



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA

Posgrado en Ciencias Biológicas

**Expresión de c-Fos en el circuito cortico-estriatal
asociado con el estado reproductivo y la construcción del
nido en la coneja**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Presenta

Hugo Cano Ramírez

Director

Dr. Kurt Leroy Hoffman

Tlaxcala, Tlax.

Enero, 2019



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA

Posgrado en Ciencias Biológicas

Expresión de c-Fos en el circuito cortico-estriatal asociado con el estado reproductivo y la construcción del nido en la coneja

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Presenta

Hugo Cano Ramírez

Comité Tutorial

Director: Dr. Kurt Leroy Hoffman

Tutores:

Dra. Gabriela González-Mariscal Muriel

Dra. Robyn Elizabeth Hudson

Dra. María Teresa Morales Guzmán

Dr. Ángel Ismael Melo Salazar

Dr. Julio César Morales Medina

Dra. Verónica Reyes Meza

Tlaxcala, Tlax.

Enero, 2019

El presente trabajo de tesis fue realizado bajo la dirección del Dr. Kurt Leroy Hoffman y la tutoría de la Dra. Gabriela González-Mariscal Muriel y la Dra. Robyn Elizabeth Hudson.

El trabajo experimental fue realizado en el Centro de Investigación en Reproducción Animal (CIRA) del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional y la Universidad Autónoma de Tlaxcala. Con apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) que me otorgó la beca para realizar mis estudios de doctorado con registro número 266917.



Universidad Autónoma de Tlaxcala
Secretaría de Investigación Científica y Posgrado
Posgrado en Ciencias Biológicas



**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

COORDINACIÓN DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
PRESENTE

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del proyecto de tesis que **Hugo Cano Ramírez** realiza para la obtención del grado de **Doctor en Ciencias Biológicas**, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es **“Expresión de c-FOS en el circuito cortico-estriatal asociado con el estado reproductivo y la construcción del nido en la coneja”**.

Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
TLAXCALA, TLAX., ENERO 15 DE 2019


DRA. GABRIELA GONZÁLEZ-MARISCAL MURIEL


DRA. VERÓNICA REYES MEZA


DRA. MARÍA TERESA MORALES GUZMÁN


DR. ÁNGEL ISMAEL MELO SALAZAR


DR. JULIO CÉSAR MORALES MEDINA

ISO

Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado bajo la Norma:
ISO 9001:2015-NMX-CC-9001-IMNC-2015



AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala por haberme permitido cumplir mi sueño de realizar estudios de Doctorado.

Dr. Hoffman, gracias por responder el primer correo que le mandé en 2013 y por este camino que hemos recorrido durante seis años, en los momentos más increíbles y también los más difíciles.

Dra. González-Mariscal, muchas gracias por haber creído en mí desde antes de comenzar el Doctorado y permitirme trabajar en un proyecto para adquirir los conocimientos necesarios y desarrollarme en esta apasionante línea de investigación.

Dra. Hudson, le agradezco el estar siempre pendiente de los avances de la investigación y siempre darme ese ánimo para seguir adelante en cada uno de los tutorales.

Dra. Morales, gracias por apoyarme para poder ampliar mi conocimiento de neurociencias y haber sido parte de LATP.

Dr. Melo, gracias por haber sido un excelente tutor y apoyarme con esos consejos tan puntuales.

Dr. Morales, gracias por apoyarme en cada uno de los momentos que pasé en el laboratorio trabajando con c-Fos, dándome consejos y motivándome cuando las cosas no salían tan bien como esperaba, esos detalles son realmente importantes.

Dra. Reyes, le agradezco esas veces que nos encontramos en CTBC, animarme e interesarse por mi trabajo, siempre me daba mucho gusto verla.

Dra. Jiménez, gracias por ayudarme cuando comencé mi experiencia en el trabajo en el laboratorio y confiar en mí.

Andy Field, thanks for believe in science and share your knowledge, even when you didn't know who I was. Your book has helped me throughout all my graduate studies.

Rebe y Soco, gracias por estar apoyándome con todas las preguntas que tuve desde el día uno y responderme un sinfín de correos que les enviaba.

RESUMEN

La conducta de construcción del nido materno en la coneja europea (*Oryctolagus cuniculis*) gestante es un comportamiento temporalmente preciso propio de la gestación asociado con un estado hormonal específico. El presente trabajo tuvo como objetivo explorar las áreas cerebrales activas durante esta conducta, lo que sugirió la existencia de un posible circuito cerebral cortico-estriatal.

El inicio de este comportamiento (los primeros 30 minutos) se observó en el día 28 de gestación cuantificando la densidad de la expresión del marcador de actividad neuronal c-Fos, el cual mostró el número de neuronas activas asociadas con el estado reproductivo (gestante/estro) con la presencia o ausencia de paja, así como los efectos independientes de su interacción.

Nuestra hipótesis consideró que el inicio y el mantenimiento de la construcción del nido que forma parte de la conducta materna en la coneja se encuentra asociado con un aumento en la expresión de la proteína c-Fos en áreas de la corteza frontal (cingulada anterior, orbitofrontal, piriforme, premotora, área prelímbica, área infralímbica), en la corteza motora y somatosensorial, así como en el estriado dorsal (caudado y putamen). Esto debido a que la coneja se encuentra motivada para realizar la conducta de acarreo de paja en lugar de sólo interactuar con ella.

Los resultados mostraron la presencia de una interacción (ANOVA de 2 vías) del estado reproductivo con la presencia/ausencia de paja. Comparaciones post-hoc (Holm-Sidak) encontraron que la expresión del aumento de la proteína c-Fos aumentó en la corteza orbitofrontal, cingulada anterior y piriforme en los grupos gestante+paja comparado con el resto de las áreas. En el caso del estriado dorsal, éste se coactivó con regiones de la corteza prefrontal que incluían las regiones dorsales del putamen y el caudado, así como las cortezas somatosensorial, premotora, motora y prelímbica.

Se sugiere que la conducta de construcción del nido de la coneja puede ser un modelo útil para entender la neurobiología de la conducta orientada a una meta y la formación de hábitos, además de que podría asemejar a aquellas regiones activas en trastornos psiquiátricos, tales como el trastorno obsesivo-compulsivo.

ABSTRACT

Nest building behavior is a component of maternal behavior in pregnant european rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). It has a specific hormonal correlate in a specific time of onset that promotes the behavior: around day 28 of pregnancy, the rabbit in the presence of straw modify the interaction from being food to become nest building material.

The present work had the objective of exploring the areas of neuronal activation that could suggest a possible cortico-striatal circuit based on the observation of similarities with behavior in obsessive-compulsive disorder, which consists of a normal behavior that become exaggerated provoking a disturbance in turning it off. The marker of neural activity c-Fos was employed considering the intrinsic dynamics of the onset of the behavior (30 minutes).

The experiment was designed to measure the expression of c-Fos and associate it with reproductive state and presence/absence of straw. Independent effects and interaction were measured. Our hypothesis considered that the onset and maintenance of nest building behavior is associated with an increase in c-Fos expression in frontal cortex (anterior cingulate, prelimbic, infralimbic, orbitofrontal, piriform and premotor cortices), as so in the primary motor and somatosensory cortex and in the dorsal striatum (caudate and putamen).

Results showed the presence of an interaction (2 WAY ANOVA) of reproductive state with the presence or absence of straw. Post-hoc comparisons (Holm-Sidak) found that c-Fos expression increased in the orbitofrontal cortex, anterior cingulate cortex and piriform cortex in the pregnant+ straw groups compared with the rest. Regarding dorsal striatum, it was coactivated with regions of CPF including the dorsal putamen, dorsal caudate, somatosensory, primary motor, premotor and prelimbic cortices.

The results obtained suggest that nest building behavior can be a useful model to understand the neurobiology of compulsions in OCD. Likewise, these areas are similar to those observed in goal-oriented behavior and habit formation.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 El Conejo Europeo.....	1
1.2 Ciclo reproductivo de la coneja.....	2
1.2.1 Estro.....	2
1.2.2 Gestación.....	3
1.2.3 Lactancia.....	5
1.3 Construcción del nido de la coneja y su correlato hormonal.....	6
1.4 Estímulos externos que modulan la conducta de acarreo de paja.....	11
II. MARCO TEÓRICO	12
2.1 Conducta materna y motivación.....	12
2.1.1 Conducta orientada a una meta y formación de hábitos.....	15
2.1.2 Regiones cerebrales que regulan la conducta materna.....	17
2.2.1 Corteza prefrontal.....	20
2.2.2 Corteza Prefrontal Medial (CPFm).....	21
Corteza cingulada anterior.....	23
Área prelímbica.....	24
Área infralímbica.....	24
Interacción entre corteza prelímbica e infralímbica para generar la conducta.....	25
2.2.3 Corteza orbitofrontal.....	26
2.2.4 Corteza premotora.....	27
2.2.5 Corteza piriforme.....	28
2.3 Ganglios basales.....	29
2.3.1 Estriado.....	30
Estriado dorsal.....	31
Caudado.....	31
Putamen.....	32
Estriado ventral.....	32
2.4 Circuitos cortico-estriatales y tálamo-corticales.....	33
2.5 Conectividad cortico estriada y su influencia en alteraciones psiquiátricas.....	35
2.6 Genes de expresión temprana (IEGs).....	36
3. JUSTIFICACIÓN	39
4. HIPÓTESIS	39
5.OBJETIVOS	39

5.1 Objetivo General	39
5.2 Objetivos específicos	39
6. METODOLOGÍA	40
6.1 Animales	40
6.2 Pruebas conductuales	41
6.3 Procedimiento quirúrgico.....	42
Perfusión para inmunohistoquímica para c-Fos	42
6.4 Secciones e identificación de regiones cerebrales	43
6.5 Proceso de inmunohistoquímica.....	43
6.6 Cuantificación del marcaje de c-Fos	44
6.7 Análisis comportamental.....	48
6.8 Análisis estadístico.....	49
6.8.1 Comparación entre grupos con células inmunorreactivas a c-Fos	49
7. RESULTADOS.....	50
7.1 Conducta	50
7.1.1 Respuesta conductual de hembras gestantes y en estro a la paja	50
7.1.2 Comportamientos de conejas gestantes y en estro sin presencia de paja	53
7.2 Expresión de c-Fos en las regiones del circuito cortico-estriatal	56
7.2.1 Corteza prefrontal.....	56
7.2.2 Estriado dorsal (núcleo caudado y putamen), corteza motora y somatosensorial	61
7.3 Correlaciones entre regiones asociadas con el acarreo de paja	66
7.3.1 Correlaciones entre regiones en conejas en estro que no acarrear paja	68
7.4 Correlaciones entre expresión de c-Fos y componentes de la conducta de acarreo de paja ...	70
8. DISCUSIÓN	72
9. CONCLUSIONES.....	79
10. PERSPECTIVAS.....	80
11. REFERENCIAS	81
12. GLOSARIO DE TÉRMINOS.....	98
13.PUBLICACIONES	99

I. INTRODUCCIÓN

1.1 El Conejo Europeo

El conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*) pertenece a la orden de los lagomorfos que incluyen a dos familias: *ochotonidae* (pikas) y *leporidae* (conejos y liebres). Esta especie cuenta con 21 pares de autosomas y 1 par de cromosomas sexuales, además de que a nivel orofacial cuenta con 6 dientes incisivos (Manning y cols. 1994). El conejo europeo se ha utilizado como modelo de estudio en diferentes áreas de investigación pasando por el desarrollo ontogenético y desórdenes neuropsiquiátricos (Hoffman y cols. 2017).

Algunas de las ventajas de usar al conejo como sujeto de investigación científica son: el conocimiento que se tiene sobre la modulación temporal de su conducta por medio de hormonas sexuales (Zarrow y cols. 1963, Zarrow y cols. 1971, González-Mariscal 2001) y la existencia de una caracterización precisa acerca de su comportamiento, tanto en la naturaleza como en el laboratorio. Además de que se han identificado las regiones cerebrales que regulan diferentes aspectos de su conducta materna (Palka y Sawyer, 1966, González-Mariscal y cols. 1990, González-Mariscal, 2001, González-Mariscal y cols. 2005, Beyer y cols. 2007, Melo y cols. 2008, Domínguez y cols. 2017, Basurto y cols. 2018).

En el campo de la neuroendocrinología, el conejo ha sido sujeto de estudios seminales sobre los mecanismos que controlan la ovulación (Hoffman y cols. 2017). La coneja es un particular modelo de estudio de la ovulación debido a que es un ovulador inducido lo que significa que responde a estímulos que ocurren durante la copula para liberar el óvulo que será fecundado. Estos estímulos incluyen la estimulación de los flancos durante la monta y de la vagina por medio de la intromisión del pene (Ramírez y Beyer 1988). Por lo tanto, en el laboratorio, la ovulación puede ser controlada con precisión para la realización de experimentos relacionados con la gestación (Hoffman y cols. 2017).

Más recientemente, el uso de técnicas de inmunohistoquímica utilizadas en la coneja para detectar la expresión de la proteína c-Fos ha permitido observar con una ubicación espacial precisa, aquellas neuronas activas durante la realización de una conducta. Aproximadamente 1-2 horas después del estímulo o comportamiento, la proteína c-Fos es expresada en las neuronas que estuvieron activas (Caba y cols. 2000, 2003; González-Mariscal y cols. 2009, González-Mariscal y cols. 2015, Cano-Ramírez y Hoffman, 2017).

A continuación, se hará una breve descripción del ciclo reproductivo de la coneja describiendo sus etapas y asociándolas con su correspondiente correlato hormonal.

1.2 Ciclo reproductivo de la coneja

1.2.1 Estro

El estro es una característica de todas las hembras mamíferas regulado por hormonas sexuales (por ejemplo, estradiol y progesterona) y es definido como un periodo de receptividad sexual caracterizado por el despliegue de comportamientos de atractividad, proceptividad y receptividad. En el caso de la coneja, el estro se induce únicamente por estradiol liberado de los folículos del ovario, a diferencia de los roedores en quienes la progesterona tiene un papel de mayor importancia en la facilitación de las conductas de estro (Challis y cols. 1973, Ramírez y Beyer, 1988, Hoffman y González-Mariscal. 2006, Beyer y cols., 2007).

Algunos comportamientos que caracterizan al estro en la coneja son: la conducta de marcaje por frotamiento del mentón (CMFM) y la conducta de lordosis. En el caso de la primera, la coneja frota la superficie ventral sobre objetos de su medioambiente, así deposita sustancias odoríferas producidas por glándulas cutáneas (González-Mariscal y cols. 1990, Hoffman y González-Mariscal, 2006, Hoffman y cols. 2009) y la segunda consiste en desplegar una postura de arqueamiento de la columna vertebral para facilitar la inserción del pene y la eyaculación (Beyer y cols. 2007).

A modo de resumen, los eventos del estro ocurren de la siguiente manera: (1) la coneja despliega conductas de proceptividad, incluyendo la CMFM, que comunican al macho su estado de receptividad incluyendo la CMFM (2) se presenta la cópula y eyaculación del macho, (3) la estimulación sensorial asociada con la cópula provoca la liberación de la hormona liberadora gonadotropina del hipotálamo que estimula la liberación de la hormona luteinizante de la pituitaria, (4) la hormona luteinizante provoca la ovulación (liberación del óvulo del folículo), (5) el folículo forma el cuerpo lúteo que sintetizará la progesterona.

1.2.2 Gestación

A nivel de desarrollo intrauterino durante el periodo de gestación de la coneja, se han observado tres etapas: (1) periodo de fertilización e implantación de los óvulos fecundados (día 1 al 6), (2) organogénesis fetal (día 6 al 18) y (3) crecimiento fetal (día 18 al 28) (Mizoguchi y cols. 2010). Durante la primera etapa, la CMFM y la lordosis se encuentran inhibidas por cambios hormonales y cerebrales asociados con la ovulación (Fig. 1), como lo son el aumento de la progesterona secretada por los cuerpos lúteos y posiblemente por una disminución en la secreción de estradiol (Hoffman y González-Mariscal 2007, 2010).

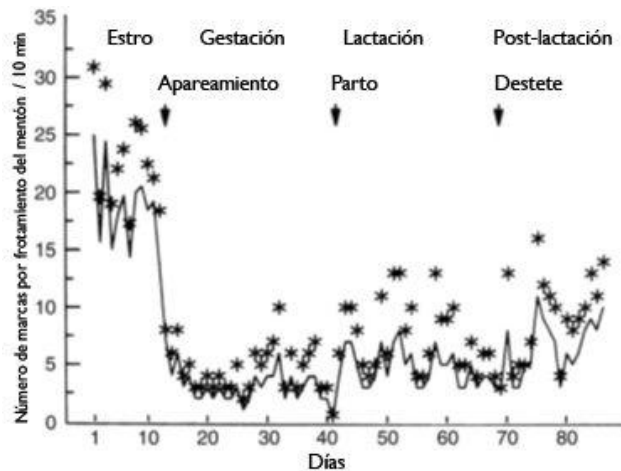


Figura. 1. Conducta de marcaje por frotamiento del mentón en 10 conejas durante el ciclo reproductivo. Notar que el apareamiento abolió el marcaje por frotamiento y el destete permitió la recuperación gradual de la conducta (González-Mariscal y cols. 1990).

Se puede observar que durante la segunda y tercera etapa se mantiene la inhibición de la receptividad sexual, así como de la inhibición de CMFM (Fig. 1). Por otra parte, durante los últimos días de la gestación, se observa una disminución en la cantidad de comida ingerida (González-Mariscal y cols. 1994).

Un dato importante es que, durante la segunda y tercera etapa, en el laboratorio la coneja expresa la conducta de construcción del nido maternal, la cual cuenta con tres componentes: la excavación, el acarreo de paja (la colecta de material para construir un nido dentro de la caja nido), y el arrancado de pelo (arrancarse el pelo del vientre y las extremidades, coleccionarlo en su boca y darle forma dentro del nido de paja construido previamente) (González-Mariscal y cols. 1994). Estos comportamientos se encuentran regulados por combinaciones de las hormonas de la gestación: estradiol, progesterona, prolactina y testosterona (Fig. 2) (González-Mariscal 2001, 2003).

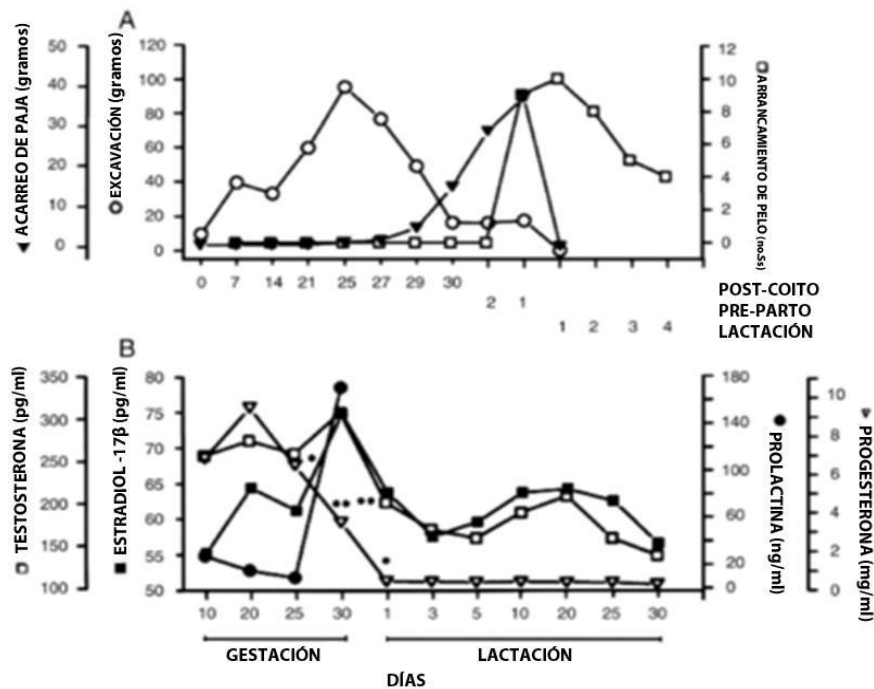


Figura 2. Cuantificación de comportamientos y concentraciones hormonales durante el ciclo gestacional de la coneja. **Panel superior:** cuantificación de excavación, acarreo de paja y arrancado de pelo. **Panel inferior:** variaciones en la concentración de estradiol, progesterona, testosterona y prolactina en la sangre durante la gestación y lactación (Adaptado de González-Mariscal y cols. 1994).

1.2.3 Lactancia

Al momento del nacimiento, los críos se encuentran altamente indefensos con una capacidad termoregulatoria muy baja y una pobre coordinación de movimientos. Esta observación es relevante porque a pesar del grado de dependencia del cuidado materno, existe una interacción mínima entre la madre y sus críos, que consiste en los pocos minutos que pasa alimentándolos después del nacimiento (González-Mariscal y cols. 2016).

Se puede definir a la lactancia como un proceso fisiológico que consiste en la producción de leche y el amamantamiento de los críos. Se ha visto que la lactancia se mantiene por medio del de la activación del reflejo de expulsión de leche mediante la succión de los pezones realizada por los críos (Mena y Beyer 1963, Tindal y cols. 1963, González-Mariscal y Gallegos 2014, González-Mariscal y cols. 2016). Las hormonas que participan en la lactancia son prolactina -producción y secreción de leche- y oxitocina -expulsión de leche de las glándulas mamarias- (González-Mariscal y cols. 2007; Crowley 2015).

La oxitocina es una hormona producida por la glándula pituitaria posterior que tiene la función de contraer los ductos de leche para su expulsión. Mientras que, en el caso de la prolactina, ésta estimula la producción de leche de las glándulas mamarias. En el caso de la coneja, a nivel cerebral, la oxitocina cuenta con receptores en áreas como el APOm, el núcleo supraóptico, el núcleo paraventricular y el septum lateral (González-Mariscal y cols. 2009, Jiménez y cols. 2015).

Se ha visto que existe una retroalimentación entre el cerebro y los pezones generada por la estimulación de las glándulas mamarias mediante la succión. Por lo que, los estímulos sensoriales que se dirigen hacia la neurohipófisis controlarían la secreción de leche (Mena y Beyer 1968, Beyer y Mena 1970). Es importante señalar que la coneja de la raza Nueva Zelanda da a luz entre 6 a 8 críos, ya que el número de críos durante el amamantamiento mantiene la lactancia, lo que también puede observarse en la naturaleza (Rödel y cols. 2012, González-Mariscal y cols. 2013).

La coneja en contraste con otros mamíferos que mantienen un contacto casi continuo entre madre y crío amamanta de forma discontinua y restringida a una vez al día durante 3 a 5 minutos (Fuchs y cols. 1984, González-Mariscal, 2001, González-Mariscal y cols. 2009). En la naturaleza, la coneja abre la madriguera y entra a ella para amamantar a sus críos, cuando termina, sale y cubre la entrada para evitar la presencia de depredadores (Myers y Poole 1961, Rödel y cols. 2012).

La coneja de la raza Nueva Zelanda en condiciones de laboratorio, a diferencia de lo que ocurre en la naturaleza, puede amamantar a críos de otra madre (González-Mariscal y Gallegos 2007). Como se mencionó anteriormente, durante el contacto diario entre madre y críos, éstos localizan los pezones de la madre por medio de una señal olfativa generada por una feromona presente en el vientre de la madre identificada como 2-metil-but-2-enal (Distel y Hudson 1985, Hudson, 1985, Hudson y cols. 1990, Schaal y cols. 2003).

Por otra parte, a nivel comportamental se ha observado que las conejas lactantes no se encuentran en estro durante la lactancia, por lo que la CMFM y la receptividad sexual se encuentran reducidas. Sin embargo, en condiciones de laboratorio y de granja puede utilizarse una técnica para restaurar el estro llamada bioestimulación, que consiste en la supresión de un episodio individual de amamantamiento para provocar la restauración del estro de 24 a 48 horas después (González-Mariscal y cols. 2015).

A continuación, se hablará sobre el comportamiento específico de la construcción del nido en la coneja presentando sus componentes y los estímulos que lo provocan.

1.3 Construcción del nido de la coneja y su correlato hormonal

Esta sección comenzará con una breve descripción acerca de la similitud del comportamiento de construcción del nido en la naturaleza y bajo condiciones de laboratorio. En la naturaleza dos semanas antes del parto, la coneja gestante excava una madriguera y cubre la entrada, una o dos noches antes del parto (aproximadamente en el día 28 de gestación) regresa a la madriguera para coleccionar pasto con el que construye un nido por medio de una secuencia comportamental realizada de 20 a 40 veces hasta que completa el nido. Una vez terminado el nido, la coneja se arranca pelo del vientre para recubrirlo (Myers y Poole 1961).

En el laboratorio, a las conejas gestantes se les provee con una caja nido de madera que contiene una pieza de cartón comprimido que cubre el suelo de ésta y que sirve como sustrato para la excavación. Alrededor del día 28 de gestación, a la coneja se le provee de paja que sirve como material para construir un nido. La conducta de excavación aumenta de forma constante durante las primeras tres semanas de gestación y cuando al conejo se le provee paja en el día 28, inmediatamente comienza a coleccionarla y acarrearla dentro de la caja nido para formar un nido.

Finalmente, justo antes del parto, el conejo se arranca pelo del vientre y lo integra con el nido (Fig 2, panel superior; González-Mariscal y cols. 1994).

Estudios realizados en laboratorio han permitido establecer que cambios específicos en los niveles plasmáticos de estradiol y progesterona están asociados con la expresión de las conductas de excavación, construcción del nido y arrancado de pelo (González-Mariscal y cols. 1994). Estos experimentos mostraron la existencia de una correlación entre los niveles de progesterona y las conductas expresadas por la coneja durante la gestación (Fig. 2, panel inferior). Basado en esta correlación, se hipotetizó que la progesterona promovía la expresión de la excavación de una madriguera y su caída disparaba la conducta de acarreo de paja. Esto se debe a que el aumento en la progesterona se encuentra asociado con un aumento en el comportamiento de excavación y la caída de progesterona se encuentra asociado con la declinación de la excavación, pero con un aumento de acarreo de paja y arrancado de pelo.

Esta hipótesis fue probada en los experimentos de González Mariscal, y cols. (1996) con respecto a la replicación de estas conductas de la gestación por medio de un tratamiento hormonal en conejas ovariectomizadas. El tratamiento consistió en que, durante 13 días, las conejas fueron tratadas diariamente con benzoato de estradiol junto con la administración sistémica de progesterona de forma subcutánea. Acabado este tratamiento, se retiró la progesterona (manteniendo la administración diaria de BE).

En el estudio referido se observó que la presencia de progesterona y estradiol inducía la conducta de excavación (Fig. 3; panel superior). Al retirarse la progesterona, ocurre el acarreo de paja y después el arrancado de pelo del vientre de la madre (Fig. 3; panel inferior). A grandes rasgos puede decirse que la disminución en los niveles plasmáticos de progesterona con el mantenimiento constante de los niveles de estradiol promueve la conducta de acarreo de paja y después del arrancado de pelo.

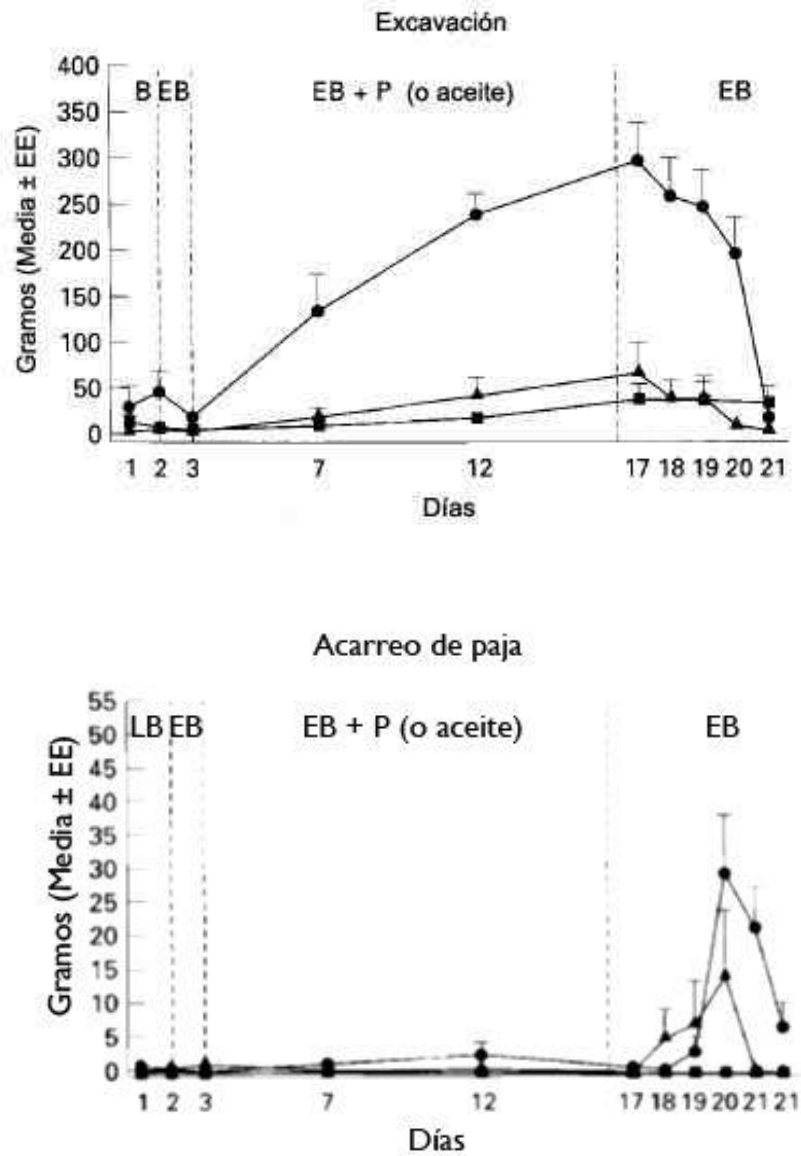


Figura 3. Panel superior. Comportamiento de excavación mostrado por hembras ovariectomizadas antes del tratamiento hormonal (B; línea base) y después de recibir benzoato de estradiol (BE; 5 $\mu\text{g}/\text{día}$) y progesterona (P; 2 o 10 $\text{mg}/\text{día}$) **Panel inferior.** Comportamiento de acarreo de para mostrado por hembras ovariectomizadas antes del tratamiento hormonal (LB; línea base) y después de recibir benzoato de estradiol (BE; 5 $\mu\text{g}/\text{día}$) y progesterona (P; 2 o 10 $\text{mg}/\text{día}$) (Adaptado de González-Mariscal y cols. 1996). ●P: 10 $\text{mg}/\text{día}$; ▲P: 2 $\text{mg}/\text{día}$; ■ aceite.

Considerando estos resultados y buscando profundizar más sobre los mecanismos hormonales que controlan la conducta, experimentos posteriores exploraron cuáles estructuras cerebrales se encontraría posiblemente involucradas en el comportamiento de construcción del nido. En primer lugar, un estudio realizado utilizando la técnica de inmunohistoquímica encontró que la expresión del receptor a estradiol se ubicaba en el área preóptica media, núcleo infundibular, cama núcleo de la estría terminalis, la amígdala y el núcleo X (Caba y cols. 2002).

De forma complementaria, se encontró que la expresión del receptor a progesterona en el diencefalo de la coneja ovariectomizada (ovx) tratada con estradiol está restringida a ciertas regiones del hipotálamo, incluyendo el núcleo paraventricular, el núcleo X, el núcleo infundibular, y el área preóptica (Caba y cols. 2003). Cabe señalarse que los análisis mencionados fueron restringidos a regiones del hipotálamo, por lo que no existe información relacionada a la expresión de los receptores en la corteza prefrontal (CPF) o el estriado.

Los estudios mencionados mostraron que las regiones diencefálicas que expresan tanto receptores a estradiol, como de receptores a progesterona, incluirían el área preóptica, núcleo infundibular y el núcleo X, aunque no se sabe si estos receptores serían expresados por distintas poblaciones de células, o si existen células dentro de estas regiones que expresan ambos receptores. Por lo tanto, es razonable hipotetizar que estas regiones podrían verse involucrados en la expresión de la conducta de construcción del nido.

Sobre esto, González-Mariscal y cols. (2005) encontraron que aplicar estradiol por medio de una cánula directamente en el área preóptica media (APOm) combinado con la administración sistémica de progesterona durante 14 días estimulaba la conducta de excavación (Fig. 4; panel superior) y cuando se dejaba de administrar progesterona, se iniciaba la conducta de acarreo de paja (Fig. 4; panel inferior). Sin embargo, cuando el estradiol se administraba sistémicamente y la progesterona se aplicaba en el APOm, al retirarse la cánula después de 14 días, no se inducía la construcción del nido (Fig. 4). Estos resultados indican que el APOm es una región importante para la regulación hormonal de la conducta de construcción del nido.

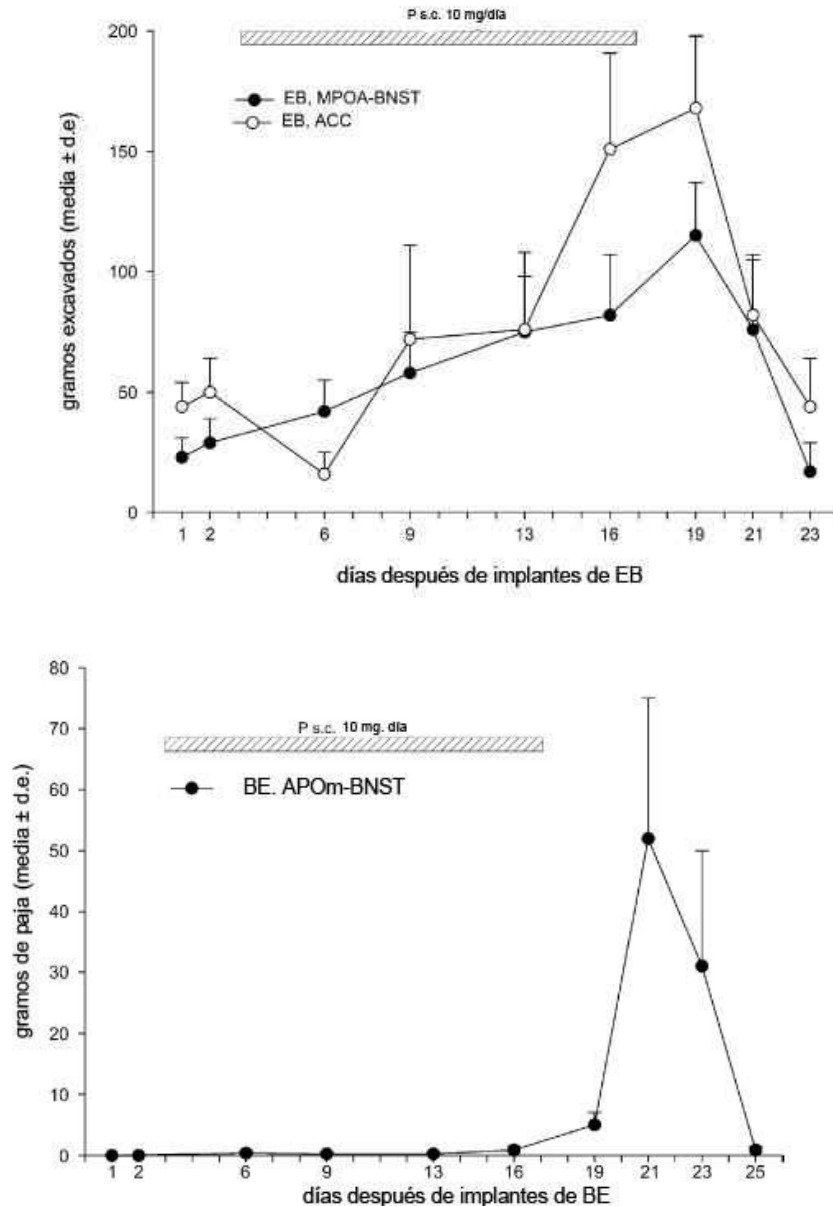


Figura 4. Panel superior. Cantidad de excavado por hembras ovx que respondían a cristales de BE implantados en APOm-BNST (n=10) o NuAcc (n=5) e inyectadas con progesterona durante el tiempo indicado. **Panel inferior.** Cantidad de acarreo de paja realizado por hembras ovx que respondieron al tratamiento mencionado (n=8). Hembras con aplicación de BE en NuAcc no mostraron una respuesta. (Adaptado de González-Mariscal y cols. 2005)

Con respecto a otras áreas que tienen un papel primordial en la construcción del nido en la coneja, Cruz y Beyer (1972) observaron que lesionar el área septal en la coneja afectaba la ejecución de la construcción del nido y alteraba el cuidado materno. Asimismo, en un estudio más reciente, Basurto y cols. (2018) encontraron que lesiones electrolíticas del área preóptica/hipotálamo anterior inhibían la construcción del nido generado por la administración de

estradiol y progesterona. Por lo que se concluyó que esta región es esencial para la inducción de la conducta de construcción del nido.

Habiendo considerado la influencia de las hormonas sobre regiones cerebrales, se procederá a describir en qué consiste la conducta de acarreo de paja y cómo se activa de forma externa.

1.4 Estímulos externos que modulan la conducta de acarreo de paja

Concretamente, la conducta de acarreo de paja consiste en un patrón motor estereotipado formado por 4 componentes secuencialmente realizados: (1) coleccionar la paja en la boca, (2) entrar a la caja nido, (3) cavar o raspar el piso de la caja nido y depositar la paja, (4) salir de la caja nido. La realización de esta secuencia comportamental definiría lo que se considera un ciclo de acarreo de paja que se repite de forma casi ininterrumpida de 30 a 40 veces en el espacio de dos a tres horas aproximadamente (Hoffman y Rueda-Morales 2009).

De forma experimental, se ha observado que en el día 28 de la gestación si se le permite a la coneja construir un nido dentro de una caja nido durante 30 minutos y luego, éste se remueve antes de que lo termine, la coneja continuará coleccionando paja para construir uno nuevo. Empero, si el nido se remueve después de 3 horas, la coneja generalmente no lo reconstruirá. Por otro lado, si se introduce un nido completo en la caja nido (250 g paja) antes de que la coneja empiece a coleccionar paja, dicha conducta se inicia, pero se inhibe al poco tiempo, aumentando otros comportamientos tales como revisar el interior de la caja nido o comer paja (Hoffman y Rueda-Morales 2009). Estos resultados muestran que las conejas acarrear la paja hasta que perciben el nido como terminado dentro de la caja nido. Es decir, la motivación para coleccionar y acarrear la paja se inhibe al percibir un nido completo.

Considerando la información presentada en esta sección, la conducta de construcción del nido en la coneja podría ser considerada como un modelo útil para definir áreas cerebrales involucradas en la modulación (inicio y terminación) de una conducta materna orientada a una meta (González-Mariscal y cols. 1994, 1996, 1998, Hoffman 2015, Cano-Ramírez y Hoffman 2017, 2018).

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Conducta materna y motivación

La conducta materna se define como una serie de conductas expresadas por la madre (durante la gestación, así como el período postparto) que son dirigidas al cuidado de los críos para contribuir a su supervivencia proporcionando alimento, cuidado y protección. Algunos ejemplos de la conducta materna involucran conductas preparto como la construcción del nido materno y conductas postparto como el amamantamiento, acicalamiento de los críos y la defensa de los críos frente a depredadores, entre otros (Brunton y Russell 2008, Olázabal y cols. 2013a, b).

La motivación, en términos generales, se define como un proceso gracias al cual los animales se energizan para generar comportamientos dirigidos a una meta omitiendo información ambiental irrelevante (Mogenson y cols. 1980, Valdés y cols. 2006, Palmiter 2008, 2011). El término “motivación maternal” se refiere a la motivación dirigida específicamente al despliegue de la conducta materna. Se ha visto que el parto se encuentra asociado con un aumento en la motivación maternal modificando la forma como se procesa y se responde conductualmente a la información proveniente del recién nacido, comparado con hembras en estro (Poindron, 2005, Numan, 2012).

Usualmente para la realización de una conducta se considera la existencia de dos fases secuenciales del comportamiento motivado o conducta orientada a una meta: apetitiva y consumatoria. La primera involucraría una búsqueda flexible de respuestas instrumentales para alcanzar una meta, seguida por una fase consumatoria que involucraría una conducta incondicionada (innata o no-aprendida). Las conductas consumatorias dentro de la conducta materna incluyen las conductas de construcción del nido, el despliegue de la conducta de amamantamiento, el acicalamiento de los críos y el acarreo de los críos. Típicamente las conductas consumatorias son asociadas con recompensa, placer y/o saciedad (Berridge y cols. 2005, Olázabal y cols. 2013a).

El tema de la motivación para alcanzar una meta es complejo, ya que involucra las condiciones del animal para energizarse y orientar su conducta hacia una meta, como podría ser un estado hormonal que generaría un estado materno motivacional con componentes conductuales para expresarlo. Se ha visto que un estímulo que genere una recompensa puede inducir un comportamiento de reforzamiento positivo, como ocurriría en la interacción de madre hacia sus críos (Broad y cols. 2006, Leckman y cols. 2004, Schultz 1998, 2011).

La motivación maternal implicaría que estímulos ambientales específicos dispararían respuestas consumatorias dirigidas al cuidado de los críos. Esta motivación sería regulada por regiones cerebrales que promoverían o inhibirían la ejecución de una acción motora adecuada respecto a circunstancias y estímulos específicos. Un ejemplo de ello sucede en la rata cuando el estímulo de encontrar un crío afuera del nido dispararía la conducta de acarreo de críos (Olázabal y cols. 2013 a, b).

Como se mencionó anteriormente, la conducta consumatoria típicamente se encuentra asociada con la recompensa o la respuesta hedónica. Con el fin de comprobar la atracción materna, Ferris y cols. (2005) investigaron en un grupo de ratas lactantes la participación de áreas cerebrales pertenecientes al sistema de recompensa integrado por regiones de la corteza prefrontal, núcleo accumbens (NuAcc) y el área ventro tegmental (AVT). Ellos encontraron una mayor activación de estas áreas por medio de resonancia magnética funcional en un grupo expuesto a sus críos en los primeros días postparto comparado con un grupo expuesto a cocaína, que también es un estímulo atrayente y competitivo.

La conducta materna es un caso interesante dentro del área de estudio de la motivación y de la conducta dirigida a una meta. En primer lugar, Olázabal y cols. (2013a) propusieron la existencia de un estado general de “motivación maternal” que promueve la expresión de una variedad de conductas específicas dirigidas al cuidado de los críos. Por contraste, la motivación sexual es asociada con una meta más específica (la cópula) y con respuestas consumatorias más limitadas (la lordosis, la monta y el patrón eyaculatorio).

En segundo lugar, no es claro en el caso de la conducta materna en dónde se encuentra la recompensa o respuesta hedónica. Por ejemplo, en el caso del acarreo de críos, uno puede especular que la respuesta hedónica se asocia con el acto de acarreo, con la interacción con sus críos o con alcanzar la meta de regresar todos sus críos al nido. Esto último es importante desde un punto de vista neurobiológico porque distintos circuitos cerebrales subyacen a la motivación y a la conducta apetitiva flexible (conducta orientada a una meta), la expresión de la conducta consumatoria (o conducta innata) y la respuesta hedónica.

En este punto, se vuelve necesario precisar las diferencias entre las respuestas de un comportamiento dirigido a una meta y en la conducta innata. El caso del comportamiento flexible involucra respuestas instrumentales que el animal realiza para obtener una recompensa o alcanzar una meta. Se puede observar que estas respuestas son flexibles, debido a que el animal presenta diferentes tipos de comportamiento, de acuerdo con las circunstancias ambientales, para alcanzar una meta. Por ejemplo, en el laboratorio, la rata puede asociar presionar una palanca para conseguir una recompensa, que sería una conducta que la rata de otra forma no realizaría para obtener comida, pero la rata posee flexibilidad cognitiva para aprender que presionar una palanca le otorgaría una recompensa. Esta respuesta se podría considerar como flexible porque la rata cambia su respuesta de acuerdo a si se encuentra saciada o no. Es decir, la rata saciada no realizará esta conducta, pero una rata hambrienta lo haría.

La expresión de comportamientos flexibles involucra procesamiento frontal y prefrontal debido a que el animal necesita integrar la información de diferentes fuentes (sensorial, estado interno de saciedad, información espacial, memoria) para elegir la respuesta comportamental adecuada. Mientras que el comportamiento no flexible es un comportamiento de estímulo-respuesta que implica que automáticamente dispara la respuesta y no existe flexibilidad cognitiva. Algunos ejemplos del comportamiento no flexible son los hábitos y la conducta innata como el acarreo de críos y la agresión maternal. Esta última clase de comportamiento también son referidos consumatorios o no condicionados, ya que no son aprendidos.

2.1.1 Conducta orientada a una meta y formación de hábitos

Se ha observado que las respuestas comportamentales pueden clasificarse con respecto a su flexibilidad, como puede observarse en el comportamiento orientado a una meta y con la formación de hábitos. Se comenzará hablando del comportamiento orientado a una meta considerando que implica flexibilidad comportamental a través de la adaptación a cambios ambientales basados en representaciones internas de recompensa (Killcross y Coutureau 2003, Verschure y cols. 2013).

Operacionalmente, la conducta flexible y orientada a una meta se caracteriza por la capacidad de ser condicionada a la obtención de una recompensa. En la práctica, estudios de la conducta orientada a una meta involucran el condicionamiento de una conducta arbitraria (por ejemplo, jalar una cadena o presionar una palanca). Otra característica importante de la conducta flexible y orientada a una meta es su capacidad para adaptarse a cambios en el estado de saciedad. Por ejemplo, una rata condicionada a presionar una palanca para recibir una recompensa de alimento desplegaría esta conducta cuando tiene hambre, pero no después de saciarse.

Por otra parte, la conducta flexible y orientada a una meta puede convertirse en una conducta inflexible y automática (el hábito) a través de la repetición. Los hábitos son considerados como acciones poco flexibles realizados de forma regular que se asocian con el ambiente hasta automatizarlos (Voon y cols. 2015). Si una acción se realiza con cierta regularidad, se fortalecerán sus asociaciones con señales ambientales automatizándose los comportamientos que no requieren planeación y organización para generar escenarios accesibles en el futuro (Gillan y cols. 2016). Esto puede ocurrir en el caso del ejemplo mencionado anteriormente: después de varias repeticiones (a lo largo de días de entrenamiento), la respuesta de la rata a la palanca se convertirá en una respuesta automática e inflexible (un hábito). Además, la rata presionará la palanca en el estado de hambre, así como en el estado de saciedad (Cardinal y cols. 2002).

En el caso de la conducta materna, se ha observado en ratones y ratas la tendencia a presionar una palanca una cierta cantidad de veces hasta consolidar esa conducta para recuperar a sus críos, que se encuentran separados físicamente. Se puede observar que este comportamiento se convierte en un hábito después de cierto tiempo de haber ejercitado el patrón motor referido (Hauser y Gandelman 1985, Lee y cols. 2000).

En este momento, deben resaltarse algunos puntos, el comportamiento de presionar una palanca comenzó siendo flexible y se volvió un hábito por medio de su repetición. En el caso de conductas maternas, estos comportamientos no son aprendidos. Una madre primeriza mostrará las conductas de forma casi indistinguible de una madre con experiencia, por lo que se estaría viendo un comportamiento no condicionado o innato.

Algunos estudios han demostrado flexibilidad en la expresión de la conducta materna, con respecto a su capacidad de modularse frente a cambios en las contingencias ambientales. Por ejemplo, existe un cambio en la intensidad de los cuidados e interacción que la madre rata le da a sus críos en diferentes momentos después de haber dado a luz, el cual disminuye durante los días postparto 12 al 16 comparado con los días 4 al 8. Este cambio en la respuesta hacia los críos depende de las señales externas dependientes del crecimiento de los críos. Por lo que el cambio observado no representa una respuesta automática y considera el desarrollo de los críos en los días postparto, conforme van creciendo necesitan menos de la madre (Wansaw, y cols. 2008).

