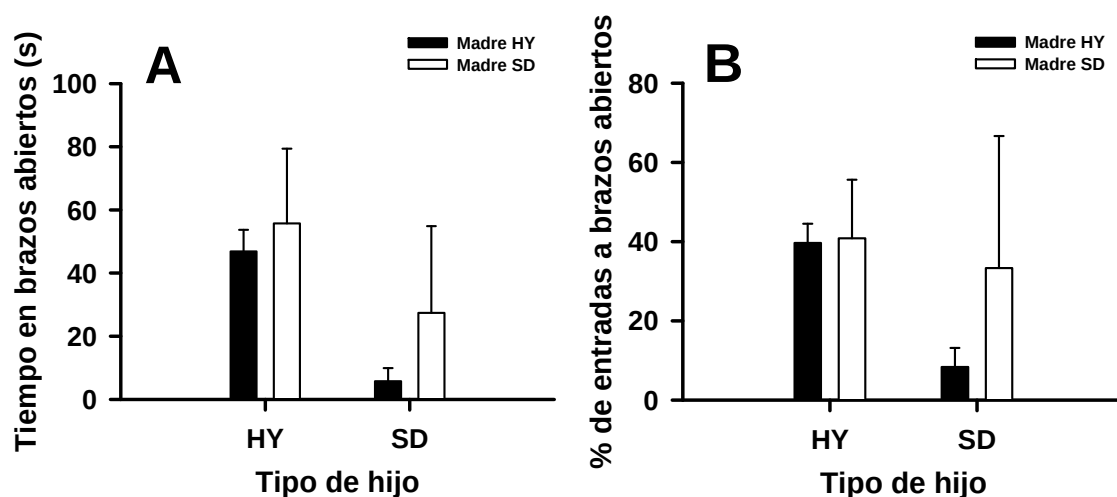
### **Conducta en la prueba del laberinto en cruz elevado**

En la prueba del laberinto en cruz elevado se obtuvo una tendencia de los individuos HY a pasar más tiempo en los brazos abiertos (madre,  $F_{(1)} = 0.7$ ,  $P = 0.4$ ; hijo,  $F_{(1)} = 3.8$ ,  $P = 0.07$ ; madre x hijo,  $F_{(1)} = 0.1$ ,  $P = 0.7$ , véase la Figura 29 A). El porcentaje de entradas a brazos abiertos no difirió entre los grupos experimentales (madre,  $F_{(1)} = 0.8$ ,  $P = 0.4$ ; hijo,  $F_{(1)} = 1.7$ ,  $P = 0.2$ , madres X hijo,  $F_{(1)} = 0.6$ ,  $P = 0.4$ , véase la Figura 29 B). El número de asomos fue significativamente mayor en los individuos HY que en los SD (hijo,  $F_{(1)} = 6.6$ ,  $P = 0.03$ , seguida de Tukey,  $q = 3.6$ ,  $P = 0.03$ ) no se obtuvieron diferencias significativas debidas al tipo de madre que los

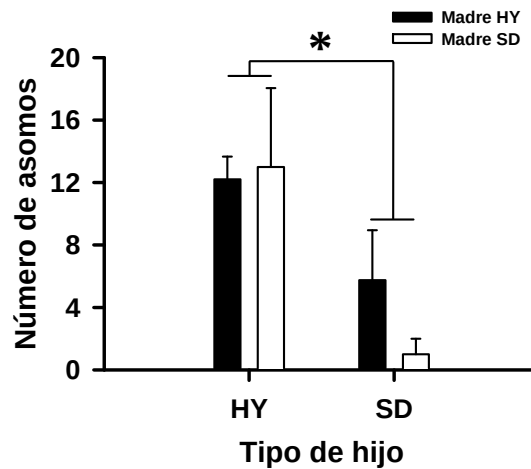
crio ni interacción (madre,  $F_{(1)} = 0.3$ ,  $P = 0.6$ , madre x hijo,  $F_{(1)} = 0.6$ ,  $P = 0.5$ , véase la Figura 30).



**Figura 28. Desempeño en caja luz-oscuridad de los individuos producto de la adopción cruzada entre la sublínea HY y la cepa SD.** A) El número de transiciones entre el compartimento iluminado y el oscuro no fue significativamente diferente entre los grupos experimentales. B) Los individuos HY, independientemente de la madre que los crio pasaron significativamente más tiempo en el compartimento iluminado ( $***P < 0.001$ ). Dentro de los individuos criados por madre HY, los de la cepa SD pasaron significativamente menos tiempo en el compartimento iluminado ( $\&\&\&P < 0.001$ ). Las barras son la media  $\pm$  el error estándar de la media.



**Figura 29. Conducta en laberinto en cruz elevado de los individuos producto de adopción cruzada entre la sublínea HY y la cepa SD.** A) En el tiempo pasado en brazos abiertos no se obtuvo diferencia significativa entre los grupos experimentales, sin embargo se obtuvo una tendencia a que los individuos HY, independientemente del tipo de madre adoptiva, pasen más tiempo en los brazos abiertos ( $P = 0.07$ ). B) En el porcentaje de entradas a brazos abiertos no se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos experimentales. Las barras son la media  $\pm$  el error estándar de la media.

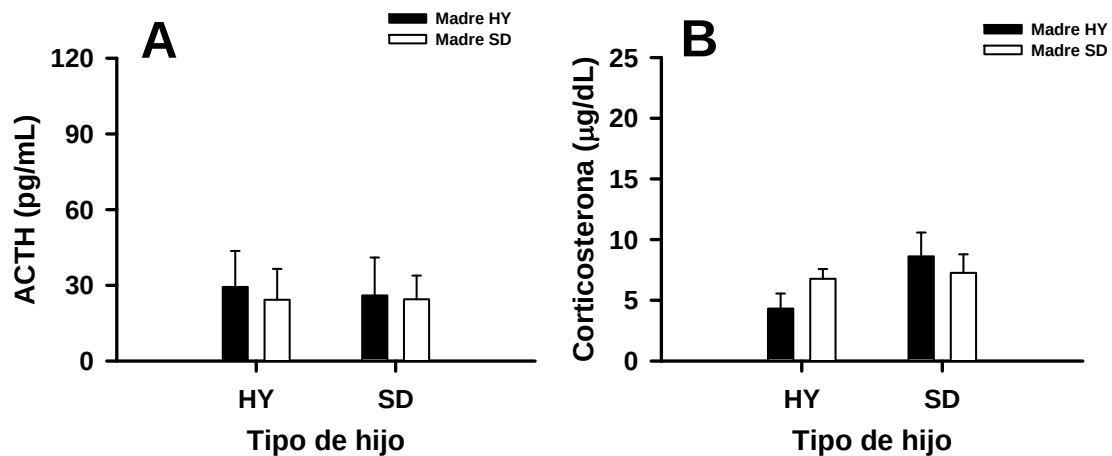


**Figura 30. Número de asomos realizados durante la prueba del laberinto en cruz elevado de los individuos producto de intercambio de camadas entre la sublínea HY y la cepa SD.** El número de asomos realizados por los individuos HY fue significativamente mayor que los realizados por los SD, independientemente del tipo de madre adoptiva (\* $P < 0.05$ ). Las barras son la media  $\pm$  el error estándar de la media.

### **Concentraciones plasmáticas de las hormona ACTH y de corticosterona previos y posteriores a las pruebas conductuales.**

La concentración plasmática basal de ACTH, es decir, de los individuos que fueron sacrificados sin previas pruebas no difirió significativamente entre los grupos experimentales (hijo,  $F_{(1)} = 0.02$ ,  $P = 0.9$ ; madre,  $F_{(1)} = 0.07$ ,  $P = 0.8$ ; hijo X madre,  $F_{(1)} = 0.02$ ,  $P = 0.9$ , véase la Figura 31 A). La concentración plasmática de corticosterona basal no difirió significativamente entre los grupos experimentales (hijo,  $F_{(1)} = 2.8$ ,  $P = 0.1$ ; madre,  $F_{(1)} = 0.1$ ,  $P = 0.7$ ; hijo X madre,  $F_{(1)} = 1.8$ ,  $P = 0.2$ , véase la Figura 31 B).

