



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**Facultad de Psicología**

**Efectos de la separación materna y el aislamiento social en la  
expresión del receptor de oxitocina en ratas wistar**

**TESIS**

Que para obtener el título de

**Licenciada en Psicología**

**PRESENTA**

Yalitza Azucena Alvarado Ramírez

**DIRECTORA DE TESIS**

Mónica Méndez Díaz

**REVISOR**

Octavio César García González

**SINODALES**

Irma Yolanda del Río Portilla

Azalea Reyes Aguilar

Pilar Durán Hernández



Ciudad Universitaria, CDMX, 2022



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Esta tesis se desarrolló en el Laboratorio de Canabinoides de la Facultad de medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, con apoyo económico de PAPIIT, proyecto No. IA207416 otorgado a la Dra. Mónica Méndez Díaz.

Agradezco a PAPIIT proyecto No. IA2077416, por la beca recibida.

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca que se me otorgó como Ayudante de Investigador Nacional nivel III, otorgado al Dr. Óscar Próspero García.

**“El misterio de la vida no es un problema que hay que resolver, sino una realidad que hay que experimentar. Un proceso que no puede ser comprendido si se detiene. Debemos fluir al mismo tiempo que el proceso, unirnos a él y caminar con él.”**

Jamis-Dune, 1965

## **Agradecimientos**

A la UNAM por abrirme sus puertas a una universidad con estudios de calidad y donde conocí mucha gente maravillosa, tanto profesores como amigos.

Al Dr. Oscar Prospero García, por dejarme formar parte del laboratorio de cannabinoides, enseñarme lo que es ser un investigador crítico y que “la excelencia está en el método”.

A la Dra. Mónica Méndez Díaz, por aceptarme como su alumna, guiarme por el camino de la investigación, por apoyarme en el proceso, por los regañones para que fuera mejor, las confidencias y su amistad.

A mis sinodales Octavio César García González, Pilar Durán Hernández, Irma Yolanda del Río Portilla y Azalea Reyes Aguilar por su tiempo y sus valiosos comentarios que sirvieron para mejorar mi trabajo de tesis.

A los miembros y compañeros del laboratorio, Alline, Diana, Martín, Aline Ostos, Johana y Octavio por su amistad, sus comentarios y ayuda tanto personal como académica. Por las comidas juntos como las pizzas, el chicharrón y los panes.

A Rodolfo por su amistad, paciencia mientras me estuvo orientando y enseñando sobre las técnicas y temas y por su gran ayuda con las fotos en el microscopio confocal.

A Brenda por su amistad desde el primer momento en que llegué al laboratorio, con la que hice una conexión, por los días de música coreana y cortes de cerebro, sus tips y enseñanzas sobre las técnicas de laboratorio.

A Karina y Lore por ser mis partner labs en los años restantes, por los días de pan en el lab, de ayuda en los experimentos, de chisme, por esa compañía única en nuestro primer viaje al extranjero.

A Pao por ser mi pony amiga de cactus, esa amistad que siempre está presente, aunque no hablemos todos los días, amistades de las que se conservan y se disfrutan.

A Salma porque en Chicago del 2019 te conocí y desde ahí te has convertido en una amiga muy importante.

A mi papá por su contribución económica y educativa.

A los murinos usados en este y otros experimentos, por su aportación a la ciencia.

A Alexandra Elbakyan por abrirnos las posibilidades al conocimiento, principalmente el de la ciencia.

## **Dedicatorias**

A mi mamá que es mi ejemplo a seguir y mi gran apoyo, siempre preocupándose porque esté bien, amándome en todo momento, aunque la haga enojar o las diferencias que hemos tenido recientemente. Porque siempre hemos sido primero sus hijos antes que ella.

A mi aguacalove Pablo por todo el amor que me ha dado, por su paciencia y apoyo cuando más lo necesitaba, siempre viéndome llorar por mis frustraciones, pero alentándome a seguir adelante para formar una vida feliz y de éxito. Espero que formemos una vida juntos.