A grandes rasgos, puede decirse que la conducta orientada a una meta es más precisa, pero requiere un mayor esfuerzo y atención, mientras que los hábitos y conducta innatas se consideran respuestas automáticas que son disparadas por un estímulo (Grahn y cols. 2008, Balleine y O'Doherty 2010, Gillan y Robbins 2014, Cohen y Padoa-Schioppa 2016).

Llegado a este punto, es importante considerar la forma en que se representan estos modelos de comportamiento a nivel cerebral. Una de las formas ha sido por medio de grabaciones electrofisiológicas. Por ejemplo, en un estudio se identificaron poblaciones neuronales en el estriado del mono, donde se observó que el comportamiento flexible y orientado a una meta generaría una mayor actividad en el núcleo caudado, mientras que los hábitos aumentarían la actividad del putamen (Hadj-Bouziane y cols. 2013). Esto será muy importante posteriormente puesto indica la existencia de áreas cerebrales diferenciables de acuerdo al tipo de comportamiento realizado.

Finalmente, considerando que la conducta materna involucra componentes motores específicos que son reflejo de la integración de diferentes estímulos maternalmente relevantes, debe conocerse qué regiones cerebrales la generan. Por lo que en la siguiente sección se presentará un esbozo acerca de ellas y cómo es que individualmente contribuyen a la conducta.

2.1.2 Regiones cerebrales que regulan la conducta materna

Los comportamientos que integran una conducta materna involucran patrones comportamentales considerados estereotipados y fijos entre especies, como lo podría ser el acarreo de críos en la rata (Fleming y cols., 1999). Se ha observado que para que se exprese alguno de estos patrones motores, se necesita de la participación de áreas cerebrales clave como lo son APOm y BNST que cuentan con grupos de neuronas especializadas en la conducta materna (Numan y Stolzenberg 2009, Stolzenberg y Numan 2011).

Experimentos han demostrado que la lesión de del APOm y BNST altera la realización de algunos aspectos que conforman a la conducta materna como lo serían el acarreo de críos y la construcción del nido en la rata, aparte de que se encuentran involucrados en la modulación de la ansiedad y la motivación durante la gestación (Oxley y Fleming 2000, McHenry y cols. 2015). Por otra parte, se ha encontrado que las áreas mencionadas presentan conexiones con regiones relacionadas con la motivación y la recompensa como lo son AVT, NuAcc y CPFm, lo que llevaría a considerar que su participación en conjunto sugiere la existencia de circuitos maternos complejos (Saltzman y Maestripieri 2011, Robinson y cols. 2011). Como puede observarse en la Fig.4, que para el presente trabajo se ha adaptado y propuesto un modelo de regulación de la conducta materna (Numan y Stolzenberg 2009, Numan 2012).

En este modelo se observa que diferentes áreas del cerebro interactúan entre sí para regular diferentes aspectos de una misma conducta, por ejemplo, por medio de la corteza prefrontal se integran diferentes estímulos sensoriales presentes en el medio ambiente. Mientras que las señales producidas por el ambiente hormonal interno serían integradas por el APOm y la BNST que cuentan con una cantidad importante de receptores hormonales. Lo que significa que mediante la interacción de estas áreas se lleva a cabo una conducta que implica la detección de una variedad de señales del medio ambiente, como lo es el acarreo de paja en la coneja.

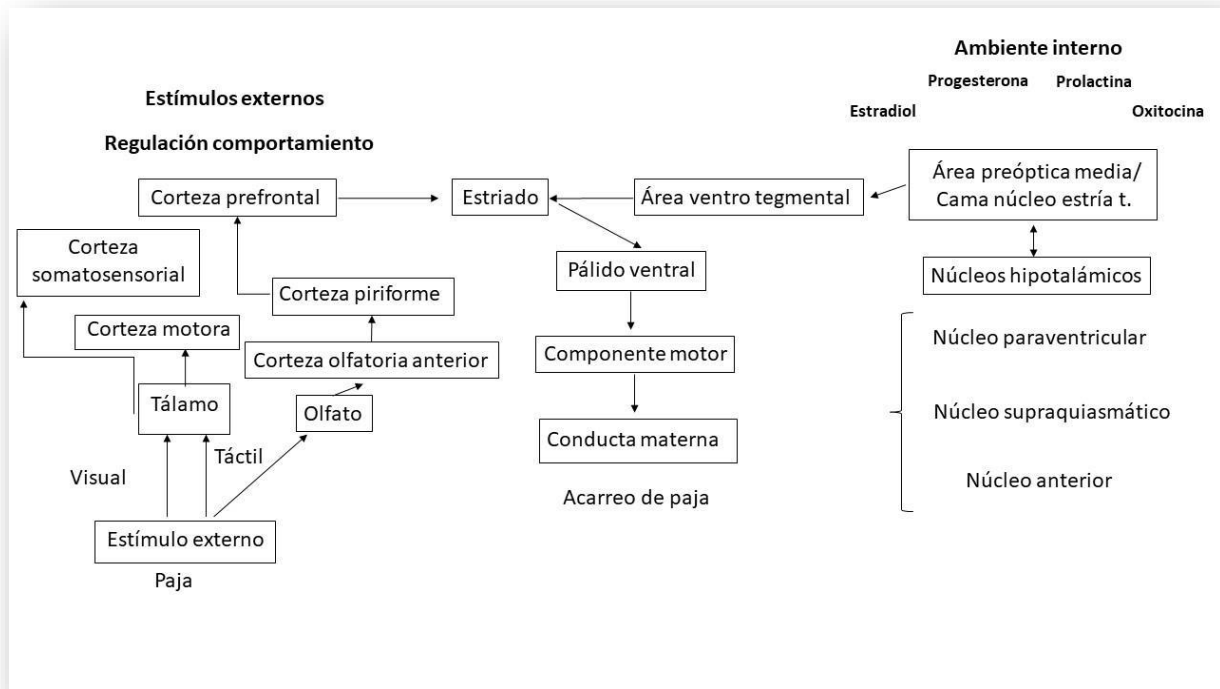


Figura 5. Modelo general de las bases neuronales del comportamiento maternal
(Adaptado de Numan y Stolzenberg 2009).

Aunque no existen muchos comportamientos con características similares a la conducta de acarreo de paja, uno que sería equiparable en el tipo de patrón motor realizado es la conducta de acicalamiento en la rata, las dos conductas consisten en la expresión serial de componentes conductuales distintos.

En el caso del acicalamiento en la rata, éste consiste en 4 componentes típicamente expresados en la siguiente secuencia: (1) una serie de movimientos en forma de elipse alrededor de la nariz, (2) series de movimientos unilaterales, cada uno realizado por una pata, (3) serie de movimientos bilaterales realizado simultáneamente por ambas patas, (4) lamido del cuerpo, precedido por una transición cefalocaudal moviendo la boca y la lengua acicalando las patas hacia el cuerpo (Berridge y cols. 2005). En breve, se ha encontrado que la expresión serial típica de los componentes motores del acicalamiento involucran la participación de una región discreta del estriado dorsal (Adridge y Berridge 1998, Berridge y cols. 2005).

Como se mencionó anteriormente, la conducta de acarreo de paja también consiste en la expresión serial de conductas distintas: (1) coleccionar la paja en la boca, (2) entrar a la caja nido, (3) cavar o raspar el piso de la caja nido y depositar la paja, (4) salir de la caja nido. Anteriormente se habló de forma general acerca de las áreas cerebrales que participan en la conducta materna, pero no se profundizó sobre ellas, por lo que a continuación se realizará un breve resumen de ellas.

2.2 Corteza cerebral

La corteza cerebral se divide en 4 lóbulos: frontal, temporal, parietal y occipital. En términos generales, estos lóbulos involucran procesamiento de información sensorial de las modalidades visual, auditiva, motor y somatosensorial. En los mamíferos, la corteza cerebral está formada por 6 capas corticales que son conglomerados de células nerviosas por medio de las cuales se integra, procesa y proyecta la información de diferentes áreas cerebrales (Fig. 5) (Shepherd, 2011, Zilles y Amunts 2010).

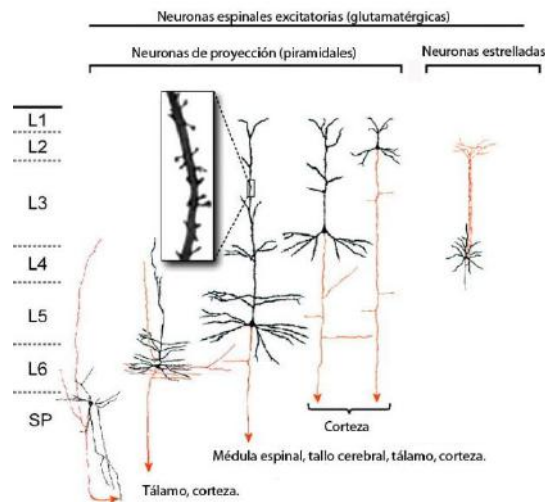


Figura 6. Tipo de neuronas de la corteza cerebral (*Adaptado de Kwan y cols. 2012*).

2.2.1 Corteza prefrontal

La corteza prefrontal que corresponde anatómicamente a la corteza del polo anterior del cerebro de los mamíferos tiene como particularidad recibir proyecciones del núcleo mediodorsal del tálamo (Goldstein y cols. 2011, Ouhaz y cols. 2015). Históricamente, esta región se ha identificado como la parte que va del lóbulo frontal del cerebro rostral a la corteza motora de asociación. La CPF se integra por la corteza prefrontal medial (infralímbica-área de Brodmann 25, prelímbica-área de Brodmann 32 y corteza cingulada anterior), la corteza orbitofrontal (área ventral y ventrolateral de la corteza prefrontal), la corteza premotora (la corteza dorsal) y la corteza insular (lateral y ventrolateral) (Tekin y Cummings 2002).

La CPF se pensaba que sólo estaba implicada en el control motor, pero con el paso del tiempo se ha observado que participa en funciones más complejas, como lo serían el control ejecutivo, comportamiento social, atención, memoria y conciencia. Una de las razones por las cuales cuenta con esa diversidad de funciones es debido su anatomía y a las proyecciones que conectan de forma cortical y subcortical (Catani y cols. 2012, Yeterian y cols. 2012).

Así, la CPF es una estructura importante en las llamadas funciones ejecutivas para orquestar pensamiento y acción de acuerdo con objetivos internos desarrollando la capacidad predictiva del organismo (Gu, 2002, Fuster, 2014, 2015, Moorman y Aston-Jones 2015). Esto resulta importante debido a que para que exista flexibilidad en la conducta orientada a una meta es necesario coordinar procesos sensoriales y motores adaptándolos a las condiciones ambientales presentes (Miller y Cohen 2001, Mushiake y cols. 2006, Barbas y Zikopoulos 2007, Everitt y Robbins 2016).

Con respecto a su participación en la conducta materna, existen trabajos que han observado en mamíferos que cuando las hembras se vuelven madres, el olor de los críos promueve aspectos de la conducta materna, modificando la aversión de las hembras en estro para interactuar y proteger a los críos (Fleming y Rosenblatt 1974, Fleming y cols. 1979, González-Mariscal y cols. 2004, Chirino y cols. 2007, Nishitani y cols. 2014). En humanos, la exposición de una madre a estímulos asociados con su propio bebé provoca una fuerte respuesta neuronal en la corteza orbitofrontal de la CPF (Strathearn y cols. 2008) y una respuesta neuronal aumentada de regiones de la CPF que regulan interacciones maternas con sistemas de recompensa (Lorberbaum y cols. 1999, Musser y cols. 2012, Lonstein y cols. 2015).

2.2.2 Corteza Prefrontal Medial (CPFm)

Esta región presenta tres subdivisiones que corresponden a las estructuras de la línea media de la corteza frontal que en general se dividen en: corteza cingulada anterior, área prelímbica y área infralímbica (Afonso, y cols. 2007, Barbas y Zikopoulos 2007, Euston y cols. 2012, Sabihi, y cols. 2014a, b). A grandes rasgos, se ha determinado que la CPFm participa en el control adaptativo del comportamiento y realiza la retroalimentación acerca del éxito de una acción (Laubach y cols. 2015).

Su organización a nivel de proyecciones (Fig. 6) muestra una amplia participación con áreas involucradas en la motivación o en la toma de decisiones como los son la corteza cingulada anterior (CCA), corteza orbitofrontal (COF), Núcleo Accumbens (NuAcc). Existe evidencia de una homología anatómica de estas áreas entre roedores, primates no humanos y humanos (Price 2007, Bissonette y cols. 2013). Así, la corteza cingulada anterior del roedor corresponde al área de Brodmann 24 en humano y en el primate no humano, el área prelímbica corresponde al área de Brodmann 32 y el área infralímbica corresponde al área de Brodmann 25. También, la CPFm se encuentra inervada por fibras dopaminérgicas originadas en el área ventro tegmental (Heidbreder y Groenewegen 2003, Cassaday y cols. 2014).

En cuanto a su funcionalidad, esta región codifica el valor de un estímulo, participa en la selección de acciones, además de que realiza asociaciones entre estímulo-respuesta (Moscarello y cols. 2010) y tiene un rol importante dentro del procesamiento emocional (Leuner y cols. 2010, Etkin y cols. 2011).

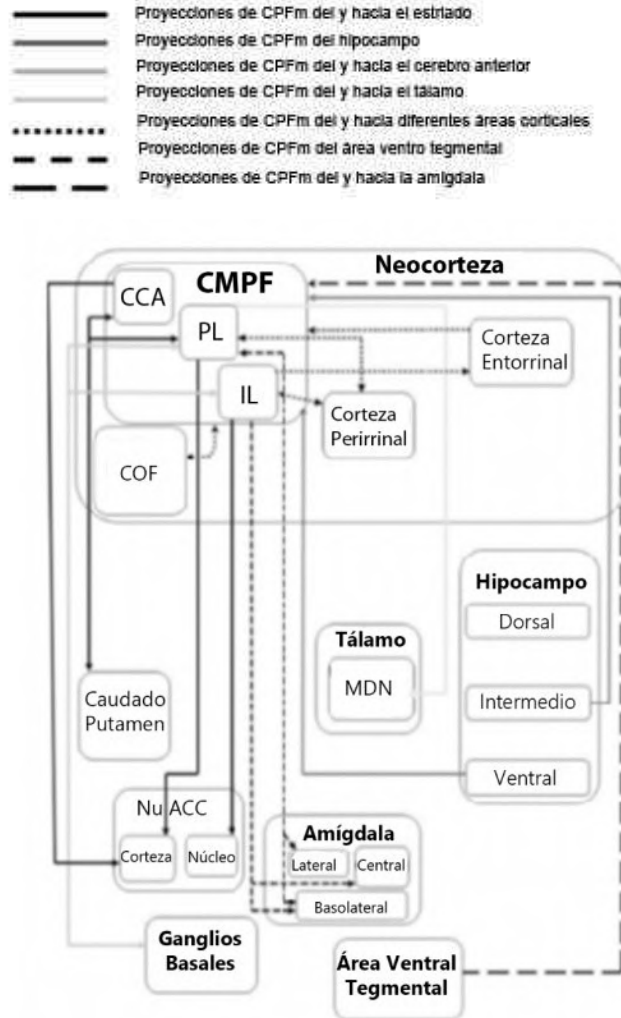


Figura 7. Conexiones de las subregiones de la corteza prefrontal medial con otras regiones cerebrales. IL: área infralímbica, PL: área prelímbica, COF: corteza orbitofrontal; CCA: corteza cingulada anterior, NuAcc: núcleo accumbens (Adaptado de Cassaday y cols. 2014).

Afonso y cols. (2007) mostraron que si se realiza una lesión extensa en la CPFm de ratas hembras, que incluyera la CCA, área prelímbica e infralímbica, y se mide su conducta materna después del parto, se observa una alteración. Esto se vería reflejado en una desorganización del acarreo de críos, ya que presentan latencias más largas para su realización y término. Lo que se interpreta como una disfunción en la capacidad de mantener la atención a los críos frente a otros estímulos presentes en el ambiente.

Por otra parte, Pereira y Morrell (2011) realizaron inactivaciones transitorias específicas del área prelímbica e infralímbica en ratas en momentos temprano y tardío postparto y encontraron que estas áreas están involucradas en el mantenimiento de la motivación para interactuar con los críos. Funcionalmente, conforme los críos crecen, la respuesta materna se vuelve menos dependiente del APOm y el área infralímbica, para distribuirse de manera más amplia añadiendo componentes al circuito materno incluyendo al área prelímbica, la cual facilitaría la expresión de los componentes del comportamiento materno tardío.

Para finalizar esta sección, puede decirse que aun cuando se puede considerar a la CPFm como una región que participa en el comportamiento mediante la interacción de las tres áreas que la conforman, también es cierto que cada una de las áreas que la integran presentan ciertas características y funciones específicas las cuales serán explicadas a detalle en las siguientes secciones.

Corteza cingulada anterior

La corteza cingulada anterior es una región (área de Brodmann 24) localizada alrededor del rostro del cuerpo calloso que cuenta con numerosas proyecciones a núcleos motores del tallo cerebral y la amígdala. Se ha considerado que está involucrada en evaluar costos y beneficios, además de realizar un monitoreo de las acciones de acuerdo a su valor para explorar la alternativa más adecuada (Euston y cols. 2012, Silvetti y cols. 2014, Laubach y cols. 2015, Kolling y cols. 2016). Además de que se ha visto involucrada en la toma de decisiones, interacciones sociales y en la generación de respuestas relacionadas con la empatía y el dolor (Devinsky y cols. 1995, Lavin y cols. 2013, Fuchs y cols. 2014).

A nivel de conectividad, se ha observado la existencia de aferencias cortico-corticales de áreas parietales y sensoriales, asimismo cuenta con una conexión con la ínsula y con el sistema límbico (Dalley y cols. 2004, Lavin y cols. 2013). Experimentos realizados para confirmar la funcionalidad de esta estructura han mostrado que esta área se activa durante la realización de respuestas incorrectas, así como de las consecuencias de las elecciones (Carter y cols. 1998, Wallis y Kennerley 2011). Esto sugiere que su actividad es dependiente de la detección de errores propios, como de los observados en alguien más (de Brujin y von Rhein 2012),

Aunque no existe mucha investigación acerca de la participación de esta área en la conducta materna de animales, en humanos se ha observado que vocalizaciones infantiles provocan un aumento de actividad neuronal en regiones cinguladas anteriores, así como en la amígdala (Seifritz y cols. 2003, Sander y cols. 2007). En el caso de las respuestas aversivas que pueden presentar padres frente al llanto de sus hijos, se observaría una hipoactividad de la porción dorsal de la CCA (Li y cols. 2018).

Área prelímbica

El área prelímbica se encuentra ubicada en la parte caudal de la CPFm (Brodmann área 32) y ha sido denominada visceromotora, ya que cuenta con proyecciones hacia los principales centros autonómicos subcorticales (Gabbott y cols. 2003, Vertes 2004). Se encuentra conectada con la ínsula, el NMD del tálamo, la amígdala basolateral, así como el estriado ventral. La región dorsal del área prelímbica en roedores es similar a la del primate y el humano (Vogt y cols. 2013). Se ha observado su participación en procesos cognitivos y de toma de decisión, incluyendo memoria de trabajo, además de la implementación de estrategias comportamentales (Powell y Redish 2014).

Con respecto a su función dentro de la conducta materna, se ha considerado que el área prelímbica tiene un papel importante en la expresión de la agresión frente a depredadores, además de que regula la ansiedad maternal (Nephew y cols. 2009). Una de las razones es que es un área que cuenta con una gran cantidad de neuronas sensibles a oxitocina (Sabihi y cols. 2014a). Así, en experimentos hechos con ratas madres colocadas en una jaula que contenía a sus críos de 3 días de edad, se observó que el bloqueo de los receptores a oxitocina del área prelímbica provocaba una disminución de la latencia para atacar a un intruso colocado en el mismo espacio (Sabihi y cols. 2014b). Esto ha sugerido la importancia de esta área para modular la conducta de agresión maternal durante el periodo postparto temprano.

Área infralímbica

El área infralímbica (área de Brodmann 25) tiene un rol fundamental dentro de la adquisición, la consolidación y la extinción de un comportamiento en paradigmas que involucran el consumo de drogas, la regulación del miedo (Barker y cols. 2014) y en la adquisición de hábitos (Coutureau y Killcross 2003; Gabbott y cols. 2003). Cuenta con proyecciones restringidas casi exclusivamente a estructuras límbicas, teniendo al núcleo reuniens como la terminación talámica

con mayor cantidad de fibras que parten del área infralímbica, además de contar con una distribución ventral al estriado e inervación de la amígdala central y basolateral, así como del hipotálamo. (Room y cols. 1985).

En el caso de su función en la conducta materna, existen pocos estudios que involucren a esta región de manera específica. Aunque, sí se ha encontrado que el área infralímbica es clave para controlar las respuestas comportamentales a estímulos aversivos (Milad y Quirck 2002) y también existe evidencia acerca de que la integridad de esta área es importante para la expresión de actividad locomotora en respuesta a señales sensoriales (vista u olfato), lo que se explica por sus conexiones hacia el sistema ascendente de alertamiento (Recavarren y cols. 2005, Valdés y cols. 2006).

A continuación, se hablará sobre la interacción del área prelímbica y el área infralímbica dentro del comportamiento y cómo son necesarias para su expresión o inhibición.

Interacción entre corteza prelímbica e infralímbica para generar la conducta

En este punto es importante hacer un paréntesis para comentar acerca de cómo la actividad entre las áreas prelímbica e infralímbica genera un balance entre la actividad inhibitoria y excitatoria (Hok, y cols. 2005). Un caso específico con respecto del cambio de funcionalidad en estas áreas puede observarse en la expresión del miedo en ratas (Fig. 7) donde éste genera una mayor activación neuronal de la corteza prelímbica, mientras que su extinción provoca una activación mayor de la corteza infralímbica (Sotres-Bayon y Quirck 2010).

En la figura 8 puede observarse la participación selectiva del área prelímbica e infralímbica, de acuerdo a un tono auditivo que coincidía con un choque eléctrico que se le daba a la rata dentro de la jaula. Por lo que se presenta una asociación entre el tono y el miedo a experimentar dolor. La expresión condicionada del miedo en respuesta al tono (lado izquierdo, Fig. 7) involucra una vía neuronal que consiste en proyecciones excitatorias del área prelímbica (PL) a la amígdala basolateral (BA) y del BA a la amígdala centromedial (CeM), la cual promueve la respuesta de miedo. Por otro lado, después de aplicar el mismo tono varias veces sin aplicar el choque eléctrico, la respuesta de miedo disminuye, reflejando el proceso de “extinción del miedo” (lado derecho, Fig. 7). La vía neuronal que subyace la extinción del miedo consiste en una proyección excitatoria

del área infralímbica (IL) a las células intercaladas de la amígdala (ITC), las cuales inhiben la CeM, así inhibiendo la respuesta del miedo (Sotres-Bayon y Quirck 2010).

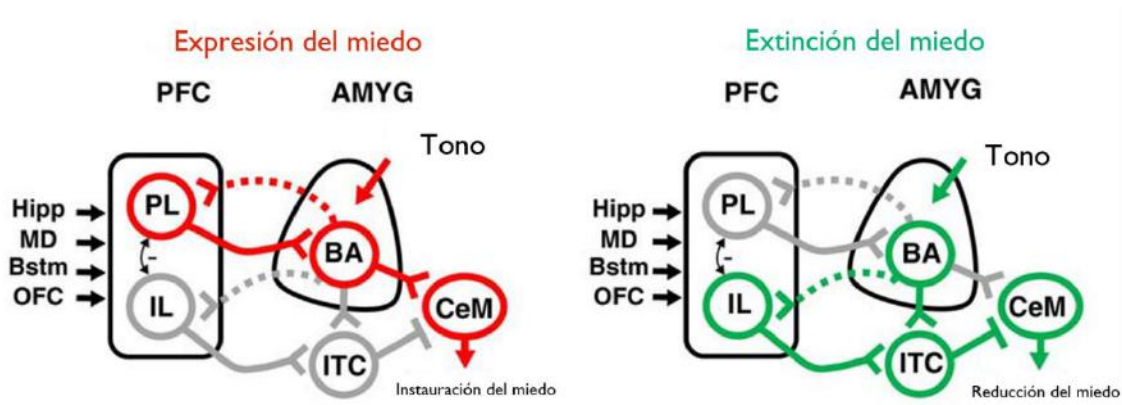


Figura 8. Representación de circuitos corticales involucrados en la expresión y reducción del miedo. PL: área prelímbica, IL: área infralímbica, BA: amígdala basolateral, CeM: amígdala centromedial, ITC: células intercaladas de la amígdala, Hipp: hipocampo, MD: tálamo mediodorsal, Bstm: monoaminas del tallo cerebral, OFC: corteza orbitofrontal (*Adaptado de Sotres-Bayon y Quirck 2010*).

Empero, esta actividad entre la corteza prelímbica e infralímbica, también puede observarse en el estrés post traumático, ya que la presencia de un estímulo aversivo activa el área prelímbica asociada con la generación de la respuesta al miedo, ansiedad o pánico; pero cuando se logra controlar, se observa que aumenta la actividad del área infralímbica (Shin y cols. 2006, Maier y Watkins 2010, Giustino y Maren 2015).

Finalmente, se mencionará que en la regulación del consumo de drogas, el modelo de interacción entre el área prelímbica e infralímbica promovería o inhibiría el consumo, respectivamente (Moorman y cols. 2015), lo que puede exponer la existencia de una dicotomía que guía la ejecución e inhibición del comportamiento. A continuación, se desarrollarán el resto de las regiones que conforman la CPF relevantes a nuestra investigación.

2.2.3 Corteza orbitofrontal

La corteza orbitofrontal (área de Brodmann 11 y 47) se encuentra en la superficie ventral del lóbulo frontal, su rol es integrar información ambiental para asignar un valor a los estímulos y también participa en el proceso de toma de decisiones (van Hasselt y cols. 2012). En otros trabajos, se ha observado su contribución para evaluar los resultados de una acción y poder modificar el desempeño cuando su valor se modifica (Balleine y cols. 2011, Wallis y Kennerley 2011).

Las conexiones de esta área se dividen en orbital y medial: la red orbital recibe aferencias de áreas corticales asociadas con los sistemas sensoriales, como visual, gusto, olfato y somatosensorial (Rolls 2000, Schoenbaum y cols. 2009), mientras que la porción medial cuenta con interconexiones con áreas límbicas involucradas con la regulación emocional (Christakou y cols. 2004, Price 2007, Rushworth y cols. 2007, Chamberlain y cols. 2008; Schoenbaum y cols. 2009, Moorman y Aston-Jones 2015). A nivel neuroanatómico, la COF se encuentra poco desarrollada en roedores, a diferencia de los que sucede en primates y humanos (Rolls 2000, Rolls 2004, Wallis 2012).

Con respecto a la investigación realizada acerca de la participación de esta área en la conducta materna, se ha observado en humanos que madres primerizas al escuchar el llanto de sus hijos presentaban activación de la COF derecha, que implicaría la realización de respuestas maternas dirigidas a sus hijos (Lorberbaum y cols. 2002). Esta área también se relaciona con estados anímicos positivos cuando una madre ve una fotografía de su hijo recién nacido comparado con niños no cercanos o adultos (Nitschke y cols. 2004). También se ha visto que la COF participa en lo que se denomina como amor maternal, ya que se activa en la madre en respuesta a la sonrisa de su hijo o el llanto, por lo que se sugiere su contribución en mecanismo neuronal de protección a su hijo (Noriuchi y cols. 2008).

2.2.4 Corteza premotora

La corteza premotora (Brodmann 6, 44 y 8) participa en la preparación de movimientos que implicarían reaccionar de forma rápida y adecuada (Schubotz y von Cramon 2003). Aunque también se ha visto que tiene un rol en la codificación espacial, así como en el aprendizaje asociativo (Gallese y cols. 1996). Esta área se encuentra conectada con la corteza motora primaria, así como de otras áreas corticales y proyecta a regiones del putamen (Moorman y Aston-Jones 2015, Schoenbaum y cols. 2009, Christakou y cols. 2004, Rushworth y cols. 2007).

Con respecto a la existencia de estudios que muestren la participación de esta área en aspectos específicos de la conducta materna, no existe mucha información. Lo que sí se ha observado es que existen respuestas específicas hacia rostros de infantes por parte de adultos en las regiones premotoras laterales, área motora suplementaria, ínsula izquierda y el circuito tálamo-cingulado (Ranote y cols. 2007, Swain y cols. 2007, Caria y cols. 2012). Esto implicaría generar una acción preparatoria para interactuar con el niño (Leibenluft y cols. 2004, Nachev y cols. 2008)

donde la magnitud de la respuesta sería valorada de acuerdo al rostro presentado y el apego emocional evocado a partir de él.

2.2.5 Corteza piriforme

La corteza piriforme (área de Brodmann 27) forma parte del sistema olfatorio y cuenta con aferencias directas del bulbo olfatorio principal, también se puede observar que se encuentra conectada sinápticamente con áreas como el núcleo olfatorio anterior y la amígdala (Bekkers y Suzuki 2013, Mainland y cols. 2014, Baum y Chery 2015). En los animales proporciona ventajas para la exploración del medio ambiente y facilita el establecimiento de estrategias para codificar la información.

En el caso de las diferencias entre las conexiones del sistema olfatorio, la corteza piriforme se encuentra mayormente conectada con la corteza orbital, la cual a su vez recibe información del núcleo mediodorsal del tálamo (NMD) (Benjamin y cols. 1978), y presenta aferencias de la corteza prepiriforme, la amígdala y la corteza temporal inferior (Rolls 2000, Price 2007). En los mamíferos, la información del bulbo olfatorio principal proyecta hacia el hipotálamo a través de la estría terminal (Wilson 2009, O'Connell y Hofmann 2011).

Con respecto a la conducta materna, la corteza piriforme tiene un rol importante en el procesamiento de señales olfativas para identificar los estímulos del medio ambiente y asociarlos con su experiencia previa, esto sucede en diferentes mamíferos, quienes por medio del procesamiento olfatorio y del estado reproductivo se aproximan o alejan de críos (Rosenblatt 1967, González-Mariscal y cols. 2004, Chirino et al. 2007, Lévy y Keller 2009).

Un ejemplo más particular ocurre con las ratas no gestantes quienes después de algunos días de haber interactuado con los críos, comienzan a expresar conductas de amamantamiento y acarreo, aunque no cuentan con la concentración hormonal óptima para la expresión de esta conducta (Numan y Stolzenberg 2009, Numan 2012). Asimismo, ratas no gestantes con lesiones en el bulbo olfatorio accesorio muestran una menor latencia para expresar las conductas maternas anteriormente mencionadas (Fleming y Rosenblatt 1974). En el caso de la coneja, la realización de lesiones en el epitelio olfatorio resulta en una interacción de las conejas vírgenes hacia los críos, quienes usualmente no responden a ellos (Chirino y cols. 2006).

En este punto cabe señalar que se han abarcado a grandes rasgos las características de las regiones de la CPF involucradas en la presente investigación. Sin embargo, en un segundo momento de este trabajo, se buscó estudiar las regiones que conforman a las llamadas vías cortico-estriatales, como las involucradas en lograr el correcto desempeño de una acción dirigida a una meta, así como en la expresión de conducta innata.

2.3 Ganglios basales

Los ganglios basales se refieren a un grupo de núcleos subcorticales responsables del control motor (Fig. 8) conformados por: estriado dorsal (núcleo caudado y putamen), estriado ventral (núcleo accumbens), globo pálido (porción interna y externa), núcleo subtalámico y sustancia nigra (pars compacta y pars reticulada) (Lanciego y cols. 2012).

Entre las funciones en las que se encuentran involucrados se encuentran aprendizaje motor, planeación, toma de decisiones y respuestas conductuales a la recompensa (Reig y Silberberg 2014). En conjunto, estas regiones interactúan para realizar una coordinación sensoriomotora, que incluye la selección, iniciación y terminación de las acciones. Para la ejecución de un comportamiento motor existen circuitos paralelos funcionalmente: el directo que promueve el comportamiento y el indirecto que lo inhibe (Graybiel 1997, Graybiel 2005, Freeze y cols. 2013).

En el caso de la vía directa que aumenta la excitación cortical y promueve una conducta se conforma de la siguiente forma: corteza motora-estriado-globo pálido segmento interno y sustancia nigra reticulada – tálamo – corteza motora. Mientras que la vía indirecta consiste en: corteza motora – estriado – globo pálido segmento externo o núcleo entopeduncular (en otras especies) – núcleo subtalámico – globo pálido segmento interno y sustancia nigra reticulada – corteza motora, la cual disminuye la excitación cortical e inhibe la conducta.

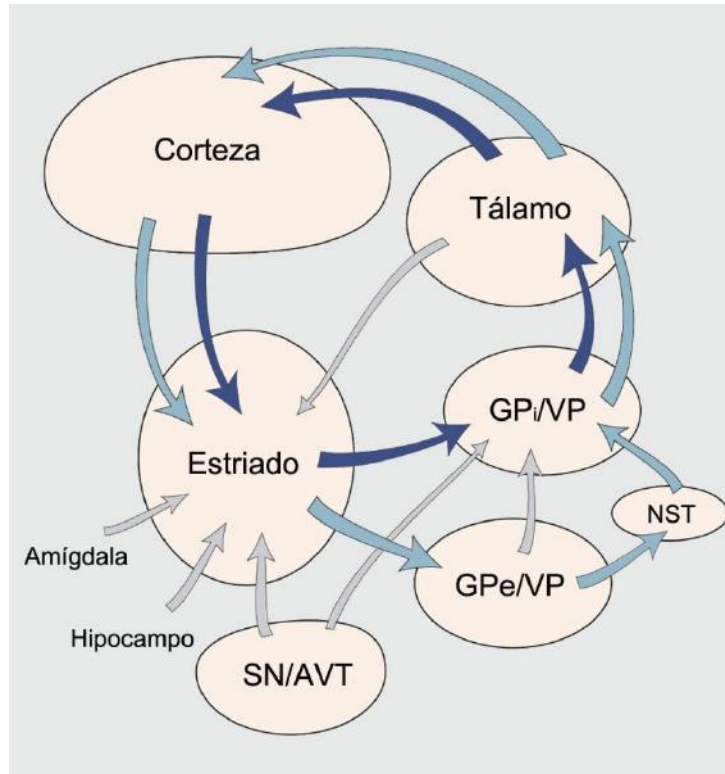


Figura 9. Ilustración esquemática de estructuras clave y vías de los ganglios basales (*Modificado de Haber 2016*). Flechas gris oscuro representan la vía directa; flechas gris claro representan la vía indirecta. Abreviaciones: SN- sustancia nigra, AVT – área ventro tegmental, GPe – globo pálido segmento externo, GPi – globo pálido segmento interno, NST – núcleo subtalámico, VP – pálido ventral.

Partiendo de esto, a continuación, se describirá el estriado, que es una de las áreas que conforman los ganglios basales y que presenta una conectividad importante con regiones de la corteza descritas en la sección anterior.

2.3.1 Estriado

Se ha denominado como una estructura heterogénea que anatómicamente representaría un punto de integración de la selección de respuesta y los procesos adaptativos (Verstynen 2014). Esta área en humanos se encuentra dividida por medio de la cápsula interna en caudado y putamen. Es un área de integración cortical y talámica (Grahn y cols. 2008, Hart y cols. 2014, Reig y Silberberg 2014, Yager, y cols. 2016) que también recibe proyecciones de la ínsula y la amígdala. La información procesada en estas vías se encuentra modulada por dopamina mediante fibras provenientes del AVT y sustancia nigra pars compacta (Pennartz y cols. 2009).

Siendo que es importante considerar la similitud entre especies, Heilbronner y cols. (2016) confirmaron la existencia de una homología del estriado con primates no humanos y con la rata observando una similitud en la recepción de proyecciones de CCA, COF, amígdala y el hipocampo (Di Martino y cols. 2008).

Estriado dorsal

Es considerada una estructura cerebral en la que convergen diferentes regiones corticales que se separan en circuitos paralelos funcionales (descritos más a detalle en la sección 2.4) (Rock y cols. 2016). Se encuentra dividido en núcleo caudado y putamen. A grandes rasgos, se ha señalado que el núcleo caudado procesa la información cognitiva, mientras que el putamen integra los elementos sensoriomotores de una conducta (Szczyпка y cols. 2001, Yanike y Ferrera 2014). Tiene un papel en el procesamiento motor y emocional (Carretié 2009) y se ve involucrada en el aprendizaje de las acciones y los resultados de la recompensa (Balleine y cols. 2007, Kurniawan y cols. 2013)

En el conejo existe una configuración anatómica similar a los humanos, ya que el caudado y el putamen se encuentran separados por medio de la cápsula interna, lo que no se presenta en roedores (Muñoz-Moreno, y cols. 2013). Con respecto a sus proyecciones, se ha visto que cuenta con aferencias topográficas de la corteza, donde porciones dorsales y laterales de la corteza proyectan hacia regiones dorsales y laterales del estriado (Pan y cols. 2010).

Caudado

Es una estructura que permite responder de forma flexible al medio ambiente, además de que se activa frente a la presencia de una recompensa (Glenn y Yang 2012). Uno de sus roles específicos es el control del movimiento y la velocidad con la que se realizan los movimientos (Villablanca 2010). Con respecto a su implicación en conducta materna, se ha visto que esta región tiene neuronas que responden a la recompensa a corto plazo, además de que se encuentra involucrado en el despliegue de la conducta romántica (Bartels y Zeki 2004, Haruno y cols. 2004, Kim y cols. 2010).

Putamen

Es un área esencial para la regulación de los movimientos y el desempeño de habilidades motoras. Algo importante para mencionar es su relevancia para el establecimiento de comportamientos dirigidos a una meta en roedores, primates no humanos y en humanos (Laquitaine y cols. 2013, Sacchet y cols. 2017). Con respecto a las conexiones existentes en esta área, se encontró que el putamen dorsal recibe proyecciones de la corteza motora y somatosensorial y recibe proyecciones de la CPF dorsal, la corteza parietal, y el tálamo dorsomedial (Alexander y Crutcher 1990, Postuma y cols. 2006, Di Martino y cols. 2008).

En el caso de la conducta materna, hay una mínima cantidad de información que considere su participación, ya que generalmente se considera el estriado dorsal como un todo. Sin embargo, lo que se ha encontrado es su involucramiento en el comportamiento dirigido a una meta (Palmiter 2008; Henschen, y cols. 2013), la coordinación e integración sensoriomotora (Szczyпка, y cols. 2001) y la recompensa (van der Meer y cols. 2010).

Estriado ventral

Aunque en la presente investigación no se exploró la activación de esta región, es importante conocerla, debido a la cantidad de aferencias de las áreas prefrontales, así como dopaminérgicas del AVT. Se ha observado que esta región es un componente fundamental de los circuitos que involucran la valoración de la recompensa y de los aspectos apetitivos del comportamiento (Eagle y cols. 1999, Fudge y Haber 2002).

El Núcleo Accumbens (NuAcc) es la estructura principal del estriado ventral. Usualmente se divide en corteza y núcleo con respecto a las conexiones de sus fibras. Se sabe que presenta conexiones únicas con el hipotálamo, así como aferencias subcorticales desde la amígdala y el globo pálido (Graybiel 1997, Wansaw y cols. 2008). Sus proyecciones aferentes provienen de tres lugares: una aferencia topográfica de la COF y de la ínsula, una proyección importante del tálamo y una aferencia del tallo cerebral y de las células cerebrales dopaminérgicas (Kreitzer y Malenka 2008, Haber y Calzavara 2009, Haber, 2011).

Llegado a este punto, es importante referir a la investigación de Haber (2003, 2008) quien anota que para entender cómo se establecen los comportamientos dirigidos a una meta se requiere del procesamiento continuo de cadenas complejas de eventos que requieren de circuitos límbicos, cognitivos y motores para su ejecución que se representan de forma cortico-estriada y tálamo-cortical. Estos serán explicados en la siguiente sección.

2.4 Circuitos cortico-estriales y tálamo-corticales

Históricamente, se ha sugerido la existencia de dos circuitos, uno motor que se conecta por medio del putamen y recibe aferencias de la corteza motora y sensoriomotora, y otro de asociación que pasa a través del núcleo caudado (Alexander y cols. 1986). Estudios previos han mostrado similitudes entre especies en la organización topográfica de las proyecciones cortico-estriadas (Burton y cols. 2015), en la rata éstas van de la corteza motora y sensoriomotora hacia el putamen y de la corteza prefrontal hacia el estriado ventral (Voorn y cols. 2004, Francois y cols. 2014). En el conejo, Carman y cols. (1963) localizaron un patrón general de conectividad donde regiones mediales de la corteza proyectaban a regiones rostrales y dorsales del caudado, mientras que la porción más lateral de la corteza proyectaba al putamen ventral (Fig. 9).

A grandes rasgos se puede hablar de tres circuitos clásicos: límbico (corteza prefrontal ventromedial), asociativo (corteza lateral prefrontal) y motor (corteza motora-premotora) (Strathearn y cols. 2008; Seger 2018). Estos circuitos se implican en la expresión del comportamiento dirigido a una meta, en conducta innata y en formación de hábitos debido a su conexión entre los ganglios basales y la corteza cerebral.

Con respecto a la segmentación del procesamiento de información (Fig. 10), las áreas del estriado dorsal (caudado y putamen) procesarían funciones sensoriomotoras, como por ejemplo conducta innata y de hábito. Mientras que el estriado ventral (NuAcc) es asociado con funciones límbicas y emocionales como la motivación (Di Martino y cols. 2008, Takahashi y cols. 2008, Mattfeld y cols. 2011, Burton y cols. 2015, Haber 2015, Morris y cols. 2016).

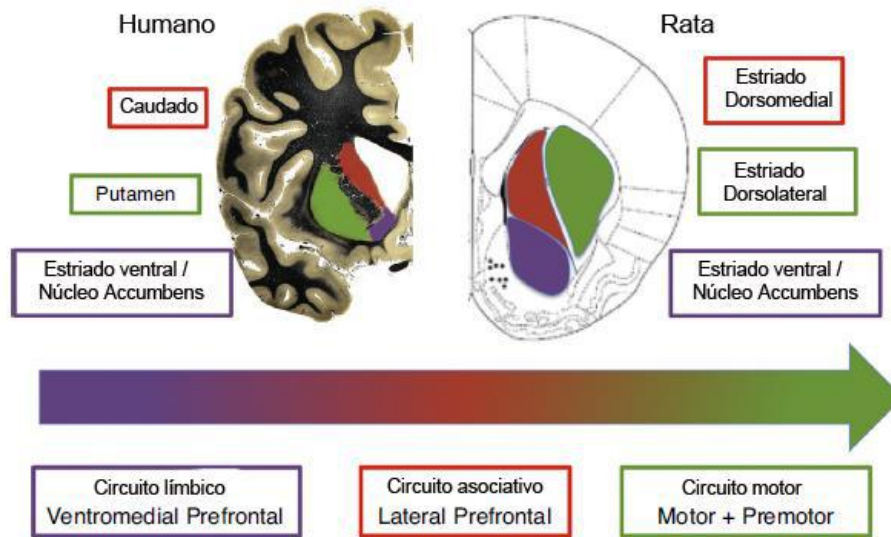


Figura 10. Representación de las diferencias con respecto a las áreas involucradas en los circuitos cortico-límbicos (*Adaptado de Seger 2018*).

Se ha visto que el comportamiento orientado a una meta se controla por medio de la intervención del estriado dorsomedial con la corteza prelímbica, la COF y el caudado, mientras que el control de los hábitos involucraría al estriado dorsal, el putamen y la corteza infralímbica (Gruber y cols. 2012, Gillan y cols. 2015). El estriado sensoriomotor se ha considerado necesario para realizar una transición de un comportamiento instrumental y flexible a un hábito, lo que implica secuencias complejas de acción convertidas en respuestas ejecutables fluidas (Pennartz y cols. 2009).

Antes de continuar, es preciso comentar acerca de la participación de estos circuitos cortico-estriatales en la conducta materna. Por ejemplo, en el caso de negligencia parental, se han observado alteraciones en áreas cerebrales de madres en quienes estímulos como lo serían el llanto y las expresiones faciales, no logran establecer una respuesta positiva de acercamiento y consuelo. Esta información resulta interesante porque implica vías que se comparten con otros comportamientos como comportamiento sexual, sociabilidad, comportamiento agresivo y consumo de drogas (Young y cols. 2011). Por lo que a continuación se tocará brevemente la influencia de los circuitos cortico-estriados en la enfermedad mental.

2.5 Conectividad cortico estriada y su influencia en alteraciones psiquiátricas

Se ha considerado que ciertos desórdenes psiquiátricos son provocados por desbalances en sistemas orientados a una meta y relacionados con hábitos (Zapata y cols. 2010, Strathearn 2011, Banca y cols. 2015). Entre ellos se encuentran el trastorno obsesivo-compulsivo (TOC), el consumo de drogas la enfermedad de Parkinson, el déficit de atención e hiperactividad (TDAH), la depresión, así como la esquizofrenia (Vandborg y cols. 2014, Van Velzen y cols. 2015).

Ante esto, se vuelve importante por medio de estudios con animales el conocer de qué forma los circuitos cortico-estriales participan en estas alteraciones generando información más precisa acerca de las áreas que tienen una activación inadecuada provocando conductas aberrantes y perjudiciales (Hoffman 2015, Peters y cols. 2016, Wolmarans y cols. 2016, Schroeder y cols. 2016, Stuchlik y cols. 2016, Szechtman y cols. 2017).

En el caso de la conducta materna, específicamente la conducta de acarreo de paja en la coneja cuenta con algunos rasgos presentes en el TOC, como el hecho de realizar una conducta de forma compulsiva hasta que percibe las señales para detenerse. De hecho, en humanos existen trabajos que han observado que factores aun desconocidos asociados con la gestación y el parto aumentan la probabilidad de que se desarrolle algún aspecto del TOC que podrían desencadenar en obsesiones que podrían afectar el bienestar del bebé (Maina y cols. 1999, Albert y cols. 2000, Thorsen y cols. 2015).

Considerando lo mencionado en los párrafos anteriores, se cuentan con diferentes herramientas para realizar un análisis acerca de las áreas cerebrales activas durante un comportamiento en animales, pero una que permite detectar con alta precisión espacial las neuronas activas durante los primeros momentos de exposición a un estímulo es por medio de genes de expresión temprana. Este tema será desarrollado a continuación.

2.6 Genes de expresión temprana (IEGs)

Para comprender de qué manera se transmite la información a través del Sistema Nervioso Central (SN) es importante considerar a la neurona como la célula especializada para la comunicación dentro de un sistema complejo (Hoffman y cols. 1993, Hoffman y Lyo 2002). Una característica importante es su capacidad de mostrar cambios fenotípicos en respuesta a diferentes estímulos y escenarios celulares que a su vez podrían clasificarse en respuestas tempranas y tardías (Pérez-Cadahía y cols. 2011, Joo y cols. 2015).

Loeblich y Nedivi (2009) manifiestan que el SN utiliza una variedad importante de genes como respuesta a la actividad con distintas propiedades celulares (Fig. 11), desde el acomodo del citoesqueleto hasta cambios en la excitabilidad y modulación de la fortaleza sináptica. El gen c-Fos es considerado como un arquetipo del grupo de los genes de expresión temprana que codifican factores de transcripción (Morgan y Curran 1986, Kovács 1998). Particularmente, la respuesta temprana presenta una duración de milisegundos a minutos, donde un primer mensaje interactúa con los receptores de la superficie celular que activan segundos mensajeros compuestos por proteínas cinasas que realizan la fosforilación de proteínas para ejecutar la respuesta y aseguran la respuesta neuronal de vida corta (Chaudhuri y cols. 2000, Pérez-Cadahía y cols. 2011).