Posterior a la prueba de campo abierto no se obtuvieron diferencias significativas en la concentración plasmática de ACTH (madre,  $F_{(1)} = 0.8$ ,  $P = 0.4$ ; hijo,  $F_{(1)} = 0.1$ ,  $P = 0.8$ ; madre x hijo,  $F_{(1)} = 0.3$ ,  $P = 0.6$ , véase la Figura 32 A). La concentración de corticosterona después de la prueba de campo abierto, fue significativamente menor en los individuos HY independientemente del tipo de madre que los cuidó

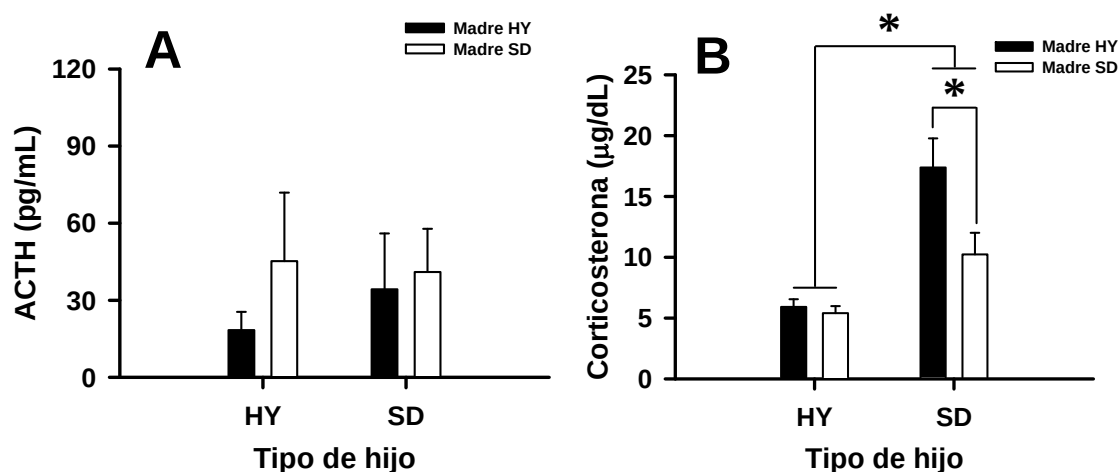


**Figura 31. Niveles basales, sin previas maniobras, de las hormonas ACTH y corticosterona de los individuos producto de la adopción cruzada entre la sublínea HY y la cepa SD. A)** La concentración plasmática de ACTH no difirió significativamente entre los grupos experimentales. **B)** La concentración plasmática basal de corticosterona no difirió significativamente entre los grupos experimentales. Las barras son la media  $\pm$  el error estándar de la media.

(hijo,  $F_{(1)} = 36.8$ ,  $P < 0.001$ , seguido de Tukey,  $q = 8.6$ ,  $P < 0.001$  véase la Figura 32 B). Los individuos cuidados por madre HY tuvieron una concentración plasmática de corticosterona significativamente mayor, independientemente de su grupo (madre,  $F_{(1)} = 8.1$ ,  $P = 0.02$ , seguida de Tukey,  $q = 4.0$ ,  $P = 0.02$ , véase la Figura 32 B). Dentro de los individuos SD, aquellos que fueron criados por una madre HY tuvieron una concentración plasmática de corticosterona 70% mayor significativamente que los criados por madre SD, después de la prueba de campo abierto (madre x hijo,  $F_{(1)} = 6.1$ ,  $P = 0.03$ , seguida de Tukey, madre cuidando a hijos SD,  $q = 5.0$ ,  $P = 0.004$ , véase la Figura 32 B).

La concentración plasmática de ACTH no difirió significativamente entre los grupos experimentales después de la prueba de caja luz-oscuridad, sin embargo se obtuvo una tendencia a que los individuos SD tuvieran una mayor concentración de ACTH que los HY ( $F_{(1)} = 3.9$ ,  $P = 0.07$ , véase la Figura 33 A) y a que los indivi-

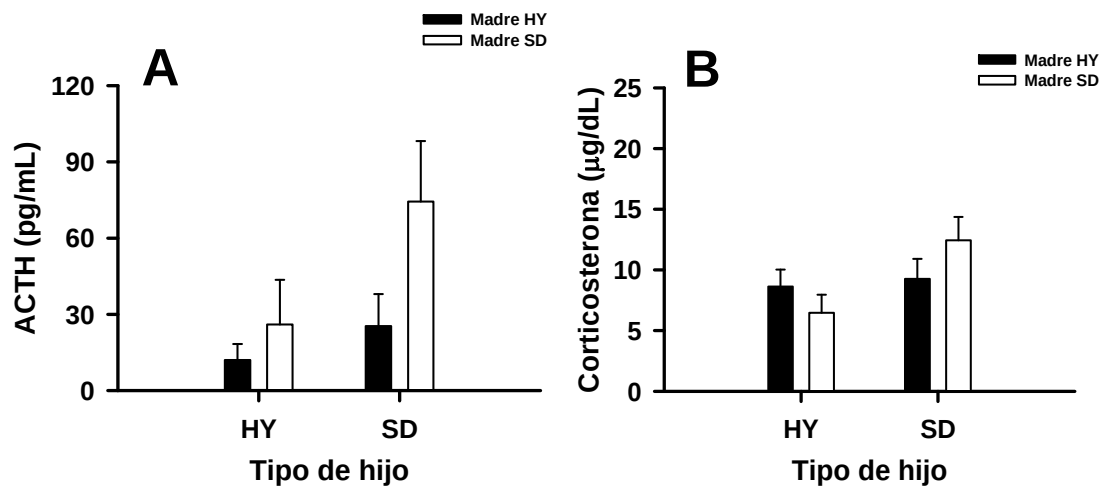




**Figura 32. Niveles plasmáticos de las hormonas ACTH y corticosterona posteriores a la prueba de campo abierto en la descendencia del intercambio de camadas entre la sublínea HY y la cepa SD. A)** La concentración plasmática de ACTH no difirió significativamente entre los grupos. **B)** La concentración plasmática de corticosterona fue significativamente menor en la sublínea HY respecto de la SD (\* $P < 0.05$ ). Dentro de los individuos SD, aquellos que fueron criados por madre HY tuvieron niveles significativamente mayores de corticosterona respecto de los criados por madre SD (\* $P < 0.05$ ). Las barras son la media  $\pm$  el error estándar de la media.

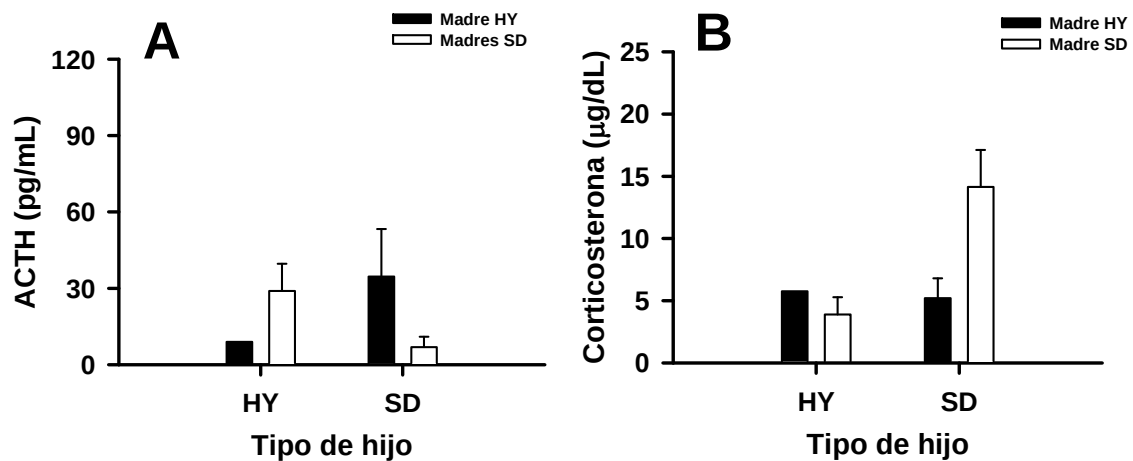
duos cuidados por madre SD tuvieron una mayor concentración de ACTH que los cuidados por madre HY ( $F_{(1)} = 4.0$ ,  $P = 0.06$ , véase la Figura 33 A). Después de la prueba de caja luz-oscuridad la concentración plasmática de corticosterona no difirió entre los grupos experimentales (madre,  $F_{(1)} = 0.1$ ,  $P = 0.8$ ; hijo X madre  $F_{(1)} = 2.8$ ,  $P = 0.1$  véase la Figura 33 B) aunque se obtuvo una tendencia a que en la descendencia de HY sea menor independientemente de la madre que los crio (hijo,  $F_{(1)} = 4.3$ ,  $P = 0.06$ , véase la Figura 33 B).