# **Efectos de la separación materna y el aislamiento social en la expresión del receptor de oxitocina en ratas wistar**

## **Resumen**

Las experiencias adversas que ocurren durante períodos críticos de desarrollo, como la vida perinatal influyen en la conducta, el desarrollo neurológico y en la función cerebral, por lo que son considerados factores de vulnerabilidad para desarrollar trastornos mentales como la depresión, la esquizofrenia y el abuso a sustancias, en la adultez. Por otra parte, la especie humana ha evolucionado de tal forma que la socialización es indispensable para la salud física y mental. En nuestro laboratorio hemos utilizado modelos que nos permiten estudiar el cuidado materno y la socialización para describir los mecanismos que subyacen esta vulnerabilidad. El objetivo principal de este trabajo fue describir el impacto que genera la separación materna en la infancia y el aislamiento social durante la adolescencia, en la expresión del receptor de oxitocina en la corteza prefrontal medial (CPFm) y el núcleo accumbens (NAc), de la rata macho adulta. Se utilizaron crías macho de 7 ratas gestantes a término que pasaron por las siguientes condiciones: no separación materna (NSM) o separación materna (SM) durante 14 días (DPN2-15) y socialización (SOC) (DPN24-60) o aislamiento social (AS) del DPN24 al DP90. Para evaluar la expresión del receptor de oxitocina, se usó la técnica de inmunofluorescencia. Se encontró que en los grupos NSM/AS y SM/AS hubo una disminución significativa en el porcentaje de inmunoreactividad, es decir, la marca fluorescente del receptor de oxitocina, en ambas áreas de interés comparados con el grupo control. Estos resultados sugieren que el AS tiene un mayor impacto sobre la expresión del OXTR que la SM en la CPFm y el NAc.

Palabras clave: Separación materna, aislamiento social, oxitocina.

## **Lista de abreviaturas**

NSM: No separación materna  
SOC: Socialización  
SM: Separación materna  
AS: Aislamiento social  
DPN: Día post natal  
SNC: Sistema nervioso central  
CPF: Corteza Prefrontal  
CPFm: Corteza Prefrontal medial  
CPFI: Corteza Prefrontal lateral  
COF: Corteza Orbitofrontal  
NAc: Núcleo accumbens  
PVN: Núcleo paraventricular  
SON: Núcleo supraóptico  
LS: Septum lateral  
AMY: Amígdala  
MeA: Amígdala medial  
ATV: Área tegmental ventral  
BO: Bulbo olfatorio  
BNST: Núcleo cama de la estría terminal  
AVP: Vasopresina  
OXT: Oxitocina  
OXTR: Receptor de oxitocina  
CB1R: Receptor de cannabinoides 1  
DA: Dopamina  
HPA: Eje hipotálamo pituitaria adrenal  
OT-DA: Oxitocinérgico-Dopaminérgico  
BDNF: Factor neurotróficos derivado del cerebro  
GC: Glucocorticoides

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico

Ca<sup>++</sup>: Calcio

K<sup>+</sup>: Potasio

Na<sup>+</sup>: Sodio

PLC: Fosfolipasa C

PIP2: Fosfolípido fosfatidinositol bifosfato

IP3: Inositol trifosfato

IP3R: Receptor de inositol trifosfato

DAG: Diacilglicerol

PKC: Proteína quinasa C

AMPc: Adenosín monofosfato cíclico

PI3K: Fosfoinositol 3-quinasa

MAPK: Proteínas quinasas activadas por mitógenos o vía de las MAP quinasas

VDCC: Canales de calcio dependientes de voltaje

PFH: Paraformaldehído

PBS: Buffer de fosfato sódico

BSA: Suero de albumina bovino

# Índice

1. Introducción.....	1
1.2 Cuidado Parental .....	2
1.3 Separación Materna .....	5
1.4 Socialización.....	8
1.5 Aislamiento Social .....	11
1.6 Sistema Oxitocinérgico .....	12
1.7 Corteza prefrontal .....	17
1.8 Núcleo Accumbens.....	19
2. Justificación.....	20
3. Planteamiento del problema.....	20
4. Pregunta de Investigación .....	20
5. Objetivos generales .....	21
5.1 Objetivos específicos .....	21
6. Hipótesis.....	21
7. Método.....	21
7.1. Sujetos.....	21
7.2 Protocolos de manipulación temprana .....	22
7.2.1 Cuidado materno y separación materna (SM):.....	22
7.2.2 Socialización y Aislamiento social: .....	23
7.3 Técnica de Inmunofluorescencia:.....	25
7.4 Diseño Experimental .....	27
7.5 Análisis Estadístico.....	28
8. Resultados .....	28
9. Discusión .....	32
10. Conclusión .....	34
11. Limitaciones.....	35
12. Propuesta.....	35
13. Referencias.....	36

## 1. Introducción

Los seres humanos somos una especie altricial, es decir, nacemos en estados inmaduros de desarrollo y necesitamos de un cuidador o cuidadores primarios que mantengan nuestra supervivencia hasta la maduración de nuestro sistema nervioso, que nos permita la supervivencia y toma de decisiones por nuestra cuenta. Asimismo, durante el transcurso de la evolución, los grupos sociales han cambiado con base a las necesidades y retos del ambiente. Estos cambios se reflejan en la estructura familiar, la cual tiene una gran influencia en la relaciones padres-hijos, y en otros componentes como los ambientes sociales (Nishi et al., 2014).