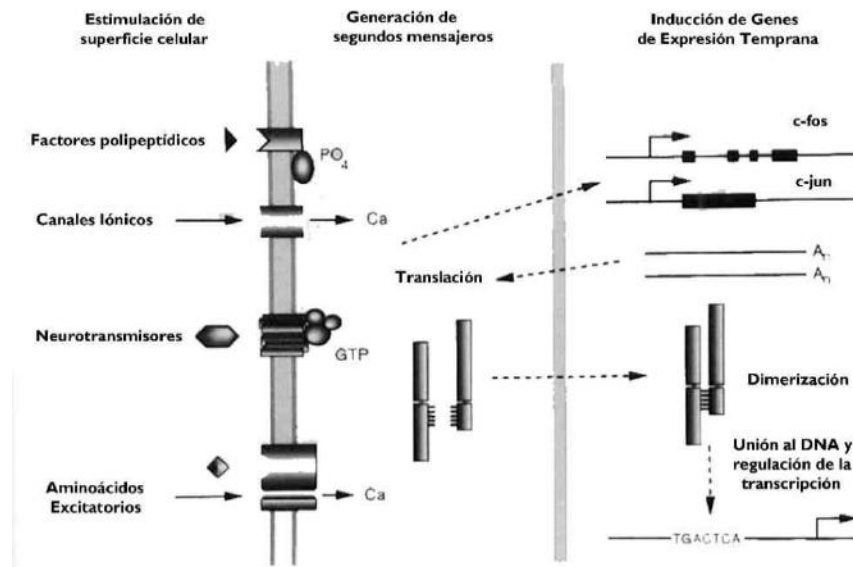


Figura 11. Ilustración de la estimulación de la superficie celular que provoca la generación de segundos mensajeros que lleva a la inducción de genes de expresión temprana (Adaptado de Curran y Morgan 1994).

Un grupo importante de IEGs se inducen después del aumento en la actividad de factores de transcripción como c-Fos, que a su vez llevaría a la expresión de un grupo de genes de expresión tardía (Bading 2013, Joo y cols. 2015). Se ha propuesto la existencia de alrededor de 500-1,000 genes reguladores de actividad en el cerebro (Curran y Morgan 1986 1994, Staiger 2006).

Cabe señalarse que la actividad neuronal basal no es suficiente para inducir la expresión de IEGs dentro de las neuronas (Kovács 1998, Steiger 2006). Se ha encontrado que los cambios en los niveles de transcripción de mRNA de IEG ocurren en respuesta a estímulos fisiológicos (Kaczmarek y Nikolajew 1990, Sheng y Greenberg 1990, Hughes y Dragunow 1995, Loebrich y Nedivi 2009). Es preciso resaltar que diferentes IEGs nucleares son regulados de manera distinta, ya sea en el caso de c-Fos, JunB, NGFI-A o Fos B (Duncan y cols. 1996, Berretta y cols. 1997, Pérez-Cadahía y cols. 2011).

Kovács (1998) ha señalado que la proteína c-Fos tiene como característica fundamental su inducción rápida en respuesta a estímulos agudos. Existen dos características que la vuelven una excelente herramienta para el mapeo cerebral: a) su bajo nivel de transcripción en condiciones basales y b) su inducción bajo un rango de estimulación transináptica y transcripcional. Se ha observado que la expresión máxima de la señal de c-Fos se da alrededor de 1 hora posterior a la presentación del estímulo, debilitándose conforme se acerca a la segunda hora posterior y desaparece de forma gradual del núcleo de la célula entre 4 y 6 horas después del tratamiento (Steiger 2006, Kóvac, 1998, Gao y Ji 2009).

Conducta materna y expresión de proteína c-Fos

En ese punto debe considerarse la expresión de c-Fos puede observarse como consecuencia de la actividad materna (Fig. 11), específicamente el olfatear, lamer o acurrucarse con los críos. Puede notarse que el conjunto de hormonas, neurotransmisores y estimulación generarían un aumento de su expresión en estructuras como lo sería el APOm, BNST, NuAcc, corteza prefrontal, olfatoria y somatosensorial, además de la amígdala (Fleming y cols. 1999). Por otra parte, un estudio realizado por González-Mariscal y cols. (2009) en el que cuantificaron el número de células inmunorreactivas en estructuras cerebrales involucradas en el amamantamiento diario, encontraron que aumentó en áreas como septum lateral, núcleo supraóptico y núcleo paraventricular.

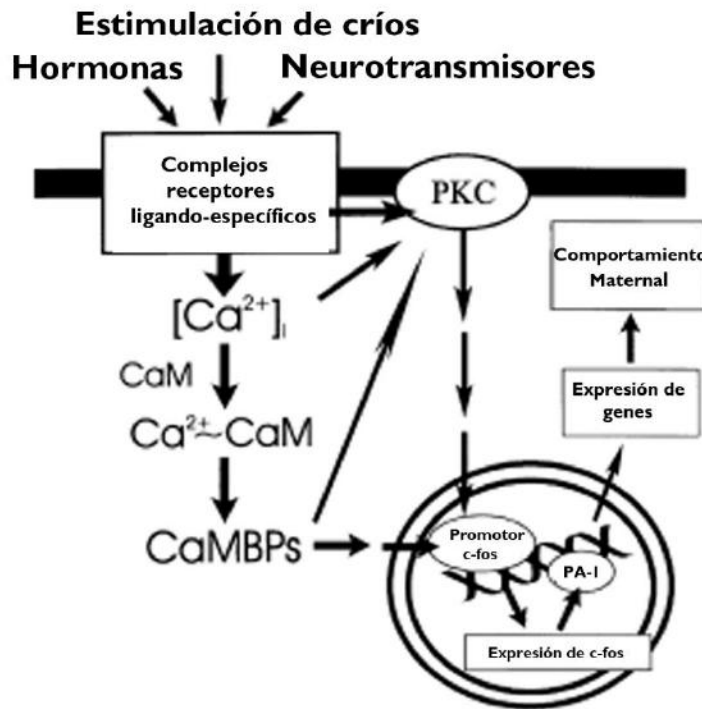


Figura 12. Modelo de transducción de vías de señalización que dirigen la expresión de c-Fos materno.
(Adaptado de Fleming y cols. 1999)

Completando esta sección que otorga evidencia de la utilidad de esta técnica en diferentes contextos, un experimento realizado sobre alertamiento y respuesta autonómica, Valdés, y cols. (2006) evaluaron la actividad del área infralímbica 2 horas después de dar alimento a ratas que habían pasado por un ayuno de 24 horas, hallando actividad en esta área después de consumir alimento, lo que indicaría su participación en el procesamiento de señales motivaciones para responder a comportamientos de tipo apetitivo.

Finalmente, cabe señalar que estos ejemplos fortalecen el uso de la medición de c-Fos en diferentes grupos de investigación para obtener una ubicación espacial bastante detallada de áreas cerebrales específicas durante la realización de una conducta.

3. JUSTIFICACIÓN

Este trabajo tuvo como finalidad proveer información acerca del sustrato neuronal activo en una conducta innata como lo es la conducta de acarreo de paja en la coneja. Esto se realizó explorando ciertas regiones de la corteza prefrontal y el estriado dorsal, que no se han investigado anteriormente midiendo la proteína c-Fos. La selección de estas áreas se debió a que forman parte de los llamados circuitos cortico-estriatales que se encuentran involucrados en procesos motivacionales, de iniciación del comportamiento y de selección de acciones.

Los resultados obtenidos podrían relacionarse a dos niveles: (1) conducta materna considerando que en madres humanas las regiones activas en respuesta a estímulos específicos como el llanto de su bebé generan actividad en algunas de las regiones observadas en este trabajo como lo sería la corteza orbitofrontal, el caudado y el putamen y (2) trastornos psiquiátricos, ya que se ha observado la existencia de un desbalance de los sistemas neuronales encargados de la modulación entre una conducta dirigida a una meta y la inflexibilidad presente en la expresión de hábitos y la conducta innata. Se propone la existencia de un posible circuito cortico-estriatal para la ejecución de esta conducta.

4. HIPÓTESIS

El inicio y ejecución del comportamiento de acarreo de paja se encuentra asociado con un aumento en la expresión de la proteína c-Fos en componentes del circuito cortico-estriatal.

5.OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Determinar cuáles regiones del circuito cortico-estriatal se encuentran activas durante el inicio del comportamiento de acarreo de paja en la coneja con experiencia materna.

5.2 Objetivos específicos

1. Analizar las diferencias comportamentales entre los grupos gestante y estro con respecto a la interacción con paja, así como con comportamientos generales sin la presencia de paja.

2. Medir la expresión de c-Fos en las regiones de CPF (CCA, área infralímbica, área prelímbica, corteza piriforme, COF, corteza agranular motora) en el inicio de la conducta de construcción del nido.
3. Medir la expresión de c-Fos en las regiones del estriado dorsal (núcleo caudado y putamen), así como de la corteza motora y sensorial en el inicio de la conducta de acarreo de paja.

6. METODOLOGÍA

6.1 Animales

Se trabajó con 36 conejas adultas (*Oryctolagus cuniculus*) de 6 a 24 meses de edad provenientes de la colonia mantenida en el Centro de Investigación en Reproducción Animal, Laboratorio Totolac, Tlaxcala. Esta colonia se mantiene en un bioterio con condiciones de temperatura ambiente (15-25°C) con un ciclo de luz de 14 horas de iluminación por 10 horas de oscuridad, y con alimento comercial para conejo (Rabbit Chow Purina) y agua ad libitum.

Durante el experimento, las conejas fueron alojadas individualmente en jaulas maternales (90cm de largo × 60 de ancho × 40 de alto), que tenían una caja de madera (49 cm × 28 cm × 27 cm) con una entrada (un agujero redondo de 22 cm de diámetro) cortado al frente de la misma. Todas las conejas tenían experiencia maternal previa (al menos una gestación). Del total de ellas (n=36), 21 fueron asignadas a los grupos experimentales de conejas gestantes y 15 fueron asignadas a los grupos experimentales de conejas en estro (no-gestantes).

Grupos de tratamiento

Las conejas que correspondieron a los grupos gestantes (n=21) se aparearon con un macho con experiencia sexual (día 0 del experimento). Las otras conejas del estudio (estro; n=15) no fueron apareadas, pero fueron alojadas bajo las mismas condiciones de las conejas gestantes. Ninguna de las hembras gestantes o en estro tuvo contacto con la paja durante los días 0 – 27 del experimento. Este trabajo se apejó a la Ley de Protección Animal y fue aprobado por el comité de ética animal de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.

6.2 Pruebas conductuales

En el día 28 del experimento (entre las 8:00 y 10:00 de la mañana), una videocámara se colocó frente a la jaula para realizar la grabación del comportamiento. En el tiempo 0 min se coloca la paja dentro de la jaula. La videocámara se inició inmediatamente antes de realizar una de las siguientes manipulaciones experimentales: (1) gestante+paja: colocar paja (aproximadamente 200 g) dentro de la jaula. Se le permitió a la hembra interactuar con la paja durante 30 min, pasado ese tiempo, se quitó toda la paja que se encontraba en la jaula y dentro de la caja nido. (2) gestante: no se le proporcionó paja a la coneja gestante. El comportamiento se videograbó durante una hora. (3) estro+paja: se colocó paja (aproximadamente 200 g) dentro de la jaula de la coneja en estro y se le permitió a la hembra interactuar con la paja durante 30 min, pasado ese tiempo, se quitó toda la paja que se encontraba en la jaula y dentro de la caja nido. (4) estro: no se le proporcionó paja a la hembra en estro. El comportamiento se videograbó durante una hora.

En todos los grupos, en $t=60$ min se terminó la grabación por video y se inició el procedimiento de perfusión. Se realizaron dos experimentos. El experimento 1 se conformó de 24 animales, 6 animales por cada grupo experimental (gestante+paja, gestante, estro+paja, estro). El objetivo principal de este experimento fue caracterizar, en la corteza prefrontal, la expresión de c-Fos asociada con la conducta de acarreo de paja.

En el caso del experimento 2, su objetivo fue caracterizar la expresión de c-Fos en el estriado, corteza motora y corteza somatosensorial. En el experimento 2 se incluyeron, hasta donde fue posible, tejidos cerebrales provenientes de animales de experimento 1. Por lo tanto, cada grupo del experimento 2 se conformó de tejido cerebral de 3 animales provenientes del experimento 1, más 3 animales. Cabe puntualizar que todos los animales fueron incluidos en el análisis de la conducta (Tabla 1). Los datos comportamentales de todos los animales (Experimentos 1 y 2) fueron combinados para el análisis estadístico final.

Grupos	Estro	Gestante	Estro+Paja	Gestante+Paja
Experimento 1: c-Fos	6	6	6	6
Experimento 2: c-Fos	3 anteriores + 3 nuevos = 6	3 anteriores + 3 nuevos = 6	3 anteriores + 3 nuevos = 6	3 anteriores + 3 nuevos = 6
Análisis de Comportamiento	9	9	9	9

Tabla 1. Datos comportamentales de los animales utilizados en los experimentos de c-Fos.

6.3 Procedimiento quirúrgico

Perfusión para inmunohistoquímica para c-Fos

Las conejas inicialmente fueron anestesiadas con Xilazina (30mg/1.5ml; I.M.) como relajante muscular, 10 minutos después se les inyectó Ketamina (150mg/1.5ml; I.M.) como anestésico y 2 minutos después se inyectaron 10,000 IU de heparina intravenosa (I.V.) para evitar la formación de coágulos durante la perfusión. Cuando la coneja se encontraba totalmente anestesiada se realizó el sacrificio por medio de una sobredosis de pentobarbital sódico (260mg/4ml; I.V.).

Inmediatamente después del sacrificio se realizó una perfusión salina transcardíaca usando el siguiente procedimiento: se abrió el abdomen y el tórax para exponer el corazón, se insertó un catéter conectado a una bomba de perfusión en el ventrículo izquierdo y se cortó la aurícula derecha para bombear aproximadamente 1 L de NaCl 0.9 en H₂O desmineralizada durante media hora, después se cambió la solución por paraformaldehído al 4% en buffer de fosfatos 0.1M pH 7.4 durante media hora.

En el día que se realizó la perfusión, el cerebro del animal permaneció dentro del cráneo a temperatura ambiente. Al día siguiente se sacó el cerebro del cráneo y se colocó en un frasco con sacarosa al 10% en buffer de fosfatos 0.1M. Una vez que el cerebro se hundió en el frasco, se cambió la solución al 20%, y cuando se hundió nuevamente se pasó a un frasco con solución al 30%. Cuando el cerebro se encontró completamente hundido en esta solución (éste ya se encontraba crioprotegido) y se procedió a su corte en el criostato. El cerebro fue cortado en 4 bloques con orientación coronal usando una matriz para cortar cerebro de conejo (Ted Pella, Inc., USA) con un grueso de aproximadamente 8mm. El primer bloque incluyó la corteza prefrontal, el

segundo incluyó el estriado dorsal; el tercero el tálamo y el cuarto el cerebelo. Los bloques fueron congelados y mantenidos a las -20°C hasta el momento de seccionarlos.

6.4 Secciones e identificación de regiones cerebrales

Los cerebros fueron seccionados utilizando un criostato Leica CM1860 a -20°C utilizando un grosor de $40\ \mu\text{m}$. Las secciones que se colectaron para el trabajo con CPF se obtuvieron a partir de un primer corte ($40\ \mu\text{m}$) localizado en el lugar donde los pedúnculos olfatorios se fusionan con la corteza prefrontal hasta llegar al punto donde aparece el cuerpo calloso. Las secciones obtenidas se almacenaron en crioprotector (a base de sacarosa, etilen glicol, polivinilpirrolidona, cloruro de sodio y agua) a -20°C .

Las secciones procesadas que fueron elegidas de forma aleatoria considerando que todas las secciones de tejido estuvieran completas, lo que significa que no se hubieran dañado por el proceso de inmunohistoquímica. Las secciones de la CPF y el estriado dorsal fueron procesadas por medio de un proceso de inmunohistoquímica para c-Fos, conforme al protocolo descrito previamente (González-Mariscal y cols. 2009). Aproximadamente se procesaron 8 secciones de cada animal. El resto de las secciones se conservan en crioprotector.

6.5 Proceso de inmunohistoquímica

Este proceso comenzó realizando 3 enjuagados de las secciones en buffer de fosfatos 0.1 (con una duración de 5 min c/u). Después se removieron las peroxidasas endógenas del tejido por medio de su enjuagado en agua oxigenada (0.5%) durante 10 minutos y después se realizaron 3 lavados en buffer de fosfatos 0.1M. El bloqueo de reacciones no específicas se realizó con suero normal 0.1M en buffer de fosfatos-Tritón 0.1% (PBT) durante una hora. Después de ese tiempo, se extrajo la solución de bloqueo y se incubó el anticuerpo primario policlonal sc-52 contra la proteína c-Fos (hecho en cabra; Santa Cruz Biotechnology; USA) con una dilución 1:2000 que se mantuvo en refrigeración durante 48 horas.

Después 48 horas, se extrajo la solución de anticuerpo primario policlonal y se lavaron las secciones 3 veces con PBT 0.1%. Al terminar, se realizó la incubación durante 1 hora en una solución de anticuerpo secundario biotinilado (10 ml buffer de fosfatos 0.1M, 1% suero normal y $50\ \mu\text{l}$ de anti-cabra anticuerpo biotinilado, hecho en conejo; Vectastain Elite ABC Peroxidase Kit; USA). Inmediatamente después se lavaron 3 veces con PBT 0.1%. Al finalizar este paso, se

incubaron durante una hora en la solución ABC consistente en 100 µl de reagente A (avidina) y 100 µl de reagente B (peroxidasa H biotinilada) en 10 ml en PBT 0.1%, y nuevamente se lavaron las secciones 3 veces con PBT 0.1%.

Para la realización del paso que involucra la Diaminobencidina (DAB) se utilizó el kit de Vector Laboratories (USA) el cual produce una reacción café en presencia de la enzima peroxidasa. Su preparación fue usando 168 µl de solución buffer, 200 µl de solución DAB, 160 µl de solución de peróxido de hidrógeno y 160 µl de solución nickel en 10 ml de agua desmineralizada. Esta solución se incubó durante 10 minutos. Al terminar se lavaron las secciones en agua durante 5 minutos.

Al terminar el proceso de DAB, se procedió a montar el tejido en laminillas preparadas con gelatina bacteriológica. Después se dejaron secar durante 72 horas para realizar el proceso de deshidratación de tejido por medio de alcoholes y colocarlas en un medio de montaje basado en una resina sintética (Entelan; Merck, Alemania) para su conservación.

6.6 Cuantificación del marcaje de c-Fos

Una vez que se tuvieron los cortes de tejido cerebral en laminillas, se tomaron dos microfotografías (cada una de una sección diferente) de manera pseudoaleatoria (considerando que las secciones estuvieran completas y correspondieran al plano de orientación seleccionado sin observarlas bajo el microscopio) usando un objetivo 4x abarcando un rectángulo de dimensiones de 1.7 x 2.2 mm (n=36).

Las secciones de la corteza prefrontal fueron seleccionadas de acuerdo a los planos de orientación #280 (COF) al #320 (todas las demás regiones) del Atlas del cerebro del conejo doméstico (Universidad de Wisconsin-Madison/ colección comparativa de cerebros de mamíferos/<http://neurosciencelibrary.org/Specimens/lagomorpha/domesticrabbit/sections/thumbnail.html>). Mientras que las secciones del estriado dorsal fueron seleccionadas considerando el plano de orientación que correspondió al plano #540 del atlas mencionado anteriormente.

Las regiones de análisis considerando todas las secciones procesadas fueron: corteza cingulada anterior, área prelímbica, área infralímbica, área premotora, corteza piriforme, corteza orbitofrontal, corteza motora, corteza somatosensorial, núcleo caudado (dorsal, medial y ventral) y putamen (dorsal, medial, ventral).

Las regiones que integran a la CPF en la coneja (Fig. 13) son corteza cingulada anterior, área infralímbica, área prelímbica y corteza motora (Buchanan y cols. 1994). Por otra parte, en el caso de la corteza orbitofrontal, la corteza somatosensorial y la corteza motora se consideraron trabajos previos realizados en el conejo (Fleischhauser 1980, Gould 1986, Muñoz-Moreno y cols. 2013).

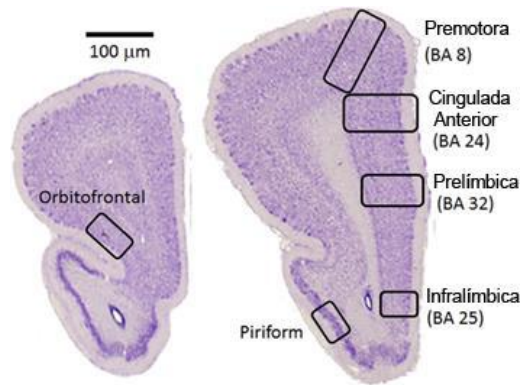


Figura 13. Fotomicrografía de una sección coronal de la corteza medial prefrontal del conejo
(Adaptada de *Wisconsin Brain Rabbit Atlas*).

6.7 Neuroanatomía de la CPF y el estriado dorsal en el conejo

Específicamente, el presente estudio estuvo inicialmente orientado hacia la exploración de aquellas áreas que correspondían a la CPF y en segundo lugar a las que forman parte del estriado dorsal, que junto con la CPF podrían establecer un circuito cortico-estriatal. Estas regiones se encuentran organizadas en una manera semejante con respecto a sus aferencias y eferencias en rata, monos y humanos (Öngur y Price 2000). Una de las particularidades de las regiones de la corteza cerebral en el humano, primate no-humano, roedores, y en el conejo es que cuentan con proyecciones segregadas topográficamente, las cuales se dirigen a regiones del estriado dorsal correspondientes al caudado y al putamen.

En el caso del conejo, Carman y cols. (1963) observaron que (Fig. 14) regiones de la corteza proyectaban a regiones específicas del caudado y el putamen, la cual podría dividirse en porciones dorsales y ventrales. De igual forma, se observó que regiones amplias de la corteza envían fibras hacia el estriado y regiones del estriado reciben aferencias corticales.

El estriado cuenta con un alto grado de organización en dimensiones anteroposteriores, la región frontal de la corteza se relaciona con la cabeza del caudado y la parte rostral del putamen, mientras que la parte medial del hemisferio proyecta exclusivamente hacia la parte dorsal del

caudado y las partes más laterales de la corteza envían fibras hacia el caudado y el putamen. Esto indica que la corteza proyecta hacia ambas subdivisiones del estriado de una manera ordenada (Carman y cols. 1963).

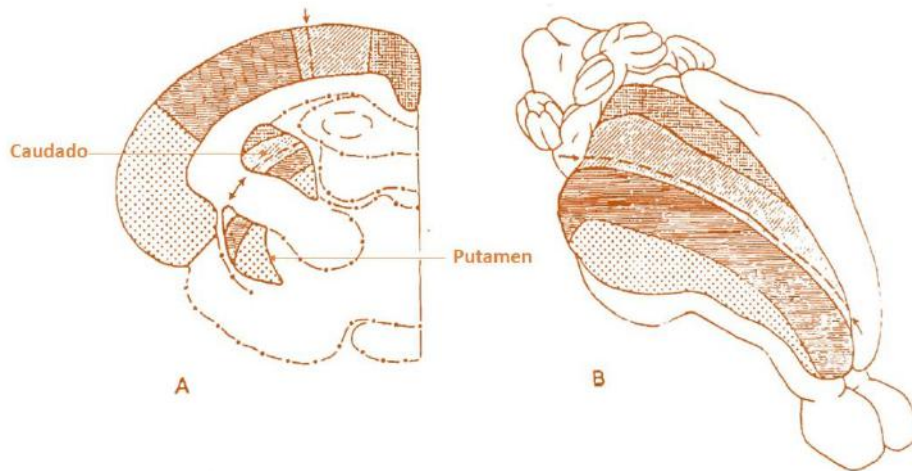


Figura 14. Representación esquemática de la conectividad cortico-estriada en el conejo. (A) Sección coronal y (B) Vista dorsal. Los colores y patrones de diseño muestran las áreas del estriado que recibe proyecciones de la corteza. (Adaptado de Carman y cols. 1963).

En el conejo, de manera funcional, una parte del área somatosensorial (Fig. 15) representa a la región de los labios y la nariz (Gould 1986), mientras que la corteza motora primaria (área precentral 1) se asocia con los músculos de los ojos y el torso (Fleischhauer 1980).

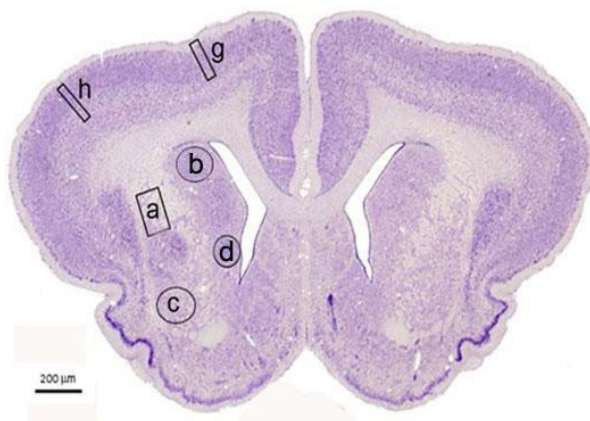


Figura 15. Fotomicrografía de una sección sagital de la corteza del conejo en un nivel correspondiente al estriado dorsal donde las cajas corresponden a las regiones muestreadas de cada una de las áreas analizadas en este estudio. a. putamen dorsal, b. caudado dorsal, c. putamen ventral, d. caudado ventral, g. motora, h. somatosensorial (Adaptada de Wisconsin Brain Rabbit Atlas).

Considerando lo anterior y particularizando un poco más acerca de estas conexiones entre áreas cerebrales, se ha visto que las regiones de la CPFm del conejo presentan proyecciones a otras áreas de la siguiente forma: (1) la corteza infralímbica (BA 25) proyecta hacia el caudado y el estriado ventral (incluyendo el caudado ventral y Nucleo Accumbens), (2) la corteza prelímbica (BA 32) hacia las porciones dorsomediales del caudado y (3) la CCA (BA 24) hacia el caudado dorsomedial y el putamen. Con respecto al resto de las regiones de la CPF, la COF cuenta con proyecciones hacia el putamen ventral, mientras que la corteza premotora y motora proyectan hacia regiones dorsales del caudado y el putamen (Carman y cols. 1965, Buchanan y cols. 1994).

El muestreo de las áreas de la corteza prefrontal se realizó de la siguiente manera: CCA, un rectángulo horizontalmente orientado (dimensiones $1.58 \text{ mm} \times 0.76 \text{ mm}$) centrado adyacente a la punta del cuerpo caloso; corteza prelímbica, un rectángulo (dimensiones $1.26 \times 0.61 \text{ mm}$) centrado ventralmente a la CCA y lateralmente al cuerpo caloso; corteza infralímbica, un rectángulo horizontal (dimensiones $1.17 \times 0.44 \text{ mm}$) posicionado a un lado de la parte inferior del ventrículo lateral y ventralmente a la corteza prelímbica; corteza piriforme, un rectángulo (dimensiones $1.31 \times 0.48 \text{ mm}$) cubriendo la parte central de la corteza piriforme lateral; COF, un rectángulo horizontal (dimensiones $1.17 \times 0.53 \text{ mm}$) centrado en el banco dorsal del surco olfatorio; y la corteza premotora, un rectángulo horizontal (dimensiones $1.5 \times 0.9 \text{ mm}$), centrado dorsalmente a la parte superior del cuerpo caloso. Las áreas muestreadas de la corteza motora y corteza somatosensorial corresponden a rectángulos verticalmente orientados (dimensiones $0.54 \text{ mm}^2 \times$ una longitud variable, que corresponde a la distancia desde la superficie cortical hacia el cuerpo caloso).

El núcleo caudado fue dividido en dos secciones: caudado dorsal: una elipse orientada horizontalmente (dimensiones $1.53 \times 1.28 \text{ mm}$) centrada adyacente a la punta de la cápsula interna; caudado ventral: una elipse orientada horizontalmente (dimensiones $1.06 \times 1.15 \text{ mm}$) centrado medialmente a la parte inferior de la cápsula interna y lateral a la parte ventral del ventrículo lateral. Para la región del putamen, éste se dividió en dos secciones: putamen dorsal: un rectángulo verticalmente orientado (dimensiones $1.0 \times 1.6 \text{ mm}$) centrado ventral al cuerpo caloso y situado entre la cápsula interna y externa; putamen ventral: una elipse horizontalmente orientada (dimensiones 1.35×1.55) centrada lateralmente a la parte inferior de la cápsula interna y dorsalmente a la comisura anterior (Ver figura 6).

El conteo de células marcadas por el anticuerpo c-Fos se realizó utilizando las fotomicrografías obtenidas anteriormente. Primero, éstas fueron codificadas para ocultar la identidad del animal, así como su grupo experimental. Por medio del software ImagePro Plus 5.1 se ubicó un área de dimensiones fijadas previamente sobre el área de interés dentro del fotomicrografía, conforme a puntos de referencia especificados. Los parámetros del programa utilizados para la selección de las células para el conteo consideraron el área (75-600) y el aspecto (1-3), además de que se consideraba la selección del color de la célula en negro con un contraste de fondo claro. La densidad del marcaje de c-Fos fue calculado como el número de células marcadas dividida por el área de muestreo total (expresada como un número de células por mm²; van Hasselt y cols. 2012).

6.7 Análisis comportamental

Las videograbaciones fueron analizadas de acuerdo al comportamiento observado en de la conducta de acarreo de paja, de éste se obtuvieron las siguientes variables considerando cada uno de los ciclos realizados para construir un nido dentro de la caja nido desde el primer momento en que se colocó la paja en la jaula de las conejas gestantes. Estos fueron comparados con los comportamientos que presentaron las conejas en estro que también interactuaron con paja.

1. *Latencia para interactuar con paja:* esta variable se midió en segundos y consistió en el tiempo que tarda la coneja para tener contacto con la paja, ya sea con las patas u boca.
2. *Latencia para entrar a CN con paja:* se midió en segundos y consistió en el tiempo que tardó para entrar por primera vez en CN con paja que colectó en la boca.
3. *Cantidad de ciclos realizados:* se midió en las veces que la coneja salía de CN después de depositar paja dentro de ella.

De igual forma, se realizó el análisis de los comportamientos de las conejas gestantes y en estro que no interactuaron con la paja en ningún momento.

1. *Entradas y salidas de CN durante 1 hora:* se contabilizaron las veces que la coneja entraba y salía de CN durante el tiempo señalado, ella tenía que entrar de cuerpo entero a CN y salir de ésta.

2. *Veces que come alimento durante 1 hora:* se contabilizaron el número de veces que la coneja ingería alimento del comedero por más de 5 segundos.
3. *Veces que bebe agua durante 1 hora:* se contabilizaron el número de veces que la coneja tomaba agua de la botella colocada en la jaula.
4. *Veces que se acerca al comedero durante 1 hora:* se contabilizaron las veces que la coneja acercaba la boca al comedero sin ingerir alimento.

6.8 Análisis estadístico

6.8.1 Comparación entre grupos con células inmunorreactivas a c-Fos

Se realizó una ANOVA de dos vías para analizar los datos de la expresión de c-Fos (Sigmaplot versión 11), considerando los efectos principales o variables independientes, estado reproductivo y la presencia/ausencia de paja. Debe apuntarse que el factor de estado reproductivo cuenta con dos niveles: gestante y no gestante, mientras que el factor de paja presenta también dos niveles: presencia y ausencia de paja. La densidad de células inmunorreactivas para c-Fos sería considerada como variable dependiente.

Debido a que se deseaban realizar comparaciones múltiples entre grupos, éstos se realizaron usando la prueba Holm-Sidak que considera sólo 4 comparaciones por pares, en el presente estudio fueron los siguientes: (1) gestante+paja vs estro+paja, (2) gestante+paja vs gestante, (3) estro+paja vs estro, (4) estro vs gestante. Los intervalos de confianza fueron calculados para las medias utilizando el programa SPSS versión 15 (Windows, IBM). Con respecto a los análisis correlacionales de la expresión de c-Fos y los datos comportamentales, estos se realizaron utilizando una prueba de correlación de rangos Spearman.

Los datos comportamentales se analizaron utilizando la prueba no paramétrica U de Mann Whitney para la comparación entre grupos gestante y estro (gestante+paja vs estro+paja; gestante vs estro). En todos los casos, la significancia estadística fue asumida donde $p < 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1 Conducta

7.1.1 Respuesta conductual de hembras gestantes y en estro a la paja

A continuación, se presentarán las comparaciones entre animales gestantes y en estro respecto a su interacción con paja durante 30 minutos ($t = 0 - 30$ min). Se observaron diferencias en la forma en que las conejas se comportaban dependiendo de su estado reproductivo. En la figura 16 se presenta la comparación entre conejas gestantes y no gestantes mostrando la latencia para interactuar con la paja después de colocarse en la jaula. Se puede observar que el grupo gestante es el que interactúa más rápidamente con ella.

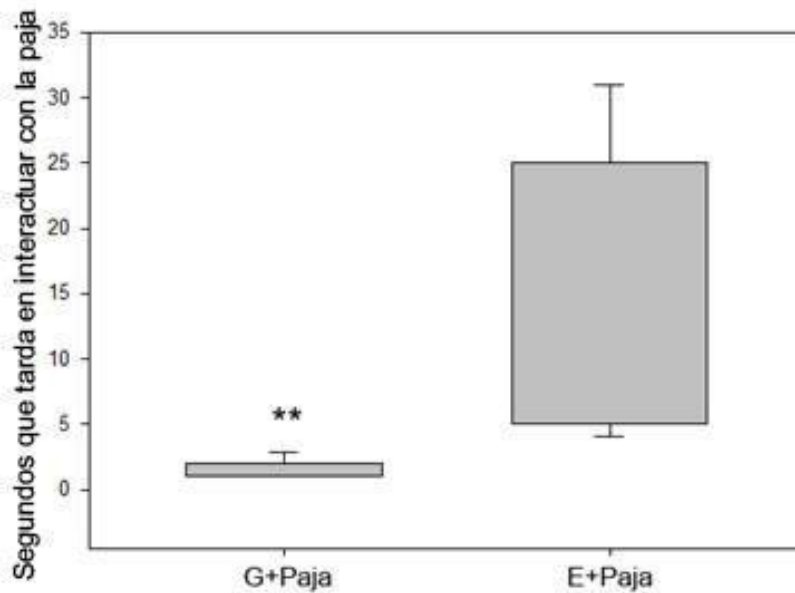


Figura 16. Latencia en segundos para interactuar con la paja entre grupo gestante y estro ($n=9$). G denota gestante y E denota estro. Los bordes superior e inferior representan el percentil 75 y 25, respectivamente. Los bigotes superiores e inferiores representan el percentil 90 y 10, respectivamente. Asterisco doble denota $p < 0.01$.

En la figura 17 se presenta la latencia para comenzar el ciclo de acarreo de paja, puede observarse que el grupo en estro no presenta este patrón conductual durante los 30 min que duró la interacción con la paja (1800 segundos).

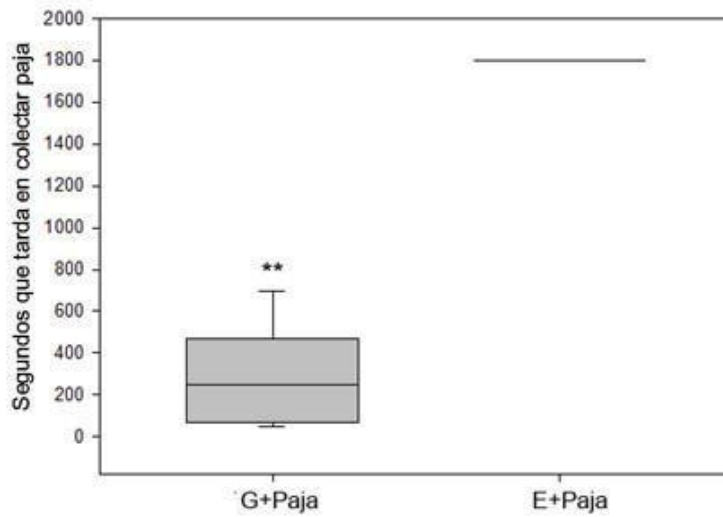


Figura 17. Latencia en segundos para coleccionar paja en grupos gestante y estro con paja (n=9). G denota gestante y E denota estro. La línea horizontal dentro de la caja representa la mediana, y los bordes superior e inferior representa el percentil 75 y 25, respectivamente. Los bigotes superiores e inferiores representan el percentil 90 y 10, respectivamente. Asterisco doble denota $p < 0.01$

La figura 18 muestra la latencia para entrar en la caja nido acarreado paja. Se puede observar que el grupo de las conejas en estro no mostraron la conducta de acarrear paja durante los 30 minutos que se mantuvo la paja dentro de la jaula.

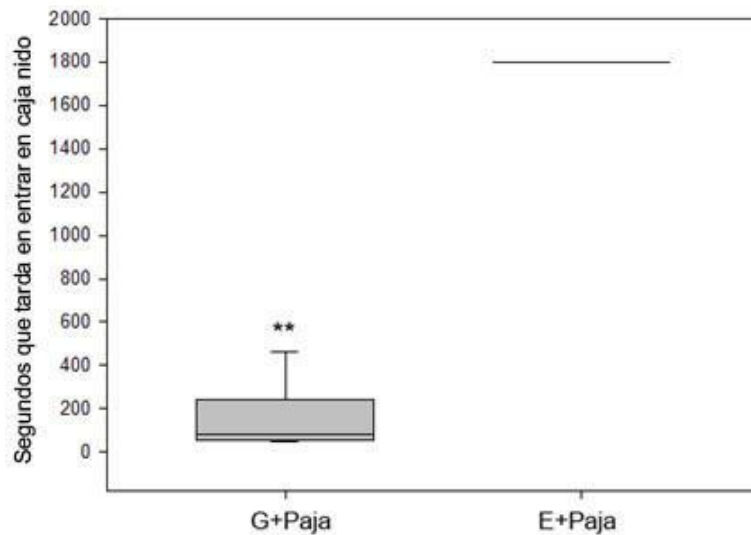


Figura 18. Latencia para entrar a la caja nido con paja en grupos gestante y estro con paja (n=9). G denota gestante y E denota estro. La línea horizontal dentro de la caja representa la mediana, y los bordes superior e inferior representa el percentil 75 y 25, respectivamente. Los bigotes superiores e inferiores representan el percentil 90 y 10, respectivamente. Asterisco doble denota $p < 0.01$.

La figura 19 muestra la latencia de los animales pertenecientes al grupo gestante para terminar el primer ciclo de acarreo de paja, en el caso de los animales en estro, ellos no realizaron ningún ciclo (1800 segundos).

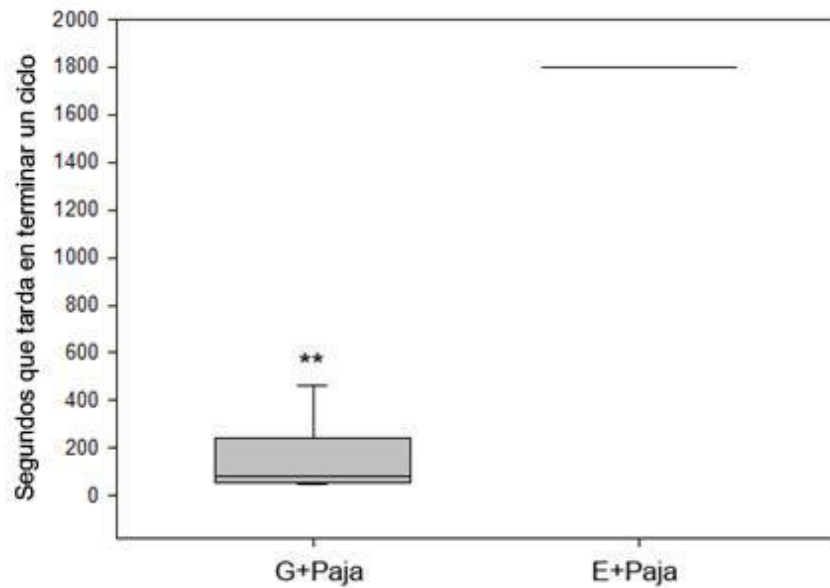


Figura 19. Latencia para terminar ciclo en grupos gestante y estro con paja (n=9). G denota gestante y E denota estro. La línea horizontal dentro de la caja representa la mediana, y los bordes superior e inferior representa el percentil 75 y 25, respectivamente. Los bigotes superiores e inferiores representan el percentil 90 y 10, respectivamente. Doble asterisco denota $p < 0.01$.

La figura 20 muestra la cantidad de ciclos realizados en cada uno de los grupos durante 30 minutos. El grupo en estro que tuvo contacto con paja no realizó ningún ciclo durante los 30 minutos.

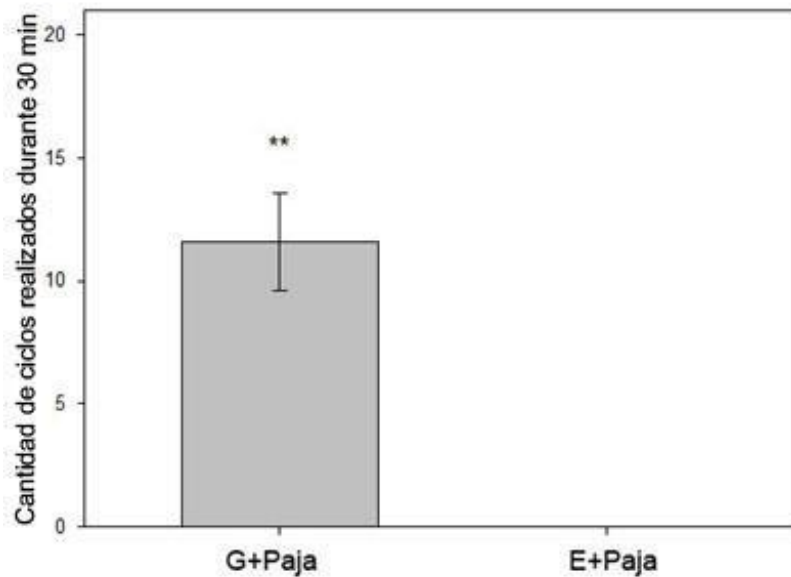
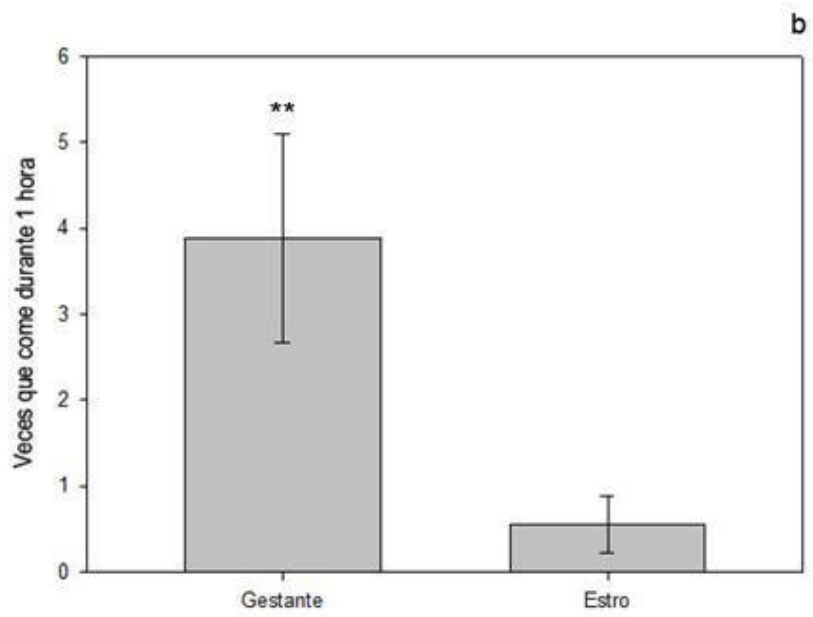
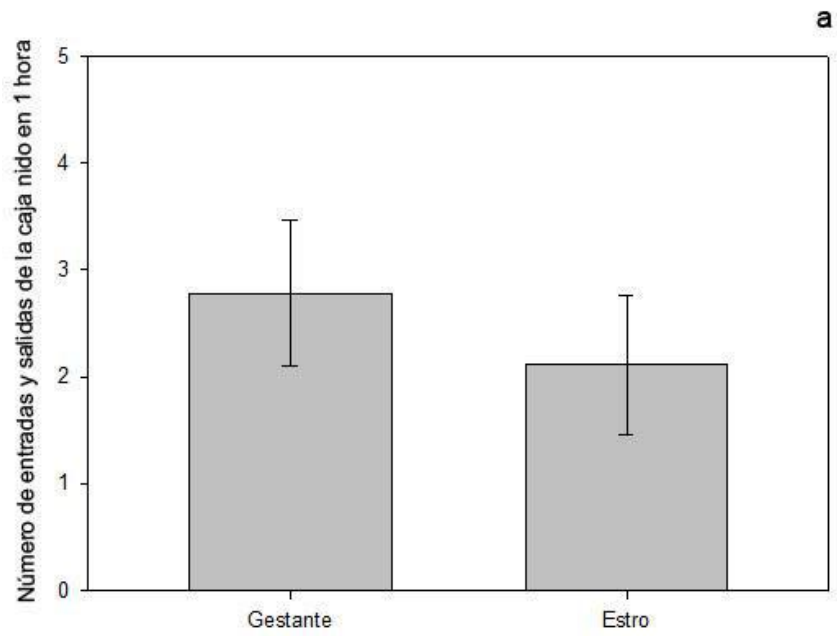


Figura 20. Cantidad de ciclos realizados durante 30 minutos (n=9). G denota gestante y E denota estro. La línea horizontal dentro de la caja representa la mediana, y los bordes superior e inferior representa el percentil 75 y 25, respectivamente. Los bigotes superiores e inferiores representan el percentil 90 y 10, respectivamente. Doble asterisco denota $p < 0.01$.

7.1.2 Comportamientos de conejas gestantes y en estro sin presencia de paja

En la siguiente figura (Fig. 21) se muestra el número de veces que las conejas entraron y salieron de la caja nido durante 1 hora, se observa que no existieron diferencias entre ambos grupos (a). También se muestra el número de veces que realizaron el comportamiento de comer o beber donde se observa una diferencia entre los grupos en la conducta de ingerir alimento, pero no así en la de tomar agua (b/c). En cuanto el número de entradas a la caja nido durante 1 hora, no se encontraron diferencias entre los grupos (d).