Posterior a la prueba del laberinto en cruz elevado no se obtuvieron diferencias significativas en la concentración plasmática de ACTH (hijo,  $F_{(1)} = 0.01$ ,  $P = 0.9$ ; madre,  $F_{(1)} = 0.06$ ; hijo X madre  $F_{(1)} = 2.2$ ,  $P = 0.2$ , véase la Figura 34 A) y en la concentración plasmática de corticosterona se obtuvo una tendencia a que dentro



**Figura 33. Niveles plasmáticos de ACTH y corticosterona posteriores a la prueba de caja luz-oscuridad de los descendientes de la adopción cruzada entre la sublínea HY y la cepa SD. A)** Se obtuvo una tendencia a que los individuos HY tuvieran una menor concentración de la hormona ACTH, independientemente de la madre que los crio ( $P= 0.07$ ) y de igual forma una tendencia a que los individuos cuidados por madres HY tuvieran una menor concentración de ACTH independientemente del grupo de procedencia ( $P= 0.06$ ). **B)** Se obtuvo una tendencia a que los individuos HY tuvieran una menor concentración de corticosterona respecto de los SD independientemente de la madre que los cuido ( $P= 0.06$ ). Las barras son la media  $\pm$  el error estándar de la media.

de los individuos SD aquellos que fueron criados por madre SD tuvieran el doble de los niveles de corticosterona respecto de los criados por madre HY (hijo,  $F_{(1)}= 3.7$ ,  $P= 0.09$ ; madre,  $F_{(1)}= 2.0$ ,  $P= 0.2$ ; hijo X madre  $F_{(1)}= 4.7$ ,  $P= 0.06$ , véase la Figura 34 B).



**Figura 34. Niveles plasmáticos de ACTH y corticosterona posteriores a la prueba del laberinto en cruz elevado de la descendencia de adopción cruzada entre la sublínea HY y la cepa SD. A)** No se obtuvo diferencia significativa entre los grupos experimentales, en cuanto a la concentración plasmática de la hormona ACTH. **B)** Se obtuvo una tendencia que dentro de los individuos SD a que los que fueron cuidados por madre HY presenten menor concentración de corticosterona ( $P=0.06$ ). Las barras son la media  $\pm$  el error estándar de la media.

## Discusión del Experimento 4

La frecuencia de bostezo espontáneo fue afectada tanto por el genotipo como por el tipo de cuidado materno tanto en las ratas HY como en las SD (véase la Figura 24). En los sujetos de la cepa SD, el cuidado materno de HY incrementó el bostezo en un 66% respecto del cuidado materno de SD y en la sublínea HY el bostezo se incrementó un 55% en las crías cuidadas por madre HY respecto de las cuidadas por madre SD. Por otro lado, la frecuencia de bostezo promedio de los sujetos HY independientemente de la madre que los crio fue 17.1 bostezos por hora y la de los sujetos de la cepa SD fue de tan sólo 6.3 bostezos por hora (véase la Figura 24) la diferencia entre los hijos HY y SD fue significativa lo que indica que a pesar de que el cuidado materno influye, el genotipo de las crías también fue un factor determinante para la expresión de esta conducta. Un

ejemplo de resultados parecidos son los obtenidos en la adopción cruzada de ratones C57BL/6J con ratones BALB/cJ en los primeros los niveles de conducta semejante a la ansiedad y liberación de corticosterona después de un estresor son mucho menores que en los BALB/cJ, después de la adopción cruzada disminuyen los niveles significativamente pero siguen manteniéndose diferencias significativas entre los grupos (Priebe y cols., 2005).

En la prueba de campo abierto la cepa SD estuvo mayor tiempo en tigmotaxis, menor tiempo en el centro y tuvo una mayor latencia de salida, respecto de la sublínea HY (véase la Figura 25 y 26). Estas tres variables están relacionadas con una mayor emocionalidad y con mayores niveles de conducta semejante a la ansiedad. Al parecer, genéticamente la cepa SD tiene mayor conducta semejante a la ansiedad respecto de la sublínea HY, a pesar de que las madres SD estimulan más a sus crías mediante el lamido ano-genital y corporal y el amamantamiento en cifosis (véase la Figura 22), lo cual disminuye las respuestas ante estresores en la etapa adulta. Esto nos lleva a suponer que la sublínea HY respecto de la cepa SD tiene genes de menores respuestas de estrés junto con cuidado materno de menor lamido ano-genital y corporal y amamantamiento en cifosis. Esto es semejante a lo que ocurre con la línea de alta ansiedad (HAB) respecto de la de baja ansiedad (LAB) ya que la línea HAB a pesar de presentar una mayor conducta semejante a la ansiedad su cuidado materno se describe como de mejor calidad puesto que dedica más tiempo a la construcción del nido, acarreo de las crías, mayor tiempo de amamantamiento en cifosis y pasa más tiempo cerca de sus crías (Wigger y cols., 2001).

La cepa SD presenta una mayor deambulación en la prueba de campo abierto (véase la Figura 27) lo que la hace menos emocional respecto a esta dimensión de la emocionalidad. Como se mencionó en la introducción, Ramos y Mormède (1997) realizaron un experimento en el correlacionaron distintas conductas que abarcan las respuestas de emocionalidad, mostrando que la deambulación y la tigmotaxis corresponden a dos ejes independientes de la emocionalidad. Esto quiere decir que aunque la deambulación se reduce y la tigmotaxis aumentan proporcionalmente con el grado de estrés, esto no significa que un animal que por su constitución genética presenta alta tigmotaxis, también necesariamente tenga que presentar baja deambulación. Lo anterior nos lleva a concluir que la sublínea HY es menos emocional respecto a la tigmotaxis pero más emocional que la SD respecto a la deambulación.

En la prueba de caja luz-oscuridad la cepa SD permaneció menos tiempo en el compartimento iluminado respecto a la sublínea HY (véase la Figura 28) lo que indica mayor nivel de emocionalidad y de conducta semejante a la ansiedad por parte de la cepa SD al igual que lo visto en la variable tigmotaxis. De acuerdo con Ramos y Mormède (1997), el tiempo en el compartimento iluminado en la prueba de caja luz-oscuridad representa la misma dimensión de emocionalidad que el tiempo pasado en tigmotaxis en el campo abierto por lo que este resultado reforzaría el obtenido en la prueba de campo abierto. Adicionalmente, en la prueba de laberinto en cruz elevado se observa un mayor número de asomos por parte de la sublínea HY respecto SD lo que indica también una menor emocionalidad de

HY, puesto que estos asomos representan una mayor actividad exploratoria en el sitio más aversivo del aparato, que son los brazos abiertos.

En el presente experimento fue muy claro el efecto del tipo de cuidado materno en la emocionalidad de la cepa SD. En la prueba de campo abierto, los individuos de la cepa SD criados por una madre HY presentan mayor nivel de emocionalidad respecto de los SD criados por una madre SD, dado que permanecieron significativamente más tiempo en tigmotaxis (véase la Figura 25). Esto se ve reforzado por una mayor latencia de salida de los individuos de la cepa SD criados por madre HY respecto de los criados por madre SD (véase la Figura 26). En la misma dirección, existió una tendencia ( $P < 0.1$ ) a una mayor emocionalidad en la caja luz-oscuridad de los individuos SD criados por madre HY, respecto de los criados por madre SD, ya que los primeros pasaron menor cantidad de tiempo en el compartimento iluminado. Sin embargo no se ve un efecto de la madre SD en la conducta en pruebas de ansiedad de la sublínea HY respecto de la crianza de madre HY tal y como se obtuvo en la adopción cruzada entre LY y HY (Experimento 1), la madre LY hace menos emocional a la sublínea HY respecto del efecto de la madre HY. Resultados semejantes se han obtenido cuando se realizan intercambios de camadas entre ratones criados selectivamente por su alto y bajo consumo de alcohol, ya que a los ratones de la línea de alto consumo, la adopción cruzada les disminuye el consumo de alcohol en tanto que en la línea de bajo consumo no hay efecto (Barrenha y Chester, 2012). Cuando se realiza intercambio de camadas entre la cepa SD y las líneas Wistar-Kyoto (WKY) y la espontáneamente hipertensa (SHR): las crías SD que son adoptadas por madres