Existe la hipótesis de que el crecimiento del cerebro humano era debido a las demandas ambientales para la supervivencia, pero otra posible hipótesis es la de Dunbar & Shultz, (2007), sobre el “cerebro social”, donde argumenta que la evolución del cerebro fue debido a vivir en la estructura de un grupo, lo que implica demandas cognitivas diferentes a las que se enfrentan los individuos que viven solos. De hecho Atzil et al., (2018), mencionan que la formación de grupos sociales se ha originado como una estrategia para la seguridad y mejora de los recursos que son necesarios para la supervivencia, desarrollo, protección y reproducción de la especie. Además, las interacciones positivas con otros generan confianza, relaciones completas y así un balance en la estructura de la sociedad, estas interacciones aparecieron temprano y han ido evolucionando conforme a la demanda de estrategias de nuestra especie (Sue Carter, 2018).

Sin embargo, cuando las relaciones sociales o el cuidado parental primario no son adecuados durante la infancia y la adolescencia como es el caso de la negligencia parental o el aislamiento social, pueden generarse ciertos cambios conductuales, como un aumento en conductas agresivas, o conductas ansiosas (Meaney, 2001) y alteraciones en el desarrollo de nuestro cerebro como altas concentraciones de glucocorticoides que posteriormente regulan el cerebro y el comportamiento en la vejez (Nishi et al., 2014) ya que en durante estos estados vulnerables aún no se encuentran en maduración los sistemas y áreas del cerebro asociados.

## 1.2 Cuidado Parental

El cuidado parental se define como cualquier conducta por parte de los progenitores dirigida hacia un miembro inmaduro de la misma especie que aumenta la probabilidad de que el organismo sobreviva hasta la madurez beneficiando a los hijos para un desarrollo óptimo (Numan, 2015).

En los mamíferos atriciales, dependiendo de la especie, el cuidado puede ser materno, paterno, biparental o aloparental (cuidado que no se lleva a cabo por los progenitores). En el humano, la conducta materna es el tipo de cuidado que predomina en los primeros años, las madres proveen las necesidades básicas como es el alimento a partir de la lactancia, calor, así como conductas que cumplen las necesidades de las crías (Numan, 2015), adicionalmente, el cuidado por ambos progenitores incluye la enseñanza de estrategias para relacionarse con otros, así como también a tener capacidades tanto físicas como cognitivas para realizar tareas que proporcionen el desarrollo de la especie en el medio ambiente.

El óptimo cuidado parental favorece el desarrollo y lo protege de padecer enfermedades mentales, como depresión, ansiedad y abuso de sustancias, y enfermedades físicas. Por lo que la calidad de las relaciones familiares y sociales es muy importante (Meaney, 2001). Durante el crecimiento y maduración los niños están mayormente expuestos a ser víctimas de abuso físico y sexual, adicionalmente, existen otras formas de abuso que comprometen la salud del individuo, por ejemplo, la negligencia emocional persistente, el conflicto familiar y la disciplina severa (Meaney, 2001).

Por lo tanto, si en el núcleo familiar no hay una relación adecuada, es decir, crecer en una familia que es fría, insolidaria y negligente, que no se le preste la atención que necesite el niño, que los padres abusen físicamente o verbalmente de él, que no sean afectuosos, que solo haya regaños, crea un ambiente estresante en los niños (Meaney, 2001; Walker & McGlone, 2013), afectando negativamente la conducta, el desarrollo neurológico y la función fisiológica incluido el metabolismo,

la reproducción y las respuestas inmunitarias (Nishi et al., 2014). El ambiente familiar disfuncional puede ser considerando un factor de vulnerabilidad para desarrollar trastornos mentales en etapas tardías del desarrollo (Portero-Tresserra et al., 2018).

Además, se ha observado bajos niveles periféricos de oxitocina (OXT) y vasopresina (AVP) en niños que han experimentado negligencia temprana, es decir, privación de cuidados parentales, en comparación con niños que fueron criados en una familia con un cuidado óptimo (Tanaka et al., 2010).