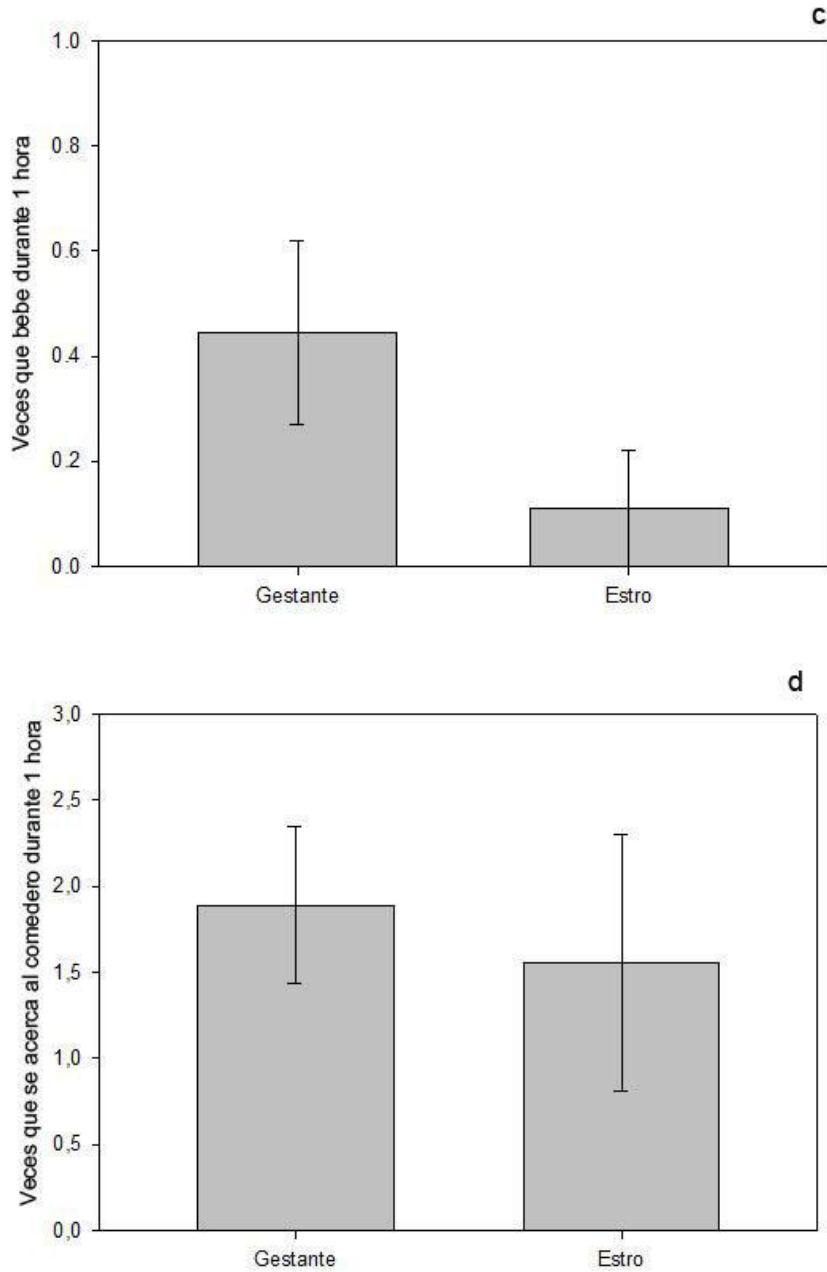


Figura 21. Variables comportamentales de conejas gestantes sin tener acceso a paja en día 28 de la gestación (n=9) (a) Número de entradas y salidas de caja nido durante 1 hora. (b) Número de veces que comieron durante 1 hora. (c) Número de veces que bebieron durante 1 hora. (d) Número de veces que se acercan al comedero durante 1 hora. Asterisco sencillo denota $p < 0.05$ y asterisco doble denota $p < 0.01$. Línea horizontal dentro de la caja representa la mediana, bordes superior e inferior corresponden a percentil 75 y 25 respectivamente, bigote superior e inferior corresponden a percentil 95 y 5 respectivamente.

7.2 Expresión de c-Fos en las regiones del circuito cortico-estriatal

Se analizó la expresión de la proteína c-Fos usando una ANOVA de 2 vías con la expresión de c-Fos (densidad de células marcadas por mm²) en las regiones cerebrales de interés como variable dependiente, y la paja (presente o no presente durante t= 0-30 min) con el estado reproductivo (gestante o estro) como factores independientes. Se consideraron los efectos principales y sus interacciones.

7.2.1 Corteza prefrontal

Las regiones de la corteza prefrontal (CPF) de las que se realizó el análisis estadístico fueron: corteza orbitofrontal, área prelímbica, área infralímbica, corteza cingulada anterior, corteza agranular motora y corteza piriforme. A continuación, la tabla 2 muestran los efectos principales del estado reproductivo, la presencia de paja y su interacción en las regiones de la CPF.

	COF	CCA	Piriforme	Premotora	Prelímbica	Infralímbica
Estado reproductivo	F(1)=5.0, p=0.04	F(1)=1.6, p=0.2	F(1)=0.4, p=0.5	F<0.001, p=0.99	F(1)=0.07, p=0.8	F(1)=0.7, p=0.4
Paja	F(1)=14.7, p<0.001	F(1)=26.9, p<0.001	F(1)=50.8, p<0.001	F(1)=17.8, p<0.001	F(1)=5.3, p=0.03	F(1)=10.3, p=0.004
Edo. Reproductivo X Paja	F(1)=15.8, p<0.001	F(1)=5.6, p=0.03	F(1)=16.3, p<0.001	F(1)=3.5, p=0.08	F(1)=4.7, p=0.04	F(1)=4.2, p=0.05

Tabla 2. Análisis de ANOVA de 2 vías considerando sus efectos principales de estado reproductivo (gestante, estro) y paja (presencia, ausencia) y sus interacciones con las regiones de la CPF. Efectos estadísticamente significativos se encuentran marcados con negritas.

En la siguiente tabla (Tabla 3) se presentan los efectos principales, el error estándar de la media y las comparaciones post-hoc (Holm Sidak) de las áreas de la CPF. En ella se puede observar que la gestación aumentó la respuesta de la COF, piriforme y CCA a la paja, por lo que existió un aumento de marcaje c-Fos en las regiones consideradas en hembras gestantes que interactuaban con paja comparadas con las que se encontraban estro con paja. Es importante señalar que los animales gestantes acarrearon paja y los animales en estro no lo hicieron, por lo que las áreas mencionadas se asocian con la conducta de acarreo de paja.

		COF	CCA	Piriforme	Premotora	Prelímbica	Infralímbica
EFFECTOS PRINCIPALES	Gestante	171.5 ^a	113.4	117.6	91.4	114.4	126.2
	Estro	114.2 ^a	91.0	107.0	91.4	106.7	110.7
	<i>Error Est.</i>	18.2	12.6	11.2	13.8	20.1	13.1
	Paja	192.5 ^b	148.2 ^b	168.7 ^b	132.8 ^b	143.2 ^b	148.1 ^b
	No paja	93.3 ^b	56.2 ^b	55.9 ^b	50.1 ^b	78.0 ^b	88.8 ^b
	<i>Error Est.</i>	18.2	12.6	11.2	13.8	20.1	13.1
INTERACCIÓN							
Gestante	Paja	272 ^{ab}	180.3 ^{ab}	206.0 ^{ab}	151.1 ^a	177.8 ^a	174.8 ^a
	No Paja	70.8 ^a	46.4 ^a	29.1 ^{ad}	31.9 ^a	51.0 ^a	77.7 ^a
Estro	Paja	112.7 ^b	116.1 ^b	131.4 ^{bc}	114.5	108.6	121.5
	No Paja	115.8	65.9	82.6 ^{cd}	68.3	104.9	99.9
	<i>Error Est.</i>	25.7	17.8	15.8	19.6	28.5	18.5

Tabla 3. Densidades de marcaje c-Fos de la CPF (medias marginales estimadas) correspondiente a efectos principales de estado reproductivo, paja y sus interacciones. Letras superíndices representan comparaciones estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Una misma letra en dos grupos distintos señala que la comparación es significativa.

A continuación, se muestra la representación gráfica de los resultados (Fig. 22) correspondientes a la CCA y la COF. En términos generales, la CCA que se encuentra implicada en procesos atencionales y la COF en la integración de información multisensorial y en la flexibilidad del comportamiento. La COF presentó un efecto del estado reproductivo ($p = 0.04$) y de la paja ($p < 0.01$), mientras que la CCA sólo presentó un efecto de la presencia de paja ($p < 0.01$) (Tabla 2), ambas mostraron una interacción significativa entre estado reproductivo y paja ($p < 0.01$; $p = 0.03$). El análisis post-hoc mostró una diferencia significativa entre el grupo gestante y paja, comparada al grupo gestante sin paja (Fig. 22; Tabla 3).

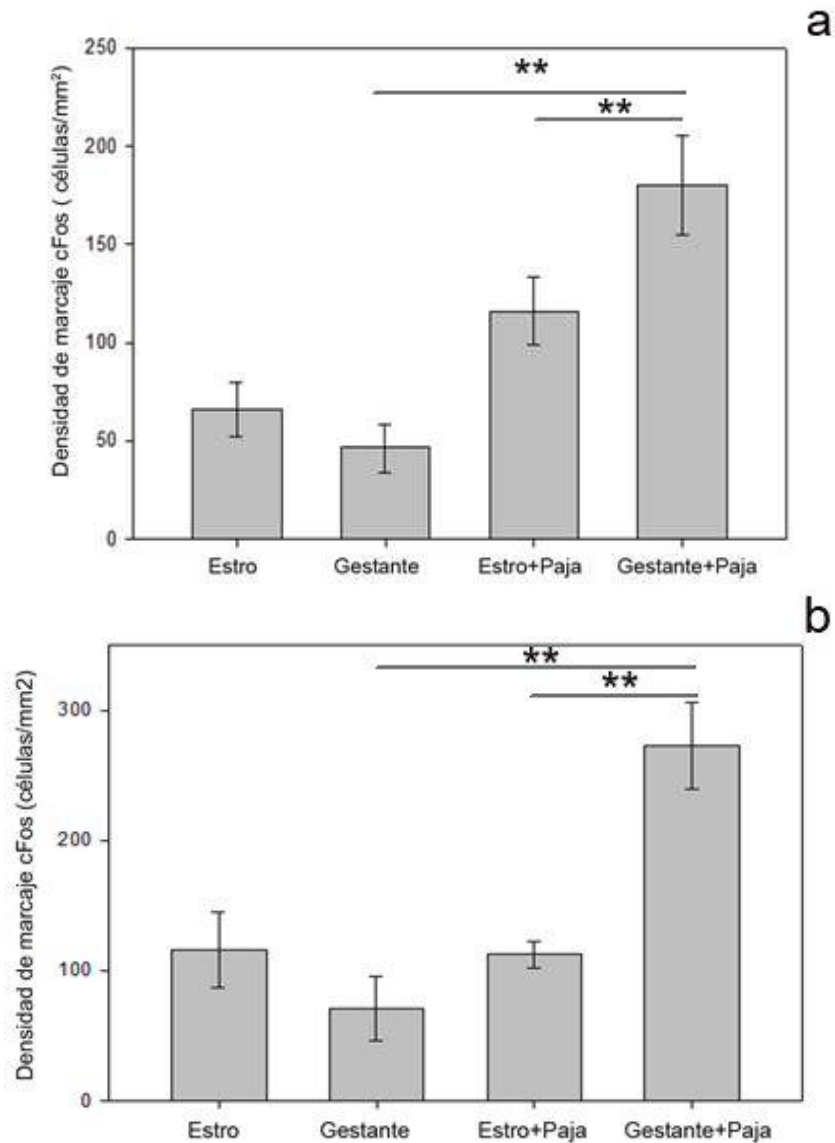


Figura 22. Diferencias en la densidad del número de células inmunorreactivas a c-Fos (n=6) entre grupos de análisis con respecto a la corteza cingulada anterior (a) y corteza orbitofrontal (b). La barra muestra la media y los bigotes señalan el error estándar de la media. Doble asterisco denota $p < 0.01$.

A continuación, se presentan las siguientes gráficas que muestran las diferencias de densidad de marcaje que corresponden a las áreas de la corteza prefrontal medial (área prelímbica e infralímbica) que se han visto involucradas en la activación e inhibición de comportamientos. Ambas regiones mostraron efectos principales de la paja, pero no del estado reproductivo (Tabla 2), además de que mostraban una interacción entre estado reproductivo y paja ($p=0.04$; $p=0.05$).

El análisis post-hoc mostró una diferencia significativa entre el grupo gestante y paja, comparada al grupo gestante sin paja (Fig. 23; Tabla 3).

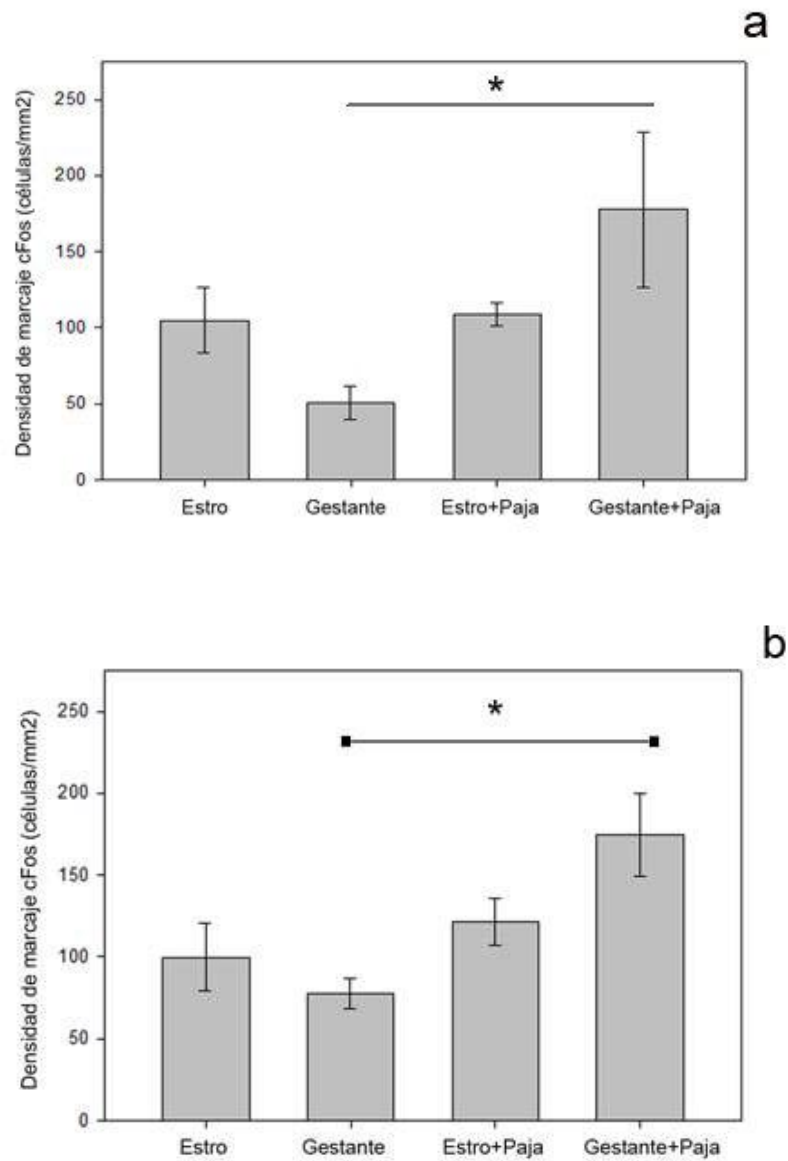


Figura 23. Diferencias en la densidad del número de células inmunorreactivas a c-Fos (n=6) entre grupos de análisis con respecto al área prefrontal (a) e infralímbica (b). La barra muestra la media y los bigotes señalan el error estándar de la media. Asterisco sencillo denota $p < 0.05$.

En el caso de la corteza piriforme, existe una interacción entre estado reproductivo y paja ($p < 0.001$; Tabla 2). Por otro lado, el área premotora que se encarga de la preparación de la respuesta motora mostró un efecto principal en la presencia de paja ($p < 0.001$), sin que exista un efecto del estado reproductivo. En las gráficas siguientes se puede observar que la corteza piriforme presentó la mayor cantidad de diferencias entre grupos (Fig. 24; Tabla 3).

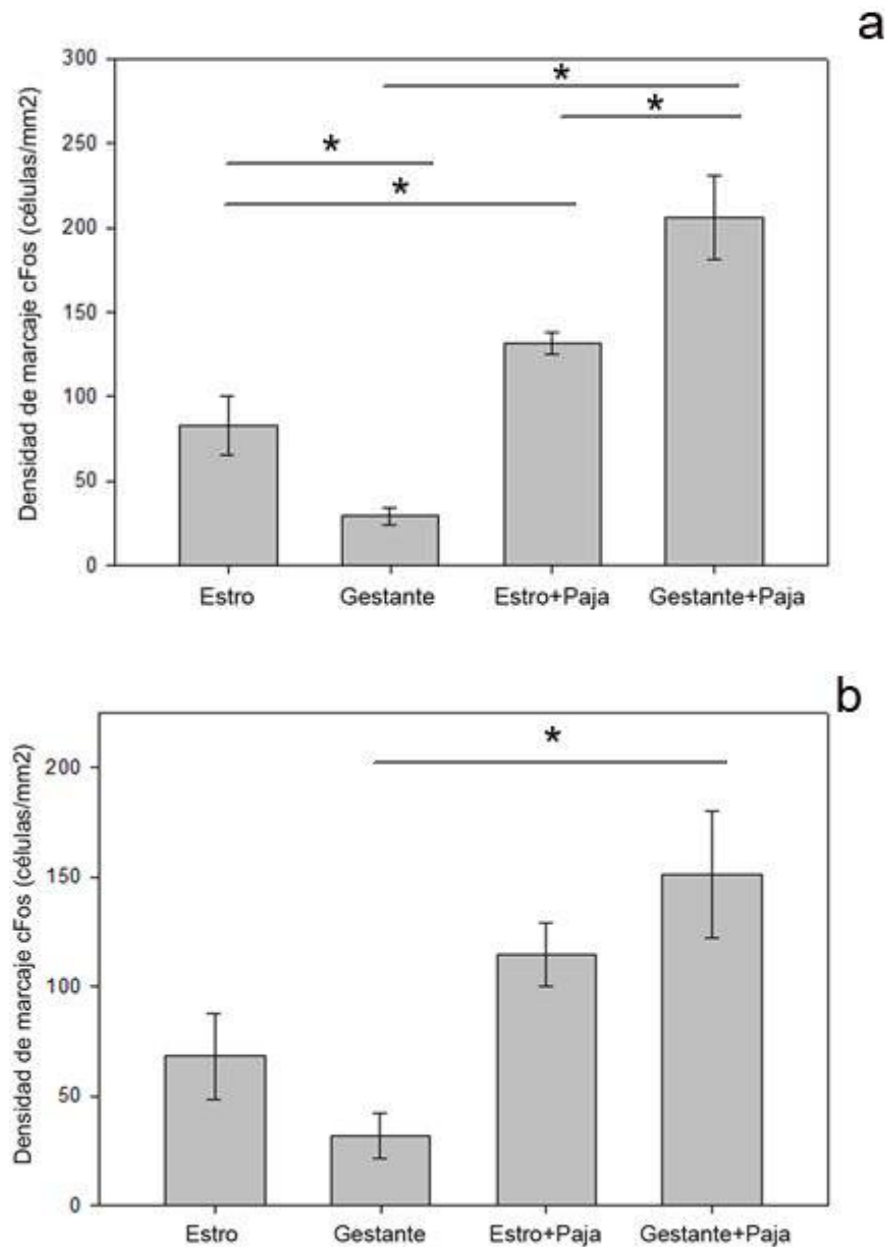


Figura 24. Diferencias en la densidad del número de células inmunorreactivas a c-Fos ($n=6$) entre grupos de análisis con respecto a la corteza piriforme (a) y premotora (b). La barra muestra la media y los bigotes señalan el error estándar de la media. Asterisco sencillo denota $p < 0.05$.

Los resultados más importantes de esta sección se pueden agrupar en dos partes: (1) regiones que presentaron una interacción significativa entre edo. reproductivo y paja que incluyó a la COF, CCA, piriforme, cVaud, dPut, área motora y somatosensorial. (2) regiones que no tuvieron una interacción significativa, pero que tiene un efecto principal significativo de la paja que incluyó al área premotora, infralímbica, dCaud y vPut. En el caso de vPut, el análisis post-hoc Holm-Sidak mostró que el grupo estro+paja fue mayor que el grupo estro, este resultado considera que vPut responde a la paja independientemente de si la hembra se encuentra gestante o no.

7.2.2 Estriado dorsal (núcleo caudado y putamen), corteza motora y somatosensorial

Como se ha mencionado anteriormente, la corteza cerebral (incluyendo la CPF) proyecta de forma topográfica al estriado dorsal que forma parte de los ganglios basales (Carman y cols. 1965, Haber 2016). En la siguiente tabla (Tabla 4) se presentan los datos acerca de la densidad de células inmunoreactivas a c-Fos referentes al estado reproductivo y la presencia de paja, además de su interacción en las divisiones del estriado dorsal, así como la corteza motora y somatosensorial.

En primer lugar, se observó la interacción entre estado reproductivo y la paja en vCaud, dPut, vPut, área motora y somatosensorial. En el caso de los efectos principales del estado reproductivo, estos se observaron en dPut, área motora y somatosensorial. Por su parte, los efectos principales de la paja se encontraron en dCaud, dPut, vPut, área motora y somatosensorial.

Estos resultados sugieren que dCaud y vPut al presentar un efecto principal de la paja, pero no así del estado reproductivo, podrían ser consideradas áreas que se encargan de aspectos más motores que cognitivos en el procesamiento de la información. A diferencia del resto de las áreas donde la interacción permite pensar que se encuentran dirigidos a la conducta de acarreo de paja, más que a una sola interacción sin un objetivo claro.

	dCaud	vCaud	dPut	vPut	Motora	SS
Estado Reproductivo	F(1)= 0.1 P=0.80	F(1)= 0.4 P= 0.55	F(1)= 9.9 P= 0.005	F(1)= 0.1 P= 0.82	F(1)= 15.8 P< 0.001	F(1)= 14.9 P< 0.001
Paja	F(1)= 14.5 P=<0.001	F(1)= 5.8 P= 0.025	F(1)= 10.5 P= 0.004	F(1)= 21.8 P= <0.001	F(1)= 49.6 P<0.001	F(1)= 47.0 P= <0.001
Estado reproductivo X Paja	F(1)= 1.2 P=0.28	F(1)= 7.3 P= 0.013	F(1)= 11.9 P= 0.002	F(1)= 0.3 P= 0.62	F(1)= 23.9 P<0.001	F(1)= 15.5 P<0.001

Tabla 4. ANOVA de 2 vías de las regiones del estriado dorsal, corteza motora y somatosensorial con efectos principales de estado reproductivo (gestante, estro) y paja (presencia, ausencia), además de sus interacciones. Efectos estadísticamente significativos se encuentran marcados en negritas.

Por otra parte, en la siguiente tabla (Tabla 5) se presentan los efectos principales y las interacciones del estado reproductivo y la presencia de paja.

		dCaud	vCaud	dPut	vPut	Motora	SS
EFFECTOS PRINCIPALES	Gestante	49.3 (9)	89.8 (15)	39.1 (6)	58.2 (10)	268.5 (26)	207.6 (22)
	Estro	52.7 (10)	76.7 (16)	11.4 (6)	54.8 (11)	117.0 (28)	81.3 (24)
	Paja	76.2 ^b (9)	109.2 (15)	39.5 (6)	90.8 ^b (10)	326.9 (27)	256.5 (23)
	No Paja	25.9 ^b (9)	57.3 (15)	11.0 (6)	22.2 ^b (11)	58.6 (27)	32.5 (23)
INTERACCIÓN							
Gestante	Paja	81.8 ^a (13)	144.7 ^{ab} (21)	68.6 ^{ab} (8)	96.3 ^a (14)	495.7 ^{ab} (37)	384 ^{ab} (31)
	No Paja	16.9 ^a (13)	34.9 ^a (21)	9.7 ^a (9)	20.2 ^a (15)	41.2 ^a (37)	31.2 ^a (31)
Estro	Paja	70.5 (14)	73.6 ^b (22)	10.5 ^b (9)	85.3 ^b (15)	158.1 ^b (40)	129.1 ^b (34)
	No Paja	34.9 (14)	79.7 (22)	12.3 (9)	24.2 ^b (15)	75.9 (40)	33.7 (34)

Tabla 5. Densidades de células inmunoreactivas a c-Fos del estriado dorsal, corteza somatosensorial y motora (medias marginales estimadas) correspondiente a efectos principales de estado reproductivo, paja y sus interacciones. Letras superíndices representan comparaciones estadísticamente significativas ($p<0.05$). Una misma letra en dos grupos distintos señala que la comparación es significativa.

La representación visual de estos datos comenzará con las porciones dorsales del caudado y el putamen (Fig. 25), donde el putamen dorsal presentó un efecto del estado reproductivo ($p=0.005$; Tabla 3), mientras que ambos presentaron un efecto de la presencia de la paja ($p<0.001$; $p=.004$). La interacción del estado reproductivo y la paja sólo fue significativa para el putamen dorsal ($p=0.002$; Tabla 3).

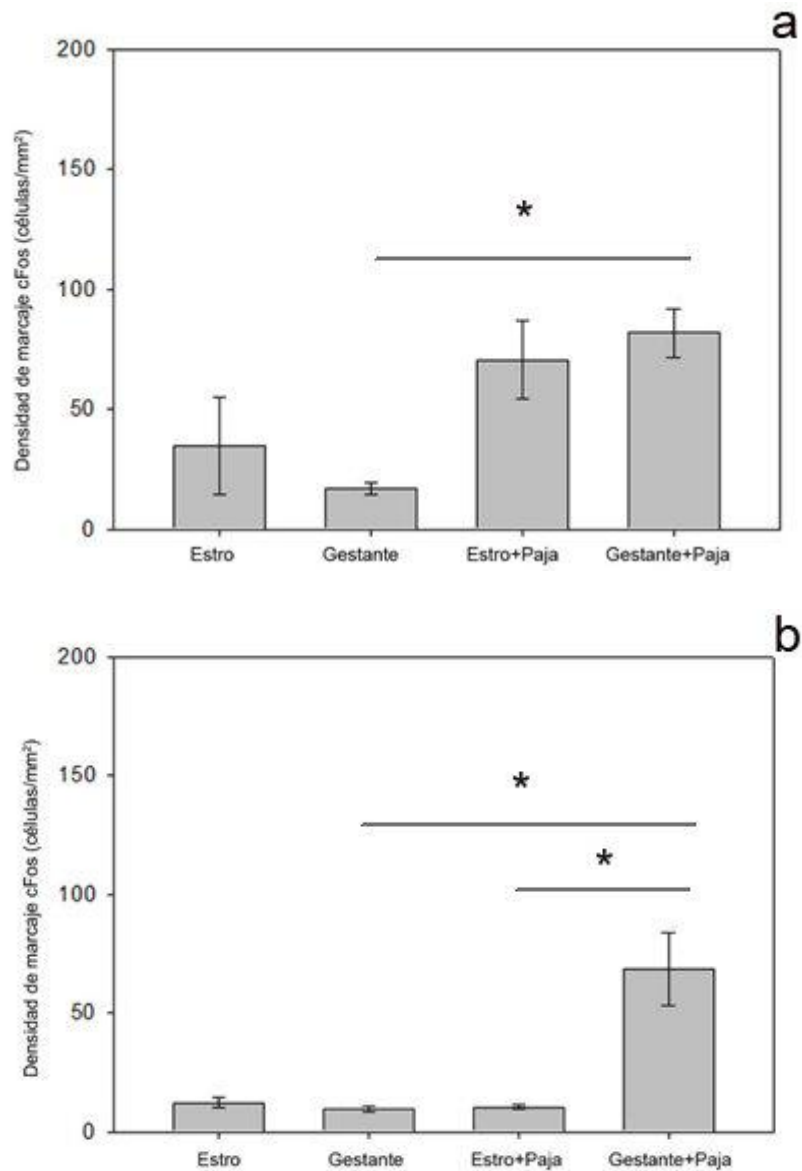


Figura 25. Diferencias en la densidad del número de células inmunorreactivas a c-Fos ($n=6$) entre grupos de análisis con respecto a la porción dorsal del estriado dorsal (a: núcleo caudado; b: putamen). La barra muestra la media y los bigotes señalan el error estándar de la media. Asterisco sencillo denota $p<0.05$.

Con respecto al estriado ventral, el caudado ventral no presentó un efecto del estado reproductivo ($p=0.55$; Tabla 3), aunque sí de la presencia de la paja ($p=0.025$), además de que contó con la interacción entre estado reproductivo y presencia de paja ($p=0.013$). Mientras que el putamen sólo presenta un efecto de la presencia de paja ($p<0.001$), aunque no del estado reproductivo ($P=0.82$) y tampoco de la interacción entre variables ($p=0.60$).

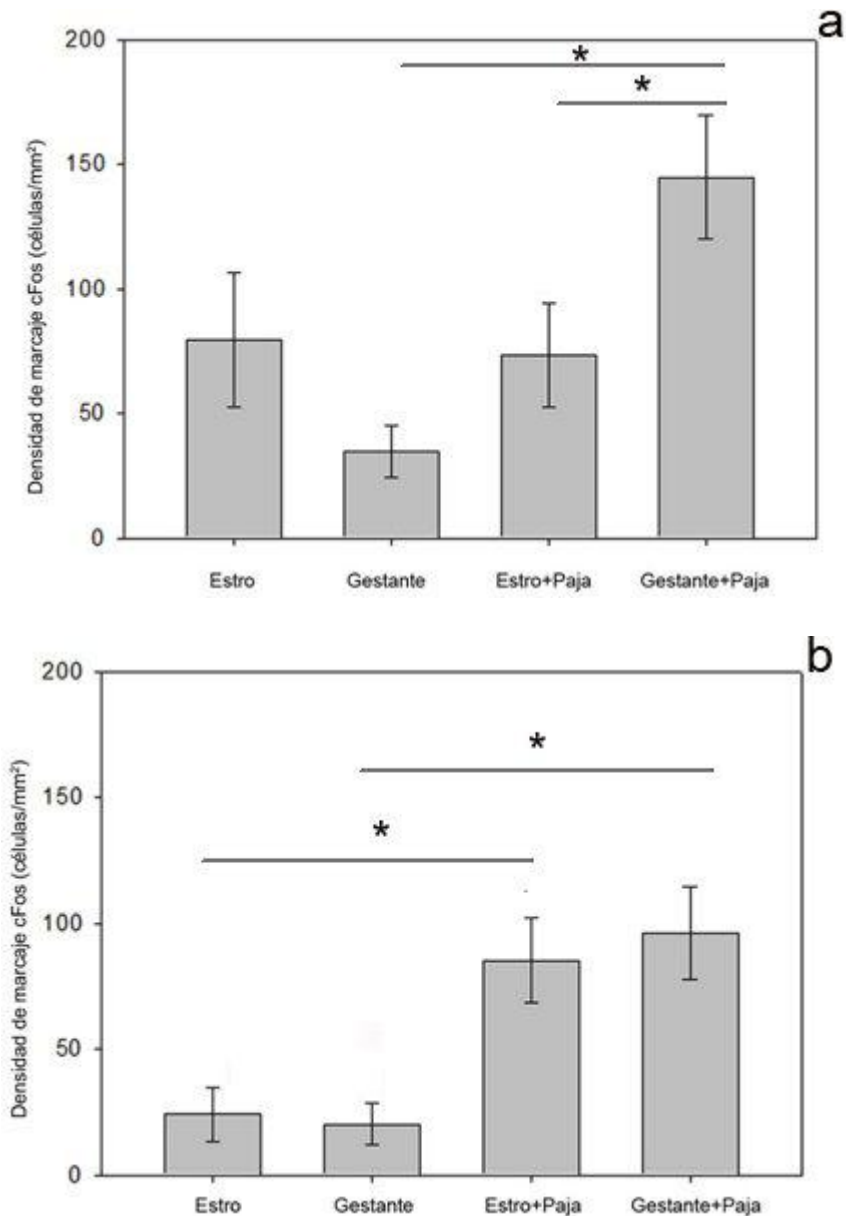


Figura 26. Diferencias en la densidad del número de células inmunorreactivas a c-Fos ($n=6$) entre grupos de análisis con respecto a la porción ventral del estriado dorsal (a: núcleo caudado; b: putamen). Letras representan comparaciones estadísticamente significativas. La barra muestra la media y los bigotes señalan el error estándar de la media. Asterisco sencillo denota $p<0.05$.

Por su parte, dentro de los grupos pertenecientes a la corteza, se observó que la corteza motora presenta un efecto de la paja ($p < 0.001$; Fig. 27, Tabla 3), del estado reproductivo ($p = 0.001$) y de la interacción del estado reproductivo con la paja ($p = 0.001$). En el caso de la corteza somatosensorial, se observa un efecto del estado reproductivo ($p = 0.001$), de la presencia de paja ($p < 0.001$), así como de su interacción ($p = 0.001$).

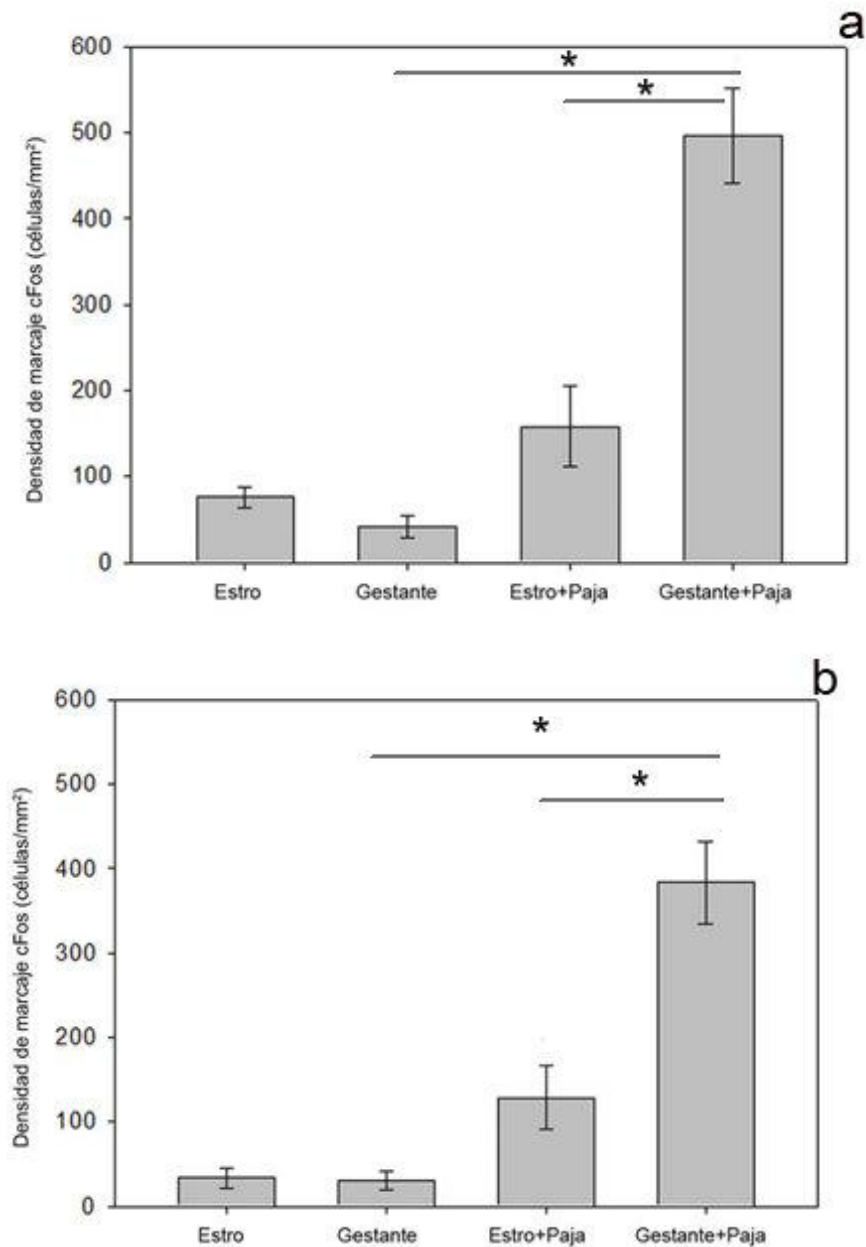


Figura 27. Diferencias en la densidad del número de células inmunorreactivas a c-Fos ($n=6$) entre grupos de análisis con respecto a la corteza somatosensorial (a) y motora (b). La barra muestra la media y los bigotes señalan el error estándar de la media. Asterisco sencillo denota $p < 0.05$.

Estos datos pueden resumirse mencionando que existen áreas que son significativas entre la interacción de edo. reproductivo y paja, las cuales fueron vCaud, dPut y áreas motora y somatosensorial. Estas áreas estarían implicadas en el acarreo de paja. Mientras que el dCaud y vPut no mostraron una interacción entre edo. reproductivo y paja, ya que sólo presentaron efectos principales de la paja, por lo que la actividad observada corresponde a la interacción con paja.

7.3 Correlaciones entre regiones asociadas con el acarreo de paja

A continuación, se presentan los resultados de la prueba de Spearman aplicado a los datos para determinar aquellas regiones que presentaron una correlación con respecto a la expresión de c-Fos. Aquellas regiones analizadas fueron dPut, vCaud, corteza motora y somatosensorial con las regiones de la CPF, su selección se debió a que mostraban una interacción significativa entre estado reproductivo y presencia de paja, además de que la prueba Holm-Sidak mostró que los grupos gestante+paja eran mayores que los grupos estro+paja y estro.

Una correlación significativa entre dos regiones cerebrales implicaría que las dos regiones mostraban una magnitud de activación neuronal similar durante aproximadamente los primeros 30 minutos de observación que corresponden al tiempo de inicio expresión de la proteína c-Fos. Una correlación entre dos áreas es consistente con la posibilidad de que estas dos áreas estén interconectadas, o formen parte de un circuito. (Tabla 6).

El análisis de correlación de las regiones de la CPF y el estriado dorsal indican que solamente el dPut se correlaciona con el área premotora ($r=0.76$; $p=0.49$), mientras que la corteza motora se correlaciona con el área prelímbica ($r=0.85$; $p=0.016$) y el área premotora ($r=0.90$; $p=0.006$)

	CCA	COF	PL	IL	Premotora	Piriforme
dPut	0.64 (0.12)	0.39 (0.38)	0.72 (0.07)	0.46 (0.29)	0.76 (0.049)	-0.25 (0.59)
vCaud	0.64 (0.12)	0.36 (0.43)	0.49 (0.27)	0.75 (0.052)	0.569 (0.19)	0.11 (0.82)
MOTORA	0.61 (0.15)	0.57 (0.18)	0.85 (0.016)	0.36 (0.43)	0.90 (0.006)	-0.14 (0.76)
SS	0.46 0.29	0.034 0.94	0.19 0.67	0.10 0.82	0.37 0.40	-0.36 0.94

Tabla 6. Correlaciones de c-Fos prefrontales-estriadas de animales gestantes+paja (n=7). Se muestran los coeficientes de correlación Spearman con sus niveles de significancia entre paréntesis. CCA: corteza cingulada anterior, COF: corteza orbitofrontal, PL: área prelímbica, IL: área infralímbica. Correlaciones significativas se señalan en negritas.

El análisis de correlación realizado entre las regiones dorsal del putamen, ventral del caudado y motora (Tabla 7: Fig. 28) permitió relacionarlas con otras áreas del siguiente modo: la región dorsal del putamen se correlaciona con el caudado dorsal ($r=0.96$; $p<0.001$) y la corteza motora ($r=0.86$; $p<0.014$). Mientras que la corteza motora presenta una correlación con el caudado dorsal ($r=0.89$; $p=0.003$), el putamen dorsal ($r=0.82$; $p=0.023$). Puede observarse que la región ventral del caudado y el putamen, además de la corteza somatosensorial no presentan una correlación con otras regiones en animales gestantes + paja.

	dCaud	vCaud	dPut	vPut	Motora	SS
dPut	0.96 (<0.001)	0.29 (0.54)	----	0.57 (0.2)	0.86 (0.014)	0.53 0.22
vCaud	0.18 (0.70)	---	0.29 (0.54)	0.29 (0.54)	0.43 (0.34)	-0.14 (0.76)
Motora	0.89 (0.007)	0.44 (0.34)	0.82 (0.023)	0.25 (0.59)	--	0.32 (0.48)
SS	0.61 0.15	-0.14 0.76	0.64 0.12	0.54 0.22	0.32 0.48	--

Tabla 7. Correlaciones de c-Fos intra-estriadas y cortico-estriadas de animales gestantes + paja (n=7). Se muestran los coeficientes correlación Spearman con sus niveles de significancia entre paréntesis. SS: corteza somatosensorial.

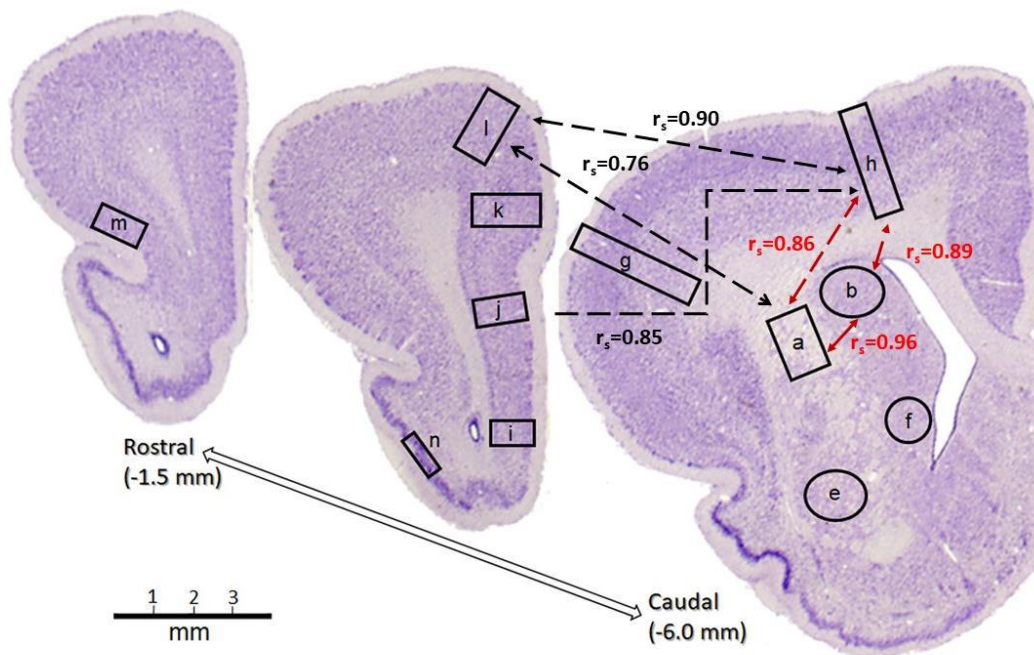


Figura 28. Representación gráfica de correlaciones de c-Fos prefrontales-estriatales, cortico-estriatales e intra-estriatales de animales gestantes+paja (n=7). Se señalan los coeficientes de correlación Spearman. Líneas punteadas negras corresponden a correlaciones involucrando la corteza prefrontal y líneas punteadas rojas corresponden a correlaciones intra-estriatales y cortico-estriatales.

7.3.1 Correlaciones entre regiones en conejas en estro que no acarrean paja

Se vio que existen correlaciones entre regiones del estriado dorsal (Tabla 8; Fig. 29) en conejas en estro que interactuaron con paja que generan un patrón distinto de regiones activas donde la porción dorsal del caudado presenta una correlación con la porción ventral del putamen ($r=0.99$; $p<0.001$), mientras que la corteza motora presentaría una correlación con la corteza somatosensorial ($r=0.89$; $p=0.02$). Se estarían observando diferencias entre las áreas que participan durante la interacción de la coneja con la paja dependiendo del estado reproductivo.

Cabe señalarse que también se presentaron correlaciones negativas (Tabla 8), lo que nos daría información sobre las áreas que interactuaban de forma distinta que significaba una activación de un área con una disminución de actividad en otra, por ejemplo, el putamen dorsal se correlacionó de forma negativa con el caudado dorsal ($r=-0.87$; $p=0.02$) y el putamen dorsal con el putamen ventral ($r=-0.84$; $p=0.04$).

	vCaud	dPut	vPut	SS	Motora
dCaud	0.54 (0.27)	-0.87 (0.02)	0.99 (<0.001)	0.03 (0.96)	0.14 (0.79)
vCaud	--	-0.54 (0.27)	0.61 (0.20)	0.26 (0.62)	-0.03 (0.33)
dPut	--	--	-0.84 (0.04)	-0.26 (0.62)	-0.31 (0.54)
vPut	--	--	--	0.058 (0.91)	0.12 (0.82)
SS	--	--	--	--	0.89 (0.02)

Tabla 8. Correlaciones de c-Fos cortico-estriadas e intra-estriadas de animales estro+paja (n=6). Se muestran coeficientes de correlación Spearman con sus niveles de significancia entre paréntesis. SS: corteza somatosensorial.

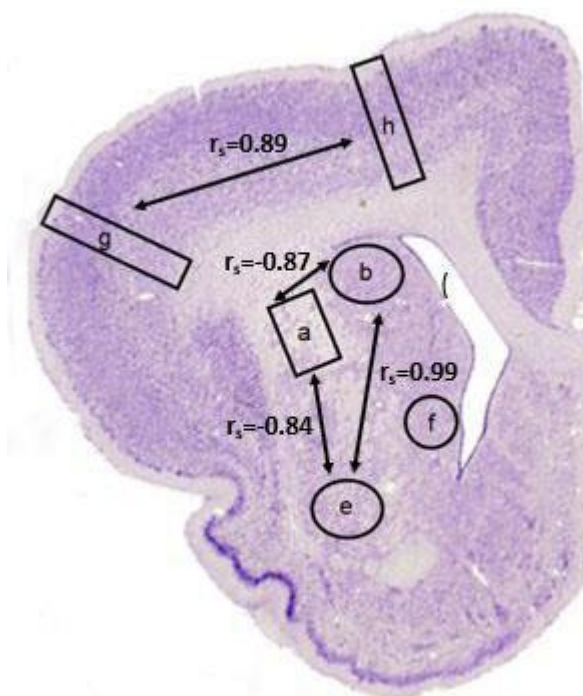


Figura 29. Representación gráfica de correlaciones de c-Fos cortico-estriadales e intra-estriadales de animales estro+paja (n=6). Se señalan los coeficientes de correlación Spearman. Líneas punteadas negras corresponden a correlaciones corticales e intra-estriadales.

7.4 Correlaciones entre expresión de c-Fos y componentes de la conducta de acarreo de paja

A continuación, se presenta la correlación de las variables comportamentales que fueron: latencia para interactuar con la paja, latencia para entrar a la caja nido acarreando paja, latencia para terminar un ciclo de acarreo de paja, la cantidad de ciclos realizadas durante 30 minutos (Tabla 8). Se observaron correlaciones entre el caudado ventral que presenta una correlación con el rango de tiempo que la coneja pasa dentro de la caja nido ($r=0.82$; $p=0.02$) y se observa que el putamen ventral presenta una correlación con el rango de duración del ciclo ($r=0.75$; $p=0.05$).

	Lat. Interact	Lat. entrar	Lat. Term.	Ciclos	Media dentro de caja nido	Rango dentro de caja nido	Media fuera de caja nido	Rango fuera de caja nido	Media duración del ciclo	Rango duración del ciclo
dCaud	-0.32 (0.49)	-0.54 (0.22)	-0.50 (0.25)	0.21 (0.64)	-0.09 (0.85)	0.14 (0.76)	0.07 (0.88)	0.250 (0.59)	-0.39 (0.38)	0.36 (0.43)
vCaud	0.16 (0.74)	-0.14 (0.76)	0.25 (0.59)	-0.58 (0.18)	0.70 (0.08)	0.82 (0.02)	-0.46 (0.29)	-0.321 (0.48)	0.43 (0.34)	0.29 (0.54)
dPut	0.47 (0.28)	-0.57 (0.18)	-0.39 (0.38)	0.13 (0.79)	0.11 (0.82)	0.29 (0.54)	0.14 (0.94)	0.21 (0.65)	-0.29 (0.54)	0.39 (0.38)
vPut	-0.16 (0.74)	-0.07 (0.88)	0.32 (0.48)	-0.16 (0.73)	0.40 (0.80)	0.57 (0.18)	0.32 (0.48)	0.14 (0.76)	0.29 (0.54)	0.75 (0.05)
Motora	-0.47 (0.28)	-0.61 (0.15)	-0.46 (0.29)	0.07 (0.88)	0.14 (0.76)	0.32 (0.48)	-0.14 (0.76)	0.11 (0.82)	-0.32 (0.48)	0.25 (0.59)
SS	-0.47 (0.28)	-0.36 (0.43)	-0.21 (0.65)	0.0 (1.0)	0.18 (0.70)	0.36 (0.43)	0.25 (0.59)	0.36 (0.43)	-0.14 (0.76)	0.57 (0.18)

Tabla 9. Correlación bivariada de las medidas comportamentales con áreas relevantes del estriado dorsal y la corteza motora y somatosensorial en animales gestantes+paja ($n=7$) con respecto a la latencia y los ciclos realizados. Se muestran coeficientes de correlación Spearman con sus niveles de significancia entre paréntesis. SS: corteza somatosensorial.