de cualquiera de estas dos líneas, presentan mayor comportamiento exploratorio respecto de los individuos de la cepa SD criados por madres SD, pero cuando las crías de las líneas WKY y SHR son adoptadas por madres SD no difieren en este aspecto respecto de las criadas por madres de sus respectivas líneas (Howells, y cols., 2009). Lo que nos permite inferir que la cepa SD es más sensible a este tipo de maniobras. En la línea Flinders sensible a colinérgicos (FSL) cambia su conducta cuando es criada por madres de la línea Flinders resistente a colinérgicos (FRL) disminuyendo el tiempo de inmovilidad en la prueba de nado forzado, un indicador de conducta semejante a la depresión. En tanto que las ratas de la línea FRL no aumentan en la duración en el tiempo de inmovilidad en la prueba de nado forzado cuando son criadas por madres de la línea FSL. Por lo se puede decir que la conducta semejante a la depresión tiene un componente materno solamente en las ratas FSL pero no así en las ratas FRL (Friedman y cols., 2006). En las líneas de ratas criadas selectivamente respecto a los extremos en su agresividad hacia los humanos, se realizó un experimento de adopción cruzada obteniéndose los siguiente: los machos de la línea agresiva criados por madres de la línea mansa incrementan su agresión poco pero significativamente, sin embargo los niveles de agresión de los machos de la línea mansa no cambian en dependencia de la madre adoptiva; las madres de la línea agresiva aumentaron dos veces los niveles de corticosterona postestrés en los machos de la línea mansa, pero las madres de la línea mansa no cambian la respuesta de corticosterona de los machos de la línea agresiva. (Plyusnina y cols., 2009). Este conjunto de ejemplos nos hablan de la variación que existe en los efectos del

cuidado materno y de cómo ocurren interacciones entre el genotipo y el ambiente temprano.

Los niveles basales de corticosterona no difirieron entre la sublínea HY y la cepa SD lo que indica que cuando no están sometidas a estresores no presentan diferencia significativa en sus niveles de corticosterona (véase la Figura 31) pues estos son regulados por las demandas metabólicas que varían circadianamente (Korf y von Gall, 2013). Después de la prueba de campo abierto, en correspondencia con la mayores respuestas conductuales semejantes a la ansiedad, la cepa SD mostró mayores niveles de la hormona corticosterona (véase la Figura 32) lo que muestra que este estresor está actuando en mayor medida en la cepa SD impactando tanto la conducta semejante a la ansiedad como la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal.

Ya que los menores niveles de corticosterona no muestran aparejados menores niveles de ACTH en la sublínea HY respecto de la cepa SD, entonces es posible inferir que las glándulas adrenales de la sublínea HY son menos sensibles a la ACTH respecto de la cepa SD, esta situación en otros trabajos ha sido relacionada con el estrés crónico (Giralt y cols., 1987; Ostrander y cols., 2006).

En la prueba de campo abierto, dentro de los individuos de la cepa SD se observó que aquellos que fueron criados por madre HY fueron más emocionales respecto de los que fueron criados por madre SD y que esto se correspondió con mayores niveles de corticosterona después de la prueba, por lo que se infiere que un mayor estrés psicológico provocó tanto un mayor nivel de conducta semejante a la



ansiedad como una mayor activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal. La mayor activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal junto con una mayor conducta semejante a la ansiedad ha sido correlacionada en distintos trabajos (Liu y cols., 1997; Landgraf y Wigger, 2002). Se ha propuesto que la causa de que se encuentren aparejadas las mayores respuestas fisiológicas con las conductuales ante estresores se debe a que ambas son reguladas por las mismas estructuras: hipocampo, amígdala y corteza prefrontal y que factores tales como el estrés crónico o el cuidado materno poco estimulante causan el desarrollo de los circuitos que prolongan y aumentan estos dos tipos de respuestas de estrés (Ulrich-Lai, 2009).

En conclusión, en la cepa SD la alta frecuencia de bostezo espontáneo se encuentra asociada a mayores respuestas de conducta semejante a la ansiedad en las pruebas de campo abierto (véase la Figura 25 y 26) y caja luz-oscuridad (véase la Figura 28) y a mayor liberación de corticosterona posterior a la prueba de campo abierto (véase la Figura 32).

## Discusión general

Nuestros experimentos muestran que la frecuencia de bostezo espontáneo es un rasgo que tiene un componente genético y otro epigenético. El genético está dado por al menos un par de alelos semidominantes, como se puede constatar en la frecuencia de bostezo espontáneo de los híbridos HY/LY y LY/HY (véase la Figura 15). En estos grupos, la frecuencia de bostezo espontáneo se encuentra en un rango intermedio entre la frecuencia de bostezo de ambas sublíneas. El gen semidominante debe de encontrarse dentro de los autosomas, puesto que de encontrarse en los cromosomas sexuales las frecuencias de bostezo de los híbridos habrían sido diferentes a lo hallado. De encontrarse en el cromosoma X o en el ADN mitocondrial, los híbridos hijos de madre HY presentarían idéntica frecuencia de bostezo a la de la sublínea HY; y híbridos de madre LY idéntica frecuencia de bostezo a la de la sublínea LY. De encontrarse en el cromosoma Y la frecuencia de bostezo de los híbridos de madre LY habría sido mayor que la de los de madre HY.

Cuando los individuos HY son cuidados por madres LY (véase la Figura 8) o por madres SD (véase la Figura 24) se observa que su frecuencia de bostezo espontáneo fue significativamente menor que los controles cuidados por madres adoptivas de la sublínea HY. Esto implica que para que el gen de alto bostezo se exprese completamente es necesario el ambiente de lactancia dado por la madre HY. Dado que las madres HY proporcionan menor cantidad de lamido ano-genital y corporal y amamantamiento en cifosis (véase la Figura 22), y que esta calidad de cuidado materno afecta las respuestas de estrés en ratas (Liu y cols., 1997),

entonces es factible que la mayor cantidad de lamido ano-genital y corporal y de amamantamiento en cifosis proporcionado por las madres LY (Ugarte y cols., 2011) y por las madres SD (véase la Figura 22) las cuales disminuyen las respuestas de estrés en HY y por lo tanto disminuyen los niveles de bostezo. La disminución de las respuestas conductuales de estrés debidas al cuidado materno en la sublínea HY fue mostrada cuando al ser cuidadas por madres LY disminuyeron su emocionalidad en variables importantes tales como la tigmotaxis y la distancia recorrida en la prueba de campo abierto alcanzando los niveles los individuos de la sublínea LY (véanse Figuras 9 y 10). Como se mencionó en la introducción, el grado de lamido ano-genital y corporal y amamantamiento en cifosis afectan el desarrollo hipocampal, ya que se sabe que una cantidad mayor de este tipo de estimulación aumenta el número de células y espinas dendríticas que se forman, así como el número de receptores a glucocorticoides en esta estructura (Weaver y cols., 2006). La relación entre el funcionamiento hipocampal y la frecuencia de bostezo consiste en que esta conducta se desencadena cuando las neuronas septohipocampales liberan acetilcolina en el hipocampo (Collins y Eguibar, 2010), por lo tanto, es posible que los cambios en el hipocampo causados por el tipo de cuidado materno, estén afectando la vía por la que se expresa el bostezo.