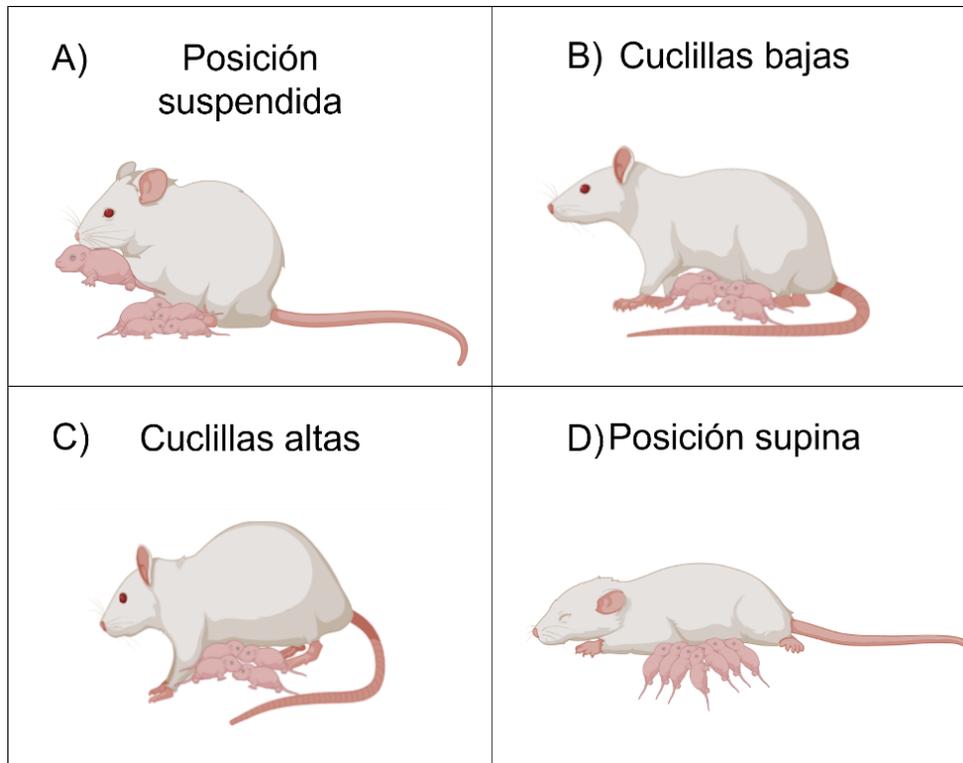
En este trabajo modelamos el cuidado negligente con ratas wistar, por lo tanto, se describirán las conductas principales que la madre le ofrece a sus crías siendo esto un desarrollo óptimo. Las conductas maternas más importantes en esta especie se expresan principalmente durante los primeros 10 días después de nacidos, excepto la postura supina.

Entre las principales conductas de cuidado materno en la rata se encuentran (Rees et al., 2009) (ver figura 1):

- Recuperación de las crías: La recuperación de las crías consiste en acarrear a los cachorros a donde se encuentre el nido que la madre ha construido.
- El acicalamiento consiste en “lamer” para limpiar a sus crías, siendo una importante fuente de estimulación en el desarrollo sensorial, emocional, y cognitivo de las crías. Existen 2 tipos de acicalamiento que la madre proporciona, el acicalamiento en el cuerpo y el acicalamiento anogenital. El primero se observa durante varias circunstancias, por ejemplo, mientras la progenitora está lactando, en la recuperación de las crías y entre recuperaciones, mientras que el segundo tiende a observarse durante la lactancia y cuando las crías están boca arriba. Este último tipo de estimulación es importante para promover el desarrollo sexual (Moore, 1984; Rees et al., 2009) de las crías macho, así como los movimientos peristálticos y de esfínteres con la finalidad de generar la micción y defecación de las crías.
- Posturas de lactancia es otro tipo de conducta materna cuyo propósito es permitir a las crías el acceso al alimento proporcionado por la madre (leche),

mantener la temperatura adecuada y protegerlos de elementos ambientales que podrían ser peligrosos. Existen diferentes tipos de posturas, la primera es la posición suspendida, es cuando la madre se coloca sobre algunos o todos sus críos en el nido, sin embargo, la madre permanece activa, acicalándose, reconstruyendo el nido y amamantando. La segunda postura son las cuclillas y consiste en la madre agazapada, en una postura quieta en respuesta a la suficiente estimulación. La última postura es la supina y está caracterizada por que la madre se acueste de lado, dando acceso libre a los pezones, y se observa durante periodos largos de conducta materna imperturbable mayores a 10 días posnatales.