Finalmente, se presentan las correlaciones entre las regiones de la corteza prefrontal (Tabla 9) con las medidas comportamentales, puede verse que la CCA se relaciona con el rango de tiempo que la coneja permaneció dentro de la caja nido ($r=0.79$; $p=0.04$), además de que la corteza infralímbica presenta correlaciones con el rango dentro de la caja nido ($r=0.93$; $p=0.003$) y la media de éste ($r=0.78$; $p=0.04$). En el caso de la corteza piriforme se presentan tres correlaciones negativas con la media de tiempo que pasó fuera de la caja nido $r=-0.86$; $p=0.01$), el rango de tiempo que pasó fuera la caja nido ($r=-0.86$; $p=0.01$) y el rango de la duración del ciclo ($r=-0.821$; $p=0.02$).

	Lat. interact. Con paja	Lat. Entrar a caja nido	Lat. Para term. ciclo	Ciclos	Media dentro de caja nido	Rango dentro de caja nido	Media fuera de caja nido	Rango fuera de caja nido	Media duración ciclo	Rango duración ciclo
CCA	0.0 (1.0)	-0.14 (0.76)	0.0 (1.0)	-0.32 (0.48)	0.40 (0.38)	0.79 (0.04)	-0.18 (0.70)	-0.18 (0.70)	0.07 (0.88)	0.46 (0.29)
COF	0.0 (1.0)	-0.14 (0.76)	0.39 (0.38)	-0.14 (0.76)	0.02 (0.97)	0.32 (0.48)	-0.36 (0.43)	-0.18 (0.70)	-0.29 (0.54)	-0.07 (0.88)
PL	-0.08 (0.87)	-0.27 (0.56)	-0.36 (0.43)	-0.17 (0.71)	0.13 (0.79)	0.41 (0.36)	-0.18 (0.70)	0.05 (0.91)	-0.20 (0.67)	0.25 (0.59)
IL	-0.16 (0.74)	0.14 (0.76)	0.36 (0.43)	-0.72 (0.07)	0.78 (0.04)	0.93 (0.003)	-0.04 (0.94)	0.04 (0.94)	0.464 (0.294)	0.57 (0.18)
Premotora	0.0 (1.0)	0.52 (0.23)	-0.49 (0.27)	0.04 (0.94)	0.04 (0.94)	0.41 (0.36)	-0.41 (0.36)	-0.23 (0.61)	-0.34 (0.45)	0.13 (0.79)
Piriforme	0.0 (1.0)	-0.39 (0.38)	-0.43 (0.34)	0.31 (0.40)	-0.18 (0.70)	-0.004 (0.94)	-0.86 (0.01)	-0.86 (0.01)	-0.46 (0.29)	-0.821 (0.02)

Tabla 10. Correlación bivariada de las medidas comportamentales con áreas relevantes de la corteza prefrontal en animales gestante+paja (n=7) con respecto a la latencia para coleccionar, latencia para terminar un ciclo y el número de ciclos realizados. Se muestran coeficientes de correlación Spearman con sus niveles de significancia entre paréntesis. SS: corteza somatosensorial.

8. DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio muestran que las regiones activas en asociación con la conducta de acarreo de paja son consistentes con los circuitos cerebrales que han sido implicados en la expresión de la conducta flexible dirigida a una meta (CCA, COF, área prelímbica y caudado ventral) y en la expresión de conducta inflexible (corteza motora, somatosensorial y putamen dorsal).

Se presentó la expresión de c-Fos en regiones corticales y subcorticales específicas, incluyendo: CCA, COF, corteza piriforme, corteza motora, corteza somatosensorial, caudado ventral y putamen dorsal. Dicho patrón de actividad cerebral fue asociado exclusivamente a la conducta de acarreo de paja, pues no se observó en conejas en estro a quienes se les proporcionó paja, ni en conejas gestantes o en estro sin paja. A su vez, la existencia del patrón observado permitió delinear la posibilidad de que existan circuitos cortico-estriatales asociados con esta conducta.

Comportamiento de conejas gestantes y en estro

Con respecto a la conducta, se observaron claras distinciones entre conejas gestantes y conejas en estro. Primero, la motivación para interactuar con la paja se observó aumentada en conejas gestantes comparadas a conejas en estro: la latencia para interactuar con la paja fue significativamente menor en conejas gestantes. En el caso de las conejas en estro, ellas solamente se acercaron a la paja para olfatearla o comerla, pero no para colectarla, además de que presentaron latencias más largas para interactuar con la paja, sin llegar a realizar ningún ciclo de acarreo de paja.

No obstante, en los animales gestantes que realizaron el acarreo de paja se pudo observar la existencia de variabilidad entre individuos, ya que existieron conejas que tardaron más tiempo en entrar a la caja nido, además de que algunas de ellas realizaron más ciclos que otras. Las causas de esto podrían deberse a diferencias en la concentración hormonal circulante en la sangre o también a la experiencia previa con respecto a la construcción del nido. Es posible que, entre mayor cantidad de gestaciones previas de la coneja, el circuito esté más consolidado.

Por otra parte, en el caso de las conejas gestantes y en estro a las que no se les proporcionó paja se cuantificaron cuatro comportamientos: (1) veces que la coneja comió alimento durante una hora, (2) veces que la coneja se acercó al comedero, pero no ingirió alimento, (3) veces que la coneja tomó agua y (4) cantidad de salidas/entradas a la caja nido. Los resultados mostraron que solamente existió diferencia en el número de veces que la coneja gestante se acercó a consumir alimento, lo que podría indicar un aumento en el estado de alertamiento generalizado y no un aumento en el consumo de alimento, ya que existen estudios que señalan que la cantidad de alimento ingerido disminuye conforme se acerca el parto (González-Mariscal y cols. 1994).

Los datos comportamentales arrojaron información acerca de las características de cada uno de los grupos experimentales por lo que se buscó identificar aquellas regiones cerebrales que se activan durante el inicio de la conducta de acarreo de paja y proponer un circuito cortico estriatal analizando la actividad prefrontal, cortical y estriatal.

Expresión de c-Fos en la corteza prefrontal

De forma cualitativa, se ha visto que la coneja gestante al acarrear la paja evita otros estímulos que desvíen su atención, lo cual requiere de la participación de la CPF para suprimir los elementos irrelevantes del medio ambiente (Heidbreder y Groenewegen 2003, Barbas y Zikopoulos 2007). Considerando que la conducta de acarreo de paja es parte de la conducta materna de construcción del nido, la CPFm estaría participando de forma importante, Afonso y cols. (2007) han presentado información acerca de cómo una lesión extensa en la CPFm desorganiza conductas maternas provocando latencia más largas para realizar los comportamientos que son alterados por estímulos cercanos a la madre, algo que no ocurre en el acarreo de paja, donde la coneja mantiene la atención y el objetivo por una cierta cantidad de ciclos.

Los resultados obtenidos de la CPF pueden dividirse en 3 condiciones: a) áreas donde se integra información y se verifica la realización del comportamiento (CCA y COF), b) áreas de la CPF que han sido involucradas en paradigmas de activación y extinción de comportamientos (corteza prelímbica e infralímbica) y c) áreas de la corteza que forman parte de procesamiento sensorial y motor (corteza piriforme y la corteza premotora).

Considerando la CCA y COF, se encontró que estas regiones mostraron una interacción entre estado reproductivo y la paja, además de que los grupos gestante+paja versus estro+paja, así como gestante+paja versus gestante fueron significativamente diferentes en las pruebas post-hoc. Este resultado indica que la actividad neuronal en estas regiones se encuentra asociada selectivamente con el acarreo de paja. Por medio de ellas, se realizaría un monitoreo de las acciones y también una integración sensorial de la paja.

Es interesante considerar que estas áreas también presentan activación en una conducta materna en humanos observada en estudios de resonancia magnética funcional (fMRI), donde a madres se les presentan imágenes o sonidos que involucran el llanto de sus hijos (Lorberbaum y cols. 2002, Seifritz y cols. 2003, Sander y cols. 2007, Li y cols. 2018). Se ha encontrado que principalmente la CCA y la amígdala se activan en respuesta al llanto y estas regiones estarían formando parte de los circuitos afectivo, cognitivo o motor (Strathearn y cols. 2008).

Por otra parte, se ha visto que la corteza prelímbica e infralímbica (Pereira y Morrell 2011, Febo y cols. 2012, Gilmartin y cols. 2014, Gourley y Taylor 2016) se activan cuando se promueve o extingue un comportamiento. Esto nos hizo pensar que la corteza prelímbica mostraría activación cuando se comenzara a construir el nido, mientras que la corteza infralímbica se activaría al terminar esta conducta. Sin embargo, los resultados no apoyaron esa idea, aunque el área prelímbica mostró una relación entre estado reproductivo y paja, las pruebas post-hoc no mostraron una diferencia significativa entre los grupos gestante+paja versus estro+paja, además de que tampoco el área infralímbica mostró una interacción significativa entre estado reproductivo y paja. Puede señalarse que en este trabajo no se midió la extinción de una conducta, ya que sólo se investigaron los primeros 30 minutos de la conducta.

En el caso de la corteza premotora que se encarga de preparar los movimientos de una acción se encontró un efecto principal de la paja, sin un efecto principal del estado reproductivo o una interacción entre ellos. Este resultado indicaría que la corteza premotora se activa en asociación con la simple interacción con la paja, sin importar si la acarrea o no. Por su parte, en la corteza piriforme se observó una mayor actividad de c-Fos en el grupo gestante y estro con paja comparado con el resto de los grupos, lo que indicaría dos cosas: (1) un procesamiento distinto de

acuerdo con el objetivo de la interacción con la paja y (2) la atractividad del estímulo olfatorio para activar una mayor cantidad neuronas de la corteza piriforme.

De manera cualitativa se observó que en los grupos que interactuaron con paja, las conejas realizaron una mayor cantidad de desplazamientos dentro de la jaula, lo cual puede explicar la existencia de una mayor actividad neuronal en la corteza premotora. Sin embargo, esto no sucede en las conejas gestantes sin paja, que se ha mostrado realizan más desplazamientos dentro de la jaula, pero sus resultados mostraron una menor expresión de c-Fos.

Los resultados obtenidos de la CPF llevaron a considerar que estudios previos realizados en la coneja mostraron la existencia de conexiones entre la CPFm y el estriado (Carman y cols. 1963, Buchanan y cols. 1994). A lo que la CPF podía correlacionarse con otras regiones que formarían parte del llamado circuito fronto-estriado que comprende el estriado dorsal (caudado y putamen), la corteza motora y la corteza somatosensorial (Cano-Ramírez y Hoffman 2017).

Expresión de c-Fos en el estriado dorsal, corteza motora y corteza somatosensorial

De las áreas analizadas sólo el putamen dorsal, la corteza somatosensorial y la corteza motora mostraron una interacción significativa entre estado reproductivo y paja. Estos resultados pueden entenderse de dos formas: (1) considerando las características motoras de la conducta de acarreo de paja, que involucra la realización de cadenas sintácticas de acciones que se codifican en áreas corticales motoras y sensoriales que cuentan con proyecciones al estriado dorsal (Alloway y cols. 2017) (2) con la respuesta neuronal existente en la conducta materna, donde se ha visto que la activación de este circuito incluiría al área motora primaria y al estriado, como sucede cuando madres humanas observan una grabación con el rostro de sus hijos llorando lo que provocaría la necesidad de realizar una acción para consolarlos (Strathearn y cols. 2008).

En el presente trabajo se encontró actividad en el vCaud (asociado con el acarreo de paja) y el vPut (asociado con la presencia de paja, pero no con el acarreo de paja). Esto podría indicar que la respuesta de tipo emocional generada en este circuito puede implicar la motivación para acarrear paja para construir un nido o una respuesta emocional frente a la ingesta de alimento. Cabe señalarse que la continuación de este trabajo podría implicar el estudio del resto de los

componentes de este circuito involucrando la amígdala, el hipocampo y el NuAcc, lo que daría una imagen más completa de este circuito.

Correlaciones de expresión de c-Fos asociadas con acarreo de paja

Considerando que la conducta de acarreo de paja mostró una mayor cantidad de células inmunoreactivas a c-Fos se encontraron correlaciones significativas que involucraron a la corteza motora, corteza premotora, área prelímbica y dPut. Los resultados obtenidos nos llevan a considerar que la integración de la información para realizar el acarreo de paja sería evaluada por el área prelímbica y el dPut, mientras que su la preparación y la ejecución de la conducta sea guiada por la corteza premotora y la motora.

Asimismo, las conejas gestantes que interactuaron con paja presentaron correlaciones de la corteza motora, corteza somatosensorial, vCaud y dPut de la siguiente forma: corteza motora con la corteza prelímbica y el área premotora, dPut con el dCaud y con la corteza motora. Se vio también la existencia de una correlación alta pero no significativa entre el vCaud y el área infralímbica. Sin embargo, en el caso del vCaud (componente del circuito límbico) no se mostraron correlaciones significativas con otra región.

Sobre esto, las correlaciones podrían señalar que la corteza motora y el área prelímbica estarían asociadas para el inicio de la conducta junto las porciones dorsales del estriado. Esto iría acorde con lo observado acerca de que el área prelímbica participa en la implementación de estrategias comportamentales y en la memoria de trabajo. Además de que las porciones dorsales del estriado se relacionan con procesamiento sensoriomotor.

Correlaciones de expresión de c-Fos asociadas con la interacción con paja

Se encontraron correlaciones significativas positivas que involucraban el dCaud, vPut y corteza somatosensorial que mostrarían la existencia de un aumento de actividad de estas áreas que podría ser consecuencia del procesamiento sensorial del estímulo, además del control y velocidad de los movimientos realizados por la coneja (Villablanca 2010). En cuanto al dPut se encontró negativamente correlacionado con el dCaud y el vPut lo cual posiblemente estaría relacionado con que interactuar con paja sin acarrearla no es una actividad que implique realizarla para conseguir un objetivo, sólo una experiencia hedónica.

Un punto interesante que se observó con respecto al dCaud es que fue la única área del estriado que presentó coactivación en ambos comportamientos, aunque en la conducta de acarreo de paja era correlacionada de forma positiva con la región del dPut, y en las conejas en estro se correlacionaba negativamente. Por lo que el dCaud podría servir como enlace entre diferentes regiones en distintas condiciones de comportamiento.

Las correlaciones presentadas pueden dar información sobre la existencia de dos tipos de activación con respecto a la interacción con paja dependiendo del estado reproductivo de la coneja, por lo que el comportamiento de acarreo de paja implicaría activación específica de diferentes áreas cerebrales.

Correlaciones entre medidas comportamentales y expresión de c-Fos

Las medidas comportamentales que fueron analizadas se pueden clasificar en: (1) motivación para acarrear paja: latencia para interactuar, latencia para acarrear y latencia para completar el primer ciclo, (2) intensidad o magnitud del comportamiento: número de ciclos y media de la duración del ciclo, (3) flexibilidad o variabilidad de los ciclos: rango de tiempo dentro de la caja nido, rango de tiempo fuera de la caja nido, media de la duración del tiempo fuera de la caja y rango de la duración del ciclo.

De estas medidas comportamentales, las correlaciones positivas nos dieron información acerca de áreas cerebrales que se activan cuando se realiza un comportamiento como lo puede ser con el tiempo que la coneja pasó dentro de la caja nido (CCA, corteza infralímbica, vCaud y vPut), que es el momento cuando realiza dos comportamientos, el depositar la paja y rascar dentro de la caja nido para acomodar la paja, lo que sería relacionado con la verificación de la cantidad de paja que haya sido colectada hasta el momento y el acomodo del nido.

Por otra parte, las correlaciones negativas se observan cuando un área cerebral presenta una menor actividad relacionada con un comportamiento (corteza piriforme con la duración del ciclo y el tiempo que pasó fuera de la caja nido) lo que podría manifestar que posiblemente la cantidad de células activas de la corteza piriforme se relacionen con la motivación para realizar los ciclos más rápidamente.

Para finalizar, se puede comentar que el modelo estudiado provee información acerca de cómo es que un comportamiento dirigido a una meta como lo es la construcción del nido es generado por medio de la integración de señales hormonales de un estado reproductivo y de un estímulo externo.

9. CONCLUSIONES

1. La gestación modifica la respuesta conductual y neuronal ante la disponibilidad de material para la construcción del nido, como lo es la paja.
2. Se han identificado áreas específicas de la corteza prefrontal que podrían formar parte de un circuito relacionado a la construcción del nido y/o un estado motivacional generalizado que involucrarían COF, corteza piriforme, ACC, área infralímbica y área prelímbica.
3. Existen áreas del estriado específicas (caudado ventral y putamen dorsal) que se asocian con el comportamiento repetitivo de acarreo de paja. También se encontró un patrón en las conejas que no colectaban paja (caudado ventral y putamen ventral).
4. La presencia de paja activa diferentes regiones cerebrales y circuitos neuronales de acuerdo con el estado endócrino reproductivo, ya que en el caso de las conejas que se encuentran en estro, la expresión observada correspondería mayormente a un aspecto motor de su interacción. El patrón observado en la coneja gestante se relaciona con la expresión de una conducta dirigida a una meta considerando la flexibilidad para realizarla.
5. El marcaje de c-Fos observado en las áreas propuestas en este trabajo indica la presencia de un circuito cortico-estriatal que regularía el comportamiento de acarreo de paja.

10. PERSPECTIVAS

1. Es necesario continuar esta investigación explorando regiones cerebrales implicadas en el circuito límbico como: el estriado ventral, el hipocampo y la amígdala, que presentan conexiones con las áreas mostradas en este trabajo.
2. La coneja europea sin experiencia maternal que ha sido criada en el laboratorio presenta latencias más largas para comenzar a construir su nido, por lo que se vuelve necesario investigar si existe un patrón de expresión distinto en un grupo de conejas en su primera gestación, así como investigar a otras especies de conejas que no presentan estas latencias.
3. Considerando que existen diferentes tipos de neuronas que expresan distintos neurotransmisores, la identificación de ellas por medio de una técnica de doble marcaje permitirá obtener información detallada acerca de cuáles son las características de ellas y comprender más a profundidad cómo se modula la transmisión de información dentro del circuito propuesto.

11. REFERENCIAS

- Afonso V, Sison M, Lovic V y Fleming A. 2007. Medial prefrontal cortex lesions in the female rat affect sexual and maternal behavior and their sequential organization. *Behavioral Neuroscience* 121, 515-526.
- Albert U, Maina G, Bogetto F y Ravizza, L. 2000. The role of recent life events in the onset of obsessive-compulsive disorder. *CNS Spectr* 5(12):44-50.
- Aldridge JW y Berridge KC. 1998. Coding of serial order by neostriatal neurons: A “natural action” approach to movement sequence. *The Journal of Neuroscience* 18(7):2777-2787.
- Alexander GE, DeLong MR y Strick PL. 1986. Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Ann. Rev. Neurosci* 9:358-81.
- Alexander GE y Crutcher MD. 1990. Preparation for movement: neural representations of intended direction in three motor areas of the monkey. *Journal of Neurophysiology* 64(1): 133-150.
- Alloway, KD, Smith, JB, Mowery, TM y Watson, GD. 2017. Sensory processing in the dorsolateral striatum: the contribution of thalamostriatal pathways. *Frontiers in Systems Neuroscience* 11: doi: 10.3389/fnsys.2017.00053
- Bading, H. 2013. Nuclear calcium signalling in the regulation of brain function. *Nature Reviews* 14, 593-608.
- Balleine BW, Delgado MR y Hikosada O. 2007. The role of the dorsal striatum in reward and decision-making. *The Journal of Neuroscience* 27(31): 8161-8165.
- Balleine BW y O’Doherty JP. 2010. Human and rodent homologies in action control: corticostriatal determinants of goal-directed and habitual action 35: 48-69.
- Balleine BW, Leung BK y Ostlund SB 2011. The orbitofrontal cortex, predicted value, and choice. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1239-43-50.
- Banca P, Voon V, Vestergaard MD, Philipak G, y cols. 2015. Imbalance in habitual versus goal directed neural systems during symptom provocation in obsessive-compulsive disorder. *Brain* 138: 798-811.
- Barbas H y Zikopoulos B. 2007. The prefrontal cortex and flexible behavior. *The Neuroscientist* 5, Vol. 13, 532-545.
- Barker JM, Taylor JR y Chandler LJ. 2014. A unifying model of the role of the infralimbic cortex in extinction and habits. *Learning and Memory* 21:441-448.
- Bartels A y Zeki S. 2004. The neural correlates of maternal and romantic love. *NeuroImage* 21: 1155-1166.
- Basurto E, Hoffman K, Lemus AC y González-Mariscal G. 2018. Electrolytic lesions to the anterior hypothalamus-preoptic area disrupt maternal nest-building in intact and ovariectomized, steroid-treated rabbits. *Hormones and Behavior* 102: 48-54.

- Baum MJ y Cherry JA. 2015. Processing by the main olfactory system of chemisignals that facilitate mammalian reproduction. *Horm Behav.* 68:53-64.
- Bekkers JM y Suzuki N. 2013. Neurons and circuits for odor processing in the piriform cortex. *Trends in Neurosciences* 36(7): 429-438.
- Benjamin M, Jackson JC, Golden GT. 1978. Cortical projections of the thalamic mediodorsal nucleus in the rabbit. *Brain Research* 141: 251-265.
- Berridge KC, Aldridge JW, Houchard KR, Zhuang X. 2005. Sequential super-stereotypy of an instinctive fixed action pattern in hyper-dopaminergic mutant mice: a model of obsessive compulsive disorder and Tourette's. *BMC Biology* 3 (4): 1-16.
- Beyer C y Mena F. 1970. Parturition and lactogenesis in rabbits with high spinal cord transection. *Endocrinology* 87: 195-197.
- Beyer C, Hoffman KL y González-Flores O. 2007. Neuroendocrine regulation of estrous behavior in the rabbit: Similarities and differences with the rat. *Hormones and Behavior* 52, 2-11.
- Bissonette GB, Powell EM, Roesch MR. 2013. Neural structures underlying set-shifting: roles of medial prefrontal cortex and anterior cingulate cortex. *Behav Brain Res* 250:91-101.
- Broad KD, Curley JP y Keverne EB. 2006. Mother-infant bonding and the evolution of mammalian social relationships. *Phil Trans. R. Soc. B* 361: 2199-2214.
- Brunton PJ y Russell JA. 2008. The expectant brain: adapting for motherhood. *Nature Reviews Neuroscience* 9: 11-25.
- Buchanan SL, Thompson RH, Maxwell BL y Powell DA. 1994. Efferent connections of the medial prefrontal cortex in the rabbit. *Exp. Brain Res.* 100: 469-483.
- Burton A, Nakamura K y Roesch MR. 2015. From ventral-medial to dorsal-lateral striatum: Neural correlates of reward-guided decision-making. *Neurobiology of Learning and Memory* 117: 51-59.
- Caba M, Pau KY, Beyer C, González A, Silver R y Spies H. 2000. Coitus-induced activation of c-fos and gonadotropin releasing hormone in hypothalamic neurons in female rabbits. *Molecular Brain Research* 78, 68-79.
- Caba M, Beyer C, González-Mariscal G y Morrell J. 2002. Immunocytochemical detection of estrogen receptor- α in the female rabbit forebrain: topography and regulation by estradiol. *Cellular Neuroendocrinology*, 77, 208-222.
- Caba M, Rovirosa MJ y Silver R. 2003. Suckling and genital stroking induces Fos expression in hypothalamic oxytocinergic neurons of rabbit pups. *Brain Res Dev.* 2003 Jul 12;143(2):119-28.
- Caba M, Rovirosa MJ, Beyer C y González-Mariscal G. 2003. Immunocytochemical detection of progesterone receptor in the female rabbit forebrain: distribution and regulation by estradiol and progesterone. *Journal of Neuroendocrinology*, 15, 855-864.
- Cano-Ramírez H y Hoffman KL. 2017. Activation of the orbitofrontal and anterior cingulate cortices during the expression of a naturalistic compulsive-like behavior in the rabbit. *Behavioural Brain Research* 320:67-74.

- Cano-Ramírez H y Hoffman KL. 2018. Activation of cortical and striatal regions during the expression of a naturalistic compulsive-like behavior in the rabbit. *Behavioural Brain Research* 351: 168-177.
- Cardinal RN, Parkinson JA, Hall J y Everitt BJ. 2002. Emotion and motivation: the role of the amygdala, ventral striatum and prefrontal cortex. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 26: 321-352.
- Caria A, de Falco S, Venbuti P, Lee S y cols. 2012. Species-specific response to human infant faces in the premotor cortex. *NeuroImage* 60(2): 884-893.
- Carman JB, Cowan WM y Powell TPS. 1963. The organization of cortico-striate conexions in the rabbit. *Brain* 86: 526-560.
- Carter CS, Braver TD, Botvinick MM, Noll D y cols. 1998. Anterior cingulate cortex, error detection, and the online monitoring of performance. *Science* 280 (5364) : 747-749.
- Carretié L, Ríos M, De la Gándara BS, Tapia M y cols. 2009. The striatum beyond rewar : caudate responds intensely to unpleasant pictures. *Neuroscience* 164 : 1615-1622.
- Cassaday HJ, Nelson AJ y Pezze MA. 2014. From attention to memory along the dorsal-ventral axis of the medial prefrontal cortex: some methodological considerations. *Frontiers in systems neuroscience* 8 (160): 1- 24.
- Catani M, Dell'Acqua F, Verdani F y Malik F. 2012. Short frontal lobe connections of the human brain. *Cortex* 48: 273-291.
- Challis J, Davies J y Ryan K. 1973. The Concentrations of Progesterone, Estrone and Estradiol-17 in the Plasma of Pregnant Rabbits. *Endocrinology* 93, 971-976.
- Chamberlain SR, Menzies L, Hampshire A y Suckling J. 2008. Orbitofrontal dysfunction in patients with obsessive-compulsive disorder and their unaffected relatives. *Science* 321: 421-422.
- Chaudhuri A, Zangenehpour S, Rahbar-Dehgan R y Ye F. 2000. Molecular maps of neuronal activity and quiescence. *Acta Neurobiol. Exp.* 60, 403-410.
- Chirino R, Beyer C, González-Mariscal G. 2007. Lesion of the main olfactory epithelium facilitates maternal behavior in virgin rabbits. *Behav Brain Res* 180(2):127-32.
- Christakou A, Robbins TW y Everitt BJ. 2004. Prefrontal cortical-ventral striatal interactions involved in affective modulation of attentional performance: Implications for corticostriatal circuit function. *The Journal of Neuroscience* 24 (4): 773-780.
- Cohen KE y Padoa-Schioppa C. 2016. The Dynamic nature of value-based decisions. *Nature Neuroscience* 19(7): 866-867.
- Coutureau E y Killcross S. 2003. Inactivation of the infralimbic prefrontal cortex reinstates goal-directed responding in overtrained rats. *Behavioral Brain Research* 146: 167-174.
- Crowley WR. 2015. Neuroendocrine regulation of lactation and milk production. *Compr Physiol* Jan;5(1):255-91. doi: 10.1002/cphy.c140029.

- Cruz ML y Beyer C. 1972. Effects of Septal lesions on maternal behavior and lactation in the rabbit. *Physiology and Behavior* 9, 361-365.
- Curran T y Morgan J. 1986. Role of ion flux in the control of c-Fos expression. *Nature* 322, 552-555.
- Curran T y Morgan J. 1994. Fos: an immediate-early transcription factor in neurons. *J Neurobiol.* 26 (3), 403-412.
- Dalley JW, Cardinal RN y Robbins TW. 2004. Prefrontal executive and cognitive functions in rodents: neural and neurochemical substrates. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 28: 771-784.
- De Brujin ER y von Rehin DT. 2012. Is your error my concern? An event-related potential study on own and observed error detection in cooperation and competition. *Front. Neurosci.* <https://doi.org/10.3389/fnins.2012.00008>
- Devinsky O, Morrell MJ y Vogt BA. 1995. Contributions of anterior cingulate cortex to behavior. *Brain* 118(1): 279-306.
- Di Martino A, Scheres A, Margulies DS, Kelly AMC y cols. 2008. Functional connectivity of human striatum: *Cerebral Cortex* 18:2735-2747.
- Distel H y Hudson R. 1985. The contribution of the olfactory and tactile modalities to the nipple-search behavior of newborn rabbits. *J Comp Physiol A.* 157(5):599-605.
- Domínguez M, Aguilar-Roblero R y González-Mariscal G. 2017. Bilateral lesions of the paraventricular hypothalamic nucleus disrupt nursing behavior in rabbits. *Eur J Neurosci.* 2017 Sep;46(5):2133-2140. doi: 10.1111/ejn.13656.
- Duncan G, Knapp D y Breese G. 1996. Neuroanatomical characterization of Fos induction in rat behavioral models of anxiety. *Brain Research* 713, 79-91.
- Eagle DM, Humby T, Howman M, Reid-Henry A y cols. 1999. Differential effects of ventral and regional dorsal striatal lesions on sucrose drinking
- Etkin A, Egner T y Kalish R. 2011. Emotional processing in anterior cingulate and medial prefrontal cortex. *Trends in cognitive sciences* 15 (2): 85-93.
- Euston D, Gurber A y McNaughton L. 2012. The role of medial prefrontal cortex in memory and decision making. *Neuron* 76, 1057-1070.
- Everitt BJ y Robbins TW. 2016. Drug addiction: updating actions to habits to compulsions ten years on. *Annu. Rev. Psychol.* 67: 23-50.
- Febo M. 2012. Firing patterns of maternal rat prelimbic neurons during spontaneous contact with pups. *Brain Res Bull* 88 (5): 534-542.
- Ferris CF, Kulkarni P, Sullivan JM, Harder JA, Messenger TL y Febo M. 2005. Pup suckling is more rewarding than cocaine: Evidence from functional magnetic resonance imaging and three-dimensional computational analysis. *The Journal of Neuroscience* 25(1): 149-156.

- Fleischhauer K, Zillers K y Schleicher A. 1980. A revised cytoarchitectonic map of the neocortex of the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Anat. Embryol* 161:121-131.
- Fleming A y Rosenblatt J. 1974. Olfactory regulation of maternal behavior in rats: I. Effects of olfactory bulb removal in experienced and inexperienced lactating and cycling females. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 86(2): 221-232.
- Fleming A, Vaccarino F, Tambosso L, Chee P. 1979. Vomeronasal and olfactory system modulation of maternal behavior in the rat. *Science*. 203(4378):372-374.
- Fleming AS, O'Day DH y Kraemer GW. 1999. Neurobiology of mother-infant interactions: experience and central nervous system plasticity across development and generations. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 23, 673-685.
- Francois J, Huxter J, Conway MW, Lowry JP y cols. 2014. Differential contributions of infralimbic prefrontal cortex and nucleus accumbens during reward-based learning and extinction. *The Journal of Neuroscience* 34(2): 596-607.
- Freeze BS, Kravitz AV, Hammack N, Berke JD y Kreitzer AC. (2013). Control of basal ganglia output by direct and indirect pathway projection neurons. *The Journal of Neuroscience* 33 (47) - 18531-18539.
- Fuchs A, Cubile L, Dawood YM y Jorgensen FN. 1984. Release of oxytocin and prolactin by suckling in rabbits throughout lactation. *Endocrinology* 114 (2): 462-469.
- Fuchs PN, Peng YB, Boyette Davis JA y Uhelski ML. 2014. The anterior cingulate cortex and pain processing. *Front Integr. Neurosci.* 8:35. doi: 10.3389/fnint.2014.00035.
- Fudge JL y Haber S. 2002. Defining the caudal ventral striatum in primates: cellular and histochemical features. *J Neurosci* 22(23):10078-10082.
- Fuster J. 2014. The prefrontal cortex makes the brain a preadaptive system. *Proceedings of the IEEE* 102, Vol. 4, 417-426.
- Fuster J. 2015. *The prefrontal cortex*. EU: Academic Press
- Gabbott P, Warner T, Jays P y Bacon S. 2003. Areal and synaptic interconnectivity of prelimbic (area 32), infralimbic (area 25) and insular cortices in the rat. *Brain Research* 993, 59-71.
- Gallese V, Fadiga L, Fogassi L y Rizzolatti G. 1996. Action recognition in the premotor cortex. *Brain* 119: 593-609.
- Gao YJ y Ji R. 2009. C-Fos or pERK, Which is a better marker for neuronal activation and central sensitization after noxious stimulation and tissue injury? *The Open Pain Journal* 2, 11-17.
- Glen AL y Yang Y. 2012. The potential role of the striatum in antisocial behavior and psychopathy. *Biol Psychiatry* 72:817-822.
- Gillan CM y Robbins TW. 2014. Goal-directed learning and obsessive-compulsive disorder. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 369: 20130475.
- Gillan CM, Apergis-Schoute AM, Morein-Zamir S y cols. 2015. Functional neuroimaging of avoidance habits in obsessive-compulsive disorder. *Am J Psychiatry* 172:284-293.

- Gillan CM, Robbins TW, Sahakian BJ, van den Heuvel OA y van Wingen G. 2016. The role of habit in compulsivity. *European Neuropsychopharmacology* 26: 828-840.
- Giustino TF y Maren S. 2015. The role of the medial prefrontal cortex in the conditioning and extinction of fear. *Front Behav Neurosci.* 9;9:298. doi: 10.3389/fnbeh.2015.00298.
- Goldstein RZ y Volkow ND. 2011. Dysfunction of the prefrontal cortex in addiction: neuroimaging findings and clinical implications. *Nature Reviews Neuroscience* 12: 652- 669.
- González-Mariscal G, Melo A, Zavala A y Beyer C. 1990. Variations in chin-marking behavior of New Zealand Female Rabbits throughout the whole reproductive cycle. *Physiology y Behavior* 48, 361-365.
- González-Mariscal G, Díaz-Sánchez V, Melo A, Beyer C y Rosenblatt J. 1994. Maternal Behavior in New Zealand White Rabbits: Quantification of Somatic Events, Motor Patterns and Steroid Plasma Levels. *Physiology and Behavior*, 55, 6, 1081-1089.
- González-Mariscal G, Melo A, Jiménez P y Rosenblatt J. 1996. Estradiol, progesterone and prolactin regulate maternal nest-building in rabbits. *Journal of Neuroendocrinology*, Vol. 8, 901-907.
- González-Mariscal G, Cuamatzi E y Rosenblatt J. 1998). Hormones and External Factors: Are They “On/Off” Signals for Maternal Nest-Building in Rabbits? *Hormones and Behavior* 33, 1-8.
- González-Mariscal G. 2001. Neuroendocrinology of maternal behavior in the rabbit. *Hormones and behavior* 40: 125-132.
- González-Mariscal G, Jiménez P, Beyer C y Rosenblatt J. 2003. Androgens stimulate specific aspects of maternal nest-building and reduce food intake in rabbits. *Hormones and Behavior* 43, 312-317.
- González-Mariscal G, Chirino R, Beyer C y Rosenblatt JS. (2004). Removal of the accessory olfactory bulbs promotes maternal behavior in virgin rabbits. *Behavioral Brain Research* 152: 89-95.
- González-Mariscal G, Chirino R, Rosenblatt J y Beyer C. 2005. Forebrain implants of estradiol stimulate maternal nest-building in ovariectomized rabbits. *Hormones and Behavior*, 47, 272-279.
- González-Mariscal G y Gallegos JA. 2007. New Zealand white rabbits show non-selective nursing in various types of nests. *World Rabbit Sci.* 15, 167-172.
- González-Mariscal G, Jiménez A, Chirino R y Beyer C. 2009. Motherhood and Nursing stimulates c-FOS Expression in the Rabbit Forebrain. *Behavioural Neuroscience*, Vol. 123, No. 4, 731-739.
- González-Mariscal G, Lemus AC, Vega-González A y Aguilar-Roblero R. 2013. Litter size determines circadian periodicity of nursing in rabbits. *Chronobiology International* 30(5): 711-718.
- González-Mariscal G y Gallegos JA. 2014. The maintenance and termination of maternal behavior in rabbits: Involvement of suckling and progesterone. *Physiology and Behavior* 124, 72-76.
- González-Mariscal G, García C y Jiménez A. 2015. Biostimulation and nursing modify mating-induced c-Fos immunoreactivity in the female rabbit forebrain. *Brain Research* 1608: 66-74.

- González-Mariscal G, Caba M, Martínez-Gómez M y cols. 2016. Mothers and offspring: The rabbit as a model system in the study of mammalian maternal behavior and sibling interactions. *Horm Behav* 77: 30-41.
- Gould HJ. 1986. Body surface maps in the somatosensory cortex of rabbit. *The Journal of Comparative Neurology* 243:207-233.
- Grahn JA, Parkinson JA y Owen AM. 2008. The cognitive functions of the caudate nucleus. *Progress in Neurobiology* 86: 141-155.
- Graybiel AM. 1997. The basal ganglia and cognitive pattern generators. *Schizophrenia Bulletin* (23) 3, 459-468.
- Graybiel AM. 2005. The basal ganglia: learning new tricks and loving it. *Current Opinion in Neurobiology* 15: 638-644.
- Gruber AJ y McDonald RJ. 2012. Context, emotion, and the strategic pursuit of goals: interactions among multiple brain systems controlling motivated behavior. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 6(50): doi: 10.3389/fnbeh.2012.00050.
- Gu Q. 2002. Neuromodulatory transmitter systems in the cortex and their role in cortical plasticity. *Neuroscience* 111(4): 815-35.
- Haber S. 2003. The primate basal ganglia: parallel and integrative networks. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 26, 317-330.
- Haber S. 2008. Parallel and Integrative processing through the Basal Ganglia reward circuit: lessons from addiction. *Biol Psychiatry* 64: 173-174.
- Haber S y Calvazara R. 2009. The cortico-basal ganglia integrative network: the role of the thalamus. *Brain Research Bulletin* 78: 69-74.
- Haber SN. 2011. "Neuroanatomy of reward: a view from the ventral striatum" en: *Neurobiology of Sensation and Reward*: Boca Raton: CRCPress/Taylor Francis.
- Haber S. 2015. Corticostriatal circuitry. *Dialogues Clin. Neurosci* 18: 7-21.
- Hadj-Bouziane F, Benatru I, Brovelli A, Klinger H y cols. 2013. Advanced Parkinson's disease effect on goal-directed and habitual processes involved in visuomotor associative learning. *Frontiers in Human Neuroscience* 6, 1351: doi: 10.3389/fnhum.2012.00351.
- Hart G, Leung BK y Balleine BW. 2014. Dorsal and ventral streams: the distinct role of striatal subregions in the acquisition and performance of goal-directed actions. *Neurobiology of learning and memory* 108: 104-118.
- Haruno M, Koruda T, Doya K y Toyama K. 2004. A neural correlate of reward-based behavioral learning in caudate nucleus: a functional magnetic resonance imaging study of a stochastic decision task. *The Journal of Neuroscience* 24(7):1660-1665.
- Hauser H y Gandelman R. 1985. Lever pressing for pups: evidence for hormonal influence upon maternal behavior of mice. *Horm Behav* 19(4): 454-468.

- Heidbreder CA y Groenewegen HJ. 2003. The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. *Neurosci Biobehav Rev* 6:555-79.
- Heilbronner SR, Rodriguez-Romaguera J, Quirck GJ, Groenewegen HJ, Haber SN. 2016. Circuit-based corticostriatal homologies between rat and primate. *Biological Psychiatry*: 2-13.
- Henschen CW, Palmiter RD y Darvas M. 2013. Restoration of dopamine signaling to the dorsal striatum is sufficient for aspects of active maternal behavior in female mice. *Neuroendocrinology* 154(11): 4361-4327.
- Hoffman GE, Smith MS y Verbalis J. 1993. C-Fos and related immediate Early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems. *Frontiers in Neuroendocrinology* 14, 173-213.
- Hoffman GE y Lyo D. 2002. Anatomical markers of activity in neuroendocrine systems: Are we all “Fos-ed out”? *Journal of Neuroendocrinology* 14, 259-268.
- Hoffman KL y González-Mariscal G. 2006. Progesterone receptor activation signals behavioral transition across the reproductive cycle in the female rabbit. *Horm Behav.* 50: 154-168.
- Hoffman KL y González-Mariscal G. 2007. Relevance of ovarian signaling for the early behavioral transition from estrus to pregnancy in the female rabbit. *Horm Behav.* 52: 531-539.
- Hoffman KL y Rueda-Morales R. 2009. Toward an understanding of the neurobiology of “just right” perceptions: Nest building in the female rabbit as a possible model for compulsive behavior and the perception of task completion. *Behavioural Brain Research*, 204, 182-191.
- Hoffman KL, Martínez-Álvarez E y Rueda-Morales RI. 2009. The inhibition of female rabbit sexual behavior by progesterone: Progesterone receptor-dependent and independent effects. *Hormones and Behavior* 55, 84-92.
- Hoffman KL, Rueda-Morales R y González-Mariscal G. 2010. Relevance of mating-associated stimuli, ovulation, and the progesterone receptor for the post-coital inhibition of estrous behavior in the female rabbit. *Horm Behav.* 2010 Nov;58(5):747-53.
- Hoffman KL. 2015. *Modeling Neuropsychiatric Disorders in Laboratory Animals*. Woodhead Publishing: Cambridge.
- Hoffman KL, Hudson R, Martínez-Gómez M y Bautista A. 2017. The Domestic Rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) as a model animal. From reproductive neurobiology to developmental psychobiology. En: *Behavioral Neuroendocrinology*. Editorial: CRC Press. Boca Ratón, USA.
- Hok V, Save E, Lenck-Santini PP y Poucet B. 2005. Coding for spatial goals in the prelimbic/infralimbic area of the rat frontal cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(12):4602-7.
- Hudson R. 1985. Do newborn rabbits learn the odor stimuli releasing nipple-search behavior? *Dev. Psychobiol.* 18 (6): 575-85.
- Hudson R, González-Mariscal G y Beyer C. 1990. Chin-marking behavior, sexual receptivity and pheromone emission in steroid-treated, ovariectomized rabbits. *Horm. Behav.* 24: 1-13.

- Hughes P y Dragunow M. 1995. Induction of immediate-early genes and the control of neurotransmitter-regulated gene expression within the nervous system. *Pharmacological Reviews*, 47, 1, 133-177.
- Joo J, Schaukowitch K, Farbiak L, Kilaru G y Kim T. 2015. Stimulus-specific combinatorial functionality of neuronal c-fos enhancers. *Nature Neuroscience*, 1-9.
- Kaczmarek L y Nikolajew E. 1990. C-Fos protooncogene expression and neuronal plasticity. *Acta Neurobiol. Exp.* 50, 173-179.
- Killcross S y Coutureau E. 2003. Coordination of actions and habits in the medial prefrontal cortex of rats. *Cerebral Cortex* Apr 13, 400-408.
- Kim P, Leckman JF, Mayes LC, Feldman R, y cols. 2010. The plasticity of human maternal brain: longitudinal changes in brain anatomy during early postpartum period. *Behavioral Neuroscience* 124(5): 695-700.
- Kolling N, Behrens TEJ, Wittmann MK, Rushworth MFS. 2016. Multiple signals in anterior cingulate cortex. *Curr Opin Neurobiol.* 37:36-43.
- Kovács K. (1998). C-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. *Neurochem. Int.* 33, 287-197.
- Kreitzer A y Malenka R. 2008. Striatal plasticity and Basal Ganglia Circuit Function. *Neuron* 60, 543-554.
- Kurniawan IT, Guitart-Masip M, Dayan P y Dolan RJ. 2013. Effort and valuation in the brain: the effects of anticipation and execution. *J Neurosci* 3:33(14): 6160-6169.
- Kwan KY, Sestan N y Anton ES. 2012. Transcriptional co-regulation of neuronal migration and laminar identity in the neocortex. *Development* 139: 1535-1546.
- Lanciego JL, Luquin N, Obeso JA. 2012. Functional neuroanatomy of the basal ganglia. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2(12) a009621. doi: 10.1101/cshperspect.a009621
- Laquitaine S, Piron C, Abellanas D, Loewenstein Y y Boraud T. 2013. Complex population response of dorsal putamen neurons predicts the ability to learn. *Plos One* 8(11): e80683.
- Laubach M, Caetano M y Nandakumar S. 2015. Mistakes were made: Neural mechanisms for the adaptive control of action initiation by the medial prefrontal cortex. *Journal of Physiology* 109, 104-117.
- Lavin C, Melis C, Mikulan E, Gelormini C y cols. 2013. The anterior cingulate cortex: an integrative hub for human socially-driven interactions. *Frontiers in Neuroscience* 7(64): doi: 10.3389/fnins.2013.00064
- Leibenluft E, Ida Gobbin M, Harrison T y Haxbi JV. 2004. Mother's neural activation in response to pictures of their children and other children. *Biol. Psychiatry* 56:225-232.
- Lee A, Clancy S, Fleming AS. 2000. Mother rats bar-press for pups: effects of lesions of the mpoa and limbic sites on maternal behavior and operant responding for pup-reinforcement. *Behav Brain Res.* 108(2): 215-31.

- Leuner B, Glasper ER y Gould E. 2010. Parenting and plasticity. *Trends in Neurosciences* 33(10): 465-473.
- Lévy F y Keller M. 2009. Olfactory mediation of maternal behavior in selected mammalian species. *Behavioral Brain Research* 200:336-345.
- Leckman JF, Feldman R, Swain JE, Eicher V, y cols. 2004. Primary parental preoccupation: circuits, genes, and the crucial role of the environment. *J Neural Transm* 111: 753-771.
- Li T, Horta M, Mascaro JS y Bijanki K. 2018. Explaining individual variation in parental responses to infant cries. *Physiology y Behavior*, 193(1): 43-54.
- Loeblich S y Nedivi E. 2009. The function of activity-regulated genes in the nervous system. *Physiol Rev* 89, 1079-1103.
- Lonstein JS, Lévy F y Fleming AS. 2015. Common and divergent psychobiological mechanisms and underlying maternal behaviors in non-human and human mammals. *Hormones and Behavior* 73:156-185.
- Lorberbaum JP, Newman JD, Dubno JR y cols. 1999. Feasibility of using fMRI to study mothers responding to infant cries. *Depression and anxiety* 10:99-104.
- Maier S y Watkins L. 2010. Role of the medial prefrontal cortex in coping and resilience. *Brain Research* 1355: 52-60.
- Maina G, Albert U, Bogetto F y cols. 1999. Recent life events and obsessive-compulsive disorder (OCD): the role of pregnancy/delivery. *Psychiatry Res* 89(1): 49-58.
- Mainland JD, Lundström JN, Reisert J, Lowe G. 2014. From molecule to mind: an integrative perspective on odor intensity. *Trends in Neurosciences* 37(8): 443-454.
- Manning P, Ringler D y Newcomer C. 1994. *The biology of the laboratory rabbit*. USA: Academic Press.
- Mattfeld AT, Gluck MA y Stark CE. 2011. Functional specialization within the striatum along both the dorsal/ventral and anterior/posterior axes during associative learning via reward and punishment. *Learning and Memory* 18:703-711.
- McHenry JA, Rubinow DR y Stuber GD. 2015. Maternally responsive neurons in the bed nucleus of the stria terminalis and medial preoptic area: putative circuits for regulating anxiety and reward. *Front. Neuroendocrinol* 38: 65-72.
- Melo A, Chirino R, Jiménez A y cols. 2008. Effect of forebrain implants of testosterone or estradiol on scent-marking and sexual behavior in male and female rabbits. *Horm Behav.* 2008 Nov;54(5):676-83. doi: 10.1016/j.yhbeh.2008.07.006. Epub 2008 Jul 29.
- Mena F y Beyer C. 1963. Effect of high spinal section on the established lactation in the rabbit. *Am. J. Physiol* 205(2):313-316.
- Mena F y Beyer C. 1968. Induction of milk secretion in the rabbit by lesions in the temporal lobe. *Endocrinology* 83: 618-620.