Si el ambiente de lactancia dado por la madre HY favorece la alta frecuencia de bostezo espontáneo, entonces se debería de ver que todos individuos que fueran cuidados por las madres de alto bostezo, presentaran una mayor frecuencia de bostezo espontáneo respecto de aquellos que siendo de las mismas características genéticas, fueran criados por una madre de la cepa SD o de la

sublínea LY, pero no fue el caso. Únicamente se vio una mayor frecuencia de bostezo espontáneo en los individuos SD que fueron criados por madre HY (véase la Figura 24) pero eso no ocurrió ni con los individuos de la sublínea LY (véase la Figura 8) ni con los híbridos entre HY y LY (véase la Figura 15). Esto significa que para que el cuidado materno influya en la frecuencia de bostezo espontáneo debe de haber una susceptibilidad genética que permita que los individuos que son criados por madre HY incrementen su frecuencia de bostezo espontáneo. Tal susceptibilidad parece existir sólo en los individuos de la cepa SD y de la sublínea HY pero no en los LY ni en los híbridos entre HY y LY. Esto nos lleva a pensar que entre el bagaje genético de la sublínea LY deben de existir genes que estén evitando que el cuidado materno proporcionado por HY aumente la frecuencia de bostezo espontáneo y además inferimos que estos genes deben de ser dominantes puesto que los híbridos no son susceptibles a incrementar su frecuencia de bostezo espontáneo ni sus respuestas de estrés por efecto del tipo de cuidado materno (véase la Tabla 2). Los genes que hacen resistente a la sublínea LY al incremento de su frecuencia de bostezo espontáneo provocada por los cuidados de la madre HY, también podrían estar actuando en el sistema de respuesta de estrés puesto que la sublínea LY no solamente permaneció con menor frecuencia de bostezo espontáneo sino que también mantuvo constantes la mayoría de sus respuestas conductuales de estrés al ser cuidados por una madre HY (véanse Figuras 9, 10, 11, 12 y 13). Proponemos que para explicar los resultados de nuestros experimentos existen en juego al menos tres tipos de pares de alelos con efectos distintos:

1.- Los que favorecen una mayor frecuencia de bostezo espontáneo. Estos fueron descritos por Urbá-Holmgren y cols., (1990) como semidominantes y en el presente trabajo mostramos que su expresión depende del cuidado materno.

2.- Los que determinan el patrón de cuidado materno de las madres HY. La existencia de estos alelos se mostró cuando Ugarte (2006) observó que a pesar de que las hembras HY fueran criadas por otro tipo de madres (como las LY y SD), éstas no diferían en el patrón de conducta materna. Nosotros mostramos que este patrón de cuidado materno determina también las respuestas de estrés de la descendencia, al parecer estos alelos fueron seleccionados por incrementar la frecuencia de bostezo.

3.- Los que dan a los individuos que los portan resistencia al tipo de cuidado materno que proporciona la madre HY. Estos alelos se encuentran en la sublínea LY pero no en la sublínea HY ni son la norma en la cepa Sprague-Dawley. Mostramos que a pesar de recibir un cuidado que incrementa la frecuencia de bostezo espontáneo y respuestas de estrés, estas respuestas no se alteran en LY respecto de los cuidados por madres LY. Este tipo de alelos deben tener un patrón de herencia dominante puesto que los híbridos mostraron niveles iguales en respuestas conductuales de estrés a los de LY.

Este último tipo de genes no es inesperado, puesto que la sublínea LY fue obtenida por selección por su baja frecuencia de bostezo espontáneo (Urbá-Holmgren y cols., 1993) y por lo tanto, a lo largo de su historia evolutiva, se debieron seleccionar genes que dieron a sus portadores resistencia a una madre tipo HY que provoca que en sus hijos se incremente la frecuencia de bostezo espontáneo. Dado que se observó la capacidad de las crías HY para modificar la

conducta materna tanto de SD como de HY (véase la Figura 23) cabría preguntarse de qué manera contribuye esta conducta alterada de la madre a las respuestas de estrés de su descendencia.

Los hallazgos más relevantes de nuestro trabajo son los efectos del cuidado materno de la sublínea HY en la cepa SD:

- Primero, porque son una prueba más de la asociación causa-efecto del estrés en la frecuencia de bostezo. Un cuidado materno asociado con modificaciones en las vías de respuesta de estrés aumentó la frecuencia de bostezo junto mayores respuestas de conducta semejante a la ansiedad y mayor activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal posterior al estrés causado por un ambiente novedoso, un estresor psicológico. Esto sitúa a la frecuencia de bostezo como un indicador de la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal que vale la pena explorar puesto que esta conducta se puede evaluar repetidas veces sin la necesidad de dispositivos costosos. Hasta ahora la frecuencia de bostezo espontáneo de las ratas de la cepa SD ha sido utilizada como un indicador de respuestas farmacológicas relacionadas con la estimulación de los receptores dopaminérgicos de la familia D2 (Collins y Eguibar, 2010) o bien se estudia la frecuencia de bostezo para entender la fisiología y etología de esta conducta pero ahora mostramos que puede ser utilizada con otra finalidad, es decir evaluar los efectos del cuidado materno en el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal.
- Segundo, el uso de este modelo de cuidado materno con menor cantidad de lamido ano-genital y corporal y amamantamiento en cifosis, permite

realizar menor número de observaciones conductuales previas a los experimentos. En el modelo tradicional se observa a las madres lactantes en los días 6 a 8 de lactancia cinco veces al día, con duración de 72 minutos cada observación. De todas las hembras observadas se conserva únicamente a aquellas que se encuentran una desviación estándar por encima de la media y una desviación estándar por debajo de la media de la cantidad de lamido ano-genital y corporal y amamantamiento en cifosis y se excluye a todas las hembras que no se encuentran en los extremos, las cuales son el 60% de las observadas y sólo el restante 40% que se localizan en los extremos de la curva normal son utilizadas para conocer los efectos de estas conductas (Liu y cols., 1997; Champagne y cols., 2003; Barha, y cols., 2007; Masís-Calvo y cols., 2013; Sequeira-Cordero y cols., 2013). En nuestro modelo contamos con un grupo completo sin necesidad de realizar preselección: las hembras de la sublínea HY. Las cuales pueden ser utilizadas como las madres que proporcionen baja cantidad de lamido ano-genital y corporal y amamantamiento en cifosis y como contraparte las hembras de la cepa de referencia SD. El modelo de observación materna empleado únicamente requiere observación de la conducta materna durante 30 minutos al día. Esta observación solo se realizará en caso de que se desee constatar o correlacionar los niveles de las conductas arriba mencionadas.

## Conclusiones

- 1.- El patrón de conducta materna de la sublínea HY influye para elevar la frecuencia de bostezo espontáneo, tanto en la sublínea HY como en la cepa Sprague-Dawley.
- 2.- La elevada frecuencia de bostezo espontáneo de la sublínea HY cuenta con un componente genético independiente del tipo de cuidado materno recibido.
- 3.- En la sublínea LY no se afecta la frecuencia de bostezo espontáneo ni las respuestas ante las pruebas de conducta semejante a la ansiedad cuando reciben el cuidado materno de la sublínea HY.
- 4.- En los híbridos la frecuencia de bostezo espontáneo es la intermedia entre las sublíneas y en las respuestas de estrés, los híbridos muestran niveles equivalentes a LY.
- 5.- El cuidado materno de la sublínea HY causó en la cepa SD elevada frecuencia de bostezo espontáneo, junto con mayores respuestas conductuales y fisiológicas ante estresores.
- 6.- El cuidado materno de SD afecta la frecuencia de bostezo espontáneo de HY sin afectar sus respuestas al conductuales y hormonales ante estresores.
- 7.- El patrón de conducta materna de la sublínea HY se debe tanto a las conductas que vienen determinadas genéticamente por la madre como a los estímulos que proporcionan las crías.
- 8.- Las madres SD que cuidaron a las crías HY muestran un diferente patrón de conducta materna que las que cuidaron a las crías SD.



## Perspectivas

- 1.- Conocer cuáles son los aspectos de la conducta de las crías HY o la clase de estímulos que están proporcionando a la madre para alterar de esa manera la conducta, pueden ser estímulos ultrasónicos, o pueden tener que ven con el olor o con los patrones de movimiento y estímulos térmicos.
- 2.- Alterar en grado variable la conducta de las madres colocándoles distintas cantidades de hijos HY en una camada, para ver cómo se afecta la conducta materna y ver como esta variable impacta a las crías. La predicción es que a medida que aumente el número de crías HY en una camada se alterará progresivamente la conducta de la madre y esto impactará en la frecuencia de bostezo espontáneo y las respuestas de estrés de la descendencia.
- 3.- Alterar la conducta de las madres SD mediante el estrés crónico prenatal y la privación materna con la finalidad de disminuir la calidad del cuidado materno y analizar el efecto en los hijos especialmente en la conducta de bostezo la cual no ha sido aún explorado.
- 4.- Conocer los cambios hipocampales que causa en las crías el patrón de cuidado materno de la sublínea HY.
- 5.- Evaluar las respuestas a fármacos ansiolíticos, ansiogénicos y antidepresivos en la descendencia SD cuidada por madres de la sublínea HY para validarlo como un modelo de maltrato infantil.
- 6.- Realizar hibridación entre la sublínea HY y la cepa Sprague Dawley, esperando que en este caso sí existan diferencias entre los híbridos dado que la SD sí han mostrado susceptibilidad al patrón de conducta expresado por las madres HY.

## Referencias

Ahmadiyeh N., Slone-Wilcoxon J.L., Takahashi J.S., & Redei E.E. (2004) Maternal behavior modulates X-linked inheritance of behavioral coping in the defensive burying test. *Biological Psychiatry*, 55, 1069-74.

Anías-Calderón, J., Verdugo-Díaz, L., & Drucker-Colín, R. (2004). Adrenalectomy and dexamethasone replacement on yawning behavior. *Behavioural Brain Research*, 154, 255-259.

Bailoo, J. D. (2011). A re-evaluation of the effects of maternal care on offspring behavioral development. Doctoral dissertation, University of North Carolina at Greensboro. pp. 205.

Barajas M. (2002) Conducta maternal y respuesta al estrés de ratas criadas por madres de alto y bajo bostezo. Tesis de Maestría en Ciencias Fisiológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. pp. 139.

Barbizet, J. (1958). Yawning. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 21, 203.

Barha, C. K., Pawluski, J. L., & Galea, L. A. (2007). Maternal care affects male and female offspring working memory and stress reactivity. *Physiology & Behavior*, 92, 939-950.

Barrenha, G. D., & Chester, J. A. (2012). Effects of cross-fostering on alcohol preference and correlated responses to selection in High-and Low-Alcohol-preferring mice. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 36, 2065-2073.

Barrett, J., & Fleming, A. S. (2011). Annual research review: all mothers are not created equal: neural and psychobiological perspectives on mothering and the importance of individual differences. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, 52, 368-397.

Bartha, C. K., Pawluski, J. L., & Galea, L. A. (2007). Maternal care affects male and female offspring working memory and stress reactivity. *Physiology & Behavior*, 92(5), 939-950.

Bourin, M., & Hascoët, M. (2003). The mouse light/dark box test. *European Journal of Pharmacology*, 463, 55-65.

Bruell, J.H. (1962). Dominance and segregation in the inheritance of quantitative behavior in mice. En E.L. Bliss (Ed.), Harper and Brothers, *Roots of Behavior*, pp. 48-67.

Buhl E. S., Neschen S., Yonemitsu S., Rossbacher J., Zhang D., Morino K., Flyvbjerg A., Perret P., Samuel V., Kim J., Cline G. W. & Petersen K. F. (2007) Increased hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity and hepatic insulin resistance in low-birth-weight rats. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, 293, 1451-1458.

Caldji, C., Tannenbaum, B., Sharma, S., Francis, D., Plotsky, P. M., & Meaney, M. J. (1998). Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 95, 5335-5340.

Champagne, F. A., Francis, D. D., Mar, A., & Meaney, M. J. (2003). Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. *Physiology & Behavior*, 79, 359-371.

Chorpita, B. F., & Barlow, D. H. (1998). The development of anxiety: the role of control in the early environment. *Psychological Bulletin*, 124, 3.

Chrousos G. P. (2009) Stress and disorders of the stress system. *Nature Reviews. Endocrinology*, 5, 374-381.

Cierpial M. A., Murphy C. A., & McCarty R. (1990) Maternal behavior of spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto normotensive rats: effects of reciprocal cross-fostering of litters. *Behavioral and Neural Biology*, 54, 90-96.

Clinton, S. M., Bedrosian, T. A., Abraham, A. D., Watson, S. J., & Akil, H. (2010). Neural and environmental factors impacting maternal behavior differences in high-versus low-novelty-seeking rats. *Hormones and Behavior*, 57, 463-473.

Collins, G.T., Eguibar, J.R. (2010) Neuropharmacology of Yawning. En Walusinski, O. (2010). The mystery of yawning in physiology and disease. Editor Olivier Walusinski. Frontiers of Neurology and Neuroscience. *Basel, Karger*, 2010, 28, pp 90–106.

Curtis H., & Barnes N. (1989) Animal behavior and it's evolution. En: Biology, 5a Edition. *New York, Worth Publishers*. pp. 1052-1053.

Díaz-Romero, M., Arias-Montaña, J. A., Eguibar, J. R., & Flores, G. (2005). Enhanced binding of dopamine D1 receptors in caudate-putamen subregions in High-Yawning Sprague-Dawley rats. *Synapse*, 56, 69-73.

Dimitsantos, E., Escorihuela, R. M., Fuentes, S., Armario, A., & Nadal, R. (2007). Litter size affects emotionality in adult male rats. *Physiology & Behavior*, 92, 708-716.

Dixit, B. N., & Buckley, J. P. (1967). Circadian changes in brain 5-hydroxytryptamine and plasma corticosterone in the rat. *Life Sciences*, 6, 755-758.

Dourish CT & Cooper SJ (1990) Neural basis of drug-induced yawning. I In: Dourish CT & Cooper SJ (Eds.) En: Neurobiology of stereotyped behaviour. Oxford University Press, England pp. 91-116.

Eguibar, J. R., Barajas, M., & Moyaho, A. (2004). Genotype-dependent effect of ACTH<sub>1-24</sub> on grooming and yawning in two inbred strains of rats. *Neuropeptides*, 38, 283-288.

Eguibar, J. R., Cortes, C., Isidro, O., & Ugarte, A. (2015). Central administration of oxytocin differentially increases yawning, penile erections and scratching in high- (HY) and low-yawning (LY) sublines of Sprague–Dawley rats. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 134, 6-11.

Eguibar J.R., & Moyaho A. (1997) Inhibition of grooming by pilocarpine differs in high- and low-yawning sublines of Sprague-Dawley rats. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 58, 317-322.

Eguibar, J. R., Romero-Carbente, J. C., & Moyaho, A. (2003). Behavioral differences between selectively bred rats: D<sub>1</sub> versus D<sub>2</sub> receptors in yawning and grooming. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 74, 827-832.

Ferdman N., Murmu R. P., Bock J., Braun K., Leshem M., Henniger M. S., & Spanagel R. (2007). Weaning age, social isolation, and gender, interact to determine adult explorative and social behavior, and dendritic and spine morphology in prefrontal cortex of rats. *Behavioural Brain Research*, 180, 174-182.

Fone K. C., & Porkess M. V. (2008). Behavioural and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents-relevance to developmental neuropsychiatric disorders. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 32, 1087-1102.

Francis, D. D., Szegda, K., Campbell, G., Martin, W. D., & Insel, T. R. (2003). Epigenetic sources of behavioral differences in mice. *Nature Neuroscience*, 6, 445-446.

Franks, B., Curley, J. P., & Champagne, F. A. (2011). Measuring variations in maternal behavior: relevance for studies of mood and anxiety. En: *Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice* (pp. 209-224). *Humana Press*.

Friedman, E., Berman, M., & Overstreet, D. (2006). Swim test immobility in a genetic rat model of depression is modified by maternal environment: a cross-foster study. *Developmental Psychobiology*, 48, 169-177.

Galler, J. R., & Tonkiss, J. (1991). Prenatal protein malnutrition and maternal behavior in Sprague-Dawley rats. *The Journal of Nutrition*, 121, 762-769.

Gallup, A. C. (2010). Letter to the Editor: Yawning as a behavioral adaptation to heat stress and water scarcity in white-faced capuchins (*Cebus capucinus*). *American Journal of Physical Anthropology*, 142(4), 670-671.

Gallup A. C., & Gallup G. G. (2008) Yawning and thermoregulation. *Physiology & Behavior*, 95, 10-16.

Gallup, A. C., & Eldakar, O. T. (2012). The thermoregulatory theory of yawning: what we know from over 5 years of research. *Frontiers in Neuroscience*, 6, 188.

Giralt, M., Garcia-Marquez, C., & Armario, A. (1987). Previous chronic ACTH administration does not protect against the effects of acute or chronic stress in male rats. *Physiology & Behavior*, 40, 165-170.

Gómez C, Saldivar-González JA & Rodríguez R (2002) Modelos animales para el estudio de la ansiedad: una aproximación crítica. *Salud Mental*, 25, 14-24.

González-Mariscal, G., & Melo, A. I. (2013). Parental behavior. En: D. W. Pfaff (Ed.). *Neuroscience in the 21st Century* (pp. 2069-2100). New York, U.S.A.: Springer.

Gross C., & Hen R. (2004). The developmental origins of anxiety. *Nature Reviews, Neurosciences*, 5, 545-552.

Grota L. J., & Ader R. (1969). Effects of litter size on emotionality, adrenocortical reactivity, and susceptibility to gastric erosions in the rat. *Psychological Reports* 24, 547-549.