- Milad MR y Quirck GJ. 2002. Neurons in medial prefrontal cortex signal memory for fear extinction. *Nature* 420 (7): 70-74.
- Miller EK y Cohen JD. 2001. An integrative theory of prefrontal cortex function. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 167-202.
- Mizoguchi Y, Matsuoka T, Mizuguchi H y cols. 2010. Changes in blood parameters in New Zealand White Rabbits during pregnancy. *Laboratory Animals* 44, 33-39.
- Mogenson GJ, Jones DL y Yim CY. 1980. From motivation to action: functional interface between the limbic system and the motor system. *Prog Neurobiol.* 14(2-3), 69-97.
- Morgan JI y Curran T. 1986. Role of ion flux in the control of c-fos expression. *Letters to nature* 322: 552-555.
- Moorman D y Aston-Jones G. 2015. Prefrontal neurons encode context-based response execution and inhibition in reward seeking and extinction. *PNAS* 112 (30), 9472-9477.
- Moorman D, James MH, McGlinchey EM y Aston-Jones G. 2015. Differential roles of medial prefrontal subregions in the regulation of drug seeking. *Brain Research* 1628:130-146.
- Morris LS, Kundu P, Dowell N y cols. 2016. Fronto-striatal organization: Defining functional and microstructural substrates of behavioral flexibility. *Cortex* 74:118-133.
- Moscarello JM, Ben-Sahar O y Ettenberg A. 2010. External incentives and internal states guide goal-directed behavior via the differential recruitment of the nucleus accumbens and the medial prefrontal cortex. *Neuroscience* 170 (2):468-477.
- Muñoz-Moreno E, Arbat-Plana A, Bataille D y Soria G. 2013. A magnetic resonance image based atlas of the rabbit brain for automatic parcellation. *PLoS ONE* 8(7): e67418. doi:10.1371/journal.pone.0067418.
- Mushiake H, Saito N, Sakamoto K, Itoyama Y y Tanji J. 2006. Activity in the lateral prefrontal cortex reflects multiple steps of future events in action plans. *Neuron* 50: 631-641.
- Musser ED, Kaiser-Laurent H y Ablow JC. 2012. The neural correlates of maternal sensitivity: an fMRI study. *Dev. Cogn. Neurosci* 2(4): 428-36.
- Myers K y Poole W. 1961. A study of the biology of the wild rabbit, *Oryctolagus cuniculus*, in confined populations. The effect of season and population increase of behavior. *CSIRO Wildlife Res*, 6, 1-41.
- Nachev P, Kennard C y Husain M. 2008. Functional role of the supplementary and pre-supplementary motor areas. *Nature reviews neuroscience* 9: 856 – 869.
- Nephew BC, Caffrey MK, Felix-Ortiz AC, Ferris CF y Febo M. 2009. Blood oxygen level-dependent signal responses in corticolimbic “emotions” circuitry of lactating rats facing intruder threat to pups. *European Journal of Neuroscience* 30, 934-945.
- Nishitani S, Kuwamoto S y Takahira A. 2014. Maternal prefrontal cortex activation by newborn infant odors. *Chem. Senses* 39: 195-202.

- Nitschke JB, Nelson EE, Rusch BD y cols. 2004. Orbitofrontal cortex tracks positive mood in mothers viewing pictures of their newborn infants. *Neuroimage* 21(2): 583-92.
- Noriuchi M, Kikuchi Y y Senoo A. 2008. The functional neuroanatomy of maternal love: mother's response to infant's attachment behaviors. *Biol Psychiatry* 63:415-423.
- Numan M y Stolzenbeg DS. 2009. Medial preoptic area interactions with dopamine neural systems in the control of the onset and maintenance of maternal behavior in rats. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 30, 46-64.
- Numan M. 2012. Maternal behavior: neural circuits, stimulus valence, and motivational processes. *Parenting: science and practice* 12, 105-114.
- O'Connell L y Hofmann H. 2011. The vertebrate Mesolimbic Reward System and social behavior network: a comparative synthesis. *The Journal of Comparative Neurology*, 35993629.
- Öngür D y Price JL. 2000. The organization of networks within the orbital and medial prefrontal cortex of rats, monkeys and humans. *Cerebral Cortex* 10:206:206-219.
- Ouhaz Z, Ba-M'hamed S, Mitchell A y cols. 2015. Behavioral and cognitive changes after early postnatal lesions of the rat mediodorsal thalamus. *Behavioral Brain Research* 292, 219-232.
- Olázabal D, Pereira M, Agrati A, Ferreira A, y cols. 2013a. New theoreticals and experimental approaches on maternal motivation in mammals. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 37, 1860-1874.
- Olázabal D, Pereira M, Agrati A y cols. 2013b. Flexibility and adaptation of the neural substrate supports maternal behavior in mammals. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 37: 1875-1892.
- Ouhaz Z, Ba-M'hamed S, Mitchell AS y cols. 2015. Behavioral and cognitive changes after early postnatal lesions of the rat mediodorsal thalamus. *Behavioural brain research* 282: 219-232.
- Oxley G y Fleming AS. 2000. The effects of medial preoptic area and amygdala lesions on maternal behavior in the juvenile rat. *Dev Psychobiol.* 37(4):253-65.
- Palka YS y Sawyer CH. 1966. The effects of hypothalamic implants of ovarian steroids on oestrous behavior in rabbits. *J. Psychiol.* 185: 251-269.
- Palmiter RD. 2008. Dopamine signaling in the dorsal striatum is essential for motivated behaviors. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1129: 35-46
- Palmiter RD. 2011. Dopamine signaling as a neural correlate of consciousness. *Neuroscience* 198: 213-220.
- Pan WX, Mao T y Dudman JT. 2010. Inputs to the dorsal striatum of the mouse reflect the parallel circuit architecture of the forebrain. *Frontiers in Neuroanatomy* 4(147) doi: 10.3389/fnana.2010.00147.
- Pennartz CM, Berke JD, Graybiel AM y cols. 2009. Corticostriatal interactions during learning, memory processing and decision making. *Journal of Neuroscience* 29(41):12831-12838.

- Pereira M y Morrell JI. 2011. Functional mapping of the neural circuitry of rat maternal motivation: effects of site-specific transient neural inactivation. *Journal of Neuroendocrinology* 23, 1020-1035.
- Pérez-Cadahía B, Drobic B y Davie J. 2011. Activation and function of immediate-early genes in the nervous system. *Biochem. Cell Biol.* 89, 61-73.
- Peters SK, Dunlop K y Downar J. 2016. Cortico-striatal-thalamic loop circuits of the salience network: A central pathway in psychiatric disease and treatment. *Front. Syst. Neurosci* 27:
- Price J. 2007. Definition of the Orbital Cortex in Relation to Specific Connections with Limbic and Visceral Structures and Other Cortical Regions. *Ann. N. Y. Acad. Sci* 1121, 54-7.
- Poindron P. 2005. Mechanisms of activation of maternal behavior in mammals. *Reprod. Nutr. Dev* 45 45: 341-345.
- Postuma RB y Dagher A. 2006. Basal ganglia functional connectivity based on a meta-analysis of 126 positron emission tomography and functional magnetic resonance imaging publications. *Cerebral cortex* 16: 1508-1521.
- Powell NJ y Redish AD. 2014. Complex neural codes in rat prelimbic cortex are stable across days on a spatial decision task. *Frontiers in behavioral neuroscience* 8 doi: 10.3389/fnbeh.2014.00120
- Ramírez VD y Beyer C. The ovarian cycle of the rabbit: its neuroendocrine control. En: Knobil, E. y Neill, J.D. (Eds.), *The Physiology of Reproduction*, Vol. 2, Raven Press, New York, 1988, 1873-1892.
- Ranote S, Elliot R, Abel KM y cols. 2004. The neural basis of maternal responsiveness to infants: an fMRI study. *NeuroReport* 15: 1825-1829.
- Recabarren MP, Valdés JL, Farias P y cols. 2005. Differential effects of infralimbic cortical lesions on temperature and locomotor activity responses to feeding in rats. *Neuroscience* 134(4): 1413-22.
- Reig R y Silberberg G. 2014. Multisensory integration in the mouse striatum. *Neuron* 83:1200-1212.
- Robinson DL, Zitzman DL y Williams SK. 2011. Mesolimbic dopamine transients in motivated behaviors: focus on maternal behavior. *Front Psychiatry* 9;2:23. doi: 10.3389/fpsyt.2011.00023.
- Rock C, Zurita H, Wilson C. y Apicela A. 2016. An inhibitory corticostriatal pathway. *eLife* 5:e15890. DOI: 10.7554/eLife.15890
- Rödel HG, Dausmann KH, Starkloff A y cols. 2012. Diurnal nursing pattern of wild-type European rabbits under natural breeding conditions. *Mammalian Biology* 77: 441-446.
- Rolls ET. 2000. The orbitofrontal cortex and reward. *Cerebral Cortex* 10, 284-294.
- Rolls ET. 2004. The functions of the orbitofrontal cortex. *Brain and cognition* 55: 11-29.
- Room P, Russchen FT, Groenewegen HJ y Lohman AH. 1985. Efferent connections of the prelimbic area (area 32) and the infralimbic area (area 25) cortices: an anterograde tracing study in the cat. *22(1):* 40-55.
- Rosenblatt JS. 1967. Non-hormonal basis of maternal behavior in the rat. *Science* 156:1512-1514.

- Ross S, Denenberg VH, Frommer GP y Sawin PB. 1959, Genetic, physiological and behavioral background of reproduction in the rabbit. V. Nonretrieving of neonates. *Journal of Mammalogy* 40(1): 91-96.
- Rushworth M, Buckley M, Behrens T, Walton M y Bannerman D. 2007. Functional organization of the medial frontal cortex. *Current Opinion in Neurobiology* 17, 220-227.
- Sabihi S, Dong S, Durosko S, Durosko N y Leuner B. 2014a. Oxytocin in the medial prefrontal cortex regulates maternal care, maternal aggression and anxiety during the postpartum period. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* Vol 8, Art 258, 1-11.
- Sabihi S, Durosko NE, Dong SM y Leuner B. 2014b. Oxytocin in the prelimbic medial prefrontal cortex reduces anxiety-like behavior in female and male rats. *Psychoneuroendocrinology* 45: 31-42.
- Sacchet MD, Camacho C, Livermore E, y cols. 2017. Accelerated aging of the putamen in patients with major depressive disorder. *J Psychiatry Neurosci* 42(3): 164-171.
- Saltzman W y Maestriperi D. 2011. The neuroendocrinology of primate maternal behavior. *Progress in Neuro-Psychopharmacology y Biological Psychiatry* 35:1192-1204.
- Sanders K, Frome Y y Scheich H. 2007. fMRI activations of amygdala, cingulate cortex and auditory cortex by infant laughing and crying. *Hum. Brain Mapp* 28(10): 1077-22.
- Schaal B, Coureaud G, Langlois D y cols. 2003. Chemical and behavioral characterization of the rabbit mammary pheromone. *Nature* 424: 68-72.
- Schoenbaum G, Roesch M, Stalnaker T y Takanashi Y. 2009. A new perspective on the role of the orbitofrontal cortex in adaptive behavior. *Nat Rev Neurosci* 10 (12), 885-892.
- Schroeder MP, Weiss C, Procissi D y cols. 2016. Intrinsic connectivity of neural networks in the awake rabbit. *Neuroimage* 129: 260-267.
- Schubotz RI y von Cramon DY. 2003. Functional-anatomical concepts of human premotor cortex: evidence from fMRI and PET studies. *NeuroImage* 20: S120-S131.
- Schultz W. 1998. Predictive Reward Signal of Dopamine Neurons. *Journal of Neurophysiology*, Vol. 80, 1-27.
- Schultz W. 2011. Reward signaling by Dopamine neurons. *The Neuroscientist*, Vol. 7, No. 4, 293-302.
- Seeger CA. 2018. Corticostriatal foundations of habits. *Current Opinion in Behavioral Sciences*, 20: 153-160.
- Seifritz E, Esposito F, Neuhoﬀ JG y cols. 2003. Differential sex-independent amygdala response to infant crying and laughing in parents versus nonparents. *Biol. Psychiatry* 54: 1367-1375.
- Shek JW, Wen GY y Wisniewski HM. 1986. Atlas of the rabbit brain and spinal cord. Switzerland: Kreuger.
- Sheng M y Greenberg M. 1990. The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the Nervous System. *Neuron* 4, 477-485.

Szczypka MS, Kwork K, Brot MD y cols. 2001. Dopamine production in the caudate putament restores feeding in dopamine-deficient mice. *Neuron* 30: 819-828.

Shepherd G. 2011. The microcircuit concept applied to cortical evolution: from three--layer to six-layer cortex. *Frontiers in Neuroanatomy* Vol. 5, Art. 30, 1-15.

Shepherd G. 2013. Corticostriatal connectivity and its role in disease. *Nat Rev Neurosci.* 14(4):278-291.

Shin LM, Rauch SL y Pitman RK. 2006. Amygdala, medial prefrontal cortex and hippocampal function in PTSD. *Ann NY Acad Sci*, 1071: 67-79.

Silvetti M, Alexander W, Verguts T y Brown J. 2014. From conflict management to reward-based decision making: Actors and critics in primate medial frontal cortex. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 46, 44-57.

Sotres-Bayon F y Quirck GJ. 2010. Prefrontal control of fear: more than just extinction. *Current Opinion in Neurobiology* 20:321-235.

Staiger J. 2006. Immediate-early gene expression in the barrel cortex. *Somatosensory and Motor Research* 23 (3/4), 135-146.

Stolzenberg D y Numan M. 2011. Hypothalamic interaction with the mesolimbic DA system in the control of the maternal and sexual behaviors in rats. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 35, 826-847.

Strathearn L, Li J, Fonagy P y Montague P. 2008. What's in a smile? Maternal brain responses to infant facial clues. *Pediatrics* 122 (1): 40-51.

Strathearn L. 2011. Maternal neglect: oxytocin, dopamine and the neurobiology of attachment. *J Neuroendocrinol* 23(11): 1054-1065.

Stuchlik A, Radostova D, Hatalova H y cols. 2016. Validity of quinpirole sensitization rat modelo of OCD: Linking evidence from animal and clinical studies. *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 10:209. doi: 10.3389/fnbeh.2016.00209.

Swain JE, Loberbaim JP, Kose S y Strathearn L. 2007. Brain basis of early parent-infant interactions: psychology, physiology, and in vivo functional neuroimaging studies. *Journal of Child Psychology and Psychiatry* 48(3/4): 262-287.

Szechtman H, Ahmari SE, Beninger RJ y cols. 2017. Obsessive-compulsive disorder: Insights from animal models. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 76: 254-279.

Takahashi Y, Schoenbaum G y Niv Y. 2008. Silencing the critics: understanding the effects of cocaine sensitization on dorsolateral and ventral striatum of and Actor/Critic model. *Frontiers in Neuroscience* (2)1 : 86-99.

Tekin S y Commings JL. 2002. Frontal-subcortical neuronal circuits and clinical neuropsychiatry. An update. *Journal of psychosomatic research* 53 : 647-654.

Tindal JS, Beyer C, Sawyer CH. 1963. Milk ejection reflex and the maintenance of lactation in the rabbit. *Endocrinology* 72 : 720-4.

- Thorsen AL, van den Heuvel OA, Hansen B y Kvale G. 2015, Neuroimaging of psychotherapy for obsessive-compulsive disorder : A systematic review. *Psychiatry Res* 233(3) :306-13.
- Valdés JL, Maldonado P, Recabarren M y cols. 2006. The infralimbic cortical area commands the behavioral and vegetative arousal during appetitive behavior in the rat. *European Journal of Neuroscience* 23, 1352-1364.
- Van der Meer MAA, Johnson A, Schmitzer NC y Redish AD. 2010. Triple dissociation of information processing in dorsal striatum, ventral striatum, and hippocampus on a learned spatial decision task. *Neuron* 67:25-32.
- Van Hasselt F, De Viesser L, Tieskens JM y cols. 2012. Individual variations in maternal care early in life correlate with later life decision-making and c-Fos expression in prefrontal subregions of rats. *Plos One*, Vol 7, 5, 1-11.
- Van Velzen LS, de Wit SJ, Curcic-Blake B y cols. 2015. Altered inhibition-related frontolimbic connectivity in obsessive-compulsive disorder. *Human Brain Mapping* 36:4064-4075.
- Vandborg SK, Hartmann TB, Bennedsen BE y cols. 2014. Memory and executive functions in patients with obsessive-compulsive disorder. *Cogn Behav Neurol* 27(1): 8-16.
- Verschure PF, Pennartz CM y Pezzulo G. 2013. The why, what, where, when and how of goal-directed choice: neuronal and computational principles. *Phil Trans. R. Soc. B* 369: 1-14.
- Verstynen TD. 2014. The organization and dynamics of corticostriatal pathways link the medial orbitofrontal cortex to future behavioral responses. *J Neurophysiol* 112: 2457-2469.
- Vertes RP. 2004. Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse* 51:32-58.
- Villablanca JR. 2010. Why do we have a caudate nucleus? *Acta Neurobiol Exp* 70: 95-105.
- Vogt BA, Hof PR, Zilles K y cols. 2013. Cingulate area 32 homologies in mouse, rat, macaque and human: cytoarchitecture and receptor architecture. *The Journal of Comparative Neurology* 52(1):4189-4204.
- Voon V, Baek K, Enander J y cols. 2015. Motivation and value influences in the relative balance of goal-directed and habitual behaviors in obsessive-compulsive disorders. *Transl Psychiatry* (2015) 5, e670; doi:10.1038/tp.2015.165
- Voorn P, Vanderschuren L, Groenewegen HJ y cols. 2004. Putting a spin on the dorsal-ventral divide of the striatum. *TRENDS in Neurosciences* 27(8):468-474.
- Wallis JD y Kennerley SW. 2011. Contrasting reward signals in the orbitofrontal cortex and anterior cingulate cortex. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1239:33-42.
- Wallis JD. 2012. Cross-species studies of orbitofrontal cortex and value-based decision making. *Nature Neuroscience* Vol 15 (1): 13-19.
- Wansaw MP, Pererira M y Morrell JI. 2008. Characterization of maternal motivation in the lactating rat: Contrasts between early and late postpartum responses. *Horm Behav* 54 (2): 294-301.

- Wilson D. 2009. Olfaction as a model system for the neurobiology of mammalian short-term habituation. *Neurobiology of Learning and Memory* 92, 199-205.
- Wolmarans D, Stein DJ y Harvey BH. 2016. Of mice and marbles: Novel perspectives on burying behavior as a screening test for psychiatric illness. *Cogn Affect Behav Neurosci* 16:551-560-
- Yager LM, Garcia AF, Wunsch AM y Ferguson SM. 2015. The ins and outs of the striatum: Role in drug addiction. 301:529-541.
- Yanike M y Ferrera VP. 2014. Interpretive monitoring in the caudate nucleus. *Elife*, 3:e03727. DOI: 10.7554/eLife.03727.
- Yeterian EH, Pandya DN, Tomaiuolo F y Petrides, M. 2012. The cortical connectivity of the prefrontal cortex in the monkey brain. *Cortex* 48(1): 58-81.
- Young KA, Gobrogge KL y Wang Z. 2011. The role of mesocorticolimbic dopamine in regulating interactions between drugs of abuse and social behavior. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 35:498-515.
- Zapata A, Minney VL, Shippenberg TS. 2010. Shift from goal-directed to habitual cocaine seeking after prolonged experience in rats. *The Journal of Neuroscience* 30(46): 15457-15463.
- Zarrow M, Farooq A, Denenberg V H y cols. (1963). Maternal Behavior in the rabbit: endocrine control of maternal-nest building. *Journal of Reproduction and Fertility*, 6, 375-383.
- Zarrow M, Gandelman R y Denenberg V. 1971. Prolactin: is it an essential hormone for maternal behavior in the mammal? *Horm. Behav.* 2: 343-354.
- Zilles K y Amunts K. 2010. Centenary of Brodmann's map- conception and fate. *Nature reviews neuroscience* 11: 139 – 145.

12. GLOSARIO DE TÉRMINOS

CPFM – conducta de marcaje por frotamiento del mentón

APOm - área preóptica media

OVX- ovariectomizada

CPF – corteza prefrontal

CPFm – corteza prefrontal medial

CPFdl - corteza prefrontal dorsal

CCA- corteza cingulada anterior

COF – corteza orbitofrontal

BNST – cama núcleo de la estría terminal

NuAcc – núcleo accumbens

BA – área de Brodmann

TOC – trastorno obsesivo-compulsivo

AVT – área ventro tegmental

OT- oxitocina

fMRI – resonancia magnética funcional

NMD – núcleo mediodorsal del tálamo

IEGs – genes de expresión temprana

SN – sistema nervioso

SNpc – sustancia nigra pars compacta

dCaud– caudado dorsal

dPut – putamen dorsal

vCaud – caudado ventral

vPut – putamen ventral

TDHA – trastorno por déficit de atención e hiperactividad



Activation of the orbitofrontal and anterior cingulate cortices during the expression of a naturalistic compulsive-like behavior in the rabbit



Hugo Cano-Ramírez^{a,b}, Kurt L. Hoffman^{b,*}

^a Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, Mexico

^b Centro de Investigación en Reproducción Animal (CIRA), Universidad Autónoma de Tlaxcala-CINVESTAV, Mexico

HIGHLIGHTS

- Maternal nest building in the rabbit is a potential model for compulsive behavior.
- Pregnancy changes the behavioral and neural responses to nest material (straw).
- Pregnancy is associated with compulsive-like collecting and carrying of straw.
- Straw carrying activates orbitofrontal, anterior cingulate, and piriform cortices.
- Nest building behavior may be homologous to compulsive behavior in OCD.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 October 2016

Received in revised form 7 November 2016

Accepted 9 November 2016

Available online 19 November 2016

ABSTRACT

We propose that maternal nest building in the female laboratory rabbit is a useful model for compulsions in obsessive-compulsive disorder (OCD). This repetitive behavior comprises collecting straw, depositing it into the nest box, and then returning to collect more straw. We reasoned that if “straw carrying” behavior is homologous to compulsive behavior, then it should be associated with activation of prefrontal regions associated with OCD, namely, the orbitofrontal and anterior cingulate cortices (OFC and ACC, respectively). In the present study, we quantified c-FOS immunoreactivity in the ACC, OFC, premotor (PM), infralimbic (IL), prelimbic (PL), and piriform (PI) cortices of: (1) pregnant female rabbits that were given straw (PREG + STRAW); (2) pregnant rabbits that were not given straw (PREG); (3) estrous rabbits that were given straw (ESTROUS + STRAW); (4) estrous rabbits that were not given straw (ESTROUS). After 1 h, all females were sacrificed and processed for brain c-FOS immunoreactivity. We found that pregnant rabbits showed lower latencies to interact with the straw than estrous rabbits, and that pregnant rabbits displayed straw carrying, while estrous rabbits did not. c-FOS expression was increased in the OFC, ACC, and PI in the PREG + STRAW compared to all other groups. By contrast, c-FOS expression in all other regions was greater in PREG + STRAW compared to PREG, but not different from ESTROUS + STRAW. These results point to an important role for the OFC, ACC, and PI in initiating repetitive straw-carrying behavior, and further support the proposal that this behavior can serve as a model for compulsions in OCD.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

In nature, the female European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) constructs a maternal nest, consisting of dry grass or similar material, inside a nest chamber hollowed out at the end of a burrow. The nest building process begins about 2 weeks before parturition (gestation in this species is 31 days), when the pregnant rabbit digs the maternal burrow. When finished, she conceals the burrow's

entrance with soil. Later, on a single night several days before parturition, she reopens the burrow, collects dry grass in her mouth, and carries it into the nest chamber and deposits it there, where she forms a nest. She repeats this “straw-carrying” behavior approximately 20–40 times before she exits the burrow and again conceals its entrance. On the night of parturition, she reopens the burrow, pulls hair from her ventrum and lines the nest with it, and then gives birth inside the nest. She cleans the young, eats the placenta, and nurses them. When finished, she leaves the burrow, conceals its entrance, and then returns only one time per day to nurse the pups, each time reopening the burrow and then concealing its entrance when she leaves [52,67].

* Corresponding author.

E-mail address: reevitro@hotmail.com (K.L. Hoffman).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbr.2016.11.022>

0166-4328/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

This behavioral pattern has been extensively studied with respect to its control by reproductive hormones. During pregnancy in the rabbit, plasma progesterone (P) levels increase gradually during the first two weeks, peaking at approximately day 15–18 of pregnancy, and thereafter decline steadily, reaching pre-pregnancy levels at parturition. By contrast, estradiol levels remain more or less constant throughout pregnancy [49,29,30,10,19]. A series of elegant studies carried out in laboratory rabbits has shown that the mid-pregnancy peak in progesterone stimulates the motivation to dig, while the subsequent decline in progesterone triggers the onset of straw-carrying behavior and, later, hair pulling [66,19–21,31].

Previously, we proposed that straw-carrying is a useful naturalistic model for compulsive behavior in obsessive-compulsive and related disorders [32]. This proposal is based in part on the repetitive, persistent, and stereotyped characteristics of this behavior. We demonstrated that, on day 28 of pregnancy, the female rabbit immediately begins collecting straw as soon as it is placed into her cage, carries it into her nest box, and then returns to collect more straw. Normally, she repeats this behavior 20–60 times. Straw-carrying is significantly prolonged if straw does not accumulate inside the nest box (by removing it through a hidden “back door”); conversely, if a nest is constructed inside the nest box by the experimenter before the rabbit has the opportunity to begin to collect straw, straw-carrying is inhibited. Moreover, if the rabbit is allowed to completely construct a nest, and then that nest is removed from the nest box by the experimenter, she typically does not re-construct it. Taken together, these observations indicate that hormonal cues promote the motivation to collect and carry straw, but this motivation is “quenched” by certain external cues associated with a fully formed nest [32].

Nest building behavior as a model is perhaps most relevant when considered in the context of the hypothesis that OCD symptoms arise due to dysfunctions in certain motivational processes [62,65]. In such models, obsessive-compulsive symptoms are due to dysfunctions in brain mechanisms that normally quench the motivational state that promotes compulsive behavior. In the pregnant laboratory rabbit, the motivation to carry straw is quenched by a specific, experimentally-controllable, cue: the presence of a finished nest inside the nest box. We propose that a detailed understanding of this “stop mechanism” should shed light on neural processes that are altered in OCD [32]. In support of this proposal, recent studies indicate that processes that control non-maternal nest building in mice might be related to those underlying obsessive-compulsive symptoms [26,64].

OCD has been associated with increased activity in specific brain regions in functional magnetic resonance imaging (fMRI) studies of human subjects. Many of these studies have utilized symptom provocation paradigms, in which the subject is imaged before and after being exposed to specific stimuli that provoke obsessive-compulsive symptoms; for example, pictures related to contamination, harm, or disorder. The general picture that has emerged is that exposure to symptom-provoking cues is associated with increased regional brain activity in the prefrontal cortex (orbitofrontal, anterior cingulate, insula), components of the basal ganglia (caudate, putamen, globus pallidus), and thalamus [58,4,51,60]. These regions form the main components of cortico-striatal-thalamocortical circuits, which are involved in motivational processes, action selection, behavioral initiation and inhibition, and implicit learning [23,24,56,61,27,25].

The present study was designed to explore the possibility that straw carrying behavior in the pregnant rabbit is associated with a similar pattern of regional brain activity as has been observed in association with obsessive-compulsive symptoms. In this study we focused on the prefrontal cortex, and used c-FOS expression as an immunohistochemical marker for regional brain activity. We argue that if nest building behavior and obsessive-compulsive symptoms

share similar neural activity patterns, then this behavior could serve as a useful model for elucidating the neurobiology of OCD. Moreover, such similarities would further support the proposal that obsessive-compulsive symptoms (clinical as well as sub-clinical) can be conceptualized as a dysregulation of normal, adaptive behavioral and cognitive patterns that are subserved by evolutionarily conserved neural circuitry [36,35].

2. Methods

2.1. Animals

Twenty-four maternally-experienced, adult female New Zealand rabbits from the colony maintained at the *Centro de Investigación en Reproducción Animal*, Tlaxcala, México), 6–24 months old, were used in these experiments. They were maintained at ambient temperature (15–25 °C), on a long-day light cycle (lights on at 06:00, lights off at 20:00 h), and given rabbit chow (Purina) and water *ad libitum*.

Half of the rabbits in the study ($n=12$) were mated with a sexually experienced buck, and placed individually in large wire “maternal” cages (90 cm long \times 60 cm wide \times 40 cm high), which contained a wooden nest box (49 cm \times 28 cm \times 27 cm) having an entrance (a hole of diameter 22 cm) cut in the front. The other rabbits of the study (“estrous”; $n=12$) were not mated but were placed individually in wire cages containing nest boxes for 28 days prior to the experiment, under the conditions described above. Throughout this work, animal care adhered to the Law for the Protection of Animals (Mexico), and the protocol was approved by the Animal Ethics Committee of the *Universidad Autónoma de Tlaxcala*.

2.2. Experimental design

The experiments were initiated between 08:30–10:00 h on the 28th day of pregnancy, or in the case of estrous rabbits, 28 days after being moved into a maternal cage with a nest box. All females were denied access to nest material (straw) until the day of the experiment. For half of the rabbits, at $t=0$ min, straw was placed inside the cage, but outside the nest box; all straw was removed from the nest box and cage at $t=30$ min. The other half of the rabbits did not receive straw. In all cases, the behavior of the rabbits was subsequently recorded for 60 min. There were four comparison groups, as follows: (1) PREG+STRAW: pregnant females were allowed to interact with straw for 30 min; (2) PREG: pregnant females that did not receive straw; (3) ESTROUS+STRAW: estrous females that were allowed to interact with straw for 30 min; (4) ESTROUS: estrous females that did not receive straw.

2.3. Sacrifice, perfusion and immunohistochemistry

Females were anesthetized with a combination of Xilazine (i.m., 30 mg, in 1.5 mL saline) and Ketamine (i.m., 150 mg, in 1.5 mL saline), and then sacrificed with an overdose of sodium pentobarbital (i.v.), 2 min after receiving an i.v. injection of 10,000 IU heparin sulfate, the latter in order to inhibit the formation of blood clots during the perfusion. Rabbits were perfused transcardially, first with physiological saline (NaCl, 0.9%) and then 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer. The brains remained within the skull overnight, at room temperature (RT). The next day, brains were removed from the skull and cryoprotected by successive overnight incubations, at 4 °C, in solutions of increasing sucrose concentration (10, 20, and 30%, 0.1 M phosphate buffer). Brains were then frozen at -20 °C and sectioned coronally using a cryostat (40 μ m), from the rostral pole to the decussation of the corpus callosum. Sections were processed for c-FOS immunohistochemistry, using a protocol modified from [22]. Free floating sections were washed three times

in phosphate buffer (PB) 0.1 M, pH 7.4 in order to remove excess aldehydes, and then for 10 min in 0.05% hydrogen peroxide in order to eliminate endogenous peroxidase activity. After preincubation for 1 h in 1% normal donkey serum (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) sections were incubated for 48 h at 4°C in the polyclonal antibody SC-52-G (Santa Cruz Biotechnology), diluted at 1:2000 with 0.1% Triton X-100 (Sigma, St. Louis, MO) in 0.1 M PB. This antibody has been used successfully to visualize the c-FOS protein in the adult female rabbit [22]. The antibody solution was removed and sections were washed 3 times in 0.1 M PB, and then processed with the Vectastain Elite ABC kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA (biotinylated donkey anti-goat serum IgG, 1 h at RT; avidin and biotinylated horseradish peroxidase solution, 1 h at RT). Sections were rinsed 3 times in 0.1 M PB, and c-FOS labeling was visualized using diaminobenzidine/nickel substrate working solution (DAB peroxidase substrate SK-4100; Vector Laboratories). Sections were mounted onto gelatin subbed slides, dehydrated and then cover-slipped with Entellan mounting medium (Merck; Darmstadt, Germany).

2.4. c-FOS cell quantification

Processed sections were examined under bright-field illumination in an Olympus CH2 microscope and 2 microphotographs were taken (using a 4× objective, encompassing an area of 3.2 mm²) from each animal (n = 24), of each of the following areas of interest: anterior cingulate cortex (ACC; BA 24), prelimbic area (BA 32), infralimbic area (BA 25), premotor area (BA 8), piriform cortex, and orbitofrontal cortex (OFC). Coronal sections photographed were selected pseudo-randomly from those corresponding to the approximate coronal orientation planes #280 (OFC; approximately 1 mm caudal to the rostral pole) and #320 (all other regions; approximately 2 mm caudal to the rostral pole) of the Brain Atlas of the Domestic Rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) (University of Wisconsin-Madison Comparative Mammalian Brain Collection website; <http://neuroscience.library.org/Specimens/lagomorpha/domesticrabbit/sections/thumbnail.html>), and the Rabbit Brain Atlas [59]. The ACC, prelimbic, infralimbic, and premotor cortices were identified according to [6]. The OFC was defined as the dorsal bank of the olfactory sulcus, based on neuroanatomical studies of the rabbit as well as extrapolation from the rat literature [5,57,55] (Fig. 1).

The micrographs were coded, and c-FOS labeling in these micrographs was quantified by two independent observers, blinded to the identity of the corresponding animal and treatment condition. Thus, each micrograph was cropped to include only the region of interest based on defined landmarks, and labelled cells within the region of interest were counted in an automatic and unbiased manner using the software ImagePro version 5.1. The landmarks of the regions of interest, and the area of each region sampled were the following: ACC, a horizontally-oriented rectangle (1.2 mm²) centered adjacent to the tip of the corpus callosum; prelimbic cortex, a rectangle (0.8 mm²) centered ventrally to the ACC and laterally to the corpus callosum; infralimbic cortex, a horizontal rectangle (0.5 mm²) positioned next to the inferior part of the lateral ventricle and ventrally to prelimbic cortex; piriform cortex, a rectangle (0.4 mm²) covering the most central part of the lateral piriform cortex; OFC, a horizontal rectangle (0.6 mm²), centered on the dorsal bank of the olfactory sulcus; premotor cortex, a rectangle (0.8 mm²), oriented as shown in Fig. 1 [6]. After quantifying the c-FOS label, the micrographs were decoded. Cell counts from the four sections per animal (corresponding to two sections for each independent observer) were summed, and c-FOS labeling density was calculated as the number of labelled cells divided by the total sampling area, for each region (number of labeled cells per mm² [63]).

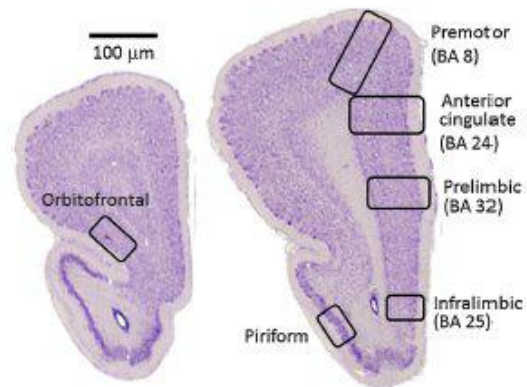


Fig. 1. Demarcation of the sampled areas for each region of interest. The OFC (left photomicrograph) was sampled from coronal sections corresponding to coronal plane #280 [Brain Atlas of the Domestic Rabbit (*Oryctolagus cuniculus*); University of Wisconsin-Madison Comparative Mammalian Brain Collection]; all other regions (right photomicrograph) were sampled from coronal sections corresponding to coronal plane #320 of this same atlas. The photomicrographs shown here were adapted and modified from the above-mentioned online brain atlas.

Statistical analysis was performed using Sigmaplot v. 11.0 (Systat Software, Inc). Data of c-FOS expression were analyzed using two-way ANOVA, with reproductive state (pregnant or estrous) and straw (presence or absence) as factors, and the density of c-FOS label as dependent variable. Main effects of reproductive state and straw were considered, along with their interaction. Pairwise multiple comparisons were performed by the Holm-Sidak test. Statistical significance was assumed where $p < 0.05$.

2.5. Quantification of behavior

In rabbits that were given straw (i.e., PREG+STRAW and ESTROUS+STRAW, the following latencies (in sec) were recorded: (a) latency to interact with the straw, defined operationally as introducing straw into mouth; (b) latency to collect straw in the mouth, distinguishable from simple interaction because it involves introducing many pieces of straw into the mouth and is accompanied by a stereotyped "pulling" (vertical head-bobbing) motion; (c) latency enter nest box while carrying straw, and (d) latency to finish the first "straw carrying cycle" (collect straw in mouth, enter nest box with straw, deposit the straw in the nest box, exit nest box without having straw in the mouth). We also registered the number of cycles carried out during the 30 min observation period. In the case of rabbits that did not receive straw (i.e., PREG and ESTROUS), we registered the number of times, during a 1 h observation period, that the rabbit entered and exited the nest box, as well as the number of times the rabbit ate rabbit chow or drank water. Behavioral data (latencies, frequencies) were analyzed using non-parametric statistical tests (Mann Whitney U; IBM SPSS software).

3. Results

3.1. Behavior of pregnant and estrous rabbits in the presence or absence of straw

Pregnant rabbits displayed very short latencies to interact with straw, and this interaction very quickly lead to collecting it in the mouth. By contrast, estrous rabbits showed longer latencies to interact with straw (Mann Whitney U, $p = 0.002$; Fig. 2a), and their straw-directed behaviors included nibbling and eating it, but

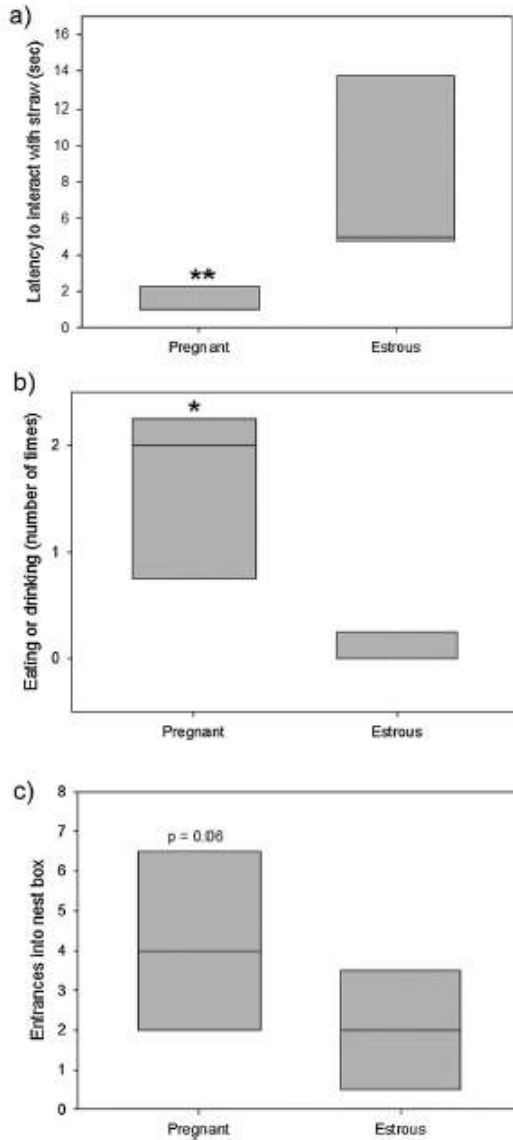


Fig. 2. Behaviors displayed by pregnant ($n=6$) and estrous ($n=6$) rabbits prior to being processed for c-FOS immunohistochemistry. (a) Latency of pregnant and estrous rabbits to interact with straw; (b) frequency of eating rabbit chow and drinking water; and (c) frequency of entrances into the nest box. The solid horizontal line within the box represents the median, and the upper and lower borders represent the 75th and 25th percentiles, respectively. Upper and lower whiskers represent the 90th and 10th percentiles, respectively. Single asterisk denotes $p < 0.05$; Double asterisks denote $p < 0.01$.

they never collected it. In the case of pregnant rabbits, the median latency to begin collecting straw was 11 s (interquartile range = 7 s), and thereafter entered the nest box carrying the straw with a median latency of 85 s (interquartile range 249 s). The median latency to complete a full straw-carrying cycle was approximately 211 s (interquartile range, 257 s). During the 30 min observation period, pregnant females displayed a median of 8 straw-carrying cycles (interquartile range: 8 cycles).

With respect to rabbits that did not receive straw, we registered two behaviors that we considered to represent the animal's general activity, or arousal: the number of entrances into the nest box, and the number of times that the rabbit ate rabbit chow or drank water during the 1 h observation period. Although the frequency of both behaviors was generally low, we observed significant differences in their expression according to reproductive state. Thus, the frequency of both behaviors was greater in pregnant rabbits, compared to estrous ones (entrances: $p = 0.065$; eating/drinking: $p = 0.026$; Mann Whitney U; Fig. 2b, c).

3.2. c-FOS labeling in the prefrontal cortex

c-FOS expression in each prefrontal region of interest was analyzed by 2-way ANOVA, with reproductive state (pregnant, estrous) and straw (present, or absent) entered as independent variables, and c-FOS label density as the dependent variable. Significant main effects of straw were observed for all regions, with the presence of straw being associated with approximately 2–3 times more c-FOS label in each region (Table 1). By contrast, a significant main effect of reproductive state was found only in the OFC, with pregnant females showing a 50% increase in c-FOS label compared to estrous females. Significant interactions between reproductive state and straw were likewise found for each region, except for the premotor cortex (Table 2). Post-hoc pairwise comparisons indicated that c-FOS expression was significantly increased in the OFC, ACC, and piriform cortex in pregnant females given straw, compared to estrous females given straw. By contrast, this comparison was not statistically significant for the infralimbic, prelimbic, or premotor cortices. In the piriform cortex, post-hoc comparisons showed a significant increase in basal c-FOS label (i.e., c-FOS expression in the absence of the straw stimulus) in estrous females, compared to pregnant ones (Fig. 3; Table 2).

4. Discussion

The objective of the present study was to characterize c-FOS expression in the prefrontal cortex associated with the pregnant rabbit's stereotyped and "compulsive-like" behavioral responses to nest building material (straw) [32]. Our hypothesis was that these behavioral responses would be associated with a pattern of prefrontal c-FOS immunoreactivity distinct from that observed in estrous females that were allowed to freely interact with straw, as well as compared to pregnant or estrous females that were not given straw. We chose as regions of interest the infralimbic (BA 25), prelimbic (BA 32), and anterior cingulate cortices (BA 24), as defined in the rabbit [6], as well as the OFC (defined as the dorsal bank of the rostral olfactory sulcus; [5,57]), and the premotor cortex (BA 8) [6]. These prefrontal areas were considered regions of interest due to their association with motivated behavior, assessment of stimulus value, action monitoring and behavioral planning, in a variety of species and behavioral paradigms (e.g., [57,40,15]). Moreover, in humans, enhanced activity in homologous cortical regions – in particular the OFC and ACC – have been associated with fMRI BOLD responses to specific external stimuli that provoke obsessive-compulsive symptoms in clinical and subclinical OCD, as well as with normal maternal responses to infant-related stimuli

Table 1

Two-way ANOVA main effects of reproductive state (pregnant, estrous) and straw (presence, absence), and their interactions.

	OFC	ACC	Piriform	Premotor	Prelimbic	Infralimbic
Rep State	F(1)= 5.0, p= 0.04	F(1)= 1.6, p= 0.2	F(1)= 0.4, p= 0.5	F< 0.001, p= 0.99	F(1)= 0.07, p= 0.8	F(1)= 0.7, p= 0.4
Straw	F(1)= 14.7, p< 0.001	F(1)= 26.9, p< 0.001	F(1)= 50.8, p< 0.001	F(1)= 17.8, p< 0.001	F(1)= 5.3, p= 0.03	F(1)= 10.3, p= 0.004
Rep state × Straw	F(1)= 15.8, p< 0.001	F(1)= 5.6, p= 0.03	F(1)= 16.3, p< 0.001	F(1)= 3.5, p= 0.08	F(1)= 4.7, p= 0.04	F(1)= 4.2, p= 0.05

Table 2

c-FOS labeling densities (estimated marginal means and standard error) corresponding to main effects of reproductive state, straw, and their interactions. Within a column, superscript letters that are the same represent statistically significant comparisons (p< 0.05).

		OFC	ACC	Piriform	Premotor	Prelimbic	Infralimbic	
MAIN EFFECTS	Pregnant	171.5 ^a	113.4	117.6	91.4	114.4	126.2	
	Estrous	114.2 ^a	91.0	107.0	91.4	106.7	110.7	
	Std Err	18.2	12.6	11.2	13.8	20.1	13.1	
	Straw	192.5 ^a	148.2 ^b	168.7 ^b	132.8 ^b	143.2 ^b	148.1 ^b	
	No straw	93.3 ^b	56.2 ^b	55.9 ^b	50.1 ^b	78.0 ^b	88.8 ^b	
	Std Err	18.2	12.6	11.2	13.8	20.1	13.1	
INTERACTION	Pregnant	Straw	272.3 ^{ab}	180.3 ^{ab}	206.0 ^{ab}	151.1 ^a	177.8 ^a	174.8 ^a
		No Straw	70.8 ^a	46.4 ^a	29.1 ^{ad}	31.9 ^a	51.0 ^a	77.7 ^a
	Estrous	Straw	112.7 ^b	116.1 ^b	131.4 ^{bc}	114.5	108.6	121.5
		No Straw	115.8	65.9	82.6 ^{cd}	68.3	104.9	99.9
		Std Err	25.7	17.8	15.8	19.6	28.5	18.5

[58,4,51,60,44,45,54]. We reasoned that if maternal nest building in the rabbit is homologous to compulsive behavior [32], then nest building behavior and compulsive behavior should be associated with similar prefrontal activation patterns.

Detailed observations on rabbit nest building behavior have been carried out in previous studies [19–21,32]. These studies demonstrate that hormonal signals during pregnancy alter the rabbit's behavioral responses to specific external stimuli. Thus, when provided with straw on day 28 of pregnancy, the female rabbit begins to collect it in her mouth with a latency of less than 10 s, carries it into the nest box with a latency of approximately 100 s, and then exits the nest box and returns to collect more straw with a latency of about 500 s. During the first 30 min, approximately 5–15 such cycles are completed, and this behavior typically continues across the next 1.5–2.5 h, expressed in bouts of continuous activity lasting approximately 25 min, separated by rest periods of approximately 15 min ([32], and unpublished observations). Observations reported in the present study are in general agreement with these earlier studies, and underscore the predictable and stereotyped nature of the pregnant rabbit's behavioral response to nest building material. Here, we observed that when pregnant female rabbits were given straw, they almost immediately began to collect it in their mouth and carry it into the nest box. Moreover, we observed that there were quantifiable differences between pregnant and estrous rabbits that were not given straw, with respect to some "general" behaviors. Pregnant rabbits tended to enter the nest box more frequently, and ate rabbit chow and drank water more frequently than estrous rabbits. We tentatively interpret these differences as indicating a generalized increase in arousal in pregnant rabbits, perhaps due to the present experimental paradigm, which had chronically deprived them of nest building material.