Guggisberg, A. G., Mathis, J., Herrmann, U. S., & Hess, C. W. (2007). The functional relationship between yawning and vigilance. *Behavioural Brain Research*, 179, 159-166.

Hofer M. A., Brunelli, S. A., & Shair, H. N. (1993). The effects of 24-hr maternal separation and of litter-size reduction on the isolation-distress response of 12-day-old rat pups. *Developmental Psychobiology*, 26, 483-497.

Holmgren, B., Budelli, R., Urbá-Holmgren, R., Eguibar, J. R., Holmgren, M., Baz-Tellez, G., & Anias, J. (1991). Food anticipatory yawning rhythm in the rat. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 51, 97-105.

Howells, F. M., Bindewald, L., & Russell, V. A. (2009). Cross-fostering does not alter the neurochemistry or behavior of spontaneously hypertensive rats. *Behavioral and Brain Functions*, 5, 24.

Huot, R. L., Thirivikraman, K. V., Meaney, M. J., & Plotsky, P. M. (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, 366-373.



Kalueff A., & Tuohimaa, P. (2005). The grooming analysis algorithm discriminates between different levels of anxiety in rats: potential utility for neurobehavioural stress research. *Journal of Neuroscience Methods*, 143, 169–177.

Korf, H. W., & von Gall C. (2013) Circadian Physiology. En: D. W. Pfaff (Ed.). *Neuroscience in the 21st Century* (pp. 1813-1845). New York, U.S.A.: *Springer*.

Kurata, A., Morinobu, S., Fuchikami, M., Yamamoto, S., & Yamawaki, S. (2009). Maternal postpartum learned helplessness (LH) affects maternal care by dams and responses to the LH test in adolescent offspring. *Hormones and Behavior*, 56, 112-120.

Korte, M., & De Boer, S. F. (2003). A robust animal model of state anxiety: fear-potentiated behaviour in the elevated plus-maze. *European Journal of Pharmacology*, 463, 163–175.

Lamprea, M. R., Cardenas, F. P., Setem, J., & Morato, S. (2008). Thigmotactic responses in an open-field. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 41, 135-140.

Landgraf, R., & Wigger, A. (2002). High vs low anxiety-related behavior rats: an animal model of extremes in trait anxiety. *Behavior Genetics*, 32, 301-314.

Lapiz, M. D., Fulford, A., Muchimapura, S., Mason, R., Parker, T. & Marsden, C. A. (2003). Influence of postweaning social isolation in the rat on brain development, conditioned behavior, and neurotransmission. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 33, 13-29.

Leuner, B., Glasper, E. R., & Gould, E. (2010). Parenting and plasticity. *Trends in Neurosciences*, 33, 465-473.

Liu, D., Diorio, J., Tannenbaum, B., Caldji, C., Francis, D., Freedman, A., Sharma, S., Pearson, D., Plotsky, P. M., & Meaney, M. J. (1997). Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science*, 277, 1659-1662.

Lukkes, J. L., Summers, C. H., Scholl, J. L., Renner, K. J., & Forster, G. L., (2009). Early life social isolation alters corticotropin-releasing factor responses in adult rats. *Neuroscience*, 158, 845-855.

Malkesman, O., Lavi-Avnon, Y., Maayan, R. & Weizman, A. (2008). A cross-fostering study in a genetic animal model of depression: maternal behavior and depression- like symptoms. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 91,1-8.

Maccari, S., Darnaudery, M., Morley-Fletcher, S., Zuena, A. R., Cinque, C., & Van Reeth, O. (2003). Prenatal stress and long-term consequences: implications of glucocorticoid hormones. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 27, 119-27.

Maccari, S., Piazza, P. V., 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.

Masís-Calvo, M., Sequeira-Cordero, A., Mora-Gallegos, A., & Fornaguera-Trías, J. (2013). Behavioral and neurochemical characterization of maternal care effects on juvenile Sprague–Dawley rats. *Physiology & Behavior*, 118, 212-217.

McCarty, R., & Lee, J. H. (1996). Maternal influences on adult blood pressure of SHRs: a single pup cross-fostering study. *Physiology & Behavior*, 59, 71-75.

McEwen, B. (2000). Stress, Definitions and Concepts of. Encyclopedia of Stress. *Editorial Board*. Editada por George Fink, 3, 508.

Meaney, M. J. (2001). Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Annual Review of Neuroscience*, 24, 1161-1192.

Meaney, M. J. (2009). Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. *Nature Neuroscience*, 12, 342-348.

Meaney, M. J., Aitken, D. H., Bodnoff S. R., Iny L. J., Tatarewicz J. E. & Sapolsky R. M. (1985). Early postnatal handling alters glucocorticoid receptor concentrations in selected brain regions. *Behavioral Neuroscience*, 99, 765-770.

Meaney, M. J., Szyf, M., & Seckl, J. R. (2007). Epigenetic mechanisms of perinatal programming of hypothalamic-pituitary-adrenal function and health. *Trends in Molecular Medicine*, 13, 269-277.

Millan, M. J. (2003) The neurobiology and control of anxious states. *Progress in Neurobiology*, 70, 83–244.

Moore, C. L. (1984). Maternal contributions to the development of masculine sexual behavior in laboratory rats. *Developmental psychobiology*, 17, 347-356.

Moore, C. L., & Power, K. L. (1986). Prenatal stress affects mother–infant interaction in Norway rats. *Developmental Psychobiology*, 19, 235-245.

Moore, C. L., Wong, L., Daum, M. C. & Leclair, O. U. (1997). Mother-infant interactions in two strains of rats: implications for dissociating mechanism and function of a maternal pattern. *Developmental Psychobiology*, 30, 301-312.

Moyaho, A., Barajas, M., Ugarte, A., & Eguibar, J. R. (2009). Genetic and littermate influences on yawning in two selectively bred strains of rats. *Developmental Psychobiology*, 51, 243-248.

Moyaho, A., Eguibar, J. R., & Díaz, J. L. (1995). Induced grooming transitions and open field behavior differ in high and low-yawning sublines of Sprague-Dawley rats. *Animal Behaviour*, 50, 61-72.

Moyaho, A., & Valencia, J., (2002). Grooming and yawning trace adjustment to unfamiliar environments in laboratory Sprague-Dawley rats (*Rattus norvegicus*). *Journal of Comparative Psychology*, 116, 263-269.

Nelson, E. E., & Winslow, J. T. (2008). Non-human primates: model animals for developmental psychopathology. *Neuropsychopharmacology*, 34, 90-105.

Ness, J. W., & Franchina, J. J. (1990). Effects of prenatal alcohol exposure on rat pups' ability to elicit retrieval behavior from dams. *Developmental Psychobiology*, 23, 85-99.

Neumann, I. D., Krömer, S. A., & Bosch, O. J. (2005). Effects of psycho-social stress during pregnancy on neuroendocrine and behavioural parameters in lactation depend on the genetically determined stress vulnerability. *Psychoneuroendocrinology*, 30, 791-806.

Noirot, E. (1972). Ultrasounds and maternal behavior in small rodents. *Developmental Psychobiology*, 5, 371-387.

Ohl, F. (2005). Animal models of anxiety. En: Anxiety and anxiolytic drugs (pp. 35-69). *Springer Berlin Heidelberg*.

Ostrander, M. M., Ulrich-Lai, Y. M., Choi, D. C., Richtand, N. M., & Herman, J. P. (2006). Hypoactivity of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis during recovery from chronic variable stress. *Endocrinology*, 147, 2008–2017.

Patin, V., Lordi, B., Vincent, A., Thoumas, J. L., Vaudry, H., & Caston, J. (2002). Effects of prenatal stress on maternal behavior in the rat. *Developmental Brain Research*, 139, 1-8.

Pawlak, C. R., Karrenbauer, B. D., Schneider, P., & Ho, Y. J. (2012). The elevated plus-maze test: differential psychopharmacology of anxiety-related behavior. *Emotion Review*, 4, 98-115.

Pellow, S., Chopin, P., File, S. E., & Briley, M. (1985). Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 14, 149-167.

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

Petrenko, O. I., Chuguy, V. F., Barykina, N. N., Alekhina, T. A., Kolpakov, V. G., & Amstislavsky, S. Y. (2004). Components of early maternal environment affecting the predisposition to catalepsy. *Behavioural Processes*, 65, 1-6.

Plyusnina, I. Z., Oskina, I. N., Tibeikina, M. A., & Popova, N. K. (2009). Cross-fostering effects on weight, exploratory activity, acoustic startle reflex and corticosterone stress response in Norway gray rats selected for elimination and for enhancement of aggressiveness towards human. *Behavior Genetics*, 39, 202-212.

Polan, H. J., & Hofer, M. A. (1999). Maternally directed orienting behaviors of newborn rats. *Developmental Psychobiology*, 34, 269-279.

Priebe, K., Brake, W. G., Romeo, R. D., Sisti, H. M., Mueller, A., McEwen, B. S., & Francis, D. D. (2005). Maternal influences on adult stress and anxiety-like behavior in C57BL/6J and BALB/cJ mice: A cross-fostering study. *Developmental Psychobiology*, 47, 398-407.

Provine, R. (2005). Yawning: The yawn is primal, unstoppable and contagious, revealing the evolutionary and neural basis of empathy and unconscious behavior. *American Scientist*, 93, 532-539.

Provine, R. R., Tate, B. C., & Geldmacher, L. L. (1987). Yawning: no effect of 3–5% CO<sub>2</sub>, 100% O<sub>2</sub>, and exercise. *Behavioral and Neural Biology*, 48, 382-393.

Prut, L., & Belzung, C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology*, 463, 3–33.

Pryce, C. R., Bettschen, D., & Feldon, J. (2001). Comparison of the effects of early handling and early deprivation on maternal care in the rat. *Developmental Psychobiology*, 38, 239-251.

Ramos, A. (2008). Animal models of anxiety: do I need multiple tests? *Trends in Pharmacological Sciences*, 10, 493-498.

Ramos, A., & Mormède, P. (1997). Stress and emotionality: a multidimensional and genetic approach. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 22, 33-57.

Rees, S. L., Lovic, V., & Fleming, A. S. (2004). Maternal behavior. En: *The Behavior of the Laboratory Rat: A Handbook with Tests*. Oxford University Press, New York, 287-297.

Rees, S. L., Steiner, M., & Fleming, A. S. (2006). Early deprivation, but not maternal separation, attenuates rise in corticosterone levels after exposure to a novel environment in both juvenile and adult female rats. *Behavioural Brain Research*, 175, 383-91.

Reinhold, K. (2002). Maternal effects and the evolution of behavioral and morphological characters: a literature review indicates the importance of extended maternal care. *Journal of Heredity*, 93, 400-405.

Rosenblatt, J. S. (1967). Nonhormonal basis of maternal behavior in the rat. *Science*, 156, 1512-1513.

Rosenblatt, J. S., & Lehrman, D. S. (1963). Maternal behavior of the laboratory rat. *Maternal Behavior in Mammals*, 8-57.

Salas, M., Torrero, C., Regalado, M., & Perez, E. (2002). Retrieving of pups by neonatally stressed mothers. *Nutritional Neuroscience*, 6, 399-405.

Sapolsky, R. M., Romero, L. M., & Munck, A. U. (2000). How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrinology Reviews*, 21, 55-89.

Seitz, P. F. (1954). The effects of infantile experiences upon adult behavior in animal subjects. I. Effects of litter size during infancy upon adult behavior in the rat. *The American Journal of Psychiatry*, 110, 916-927.

Sequeira-Cordero, A., Masís-Calvo, M., Mora-Gallegos, A., & Fornaguera-Trías, J. (2013). Maternal behavior as an early modulator of neurobehavioral offspring responses by Sprague-Dawley rats. *Behavioural Brain Research*, 237, 63-70.

Serra, M., Pisu, M. G., Littera, M., Papi, G., Sanna, E., Tuveri, F., Usala, L., Purdy R. H., & Biggio, G. (2000). Social isolation-induced decreases in both the



abundance of neuroactive steroids and GABA(A) receptor function in rat brain. *Journal of Neurochemistry*, 75, 732-740.

Slater, P. B. J. (2000). El comportamiento animal. *Cambridge University Press*, pp. 11-29.

Spencer, S. J., & Tilbrook, A. (2009). Neonatal overfeeding alters adult anxiety and stress responsiveness. *Psychoneuroendocrinology*, 34, 1133-1143.

Steimer, T. (2002). The biology of fear-and anxiety-related behaviors. *Dialogues in clinical neuroscience*, 4, 231.

Stern, J. M. (1997). Offspring-induced nurturance; animal-human parallels. *Developmental Psychobiology*, 31, 19-37.

Treit, D. & Fundytus, M. (1988). Thigmotaxis as a test for anxiolytic activity in rats. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 31, 959-962.

Tufik, S., de Luca Nathan, C., Neumann, B., Hipólido, D. C., Lobo, L. L., de Medeiros, R., Troncone, L. R., Braz, S., & Suchecki, D. (1995). Effects of stress on drug-induced yawning: constant vs. intermittent stress. *Physiology & Behavior*, 58, 181-184.

Ugarte, A. (2006). Conducta maternal y respuesta al estrés de ratas criadas por madres de alto y bajo bostezo. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala. pp. 118

Ugarte, A., Eguibar, J. R., Cortés, M. C., León-Chávez., B. A. & Melo, A. I. (2011). Comparative analysis of maternal care in the high- (HY) and low- (LY) yawning sublines from Sprague-Dawley rats. *Developmental Psychobiology*, 53, 105-117.

Ulrich-Lai, Y. M., & Herman, J. P. (2009). Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nature Reviews Neuroscience*, 10, 397-409.

Urbá-Holmgren, R., Trucios, N., Holmgren, B., Eguibar, J. R., Gavito, A., Cruz, G., & Santos, A. (1990). Genotypic dependency of spontaneous yawning frequency in the rat. *Behavioural Brain Research*, 40, 29-35.

Urbá-Holmgren, R., Santos, A., Holmgren, B., & Eguibar, J. (1993). Two inbred rat sublines that differ in spontaneous yawning behavior also differ in their responses to cholinergic and dopaminergic drugs. *Behavioural Brain Research*, 56, 155-159.

Uribe, C. A. (2010). Determinación de las respuestas conductuales ante situaciones de estrés en ratas de alto bostezo y bajo bostezo de la línea Sprague-Dawley. Tesis de Maestría en Ciencias Fisiológicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. pp. 137.

Uribe, C.A., Cortés, M.C., Eguibar, J.R. (2015). Neurofisiología del Bostezo. Cap 13. En, Rivera, L. Neurología en la medicina del dormir. *Ed. Pydesa, México*. PP. 129-138.

Valleé, M., Mayo, W., Dellu, F., Le Moal, M., Simon, H., & Maccari, S. (1997). Prenatal stress induces high anxiety and postnatal handling induces low anxiety in

adult offspring: correlation with stress-induced corticosterone secretion. *The Journal of Neuroscience*, 17, 2626–2636.

Van Erp, A. M., Kruk, M. R., Meelis, W., & Willekens-Bramer, D. C. (1994). Effect of environmental stressors on time course, variability and form of self-grooming in the rat: handling, social contact, defeat, novelty, restraint and fur moistening. *Behavioural Brain Research*, 65, 47-55.

Vick, S. J., & Paukner, A. (2010). Variation and context of yawns in captive chimpanzees (*Pan troglodytes*). *American Journal of Primatology*, 72, 262-269.

Walker, C. D., Kudreikis, K., Sherrard, A., & Johnston, C. C. (2003). Repeated neonatal pain influences maternal behavior, but not stress responsiveness in rat offspring. *Developmental Brain Research*, 140, 253-261.

Walusinski, O. (2009). Yawning in Diseases. *European Neurology*, 62, 180-187.

Weaver, I. C. G., Meaney, M. J., & Szyf, M. (2006). Maternal care effects on the hippocampal transcriptome and anxiety-mediated behaviors in the offspring that are reversible in adulthood. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 103, 3480–3485.

Weinstock, M. (2008). The long-term behavioural consequences of prenatal stress. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 32(6), 1073-1086.

Wigger, A., Loersch, P., Weissenbacher, P., Holsboer, F., & Landgraf, R. (2001). Cross-fostering and cross-breeding of HAB and LAB rats: a genetic rat model of anxiety. *Behavior Genetics*, 31, 371-382.

Wigger, A., Landgraf, R., & Hölter, S. M. (2002). Alcohol self-administration in two rat lines selectively bred for extremes in anxiety-related behavior. *Neuropsychopharmacology*, 26, 729-736.