In the present study, we allowed the rabbits to interact with straw for 30 min, removed the straw from the cage, and then sacrificed the animal 30 min later. Given the known delay between stimulus-induced neuronal activation and the subsequent peak in c-FOS protein expression (at approximately 90 min; [11,39]), we assume that the observed c-FOS labeling represents neural activity associated with the *initial* behavioral responses to the straw stimulus. Considering the temporal context is important, since pre-

vious studies have indicated that straw carrying is inhibited once the straw nest is perceived by the rabbit to be completed, that is, when a significant amount of straw has accumulated inside the nest box [32]. In this regard, we propose that the present paradigm is comparable to human fMRI paradigms that examine immediate brain responses to external stimuli: specifically, OCD symptom provocation studies.

Regarding c-FOS expression, all regions of interest showed robust main effects of straw. This is not surprising, since this stimulus evoked behavioral responses in all animals. Thus, while pregnant females invariably began to collect straw and carry it into the nest box, estrous females typically nibbled on it, or ate it. Straw is a complex stimulus, and interacting with it is expected to activate brain regions involved in olfactory, gustatory, and somatosensory processing, as well as motor regions associated with nibbling on and eating it, in addition to those regions that might participate more selectively in promoting the "compulsive-like" behavioral response to nest building material in the context of pregnancy. On the other hand, a main effect of reproductive state was found only in the OFC. It is likely that this effect was driven exclusively by rabbits in the PREG + STRAW group, as there was no indication that pregnant rabbits that were not given straw displayed increased c-FOS label in the OFC, compared to estrous females (either given straw, or not given straw; see Fig. 3). In addition to underscoring the relevance of this region for "compulsive-like" straw carrying, this result coincides with fMRI studies of human mothers, which demonstrate that exposure to infant-associated stimuli – particularly those having a positive hedonic valence – strongly activate the OFC [43,54].

In addition to main effects of straw and reproductive state, all regions except the pre-motor cortex showed significant straw by reproductive state interactions (Table 2). In support of our original hypothesis, post-hoc comparisons showed that pregnancy selectively enhanced responsiveness of the OFC and ACC to straw. Thus, we observed a significant increase in c-FOS label in these regions, in pregnant females that were given straw compared to estrous females that were given straw. Additionally, c-FOS labeling in the piriform cortex was significantly increased in pregnant rabbits given straw, compared to estrous rabbits given straw. Although

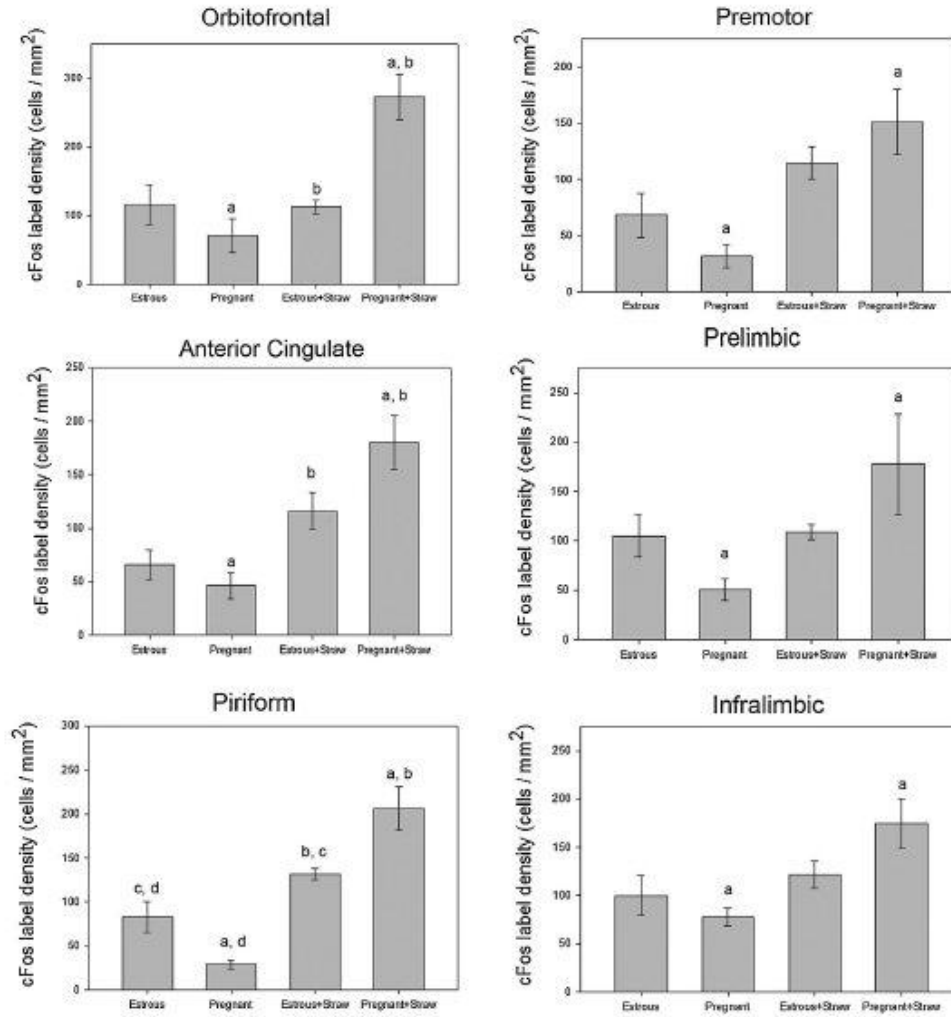


Fig. 3. c-FOS expression in the prefrontal cortex of PREG + STRAW, PREG, ESTROUS + STRAW, and ESTROUS groups ($n = 6$ animals for each group). Bar height denotes mean, whiskers denote standard error. Statistically significant pairwise comparisons ($p < 0.05$; Holm-Sidak) are marked with the same letter.

we had not predicted increased activation in the piriform cortex, this region has been associated with compulsive-like behavior in at least one other animal model [8]. By contrast, post-hoc analyses failed to show significant differences in c-FOS labeling density in the prelimbic, infralimbic, or premotor cortices, between pregnant females given straw and estrous females given straw.

Symptom provocation paradigms in fMRI and PET studies have been useful to define regional brain activity associated with OCD as well as anxiety disorders, where neuropsychiatric symptoms can be precipitated by specific external cues. In such paradigms, changes in brain activation patterns are typically recorded while the subject is exposed to neutral control stimuli or specific symptom-provoking stimuli. Important insight into the nature of anxiety disorders

has been gained from studies involving subjects with clinically-diagnosed anxiety disorders, as well as from non-clinical subjects. For example, in specific phobia, phobogenic stimuli evoke greater responses compared to control subjects in the insula (BA 13), amygdala, globus pallidus, thalamus, pulvinar, and cerebellum [37]. This body of work points to an overactive "fear circuit" underlying anxiety disorder symptoms, and this is supported by brain imaging studies in non-clinical subjects: normal phasic and sustained fear responses were associated with increased activity in the dorso-medial prefrontal, anterior cingulate, and medial orbital cortices, insula, amygdala, bed nucleus of the stria terminalis (BNST), hippocampus, and medial caudate [3]. Experimentally-induced fear paradigms in rodent models trigger c-FOS activation in most of

these same regions (e.g., [7,38,9,13]), supporting the proposal that fMRI BOLD activity in human subjects and c-FOS expression in animal models are comparable means to assess regional brain activity. In the case of OCD, symptom-provoking stimuli generally elicit increased fMRI BOLD responses in the prefrontal cortex (ACC, OFC, and insular cortex), basal ganglia (caudate, putamen, and globus pallidus), thalamus, and amygdala. However, different symptom dimensions (e.g., contamination obsessions/washing compulsions and checking compulsions) are associated with slightly different patterns of BOLD activation, [47].

We have argued previously that straw carrying behavior resembles compulsive behavior in that it is stereotyped, involves repeated functional behavioral components, and persists across an extended period of time [32,34,33,68–71]. Moreover, similar to compulsions in OCD [14], straw carrying is carried out within a specific spatiotemporal context: it is carried out in bouts of many repetitions, and is directed toward the nest box. This proposal is also supported by pharmacological studies: systemic administration of dopamine D1 and D2 receptor antagonists reduced the duration of the straw carrying bout (the number of straw carrying repetitions), without altering the form of the behavior itself [34]. That dopamine receptor antagonists reduced the duration of straw carrying behavior is consistent with models of OCD pathophysiology that propose an imbalance in the activity of direct and indirect basal ganglia pathways.

The present results further provide further support for the use of nest building in the rabbit as a model for compulsive behavior. Like obsessive-compulsive symptoms, the initiation of repetitive straw carrying was associated with increased regional brain activity in the OFC and ACC. The OFC might be an especially important region for generating the stereotyped behavioral response to nest material during pregnancy, as it is known to receive processed sensory information from all sensory channels, as well as to have extensive interconnections with medial prefrontal regions, which in turn communicate extensively with reproductive-hormone responsive subcortical regions such as the amygdala and hypothalamus [40,57]. The ACC, on the other hand, has been implicated in action monitoring and error detection [18]; these processes are likely important during nest building, as the rabbit adjusts her behavior according to the ongoing status of nest completion [32].

Several authors have suggested an important relationship between obsessive-compulsive symptoms and normal, adaptive parental behavior. Leckman and colleagues [42] and Abramowitz and colleagues [2] described thought and behavior patterns in new parents that strikingly resemble the symptoms of obsessive-compulsive disorder (OCD). Leckman and colleagues [42] propose that such "early parental preoccupations and behavior", are triggered by enhanced activity of conserved neural pathways that link heightened error detection and risk assessment to harm avoidant behaviors. In support of this idea, pregnancy and childbirth are times of increased risk for the onset or exacerbation of OCD symptoms [17,53,46,41,28,12,2]; reviewed in [1,48]. Reproductive hormones, including progesterone, might play an important role in OCD symptom exacerbation [17]. Consistent with this idea, some studies have reported an increase in subclinical obsessive-compulsive-like thoughts and behaviors – typically having to do with contamination and cleaning – during the luteal phase of the menstrual cycle [72]. These obsessive-compulsive-like experiences were positively correlated with salivary progesterone concentrations [16].

We propose that nest building behavior could be a useful model for understanding the neurobiology of compulsive behavior in OCD. Just as studies of normal fear responses and fear learning have added greatly to our understanding of anxiety disorders [50], we argue that nest building might enrich our understanding of

obsessive-compulsive symptoms, perhaps in particular those that are associated with certain hormonal or reproductive states.

Acknowledgements

This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), México (grant #129381, KLH), and a doctoral fellowship to HCR (CONACyT, #266917).

References

- [1] J.S. Abramowitz, S.A. Schwartz, K.M. Moore, K.R. Luenzmann, Obsessive-compulsive symptoms in pregnancy and the puerperium: a review of the literature, *J. Anxiety Disord.* 17 (2004) 461–478.
- [2] J.S. Abramowitz, C.A. Nelson, R. Rygwall, M. Khanlker, The cognitive mediation of obsessive-compulsive symptoms: a longitudinal study, *J. Anxiety Disord.* 21 (2007) 91–104.
- [3] R.P. Alvarez, G. Chen, J. Bodurka, R. Kaplan, C. Grillon, Phasic and sustained fear in humans elicits distinct patterns of brain activity, *Neuroimage* 55 (2011) 389–400.
- [4] A. Baioui, J. Pilgramm, C.J. Maerz, B. Walter, D. Vaitl, R. Stark, Neural response in obsessive-compulsive washers depends on individual fit of triggers, *Front. Hum. Neurosci.* 7 (2014) 143.
- [5] R.M. Benjamin, J.C. Jackson, G.T. Golden, Cortical projections of the thalamic mediodorsal nucleus in the rabbit, *Brain Res.* 141 (1978) 251–265.
- [6] S. Buchanan, R. Thompson, B. Maxwell, D.A. Powell, Efferent connections of the medial prefrontal cortex in the rabbit, *Exp. Brain Res.* 100 (1994) 469–483.
- [7] R.K. Butler, E.M. Oliver, A.C. Sharke, J. Parilla-Carretero, K.F. Kaigler, J.R. Fadel, M.A. Wilson, Activation of corticotropin releasing factor-containing neurons in the rat central amygdala and bed nucleus of the stria terminalis following exposure to two different anxiogenic stressors, *Behav. Brain Res.* 304 (2016) 92–101.
- [8] K.M. Campbell, L. de Lecea, D.M. Severnyne, M.G. Caron, M.J. McGrath, S.B. Sparber, L.Y. Sun, F.H. Burton, OCD-like behaviors caused by a neuropotentiating transgene targeted to cortical and limbic D1+ neurons, *J. Neurosci.* 19 (1999) 5044–5053.
- [9] J.P. Casanova, C. Madrid, M. Contreras, M. Rodriguez, M. Vasquez, F. Torrealba, A role for the interoceptive insular cortex in the consolidation of learned fear, *Behav. Brain Res.* 296 (2016) 70–77.
- [10] J.R.G. Challis, I.J. Davies, K.J. Ryan, The concentrations of progesterone, estrone and estradiol-17 beta in the plasma of pregnant rabbits, *Endocrinology* 93 (1973) 971–976.
- [11] A. Chaudhuri, S. Zangenehpour, R. Rahbar-Dehgan, F. y Ye, Molecular maps of neuronal activity and quiescence, *Acta Neurobiol. Exp.* 60 (2000) 403–410.
- [12] L.H. Chaudron, N. Nirodi, The obsessive-compulsive spectrum in the perinatal period: a prospective pilot study, *Arch. Women's Mental Health* 13 (2010) 403–410.
- [13] R.A. Dielenberg, G.E. Hunt, I.S. McGregor, When a rat smells a cat: the distribution of FOS immunoreactivity in rat brain following exposure to a predatory odor, *Neuroscience* 104 (2001) 1085–1097.
- [14] D. Eilam, H. Szechtman, Psychostimulant-induced behavior as an animal model of obsessive-compulsive disorder: an ethological approach to the form of the compulsive rituals, *CNS Spectr.* 10 (2005) 191–202.
- [15] D.R. Euston, A.J. Gruber, B.L. McNaughton, The role of medial prefrontal cortex in memory and decision making, *Neuron* 76 (2012) 1057–1070.
- [16] D.S. Fleischman, D.M.T. Fessler, Progesterone's effects on the psychology of disease avoidance: support for the compensatory behavioral prophylaxis hypothesis, *Horm. Behav.* 59 (2011) 271–275.
- [17] A. Forray, M. Foisneau, B. Pittman, C.J. McDougall, C.N. Epperson, Onset and exacerbation of obsessive-compulsive disorder in pregnancy and the postpartum period, *J. Clin. Psychiatry* 71 (2010) 1061–1068.
- [18] P.G. Gasquoin, Localization of function in anterior cingulate cortex: from psychosurgery to functional imaging, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 37 (2013) 340–348.
- [19] G. González-Mariscal, V. Díaz-Sánchez, A.I. Melo, C. Beyer, J.S. Rosenblatt, Maternal behavior in New Zealand White rabbits: quantification of somatic events, motor patterns, and steroid plasma levels, *Physiol. Behav.* 55 (1994) 1081–1089.
- [20] G. González-Mariscal, A.I. Melo, P. Jiménez, C. Beyer, J.S. Rosenblatt, Estradiol, progesterone, and prolactin regulate maternal nest-building in rabbits, *J. Neuroendocrinol.* 8 (1996) 901–907.
- [21] G. González-Mariscal, E. Cuamatzi, J.S. Rosenblatt, Hormones and external factors: are they on/off signals for maternal nest-building in rabbits? *Horm. Behav.* 33 (1998) 1–8.
- [22] G. González-Mariscal, C. García Dalmaín, A. Jiménez, Biostimulation and nursing modify mating-induced c-FOS immunoreactivity in the female rabbit forebrain, *Brain Res.* 1608 (2015) 66–74.
- [23] A.M. Graybiel, The basal ganglia and cognitive pattern generators, *Schizophr. Bull.* 23 (1997) 459–469.
- [24] A.M. Graybiel, The basal ganglia and chunking of action repertoires, *Neurobiol. Learn. Mem.* 70 (1998) 119–136.

- [25] A.M. Graybiel, S.L. Rauch, Toward a neurobiology of obsessive-compulsive disorder, *Neuron* 28 (2000) 343–347.
- [26] D.M. Greene-Schloesser, E.A. Van der Zee, D.K. Sheppard, M.R. Castillo, K.A. Gregg, T. Ilurrow, H. Foltz, M. Slater, A. Buit-Ito, Predictive validity of a non-induced mouse model of compulsive-like behavior, *Behav. Brain Res.* 221 (2011) 55–62.
- [27] A.J. Gruber, R.J. McDonald, Context, emotion, and the strategic pursuit of goals: interactions among multiple brain systems controlling motivated behavior, *Front. Behav. Neurosci.* 6 (2012) 50.
- [28] V. Guglielmi, N.C. Vulink, D. Denys, Y. Wang, J.F. Samuels, G. Nestadt, Obsessive-compulsive disorder and female reproductive cycle events: results from the OCD and reproduction collaborative study, *Depress. Anxiety* 31 (2014) 979–987.
- [29] J. Hilliard, H.G. Spies, C.H. Sawyer, Cholesterol storage and progesterin secretion during pregnancy and pseudopregnancy in the rabbit, *Endocrinology* 82 (1967) 157–165.
- [30] J. Hilliard, R.J. Scaramuzzi, R. Penardi, C.H. Sawyer, Progesterone, estradiol and testosterone levels in ovarian venous blood of pregnant rabbits, *Endocrinology* 93 (1973) 1235–1238.
- [31] K.L. Hoffman, G. González-Mariscal, Progesterone receptor activation signals behavioral transitions across the reproductive cycle of the female rabbit, *Horm. Behav.* 50 (2006) 154–168.
- [32] K.L. Hoffman, R.L. Rueda-Morales, Toward an understanding of the neurobiology of just right perceptions: nest building in the female rabbit as a possible model for compulsive behavior and the perception of task completion, *Behav. Brain Res.* 204 (2009) 182–191.
- [33] K.L. Hoffman, Animal models of obsessive compulsive disorder: recent findings and future directions, *Expert Opin. Drug Discov.* 6 (2011) 725–737.
- [34] K.L. Hoffman, R.L. Rueda-Morales, D1 and D2 dopamine receptor antagonists decrease behavioral bout duration, without altering the bout's repeated behavioral components, in a naturalistic model of repetitive and compulsive behavior, *Behav. Brain Res.* 230 (2012) 1–10.
- [35] K.L. Hoffman, *Modeling Neuropsychiatric Disorders in Laboratory Animals*, first ed., Woodhead Publishing, Elsevier, Amsterdam, 2015.
- [36] K.L. Hoffman, New dimensions in the use of rodent behavioral tests for novel drug discovery and development, *Exp. Opin. Drug Discov.* 11 (2016) 343–353.
- [37] J.C. Ipser, L. Singh, D.J. Stein, Meta-analysis of functional brain imaging in specific phobia, *Psychiatry Clin. Neurosci.* 67 (2013) 311–322.
- [38] X. Jiao, K.D. Beck, C.E. Myers, R.J. Servatius, K.C. Pang, Altered activity of the medial prefrontal cortex and amygdala during acquisition and extinction of an active avoidance task, *Front. Behav. Neurosci.* 9 (2015) 249.
- [39] J.Y. Joo, K. Schaukowitz, L. Farbiak, G. Kilars, T.K. Kim, Stimulus-specific combinatorial functionality of neuronal c-FOS enhancers, *Nat. Neurosci.* 19 (2015) 75–83.
- [40] M.L. Kringelbach, E.T. Rolls, The functional neuroanatomy of the human OFC: evidence from neuroimaging and neuropsychology, *Prog. Neurobiol.* 72 (2004) 341–372.
- [41] J. Labad, J.M. Merchón, P. Alonso, C. Segalás, S. Jiménez, J. Vallejo, Female reproductive cycle and obsessive-compulsive disorder, *J. Clin. Psychiatry* 66 (2005) 428–435.
- [42] J.F. Leckman, L.C. Mayes, R. Feldman, D.W. Evans, R.A. King, D.J. Cohen, Early parental preoccupations and behaviors and their possible relationship to the symptoms of obsessive-compulsive disorder, *Acta Psychiatr. Scand.* 396 (Suppl) (1999) 1–26.
- [43] E. Leibenluft, M.I. Gobbi, T. Harrison, J.V. Haxby, Mother's neural activation in response to pictures of their children and other children, *Biol. Psychiatry* 56 (2004) 225–232.
- [44] J.P. Lorderbaum, J.D. Newman, J.R. Dubno, A.R. Horwitz, Z. Najas, C.C. Tenenback, C.W. Bloomer, D.E. Bohning, D. Vincent, M.R. Johnson, N. Emmanuel, O. Brawman-Mintzer, S.W. Book, R.B. Lydiard, J.C. Ballenger, M.S. George, Feasibility of using fMRI to study mothers responding to infant cries, *Depress. Anxiety* 10 (1999) 99–104.
- [45] J.P. Lorderbaum, J.D. Newman, A.R. Horwitz, J.R. Dubno, R.B. Lydiard, M.B. Hamner, D.E. Bohning, M.S. George, A potential role for thalamocingulate circuitry in human maternal behavior, *Biol. Psychiatry* 51 (2002) 431–445.
- [46] G. Maina, U. Albert, F. Bogetto, P. Vaschetto, L. Ravizza, Recent life events and obsessive-compulsive disorder (OCD): the role of pregnancy/delivery, *Psychiatry Res.* 89 (1999) 49–58.
- [47] D. Mataix-Cols, S. Cullen, K. Lange, F. Zelaya, C. Andrew, E. Amaro, M.J. Brammer, S.C.R. Williams, A. Speckens, M.L. Phillips, Neural correlates of anxiety associated with obsessive-compulsive symptom dimensions in normal volunteers, *Biol. Psychiatry* 53 (2003) 482–493.
- [48] M. McGuinness, J. Blissett, C. Jones, OCD in the perinatal period: is postpartum OCD (ppOCD) a distinct subtype? A review of the literature, *Behav. Cognit. Psychother.* 39 (1999) 285–310.
- [49] G. Mikhail, M.W. Nall, W.M. Allen, Progesterone levels in the rabbit ovarian vein blood throughout pregnancy, *Endocrinology* 69 (1961) 504–509.
- [50] M.R. Milad, G.J. Quirk, Fear extinction as a model for translational neuroscience: ten years of progress, *Annu. Rev. Psychol.* 63 (2012) 129–151.
- [51] B. Millet, T. Dondaine, J.-M. Reynann, A.B. Bougaignon, F. Naudet, N. Jaafari, D. Drapier, V. Turmel, H. Mesbah, M. Vérin, F. Le Jeune, Obsessive-compulsive disorder networks: positron emission tomography and neuropsychology provide new insights, *PLoS One* 8 (2013) e53241.
- [52] K. Myers, W.E. Poole, A study of the biology of the wild rabbit, *Oryctolagus cuniculus* (L.), in confined populations. II. The effects of season and population increase on behaviour, *C.S.I.R.O. Wildl. Res.* 6 (1961) 1–41.
- [53] F. Neziroglu, R. Anemone, J.A. Yaryura-Tobias, Onset of obsessive-compulsive disorder in pregnancy, *Am. J. Psychiatry* 149 (1996) 947–950.
- [54] J.B. Nitchke, E.E. Nelson, B.D. Rusch, A.S. Fox, T.R. Gales, R.J. Davison, OFC tracks positive mood in mothers viewing pictures of their newborn infants, *Neuroimage* 21 (2004) 583–592.
- [55] N. Onoda, K. Inamura, E. Obata, M. Iino, Response selectivity of neocortical neurons to specific odors in the rabbit, *J. Neurophysiol.* 2 (1984) 638–652.
- [56] A. Parent, L.N. Hazrati, Functional anatomy of the basal ganglia. I. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortico loop, *Brain Res. Brain Res. Rev.* 20 (1995) 91–127.
- [57] J.L. Price, Definition of the orbital cortex in relation to specific connections with limbic and visceral structures and other cortical regions, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1121 (2007) 54–71.
- [58] J.Y. Rotge, D. Guehl, B. Dillharreguy, E. Cuny, J. Tignol, B. Bioulac, M. Allard, P. Burbaud, B. Auquier, Provocation of obsessive-compulsive symptoms: a quantitative voxel-based meta-analysis of functional neuroimaging studies, *J. Psychiatry Neurosci.* 233 (2008) 405–412.
- [59] J.W. Shek, G.Y. Wen, H.M. Wisniewski, *Atlas of the rabbit brain and spinal cord*, Karger Basel, Switzerland, 1986.
- [60] D. Simon, N. Adler, C. Kauffmann, N. Kathmann, Amygdala hyperactivation during symptom provocation in obsessive-compulsive disorder and its modulation by distraction, *NeuroImage: Clinical* 4 (2004) 549–557.
- [61] Y. Smith, M.D. Bevan, E. Shink, J.P. Bolam, Microcircuitry of the direct and indirect pathways of the basal ganglia, *Neuroscience* 86 (1998) 353–387.
- [62] H. Szechtman, E. Woody, Obsessive-compulsive disorder as a disturbance of security motivation, *Psychol. Rev.* 111 (2004) 111–127.
- [63] F. van Hasselt, L. De Viesser, J.M. Tieskens, S. Cornelisse, A. Baars, M. Lavrijsen, H. Krugers, R. Van de Bos, M. Jöels, Individual variations in maternal care early in life correlate with later life decision-making and c-FOS expression in prefrontal subregions of rats, *PLoS One* 7 (2012) e37820.
- [64] W. Wolmarans de, D.J. Stein, B.H. Harvey, Excessive nest building is a unique behavioural phenotype in the deer mouse model of obsessive-compulsive disorder, *J. Psychopharmacol.* 30 (2016) 867–874.
- [65] E.Z. Woody, H. Szechtman, Adaptation to potential threat: the evolution, neurobiology, and psychopathology of the security motivation system, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 35 (2011) 1019–1033.
- [66] M.X. Zarrow, A. Farooq, V.H. Denenberg, P.B. Sawin, S. Ross, Maternal behaviour in the rabbit: endocrine control of maternal-nest building, *J. Reprod. Fertil.* 6 (1963) 375–383.
- [67] M.X. Zarrow, V.H. Denenberg, C.O. Anderson, Rabbit: frequency of suckling in the pup, *Science* 150 (1965) 1835–1836.
- [68] R. Zor, H. Hermesh, H. Szechtman, D. Eilam, Turning order into chaos through repetition and addition of elementary acts in obsessive-compulsive disorder (OCD), *World J. Biol. Psychiatry* 10 (2009) 480–487.
- [69] R. Zor, H. Keren, H. Hermesh, H. Szechtman, J. Mott, D. Eilam, Obsessive-compulsive disorder: a disorder of pessimal (non-functional) motor behavior, *Acta Psychiatr. Scand.* 120 (2009) 288–298.
- [70] R. Zor, H. Szechtman, H. Hermesh, N. Fineberg, D. Eilam, Manifestation of incompleteness obsessive-compulsive disorder (OCD) as reduced functionality and extended activity beyond task completion, *PLoS One* 6 (2011) e25217.
- [71] R. Zor, N. Fineberg, D. Eilam, H. Hermesh, Video telemetry and behavioral analysis discriminate between compulsive cleaning and compulsive checking in obsessive-compulsive disorder, *Eur. Neuropsychopharmacol.* 21 (2011) 814–824.
- [72] K.M. Dillon, D. Brooks, Unusual cleaning behavior in the luteal phase, *Psychol. Rep.* 70 (1992) 35–39.



Research report

Activation of cortical and striatal regions during the expression of a naturalistic compulsive-like behavior in the rabbit

Hugo Cano-Ramírez^{a,b}, Kurt L. Hoffman^{b,*}

^a *Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México*

^b *Centro de Investigación en Reproducción Animal (CIRA), Universidad Autónoma de Tlaxcala-CINVESTAV, México*



ARTICLE INFO

Keywords

Compulsion
Obsessive-compulsive
Caudate
Putamen
Statium
Maternal behavior
Rabbit
Animal model

ABSTRACT

Nest building behavior in the pregnant rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) can serve as a model for compulsions in obsessive compulsive disorder (OCD). Previous work showed that the “straw carrying” phase of nest building (during which the rabbit repeatedly collects straw in its mouth, carries it into the nest box and deposits it there, and then returns to collect more) is associated with increased c-FOS expression (a marker of neuronal activity) in the orbitofrontal, anterior cingulate, and piriform cortices. In the present study, we quantified c-FOS expression in the caudate and putamen, as well as in the primary motor, somatosensory, and prefrontal cortices of (1) pregnant rabbits given straw (PREG + STRAW); pregnant rabbits not given straw (PREG); (3) estrous rabbits given straw (ESTROUS + STRAW); and (4) estrous rabbits not given straw (ESTROUS). We found that straw carrying was associated with increased c-FOS expression in the dorsal putamen, ventral caudate, primary motor cortex, and somatosensory cortex. Additionally, a correlational analysis of PREG + STRAW animals revealed that these regions, along with the premotor and prefrontal cortices, were significantly intercorrelated with respect to c-FOS expression, suggesting their “coactivation” during repetitive straw carrying. By contrast, behavioral interactions of non-pregnant (ESTROUS) rabbits with straw (e.g., sniffing, nibbling it) were associated with a distinct pattern of c-FOS expression that included the medial and ventral putamen. c-FOS expression in PREG + STRAW rabbits is similar to patterns of regional brain activity in OCD patients exposed to obsession-provoking stimuli, as well as to those observed in healthy human mothers responding to infant-associated stimuli.

1. Introduction

Many types of neuropsychiatric symptoms occur along a continuum of severity that includes non-pathological, “normal” experience [e.g., 1, 2]. Thus, otherwise adaptive behavioral, cognitive, or emotional responses (“psychophysiological” responses) become pathological when they are exaggerated in intensity, prolonged in duration, or increased in frequency. Anxiety symptoms are a particularly clear example of this idea: acute fear (for example, of a spider or snake) or tonic anxious arousal can be adaptive and non-pathological in certain circumstances. However, acute and tonic fear responses that are unusually intense, prolonged, or out of context are non-adaptive, and comprise the core symptoms of anxiety disorders.

Therefore, an understanding of the neurobiological underpinnings of neuropsychiatric symptoms requires an understanding of the neural mechanisms that control the frequency, duration, and intensity of the corresponding adaptive psychophysiological response, and how certain stimuli (environmental, social, or internal cues, for example) optimally

interact with these mechanisms at the neural level. According to this conceptualization of neuropsychiatric symptoms, alterations in neurobiological mechanisms that underlie the triggering of an adaptive psychophysiological response would determine symptom frequency and context of its occurrence, while negative regulatory systems would determine its intensity and duration.

We have proposed that maternal nest building in the domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) can serve as a useful model for elucidating the neurobiology underlying obsessive-compulsive symptoms, a core characteristic of obsessive compulsive disorder (OCD) and other disorders of the obsessive-compulsive spectrum [3–5]. Obsessions are intrusive, persistent, and repetitive thoughts, while compulsions are repetitive, often stereotyped, behaviors performed ostensibly in order to reduce anxiety associated with obsessions. An intriguing characteristic of OCD, one that may provide clues about the neurobiological origins of its symptoms, is that the content of obsessions and compulsions is most often related to one or more of the following themes: contamination/cleaning, danger/checking, symmetry/counting, and hoarding.

* Corresponding author.

E-mail address: rcviro@hotmail.com (K.L. Hoffman).

<https://doi.org/10.1016/j.bbr.2018.05.034>

Received 24 January 2018; Received in revised form 14 May 2018; Accepted 29 May 2018

Available online 07 June 2018

0166-4328/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

Notably, each of these symptom categories involves evolutionarily conserved, adaptive cognitive-behavioral responses [6–8].

Maternal nest building in the rabbit comprises three behavioral phases, orchestrated by hormonal changes of pregnancy, that are expressed in a reliable temporal sequence: (1) digging a nest burrow, which typically occurs during mid-pregnancy; (2) collecting nest material (e.g., dry grass or straw) and depositing it into the nest burrow in order to form a nest, which typically occurs on a single evening during the final week of pregnancy; and (3) plucking hair from the ventrum and lining the nest with it, which typically occurs on the night of parturition (31 or 32 days after mating) [9–12].

The second phase of maternal nest building, the collection of nest material or “straw carrying”, is the focus of the present study. In the laboratory, we have described this behavior in terms of individual components that comprise a straw carrying “cycle” [3–5]. Thus, the rabbit collects straw in her mouth by means of stereotyped head-bobbing motions, carries the straw into the nest box and deposits it there (often accompanied by digging into or scratching the floor of the nest box), and then returns to collect more straw. Approximately 20–40 such cycles are displayed during the straw carrying phase. In the laboratory, the introduction of straw into the rabbit’s cage during late pregnancy (e.g., 28 days after mating) quickly triggers straw carrying, and this behavior is negatively modulated by the quantity of straw that is inside the nest box: more straw inside the nest box inhibits ongoing nest building behavior; less straw prolongs it [3]. Importantly, once the straw nest is completely formed inside the nest box, its removal does not provoke a second straw carrying phase: therefore, external stimuli associated with a completed straw nest apparently engage neurobiological processes that satiate the motivation to collect and carry straw. This behavior is adaptive only in a specific context (late pregnancy), and the signals that control the correct contextual expression are the hormones of pregnancy, the presence of nest building material, and the absence (or presence) of a completed straw nest inside the nest box, all of which can be experimentally controlled. Thus, straw carrying provides a unique opportunity to investigate neurobiological mechanisms that control the initiation and termination of a complex, repetitive behavioral response.

In the present study, we examined the pattern of c-FOS expression (a marker of neuronal activity) in the striatum, somatosensory cortex, and motor cortex associated with the display of repetitive straw carrying behavior. We correlated c-FOS expression in these regions with prefrontal regions, as well as with specific behavioral parameters of repetitive straw carrying behavior. We predicted that repetitive straw carrying would be associated with increased c-FOS expression in the striatum (caudate, putamen), in part because of human studies that observed fMRI activation of this region in association with OCD symptom provocation. Our working model is that straw carrying behavior in the rabbit is an adaptive, compulsive-like behavior that can serve to model the neurobiology of compulsions of OCD.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Twenty-six adult (6–24 months), maternally-experienced female New Zealand rabbits (that had at least one prior full-term pregnancy, in which a complete maternal nest was constructed, and in which pups were raised to weaning), from the colony maintained at the *Centro de Investigación en Reproducción Animal*, Tlaxcala, México), were used in these experiments. They were maintained at ambient temperature (15–25 °C), on a long-day light cycle (lights on at 06:00, lights off at 20:00 h), and given rabbit chow (Purina) and water *ad libitum*.

Rabbits ($n = 14$) were mated with a sexually experienced buck, and placed individually in large wire “maternal” cages (90 cm long \times 60 cm wide \times 40 cm high), which contained a wooden nest box (49 cm \times 28 cm \times 27 cm) having an entrance (a hole of diameter

22 cm) cut in the front. The other rabbits of the study (“estrous”; $n = 12$) were not mated but were placed individually in wire cages containing nest boxes for 28 days prior to the experiment, under the conditions described above. Throughout this work, animal care adhered to the Law for the Protection of Animals (Mexico), and the protocol was approved by the Animal Ethics Committee of the *Universidad Autónoma de Tlaxcala*.

2.2. Experimental design

The experiments were initiated between 08:30–10:00 h on the 28th day of pregnancy, or in the case of estrous rabbits, 28 days after being moved into a maternal cage with a nest box. All females were denied access to nest material (straw) until the day of the experiment. For half of the rabbits, at $t = 0$ min, straw was placed inside the cage, but outside the nest box; all straw was removed from the nest box and cage at $t = 30$ min. The other half of the rabbits did not receive straw. In all cases, the behavior of the rabbits was subsequently recorded for 60 min. There were four comparison groups, as follows: (1) PREG + STRAW ($n = 7$): pregnant females were allowed to interact with straw for 30 min; (2) PREG ($n = 7$): pregnant females that did not receive straw; (3) ESTROUS + STRAW ($n = 6$): estrous females that were allowed to interact with straw for 30 min, (4) ESTROUS ($n = 6$): estrous females that did not receive straw. Immediately after the 1 h observation period, the rabbit was sacrificed and perfused.

2.3. Sacrifice, perfusion and immunohistochemistry

Females were anesthetized with a combination of Xilazine (i.m., 30 mg, in 1.5 mL saline) and Ketamine (i.m., 150 mg, in 1.5 mL saline), and then sacrificed with an overdose of sodium pentobarbital (i.v.), 2 min after receiving an i.v. injection of 10,000 IU heparin sulfate, the latter in order to inhibit the formation of blood clots during the perfusion. Rabbits were perfused transcardially, first with physiological saline (NaCl, 0.9%) and then 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer. The brains remained within the skull overnight, at room temperature (RT). The next day, brains were removed from the skull and cryoprotected by successive overnight incubations, at 4 °C, in solutions of increasing sucrose concentration (10, 20, and 30%, 0.1 M phosphate buffer). Brains were then frozen at -20 °C and sectioned coronally using a cryostat (40 μ m), from the rostral pole to the beginning of the thalamus. Sections were processed for c-FOS immunohistochemistry, using a protocol previously described [5]. Free floating sections were washed three times in phosphate buffer (PB) 0.1 M, pH 7.4 in order to remove excess aldehydes, and then for 10 min in 0.05% hydrogen peroxide in order to eliminate endogenous peroxidase activity. After preincubation for 1 h in 1% normal donkey serum (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) sections were incubated for 48 h at 4 °C in the polyclonal antibody SC-52-G (Santa Cruz Biotechnology), diluted at 1:2000 with 0.1% Triton X-100 (Sigma, St. Louis, MO) in 0.1 M PB. This antibody has been used successfully to visualize the c-FOS protein in the adult female rabbit [5]. The antibody solution was removed and sections were washed 3 times in 0.1 M PB, and then processed with the Vectastain Elite ABC kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA (biotinylated donkey anti-goat serum IgG, 1 h at RT; avidin and biotinylated horseradish peroxidase solution, 1 h at RT). Sections were rinsed 3 times in 0.1 M PB, and c-FOS labeling was visualized using diaminobenzidine/nickel substrate working solution (DAB peroxidase substrate SK-4100; Vector Laboratories). Sections were mounted onto gelatin subbed slides, dehydrated and then cover-slipped with Entellan mounting medium (Merck, Darmstadt, Germany).

2.4. c-FOS cell quantification

Processed sections were examined under bright-field illumination in an Olympus CH2 microscope and 2 microphotographs were taken

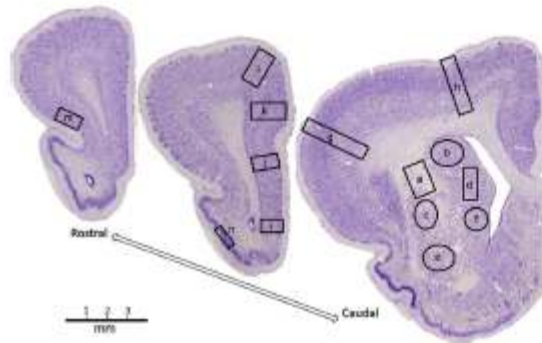


Fig. 1. Demarcation of the sampled areas for each region of interest. a) dorsal putamen (dPut); b) dorsal caudate (dCaud); c) medial putamen (mPut); d) medial caudate (mCaud); e) ventral putamen (vCaud); f) ventral caudate (vCaud); g) somatosensory cortex; h) primary motor cortex; i) infralimbic cortex (IL); j) prelimbic cortex (PL); k) anterior cingulate cortex (ACC); l) premotor cortex; m) orbitofrontal cortex (OFC); n) piriform cortex. All regions were sampled from coronal sections corresponding approximately to coronal planes #300, #360, and #540 [Brain Atlas of the Domestic Rabbit (*Oryctolagus cuniculus*); University of Wisconsin-Madison Comparative Mammalian Brain Collection]. The photomicrographs shown here were adapted and modified from the above-mentioned online brain atlas: <http://www.brainmuseum.org/Specimens/Lagomorpha/domesticrabbit>.

(using a 4x objective, encompassing dimensions of 2.2 x 1.75 mm) from each animal ($n = 24$), of each of the following areas of interest: caudate nucleus (dorsal, medial, ventral; dCaud, mCaud and vCaud, respectively), putamen (dorsal, medial, ventral; dPut, mPut, and vPut, respectively), somatosensory cortex and motor cortex. In the rabbit (unlike the rodent), the striatum is divided by the internal capsule into the caudate nucleus and putamen (e.g., [13]; see also Fig. 1 of the present study). The somatosensory (S1) and motor (M1) cortices were identified based on previous descriptions of the rabbit neocortex [14–16]. The somatosensory area sampled would encompass the lip region [15], while the primary motor cortex region sampled (area Precentral 1, PrC1 [14] is most likely associated with the “trunk, eye muscles, and rhinarium” [14]). This region is medially adjacent to regions of S1 that correspond to the forepaws [15]. We also sampled the following regions of the prefrontal cortex, as described in a previous manuscript [5]: anterior cingulate cortex (ACC; BA 24), premotor (BA 8), prelimbic (PL; BA 32) and infralimbic (IL; BA 25) areas, orbitofrontal cortex (OFC), and piriform cortex. Coronal sections to be photographed of the striatum were selected pseudo-randomly from those corresponding to the approximate coronal orientation planes #540 (caudate nucleus; approximately 9 mm caudal to the rostral pole) of the Brain Atlas of the Domestic Rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) (University of Wisconsin-Madison Comparative Mammalian Brain Collection website; <http://neuroscience.library.org/Specimens/Lagomorpha/domesticrabbit/sections/thumbnail.html>), and the Rabbit Brain Atlas [17], while those of the prefrontal cortex were selected pseudo-randomly from those corresponding to the approximate coronal orientation planes #300 (OFC; approximately 1 mm caudal to the rostral pole) and #360 (all other regions; approximately 2 mm caudal to the rostral pole).

The micrographs were coded, and c-FOS labeling in these micrographs was quantified by an observer (HCR) blinded to the identity of the corresponding animal and treatment condition. Thus, each micrograph was cropped to include only the region of interest based on defined landmarks, and labeled cells within the region of interest were counted in an automatic and unbiased manner using the software ImagePro version 5.1.

The landmarks of the regions of interest, and the dimensions of each region sampled were the following: the caudate nucleus was divided in

three sections, dCaud: a horizontally-oriented ellipse (1.53 x 1.28 mm) centered adjacent to the tip of the internal capsule; mCaud: a vertically-oriented rectangle (0.63 x 1.59 mm) centered ventrally to the dorsolateral caudate and medially to the internal capsule; vCaud: a horizontally-oriented ellipse (1.06 x 1.15 mm) centered medially to the inferior part of the internal capsule and lateral to the ventral-most extent of the lateral ventricle. The putamen was also divided in three sections; dPut: a vertically-oriented rectangle (1.0 x 1.6 mm) centered ventral to the corpus callosum and situated between the internal and external capsules; mPut: a vertically-oriented ellipse (1.41 x 1.14 mm) centered ventrally to the dorsolateral putamen and lateral to the internal capsule; vPut: a horizontally-oriented ellipse (1.35 x 1.55 mm) centered laterally to the inferior part of the internal capsule and dorsally to the anterior commissure. The areas sampled from the motor cortex and somatosensory cortex were vertically-oriented rectangles (0.54 mm x a variable length, the latter corresponding to the distance from the cortical surface to the corpus callosum), placed as shown in Fig. 1. For the prefrontal cortex, the landmarks of the regions of interest, and the area of each region sampled were as described in a previous manuscript [5]: ACC, a horizontally-oriented rectangle (1.58 x 0.76 mm) centered adjacent to the tip of the corpus callosum; prelimbic cortex, a rectangle (1.26 x 0.61 mm) centered ventrally to the ACC cortex and laterally to the corpus callosum; infralimbic cortex, a horizontal rectangle (1.17 x 0.44 mm) positioned next to the inferior part of the lateral ventricle and ventrally to prelimbic cortex; piriform cortex, a rectangle (1.31 x 0.48 mm) covering the most central part of the lateral piriform cortex; OFC, a horizontal rectangle (1.17 x 0.53 mm), centered on the dorsal bank of the olfactory sulcus; and premotor cortex, a horizontal rectangle (1.5 x 0.9 mm), centered dorsally to the superior part of the corpus callosum [18].

After quantifying the c-FOS label, the micrographs were decoded. Cell counts from the two sections per animal were summed, and c-FOS labeling density was calculated as the number of labeled cells divided by the total sampling area, for each region (number of labeled cells per mm^2 ; [5,19]).

2.5. Quantification of behavior

In rabbits that were given straw (i.e., PREG + STRAW and ESTROUS + STRAW, the following latencies (in sec) were recorded: (a) latency to interact with the straw, defined operationally as introducing straw into mouth; (b) latency to collect straw in the mouth, distinguishable from simple interaction because it involves introducing many pieces of straw into the mouth and is accompanied by a stereotyped “pulling” (vertical head-bobbing) motion; (c) latency enter nest box while carrying straw, and (d) latency to finish the first “straw carrying cycle” (collect straw in mouth, enter nest box with straw, deposit the straw in the nest box, exit nest box without having straw in the mouth). We also registered the number of cycles carried out during the 30 min observation period. In the case of rabbits that did not receive straw (i.e., PREG and ESTROUS), we registered the number of times, during a 1 h observation period, that the rabbit entered and exited the nest box, as well as the number of times the rabbit ate rabbit chow or drank water.

Statistical analysis. Data of c-FOS expression were analyzed using two-way ANOVA (Sigmaplot v. 11.0; Systat Software, Inc), with reproductive state (pregnant or estrous) and straw (presence or absence) as factors, and the density of c-FOS label as dependent variable. Main effects of reproductive state and straw were considered, along with their interaction. Planned pairwise comparisons were performed by the Holm-Sidak test. 95% confidence intervals were calculated for observed means, using SPSS software (v. 15.0 for Windows, IBM). Correlational analyses on c-FOS expression and behavioral data were done using the nonparametric Spearman Rank Correlation test and behavioral data were analyzed using the nonparametric Mann Whitney U test; both analyses done using SPSS v.15 software. In all cases, statistical significance was assumed where $p < 0.05$.

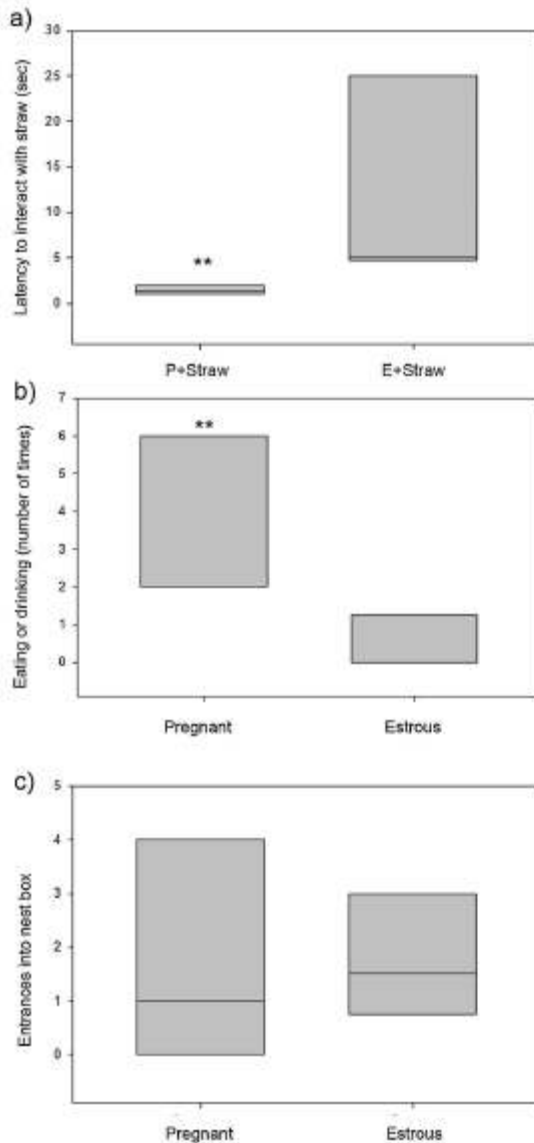


Fig. 2. Behaviors displayed by pregnant and estrous rabbits prior to being processed for c-FOS immunohistochemistry. (a) Latency of pregnant ($n = 7$) and estrous ($n = 6$) rabbits to interact with straw; (b) frequency of eating rabbit chow and drinking water, for pregnant ($n = 7$) and estrous ($n = 6$) rabbits not given straw; and (c) frequency of entrances into the nest box, for pregnant ($n = 7$) and estrous ($n = 6$) rabbits not given straw. The solid horizontal line within the box represents the median, and the upper and lower borders represent the 75th and 25th percentiles, respectively. Upper and lower whiskers represent the 90th and 10th percentiles, respectively. Double asterisks denote $p < 0.01$.

3. Results

3.1. Behavior of pregnant and estrous rabbits in the presence or absence of straw

Pregnant rabbits presented shorter latencies to interact with the

straw compared to estrous rabbits (Mann Whitney $U = 0.000$; $p < 0.001$; Fig. 2a). While pregnant rabbits almost immediately began to collect and carry the straw after it was placed into the cage (time of placement of straw into cage was designated as $t = 0$ s), straw-directed behavior of estrous rabbits was limited to nibbling on or eating the straw, but not collecting or carrying it. Thus, for pregnant rabbits, the median time to enter the nest box while carrying straw was 78 s (interquartile range = 191 s), and the median time to complete a full straw-carrying cycle was 295 s (interquartile range = 432 s). During the 30 min observation period, pregnant rabbits displayed a median of 12 (interquartile range = 7 cycles) straw carrying cycles.

In addition to the obvious differences between pregnant and estrous rabbits with respect to their behavioral response to straw, we also observed subtle behavioral differences between these two groups in the absence of straw. Thus, the number of times that the rabbit ate chow or drank water during the 1 h observation period was increased in pregnant rabbits, compared to estrous (eating and drinking; Mann Whitney $U = 3.0$; $p = 0.008$; Fig. 2b). However, another behavioral measure, the number of entrances into the nest box during 60 min, was not significantly different between the two groups (Mann Whitney $U = 16.5$ $p = 0.534$; Fig. 2c).

3.2. c-FOS labeling in the striatum (caudate and putamen), somatosensory cortex, and primary motor cortex

c-FOS expression in the striatum (dorsal, medial and ventral caudate and putamen) and in motor and somatosensory cortices were analyzed by 2-way ANOVA, with reproductive state (pregnant, or estrous) and straw (present, or absent) entered as independent variables, and c-FOS label density as the dependent variable. Significant main effects of straw were observed in all the regions, while main effects of reproductive state were found only in the dPut, motor, and somatosensory cortices (Table 1). Significant reproductive state by straw interactions were observed for the vCaud, dPut, primary motor cortex, and somatosensory cortex. Post-hoc pairwise comparisons indicated that c-FOS expression was significantly increased in the dPut, vCaud, primary motor cortex, and somatosensory cortex in pregnant females given straw, compared to estrous females given straw. By contrast, this comparison was not statistically significant for other striatal regions (dCaud, mCaud, mPut, and vPut) (Fig. 3; Table 2). Representative photomicrographs of primary motor cortex, sensorimotor cortex, caudate, and putamen are presented as supplementary material (Supplementary Figs. S1–S4).

This analysis also identified brain regions that were activated in association with the rabbit simply interacting with the straw, without collecting or carrying it. Thus, while all regions analyzed showed significant main effects of straw (Table 1), the post-hoc comparison of ESTROUS + STRAW and ESTROUS was significant for mPut and vPut (Fig. 3; Table 2). By contrast, none of the brain regions analyzed showed significant post-hoc differences in c-FOS expression between PREG and ESTROUS rabbits.

3.3. Coactivations of striatal and cortical regions in PREG + STRAW and ESTROUS + STRAW rabbits

The results of the 2-way ANOVA showed that c-FOS expression in the dPut, vCaud, primary motor cortex, and somatosensory cortex was associated with the display of repetitive straw carrying. Since the striatum receives topographically-organized input from the entire cerebral cortex, we used a correlation analysis in order to test for "coactivations" between these striatal areas and prefrontal, primary motor, and somatosensory cortices, considering only those rabbits in the PREG + STRAW group ($n = 7$). We use the term "coactivation" here in order to refer to two distinct brain regions that showed significantly correlated c-FOS expression, implying that both regions were activated to a similar extent sometime during the observation period. However,

Table 1

Two-way ANOVA main effects of reproductive state (pregnant, estrous) and straw (present, absent) and their interactions. Statistically significant effects are shown in bold type. SS denotes somatosensory cortex.

	dCaud	mCaud	vCaud	dPut	mPut	vPut	Motor	SS
Rep state	F(1) = 0.1 P = 0.80	F(1) = 0.3 P = 0.61	F(1) = 0.4 P = 0.55	F(1) = 9.9 P = 0.005	F(1) = 0.2 P = 0.70	F(1) = 0.1 P = 0.82	F(1) = 15.8 P < 0.001	F(1) = 14.9 P < 0.001
Straw	F(1) = 14.5 P < 0.001	F(1) = 18.8 P < 0.001	F(1) = 5.8 P = 0.025	F(1) = 10.5 P = 0.004	F(1) = 19.0 P < 0.001	F(1) = 21.8 P < 0.001	F(1) = 49.6 P < 0.001	F(1) = 47.0 P < 0.001
Rep state x Straw	F(1) = 1.2 P = 0.28	F(1) = 1.7 P = 0.21	F(1) = 7.3 P = 0.013	F(1) = 11.9 P = 0.002	F(1) = 0.8 P = 0.38	F(1) = 0.3 P = 0.62	F(1) = 23.9 P < 0.001	F(1) = 15.5 P < 0.001

due to the temporal dynamics of c-FOS expression (a gradual rise across approximately 45 min after inducing stimulus, and then a decline across the following hour), the temporal resolution of this technique is not sufficiently sensitive to resolve whether correlated regions were activated simultaneously or successively. Thus, connectivity relationships cannot be inferred from this analysis.

With regards to striatal-prefrontal coactivations, we found that c-FOS expression in the dPut was significantly correlated with that of the premotor cortex, c-FOS expression in the motor cortex was significantly correlated with that of the prelimbic and premotor cortices, while c-FOS expression in the vCaud and somatosensory cortex was not significantly correlated with any of these prefrontal regions (Table 3). With regards to correlations among striatal regions and the somatosensory and primary motor cortices, we found that c-FOS expression in the dPut was significantly correlated with expression in the dCaud and primary motor cortex (Table 4), c-FOS expression in the motor cortex was correlated with that in the dCaud and dPut. C-FOS expression in vCaud and somatosensory cortex was not significantly correlated with any of the other regions.

These correlation patterns were not observed in estrous rabbits that were given straw (Table 5). Thus, in ESTROUS + STRAW rabbits ($n = 6$), c-FOS expression in the dPut and dCaud were not significantly correlated with that of the somatosensory or motor cortices. Instead, c-FOS expression in the vPut was negatively correlated with that in the dPut, while showing positive correlations with the dCaud and mPut. C-FOS expression in the vCaud was significantly correlated with the mCaud, and c-FOS expression in the primary motor cortex showed a significant positive correlation only with that of the somatosensory cortex. However, due to the nature of this analysis (all possible correlations were tested), the possibility of type II error is increased; therefore these results should be considered preliminary. In the case of estrous rabbits, we did not have data on c-FOS expression in the prefrontal cortex, and so we were unable to test for correlations with these regions.

3.4. Correlations between regional c-FOS expression and behavioral measures

Finally, we carried out an exploratory analysis of correlations between c-FOS expression in the striatal, prefrontal, motor and somatosensory regions, and the following behavioral parameters of repetitive straw carrying (Hoffman and Rueda-Morales, 2009; 2012) [3,4]: (a) latency to interact with straw; (b) latency to enter the nest box while carrying straw; (c) latency to complete the first straw carrying cycle; (d) mean time spent inside the nest box per cycle; (e) mean time spent outside the nest box per cycle; (f) mean cycle duration; (g) range of time spent inside the nest box per cycle across all cycles (i.e., the longest time spent inside the box minus the least time spent inside the box; this term reflects variability between cycles with respect to this measure); (h) range of time spent outside the nest box per cycle across all cycles (i.e., the longest time spent outside the box minus the least time spent outside the box; this term reflects variability between cycles with respect to this measure); and (i) range of cycle duration across all cycles (the longest cycle duration minus the shortest cycle duration; this term

reflects variability in cycle duration). Of all of these behavioral measures, we found the following significant positive correlations of regional c-FOS expression with behavior: (1) vCaud and range of time spent inside the nest box per cycle ($r = 0.82$; $p = 0.02$); (2) ACC and range of time spent inside the nest box per cycle ($r = 0.79$; $p = 0.04$); (3) IL and range of time spent inside the nest box per cycle ($r = 0.93$, $p = 0.003$); IL and mean time spent inside the nest box per cycle ($r = 0.78$; $p = 0.04$). Additionally, the following significant negative correlations were found: piriform cortex and mean time spent outside per cycle ($r = -0.86$; $p = 0.01$); piriform cortex and range of time spent outside per cycle ($r = -0.86$; $p = 0.01$); piriform cortex and range of cycle duration ($r = -0.82$; $p = 0.02$). These results should be considered preliminary, due to the exploratory nature of the analysis and the increased possibility for type II error.

4. Discussion

In the present study, we found that repetitive straw-carrying behavior in pregnant rabbits was associated with increased c-FOS expression in specific striatal regions (dPut, vCaud), as well as in the motor and somatosensory cortices, compared to estrous rabbits that were able to interact with straw, but did not collect and carry it. Moreover, a correlational analysis of c-FOS expression in PREG + STRAW rabbits revealed coactivations among regions that are known from independent studies to participate in cortico-basal ganglia thalamocortical circuits. Specifically, dorsal striatal and motor control regions (dPut, dCaud, and primary motor cortex, as well as premotor and prelimbic cortices, showed correlated c-FOS expression. Additionally, c-FOS expression in “limbic-associated” regions (i.e., vCaud, vPut, IL, and ACC) was positively correlated with behavioral measures indicative of inter-cycle variability (the range of time spent inside the nest box per cycle, range of cycle duration). By contrast, c-FOS expression in the piriform cortex was negatively correlated with behavioral measures indicative of inter-cycle variability (range of time spent outside per cycle, range of cycle duration). A distinct pattern of regional c-FOS correlations was observed in ESTROUS + STRAW animals.

4.1. Regional c-FOS expression

4.1.1. Regional c-FOS associated with repetitive straw carrying

The dPut, vCaud, primary motor cortex, and somatosensory cortex were regions where increased c-FOS expression was selectively associated with repetitive straw carrying. With respect to the dPut, we propose that this area is functionally homologous to the dorsolateral striatum in the rat, and to the dorsal or dorsocaudal putamen in the human and non-human primate. This proposal is based in part on our observation that c-FOS expression in the dPut was significantly correlated with that in the dCaud and primary motor cortex, consistent with a close functional relationship among these areas (see section 4.2). Activity in this striatal area has been associated with inflexible behavior, habit learning and expression, and stimulus-response type behaviors [20,21], as well as with the display of grooming behavior in the rodent (a species-specific, sequenced behavior; [22]). Our finding that repetitive straw carrying in the rabbit was associated with activity in

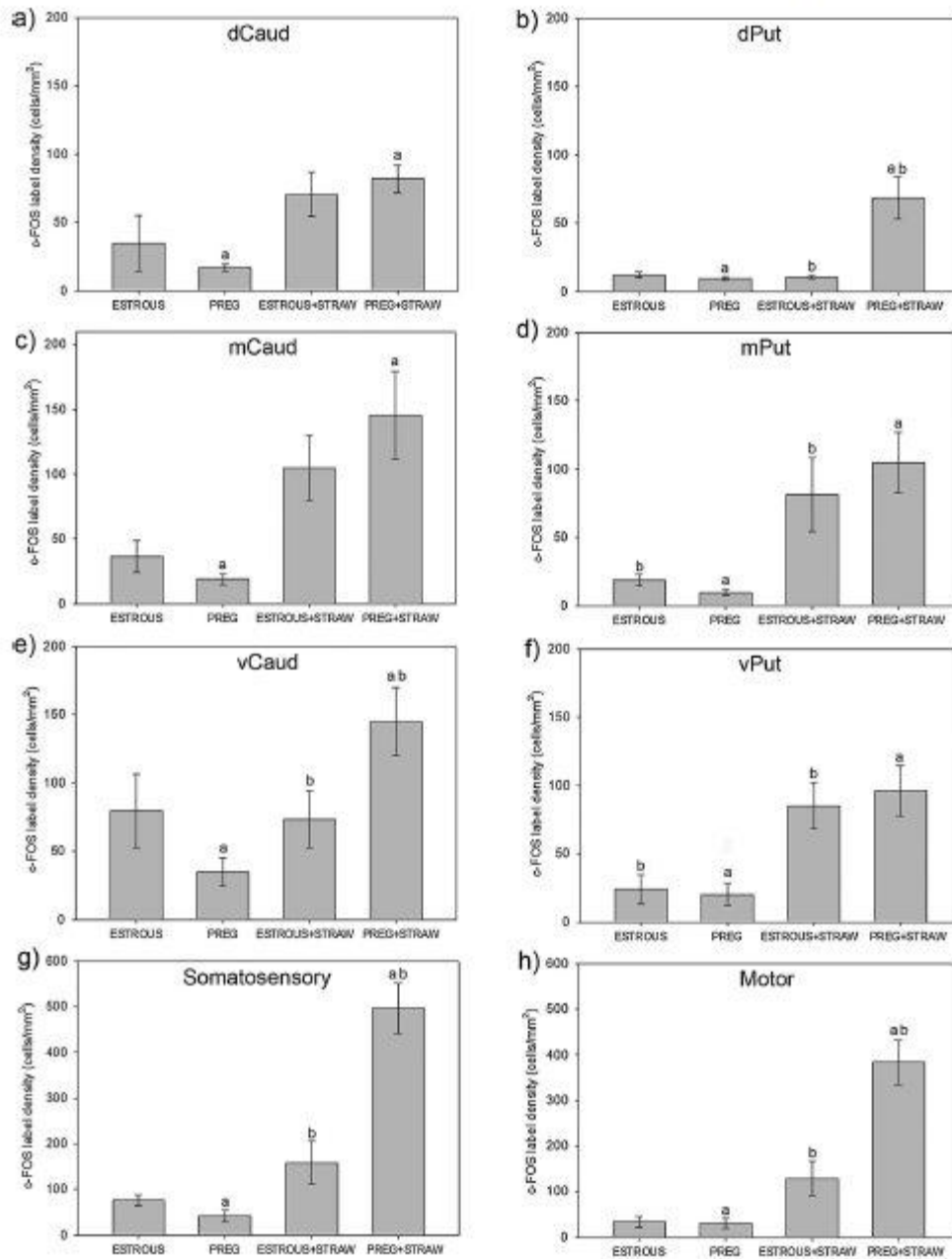


Fig. 3. c-FOS expression in the striatum and somatosensory and motor cortices of PREG + STRAW (n = 7), PREG (n = 7), ESTROUS + STRAW (n = 6), and ESTROUS (n = 6) groups. Bar height denotes mean, whiskers denote standard error. Statistically significant pairwise comparisons ($p < 0.05$; Holm-Sidak) are marked with the same letter.

this striatal region corresponds well to the notion of a dorsoventral functional gradient within the striatum, with dorsal striatum mediating habit and stimulus-response behavior and ventral striatum mediating goal-directed behavior [20,21,23].

Increased c-FOS expression in the vCaud was also associated with repetitive straw carrying behavior. We propose that this region is

functionally homologous to the vCaud in human and non-human primate, and the ventral striatum in the rodent, based in part on the observation that c-FOS expression in the vCaud was significantly correlated with several behavioral measures related to a more flexible, or variable, pattern of straw carrying behavior. In contrast to dorsal striatal regions, the ventral striatum (including the vCaud and nucleus

Table 2

c-FOS labeling densities (least square means, with standard error in parentheses, followed by CI 95 in brackets) corresponding to main effects of reproductive state and straw, and planned pairwise comparisons (Holms – Sidak), the latter carried out in cases where interaction term was significant. In cases where the interaction term was not significant, significant main effects (pregnant vs. estrous; straw vs. no straw) are denoted by same superscript lettering. For planned pairwise comparisons, same superscript letters represent statistically significant comparisons. SS denotes somatosensory cortex.

		dCaud	mCaud	vCaud	dPut	mPut	vPut	Motor	SS	
MAIN EFFECTS	Pregnant	49 (9) [27-72]	82 (15) [30-134]	90 (15) [47-133]	39 (6) [16-67]	57 (13) [22-100]	58 (10) [29-94]	269 (26) [120-417]	208 (22) [90-325]	
	Estrous	53 (10) [23-82]	71 (17) [34-108]	77 (16) [41-113]	11 (6) [9-14]	50 (13) [15-85]	55 (11) [26-84]	117 (28) [59-175]	81 (24) [29-134]	
	Straw	76 ^a (9.3) [57-96]	125 ^a (16) [80-174]	109 (15) [71-153]	40 (6) [17-67]	95 ^a (13) [57-131]	91 ^a (10) [65-118]	327 (27) [209-471]	257 (23) [163-370]	
	No Straw	26 ^a (9) [5-46]	28 ^a (16) [14-41]	57 (15) [24-87]	11 (6) [8-14]	14 ^a (13) [8-20]	22 ^a (11) [8-37]	59 (27) [36-79]	33 (23) [16-49]	
PAIRWISE	Pregnant	Straw	82 (13) [57-106]	146 (22) [63-229]	145 ^{ab} (21) [84-206]	69 ^{ab} (8) (17) [31-106]	105 (14) [51-159]	96 (14) [51-141]	496 ^{ab} (37) [360-631]	384 ^{ab} (31) [265-503]
		No Straw	17 (13) [11-23]	19 (22) [9-29]	35 ^a (21) [9-60]	10 ^a (9) [6-13]	10 (18) [4-16]	20 (15) [-0.9-41]	41 ^a (37) [10-72]	31 ^a (3) [4-58]
	Estrous	Straw	71 (14) [29-112]	105 (23) [40-170]	74 ^a (22) [20-127]	11 ^a (9) [8-13]	81 (18) [12-150]	85 (15) [42-129]	158 ^a (40) [37-279]	129 ^a (34) [31-227]
		No Straw	35 (14) [17-87]	37 (23) [6-67]	80 (22) [10-149]	12 (9) [7-18]	19 (18) [7-33]	24 (15) [-4-52]	76 (40) [44-108]	34 (34) [4-64]

Table 3

Striatal-prefrontal c-FOS coactivations, of PREG + STRAW animals (n = 7). Spearman correlation coefficients are shown, along with their significance levels in parentheses.

	AOC	OFC	PI	IL	Premotor	Piriform
dPut	0.64 (0.12)	0.39 (0.38)	0.72 (0.07)	0.46 (0.29)	0.76 (0.049)	-0.25 (0.59)
vCaud	0.64 (0.12)	0.36 (0.43)	0.49 (0.27)	0.75 (0.052)	0.569 (0.19)	0.11 (0.82)
Motor	0.61 (0.15)	0.57 (0.18)	0.85 (0.016)	0.36 (0.43)	0.90 (0.006)	-0.14 (0.76)
Somatosensory	0.46 (0.29)	0.034 (0.94)	0.19 (0.67)	0.10 (0.82)	0.37 (0.40)	-0.36 (0.94)

accumbens) has been associated with reward processing and the expression of flexible, goal-directed behavior [20,21,23]. Increased activation of this region during repetitive straw carrying is consistent with functional models that propose that neural systems underlying habit and flexible goal-directed behaviors act in parallel to modulate the ongoing expression of instrumental behavior, with the balance shifting between behavioral flexibility (ventral striatum; goal-directed) and inflexibility (dorsal striatum; habit), according to existing contingencies [24–26].

Table 4

Intra-striatal and striatal-cortical c-FOS coactivations, of PREG + STRAW animals (n = 7). Spearman correlation coefficients are shown, along with their significance levels in parentheses. SS: somatosensory cortex.

	dCaud	mCaud	vCaud	dPut	mPut	vPut	Motor	SS
dPut	0.96 (< 0.001)	0.39 (0.38)	0.29 (0.54)	-	0.43 (0.34)	0.57 (0.2)	0.86 (0.014)	0.53 (0.22)
vCaud	0.18 (0.70)	0.11 (0.82)	-	0.29 (0.54)	0.36 (0.43)	0.29 (0.54)	0.43 (0.34)	-0.14 (0.76)
Motor	0.89 (0.007)	0.71 (0.071)	0.44 (0.34)	0.82 (0.023)	0.46 (0.29)	0.25 (0.59)	-	0.32 (0.48)
Somatosensory	0.61 (0.15)	0.07 (0.88)	-0.14 (0.76)	0.64 (0.12)	0.29 (0.54)	0.54 (0.22)	0.32 (0.48)	-

Table 5

Intra-striatal and striatal-cortical c-FOS coactivations, of ESTROUS + STRAW animals (n = 6). Spearman correlation coefficients are shown, along with their significance levels in parentheses. SS: somatosensory cortex.

	mCaud	vCaud	dPut	mPut	vPut	SS	Motor
dCaud	0.75 (0.08)	0.54 (0.27)	-0.87 (0.02)	0.90 (0.02)	0.99 (< 0.001)	0.03 (0.96)	0.14 (0.79)
mCaud	-	0.84 (0.04)	-0.61 (0.20)	0.66 (0.15)	0.77 (0.07)	-0.06 (0.91)	-0.12 (0.83)
vCaud	-	-	-0.54 (0.27)	0.64 (0.17)	0.61 (0.20)	0.26 (0.62)	-0.03 (0.33)
dPut	-	-	-	-0.75 (0.08)	-0.84 (0.04)	-0.26 (0.62)	-0.31 (0.54)
mPut	-	-	-	-	0.96 (0.003)	0.20 (0.70)	0.67 (0.15)
vPut	-	-	-	-	-	0.058 (0.91)	0.12 (0.82)
SS	-	-	-	-	-	-	0.89 (0.02)

In addition to specific striatal regions, we found that c-FOS expression in the primary motor and somatosensory cortices was associated with repetitive straw carrying. The latter activation pattern might be related to increased processing of somatosensory stimuli –

particularly from the mouth region [15] – that could be associated with identifying straw as a nest building material and gathering a certain quantity of it in the mouth, before carrying it to the nest box. Likewise, increased activation in the primary motor cortex might reflect increased motor output during repetitive straw carrying behavior.

4.1.2. Regional c-FOS expression associated with non-specific (non-straw carrying) interactions with straw

Our analyses also identified striatal regions that showed an increase in c-FOS expression in response to interacting with straw, but not collecting or carrying it. Thus, in the case of non-pregnant rabbits, straw that was placed into the home cage was investigated visually, by olfaction, and by nibbling on it. In most cases, the rabbit spent an extended period of time (minutes) nibbling on and eating the straw, but collecting straw in the mouth and carrying it into the nest box was never observed. This behavior was associated with increased c-Fos activity in the vPut, mPut, dCaud, and mCaud.

4.2. Coactivation of brain regions as determined by c-FOS expression

Neuroanatomical studies have shown that corticostriatal projections in the rabbit are topographically organized in a manner that is generally similar to the human and non-human primate (Haber 2014; Morris et al. 2016; Di Martino et al., 2008) [13,23,27,28,29]. Thus, in the rabbit, the ventromedial prefrontal cortex (BA 25; infralimbic cortex) projects to the ventral striatum (vCaud and nucleus accumbens), while the prelimbic area (BA 32) projects to the dCaud, and the ACC (BA 24) region projects to the mCaud, mPut, and vPut. The orbitofrontal region, on the other hand, projects to the rostral vPut. Premotor, primary motor, and somatosensory cortices project to more dorsal and lateral striatal regions, including the dCaud and dPut [13,18].

Functional connectivity studies in humans indicate a similar organization of corticostriatal projections [23,27,28,29]. Thus, medial prefrontal regions (e.g., BA 25, 32 and 24, medial orbitofrontal cortex) are functionally connected to the ventral striatum (nucleus accumbens and vCaud), while lateral orbitofrontal cortex showed functional connectivity with the vCaud and vPut [28]. Anterior premotor cortex (BA8) shows functional connectivity with the dCaud, while supplementary motor area, premotor cortex (BA6), and primary motor cortex (BA4) are functionally connected to dCaud and dPut [27,28]. Corticostriatal projections in the non-human primate likewise show a similar topography [30].

The present analyses revealed that repetitive straw carrying behavior was associated with a pattern of correlated c-FOS expression that included dPut, dCaud, primary motor, premotor and prelimbic cortices. Although connectivity patterns cannot be inferred based on this analysis, this coactivation pattern is consistent with known functional and connectivity relationships among these areas (discussed above).

When correlations between c-FOS expression and behavioral variables were explored, we found that c-FOS expression in the vCaud, vPut, II, and ACC was significantly correlated with measures that would indicate a more flexible expression of repetitive straw carrying, in which the time spent inside the nest box and/or cycle duration varied more widely between cycles. This coactivation pattern and its relationship with behavioral measures are also consistent with known functional and connectivity relationships among these areas, as well as their association with flexible, goal-directed behavior. Overall, these regional coactivation patterns coincide with those that have consistently been associated with obsessive-compulsive symptoms, habit and stimulus-response behaviors, and adaptive maternal behavior, as discussed in the following sections.

Interestingly, the dCaud was the only striatal region that showed coactivation with regions (dPut, motor cortex) associated with repetitive straw carrying (an inflexible, stimulus-response type interaction with straw of PREG + STRAW group) as well as regions (mCaud, mPut, vPut) associated with interacting with straw, but not collecting

and carrying it (in ESTROUS + STRAW group). This observation suggests that the dCaud could be a region that “gates” the expression of flexible and inflexible behavioral responses. In this context, it is compelling that the dCaud was positively correlated with the dPut during repetitive straw carrying in pregnant rabbits, but negatively correlated with this same region during non-straw carrying interactions with straw displayed by estrous rabbits (see Tables 4 and 5). In this latter circumstance, dCaud was positively correlated with the vPut and mPut. It is notable that, in the rabbit, this region of the caudate nucleus (dCaud) receives input primarily from the medial-most regions of the neocortex, which would include cingulate, premotor, and primary motor cortices [13].

4.3. Relationship to maternal behavior, habit, and OCD

In the pregnant rabbit, the motivational salience of straw increases after mid-pregnancy, when it changes from a neutral or perhaps mildly interesting food material to a maternally-relevant stimulus (nest building material). The present study shows that the pattern of c-FOS expression associated with straw carrying behavior resembles the pattern of activation of brain regions associated with maternal behavior and responsiveness to maternally-relevant stimuli. Thus, the present results, as well as those from a previous study [5] parallel the results of studies of human mothers showing that the prefrontal cortex and striatum participate importantly in maternal responsiveness to infant-associated stimuli [31–33]. Specifically, a baby's cry elicits patterns of brain activity that include the anterior cingulate and orbitofrontal cortices (associated with stimulus valence and motivational salience), as well as areas associated with behavioral planning and execution, such as the supplementary motor area and dorsal striatum [34–36]. Although such parental responses are adaptive and “normal”, the reported increase in non-clinical and clinical obsessive-compulsive symptoms during the postpartum period (in both the mother and her male partner) suggests that commonalities exist between the neural circuitry that underlies these adaptive responses and that which underlies obsessive-compulsive symptoms [37].

The pattern of c-FOS expression associated with straw carrying also overlaps with brain regions that have been implicated in the expression of goal directed and habitual behavior, which are suggested to comprise segregated, but interacting neural systems that operate in parallel to guide instrumental behavior [38,39]. The striatum is organized according to a functional gradient such that the ventral striatum is associated with motivation, dorsomedial with goal-directed action, and dorsolateral with habitual and stimulus-response behavior [40]. Thus, activation of premotor and primary motor cortices, along with the dorsolateral striatum (in the case of rodents) and the dorsal caudate and putamen (in the case of primate/human) has been associated with the expression of habit behavior, while activation of the orbitofrontal cortex, ventromedial prefrontal cortex and ventral caudate have been associated with flexible goal-directed behavior [26–28,41–43]. A number of studies have implicated cortical motor areas and dorsolateral striatum in the expression of movement sequences, initiated and terminated in a specific manner and comprising individual behavioral components that can be modified based on a learning process that involves the activation of dorsal putamen [41,44–46].

Consistent with our proposal that straw carrying behavior can serve as a useful model for understanding the neurobiology of compulsions in OCD, the pattern of neuronal activity associated with straw carrying includes many brain regions that have likewise been implicated in obsessive-compulsive symptoms. Studies of resting state activity in OCD patients show increased functional connectivity among brain regions that comprise corticostriatal thalamocortical circuits, compared to healthy controls [47]. OCD symptom severity was correlated with increased connectivity between the OFC and putamen [48], and the ventral striatum and anterior cingulate cortex [49]. In a symptom provocation study [26], OCD patients showed increased effective

connectivity between ventral striatum and ventromedial prefrontal cortex, which were deactivated in response to symptom provocation. Other symptom provocation studies have shown increased activation of the OFC, caudate, and putamen in OCD patients exposed to symptom-provoking stimuli (Simon et al., 2014; Baiou et al., 2013; Rotge et al., 2008; Mataix-Cols et al., 2004) [50–52]. Some studies suggest that OCD involves an imbalance in the activities of neural systems that regulate the expression of habitual versus flexible, goal-directed behavior, which favors the expression of habit behavior [24,26,42].

Although the core symptoms of OCD are obsessions (intrusive thoughts) and compulsions (repetitive, often stereotyped, behavior), this disorder is quite heterogeneous with respect to the content of the obsessions and compulsions, as well as their underlying subjective motivation. Factor analysis has consistently supported 4 or 5 symptom dimensions, based on the content of the patients' obsessions and compulsions. Thus, symptom dimensions comprise: (1) contamination/cleaning (contamination obsessions and cleaning compulsions); (2) doubt (obsessions related to harm or safety, and compulsions such as checking); (3) sexual, aggressive, or religious obsessions; (4) superstitious obsessions and ritualized compulsions; (5) hoarding obsessions and compulsions related to symmetry [8]. An alternative model proposes two dimensions, based on the patient's motivation to perform the compulsions: "harm avoidance" and "incompleteness" dimensions [53–55].

A few imaging studies have been carried out in order to determine whether distinct symptom dimensions are associated with the activation of different brain regions. In one such study [52], OCD patients were grouped as "washers" (contamination/cleaning dimension), "checkers" (checking and aggressive symptoms), or "hoarders" (primarily hoarding symptoms). When these groups were presented with symptom-provoking stimuli in the form of photographs, all showed increased fMRI activation in the OFC and visual processing areas. However, washers showed increased activity in the right caudate and ventromedial prefrontal regions, while checkers showed increased activation in the putamen, globus pallidus, thalamus, and dorsal cortical areas. In a study that specifically compared fMRI activations in OCD patients with and without hoarding symptoms in a symptom provocation paradigm [56], hoarders showed significantly increased activations within the ventromedial prefrontal cortex (VMPPFC; BA 11/10), compared to OCD non-hoarders and healthy controls. Considering all OCD subjects, subjective anxiety provoked by hoarding-related stimuli was positively correlated with a number of additional areas, including hippocampus, amygdala, ventral striatum, and sensorimotor cortex. By contrast, negative correlations with subjective anxiety were observed for basal ganglia regions (caudate and putamen), anterior cingulate gyrus (BA 24) and dorsolateral/medial prefrontal regions (BA 32/8/10/46).

The present results show that repetitive straw carrying behavior is selectively associated with c-FOS label in the dPut, vCaud, primary motor, and somatosensory cortices, along with a pattern of regional coactivation that includes prelimbic, premotor, primary motor cortex, somatosensory cortex dCaud, and dPut. Additionally, a previous study showed activation of the ACC, OFC, and piriform cortices associated with straw carrying behavior [5]. Thus, considering washing, checking and hoarding dimensions of OCD, the pattern of c-FOS expression associated with repetitive straw carrying is most similar to increases in BOLD fMRI signal in individuals with checking compulsions. This proposal is further supported by the characteristics of straw carrying behavior, which involves monitoring the status of nest completion and external stimulus-based negative feedback mechanisms that inhibit straw carrying once the nest is finished [3,4]. Indeed, a behavior resembling "checking" is displayed by straw carrying rabbits in response to an experimental manipulation where a completed nest is placed inside the nest box before the rabbit is able to collect and carry straw [3].

The present results are consistent with models that propose that obsessive-compulsive symptoms are pathological expressions of

normal, adaptive cognitive and behavioral responses. Since maternal nest building motivation is activated by specific hormonal cues (estrogen and progesterone), this behavioral model might be especially useful to define neural mechanisms by which reproductive state and gonadal hormones provoke or exacerbate certain obsessive compulsive symptoms, as in the case of obsessive compulsive symptoms associated with pregnancy and the premenstruum [57–59].

Acknowledgements

This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México (grant #129381, KLH), and a doctoral fellowship to HCR (CONACYT, # 266917).

References

- A. Apex, T.J. Fallon Jr., R.A. King, G. Batzoni, A.H. Zohar, M. Binder, A. Weizman, J.F. Leckman, D.J. Pauls, S. Kron, D.J. Cohen, Obsessive-compulsive characteristics: from symptoms to syndrome, *J. Am. Acad. Child Adolesc. Psychiatry* 35 (1996) 907–912.
- J. Van Os, M. Hanssen, R.V. Bijl, A. Ravelli, Strauss (1969) revisited: a psychosis continuum in the general population? *Schiz. Res.* 45 (2000) 11–20.
- K.L. Hoffman, R.I. Rueda-Morales, Toward an understanding of the neurobiology of "just right" perceptions: nest building in the female rabbit as a possible model for compulsive behavior and the perception of task completion, *Behav. Brain Res.* 204 (2009) 182–191.
- K.L. Hoffman, R.I. Rueda-Morales, D1 and D2 dopamine receptor antagonists decrease behavioral bout duration, without altering the bout's repeated behavioral components, in a naturalistic model of repetitive and compulsive behavior, *Behav. Brain Res.* 230 (2012) 1–10.
- H. Cano-Ramirez, K.L. Hoffman, Activation of the orbitofrontal and anterior cingulate cortices during the expression of a naturalistic compulsive-like behavior in the rabbit, *Behav. Brain Res.* 320 (2017) 67–74.
- K.L. Hoffman, *Modeling Neuropsychiatric Disorders in Laboratory Animals*, Woodhead Publishing, Elsevier, Amsterdam, 2015.
- D. Mataix-Cols, M.C. Rosario-Campos, J.F. Leckman, A multidimensional model of obsessive-compulsive disorder, *Am. J. Psychiatry* 162 (2005) 228–238.
- H. Kanberg, K.L. Delucchi, S.E. Stewart, C. Lochner, D.A. Denys, D.E. Stack, J.M. Andreas, J.E. Grant, S.W. Kim, K.A. Williams, J.A. den Boer, A.J. van Balkom, J.H. Smit, P. van Oppen, A. Polman, M.A. Jenike, D.J. Stein, C.A. Mathews, D.C. Guth, Symptom dimensions in OCD: item-level factor analysis and testability estimates, *Behav. Genet.* 40 (2010) 505–517.
- K. Myers, W. Poole, A study of the biology of the wild rabbit, *Oryzologus cuniculus*, in confined populations: the effect of season and population increase of behavior, *CSRO Wildl. Res.* 6 (1961) 1–41.
- G. González-Mariscal, V. Díaz-Sánchez, A.I. Melo, C. Beyer, J. Rosenblatt, Maternal behavior in New Zealand White rabbits: quantification of somatic events, motor patterns and steroid plasma levels, *Physiol. Behav.* 55 (1994) 1081–1089.
- G. González-Mariscal, A.I. Melo, P. Lindner, J. Rosenblatt, Estradiol, progesterone and prolactin regulate maternal nest-building in rabbits, *J. Neuroendocrinol.* 8 (1996) 901–907.
- G. González-Mariscal, Neuroendocrinology of maternal behavior in the rabbit, *Horm. Behav.* 40 (2001) (2001) 125–132.
- J.B. Carman, W.M. Cowan, T.P.S. Powell, The organization of cortico-estrate connections in the rabbit, *Brain* 86 (1963) 526–560.
- K. Fleischhauer, K. Zillers, A. Schleicher, A revised cytoarchitectonic map of the neocortex of the rabbit (*Oryzologus cuniculus*), *Anat. Embryol.* 161 (1980) 121–131.
- H.J. Gould 3rd, Body surface maps in the somatosensory cortex of rabbit, *J. Comp. Neurol.* 243 (1985) (1985) 207–233.
- E. Muñoz-Moreno, A. Arias-Plaza, D. Bataille, G. Sosa, M. Iliá, A. Prats-Gallina, E. Elanich, E. Gratacos, A magnetic resonance image-based atlas of the rabbit brain for automatic parcellation, *PLoS One* 8 (2013) e67418.
- J.W. Szeik, G.Y. Wen, H.M. Wisniewski, *Atlas of the Rabbit Brain and Spinal Cord*, Karger, Switzerland, 1986.
- S.I. Buchanan, R.H. Thompson, R.L. Maxwell, D.A. Powell, Efferent connections of the medial prefrontal cortex in the rabbit, *Exp. Brain Res.* 100 (1994) 469–483.
- F.N. Van Hasselt, I. De Visser, J.M. Tieskens, S. Cornelisse, A.M. Baars, M. Lavrijen, H.H. Krugers, R. van den Bos, M. Joëls, Individual variations in maternal care early in life correlate with later life decision-making and c-Fos expression in prefrontal subregions of rats, *PLoS One* 7 (2012) 1–11.
- B.W. Balleine, J.P. O'Doherty, Human and rodent homologies in action control: corticostriatal determinants of goal-directed and habitual action, *Neuropsychopharmacology* 35 (2010) 48–69.
- A.J. Gable, R.J. McDonald, Context, emotion, and the strategic pursuit of goals: interactions among multiple brain systems controlling motivated behavior, *Front. Behav. Neurosci.* 6 (2012) 50.
- J.W. Aldridge, K.C. Berridge, Coding of serial order by neostriatal neurons: a "natural action" approach to movement sequence, *J. Neurosci.* 18 (1998) 2777–2787.
- S.N. Haber, Corticostriatal circuitry, *Dialog. Clin. Neurosci.* 18 (2016) 7–21.

- [24] C.M. Gillan, T.W. Robbins, Goal-directed learning and obsessive compulsive disorder, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 369 (2014) 20130475.
- [25] C.M. Gillan, T.W. Robbins, R.J. Sahakian, O.A. van den Heuvel, G. van Wigen, The role of habit in compulsivity, *Eur. Neuropsychopharmacol.* 26 (2016) 828–840.
- [26] P. Banca, V. Voon, M.D. Vestergaard, G. Phillips, I. Almeida, F. Poehlke, J. Rebecq, M. Carado-Bracco, Imbalance in habitual versus goal directed neural systems during symptom provocation in obsessive-compulsive disorder, *Brain* 138 (2015) 798–811.
- [27] A. Di Martino, A. Schems, D.S. Margulies, A.M. Kelly, L.Q. Uddin, Z. Shihzad, B. Birmah, J.R. Walters, F.X. Castellanos, M.P. Milham, Functional connectivity of human striatum: a resting state fMRI study, *Cereb. Cortex* 18 (2008) 2735–2747.
- [28] L.S. Morán, P. Kunda, N. Dowell, D.I. Mecklinger, P. Faver, M.A. Irvine, T.W. Robbins, N. Dave, E.T. Bullmore, N.A. Harrison, V. Voon, Fronto-striatal organization: defining functional and microstructural substrates of behavioral flexibility, *Cortex* 74 (2016) 118–133.
- [29] S.N. Haber, Parallel and integrative processing through the basal ganglia reward circuit: lessons from addiction, *Biol. Psychiatry* 64 (2008) 173–174.
- [30] S.N. Haber, R. Knutson, The reward circuit: linking pd mice and human imaging, *Neuropsychopharmacology* 35 (2010) 4–26.
- [31] M. Noriuchi, Y. Kikuchi, A. Senoo, The functional neuroanatomy of maternal love: mother's response to infant's attachment behaviors, *Biol. Psychiatry* 63 (2008) 415–423.
- [32] S. Nishitani, S. Kawamoto, A. Takahira, T. Miyamura, K. Shinohara, Maternal prefrontal cortex activation by newborn infant odors, *Chem. Senses* 39 (2014) 195–202.
- [33] J.E. Swain, S.S. Ho, K.L. Rosenblum, D. Mowlem, C.J. Dayton, M. Munik, Parent-child interaction decreases stress and increases maternal brain activity and connectivity during own baby-cry: an exploratory study, *Dev. Psychopathol.* 29 (2017) 535–553.
- [34] I. Strathman, J. Li, P. Fougy, P. Montague, What's in a smile? Maternal brain responses to infant facial cues, *Pediatrics* 122 (2008) 40–51.
- [35] M.H. Bornstein, D.L. Putnick, P. Rigo, G. Eposito, J.F. Swain, J.T.D. Sawalky, X. Su, X. Du, K. Zhang, L.R. Coie, N. De Plamp, P. Vermut, Neurobiology of culturally common maternal responses to infant cry, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114 (2017) E0465–E0473.
- [36] S. Kim, U. Jyengar, L.C. Mayes, M.N. Potenza, H.J.V. Rutherford, I. Strathman, Mothers with substance addictions show reduced reward responses when viewing their own infant's face, *Hum. Brain Mapp.* 38 (2017) 5421–5439.
- [37] D.L. Feygina, J.E. Swain, J.F. Leckman, The normalcy of neurotic evolutionary origins of obsessive-compulsive disorder and related behaviors, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 30 (2006) 854–864.
- [38] H.H. Yin, B.J. Knowlton, R.W. Balleine, Inactivation of dorsolateral striatum enhances sensitivity to changes in the action-outcome contingency in instrumental conditioning, *Behav. Brain Res.* 166 (2006) 189–196.
- [39] A. Zapata, V.L. Minney, T.S. Shippenberg, Shift from goal-directed to habitual cocaine seeking after prolonged experience in rats, *J. Neurosci.* 30 (2010) 15457–15463.
- [40] M. Ito, K. Doya, Distinct neural representation in the dorsolateral, dorsomedial, and ventral parts of the striatum during fixed- and free-choice tasks, *J. Neurosci.* 35 (2015) 3499–3514.
- [41] C.M. Gremel, R.M. Costa, Orbitofrontal and striatal circuits dynamically encode the shift between goal-directed and habitual actions, *Nat. Commun.* 4 (2013) 2264.
- [42] S. de Wit, P. Watson, H.A. Hasty, M.X. Cohen, J. van de Vijve, K.R. Ridderinkhof, Corticostriatal connectivity underlies individual differences in the balance between habitual and goal-directed action control, *J. Neurosci.* 32 (2012) 12066–12075.
- [43] A. Burton, K. Nakamura, M.R. Roach, From ventral-medial to dorsal-lateral striatum: neural correlates of reward-guided decision-making, *Neurobiol. Learn. Mem.* 117 (2015) 51–59.
- [44] H.C. Cromwell, K.C. Berridge, Implementation of action sequences by a substriatal site: a lesion-mapping study of grooming syntax, *J. Neurosci.* 16 (1996) 3444–3458.
- [45] E. Tricomi, B.W. Balleine, J.P. O'Doherty, A specific role for posterior dorsolateral striatum in human habit learning, *Eur. J. Neurosci.* (2009) 2225–2232.
- [46] X. Jin, R.M. Costa, Start/stop signals emerge in nigrostriatal circuits during sequence learning, *Nature* 466 (2010) 457–462.
- [47] J.M. Hou, M. Zhao, W. Zhang, L.H. Song, W.J. Wu, J. Wang, D.Q. Zhou, B. Xia, M. He, J.W. Guo, W. Qu, H.T. Li, Resting state functional connectivity abnormalities in patients with obsessive-compulsive disorder and their healthy first-degree relatives, *J. Psychiatry Neurosci.* 39 (2014) 304–311.
- [48] J.C. Beucke, J. Sequeira, T. Talakdar, C. Lammann, K. Zechenderlein, T. Endrass, C. Kaufman, N. Kathman, Abnormally high degree connectivity of the orbitofrontal cortex in obsessive-compulsive disorder, *JAMA Psychiatry* 70 (2013) 619–629.
- [49] A. Anticicovic, S. Hu, S. Zhang, A. Savic, E. Billingsley, S. Waylinck, G. Repas, M.W. Cole, S. Bednarski, J.H. Krystal, M.H. Bloch, C.S. Li, C. Pincus, Global resting-state fMRI analysis identifies frontal cortex, striatal, and cerebellar dysconnectivity in obsessive-compulsive disorder, *Biol. Psychiatry* 75 (2014) 595–605.
- [50] J. Roxe, D. Gushi, B. Dilharreguy, E. Cuny, J. Tignol, B. Rouleau, M. Allard, P. Burbaud, B. Aouizerate, Provocation of obsessive-compulsive symptoms: a quantitative voxel-based meta-analysis of functional neuroimaging studies, *J. Psychiatry Neurosci.* 33 (2008) 405–412.
- [51] A. Bakouf, J. Pilgramm, C.J. Merz, B. Walter, D. Vaitl, R. Stark, Neural response in obsessive-compulsive walkers depends on individual fit of triggers, *Front. Hum. Neurosci.* 7 (2013) 143.
- [52] D. Mataix-Cols, S. Wooderson, N. Lawrence, M.J. Brammer, A. Spekreijjs, M.L. Phillips, Distinct correlates of washing, checking, and hoarding symptom dimensions in obsessive-compulsive disorder, *Arch. Gen. Psychiatry* 61 (2004) 564–576.
- [53] L.J. Summerfeldt, Understanding and treating incompleteness in obsessive-compulsive disorder, *J. Clin. Psychol.* 60 (2004) 1155–1168.
- [54] W. Föcker, S. Gönner, Incompleteness and harm avoidance in OCD symptom dimensions, *Behav. Res. Ther.* 46 (2008) 895–904.
- [55] A.S. Plautz, M.E. Golem, Moving beyond an exclusive focus on harm avoidance in obsessive-compulsive disorder: behavioral validation for the separability of harm avoidance and incompleteness, *Behav. Ther.* 40 (2009) 251–259.
- [56] S.K. Au, D. Mataix-Cols, N.S. Lawrence, S. Wooderson, V. Gianpietro, A. Spekreijjs, M.J. Brammer, M.L. Phillips, To discard or not to discard: the neural basis of hoarding symptoms in obsessive-compulsive disorder, *Mol. Psychiatry* 14 (2009) 318–331.
- [57] K.E. Williams, L.M. Koran, Obsessive-compulsive disorder in pregnancy, the postpartum, and the perimenstruum, *J. Clin. Psychiatry* 58 (1997) 330–334.
- [58] J. Labad, J.M. Mendón, P. Alonso, C. Segallas, S. Jandrea, J. Vallejo, Female reproductive cycle and obsessive-compulsive disorder, *J. Clin. Psychiatry* 66 (2005) 428–435.
- [59] V. Guglielmi, N.C. Valink, D. Denys, Y. Wang, J.F. Samuels, G. Nestadt, Obsessive-compulsive disorder and female reproductive cycle events: results from the OCD and reproduction collaborative study, *Depress. Anxiety* 31 (2014) 979–987.