- Construcción del nido, conducta en la cual la madre reúne material y escoge un lugar para agrupar a sus crías. Además de estas conductas maternas, existen otras conductas que se presentan en el contexto de cuidado materno, como el acarreo de crías, conductas exploratorias como el olfateo y excavación en el nido o cama de la casa hogar y auto acicalamiento.



**Figura 1.** Ilustraciones de las diferentes posturas de cuidado materno. A) Posición suspendida, la rata madre está sobre todos los cachorros mientras se involucra en otros comportamientos como vocalizar, acicalamiento a los cachorros, reconstruyendo el nido o acicalándose. B) Cuclillas bajas, la madre extiende sus extremidades con la espalda ligeramente arqueada permitiendo que los cachorros accedan a su vientre. C) Cuclillas altas, esta postura se caracteriza por un alto arqueamiento de la espalda y extensiones importantes de las extremidades por parte de la rata madre que permite a las crías acceder a su vientre. Además, las ratas madres cesan toda otra actividad durante la lactancia. D). Posición supina, esta postura se caracteriza por la rata madre acostada o durmiendo de lado con cachorros unidos a sus pezones (Modificado de Rees et al., 2009).

### 1.3 Separación Materna

La separación materna (SM) es uno de los modelos experimentales en roedores más utilizados, que asocia la carencia de cuidado materno sobre alteraciones duraderas en el comportamiento y en la neurobiología del sistema nervioso central (SNC), causando vulnerabilidad para el padecimiento de enfermedades en la salud en la vida adulta (Lukas et al., 2010; Nishi et al., 2014).

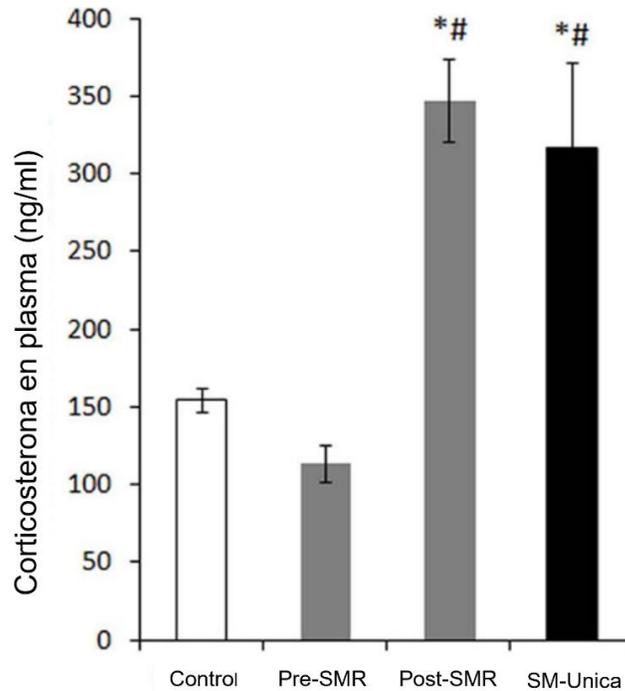
Este modelo consiste en separar a la madre de sus crías por breves periodos de 15 min hasta 60 min, o prolongados de 3 h, 6 h y hasta 24 h, y hasta las primeras dos semanas de vida y es comúnmente usado para examinar las consecuencias de experiencias de la vida temprana, siendo un simulador de estrés social temprano y un entorno de riesgo, debido a la interrupción de las interacciones sociales con la madre que son fundamentales para un desarrollo óptimo (Nylander & Roman, 2013).

Los resultados sobre el neurodesarrollo de las crías dependen de las manipulaciones que se realicen en cuanto al tiempo y duración de la separación materna. Por ejemplo, la separación materna de 15 min, que también es llamada "handling", simula condiciones de crianza natural de los roedores, en donde la madre deja a sus crías solas por un breve periodo de tiempo para conseguir comida, siendo que en este modelo se observan efectos beneficiosos en etapas tardías del desarrollo, como un decremento en conductas tipo ansiosas, además de niveles bajos de corticosterona y la actividad del eje hipotálamo pituitaria adrenal (HPA), teniendo como consecuencia, una respuesta reducida al estrés, es decir, resiliencia a este mismo, siendo considerado este un ambiente protector (Nishi, 2020; Nylander & Roman, 2013; Tata, 2012). Mientras que la separación materna por 24 horas en el DPN 10, está relacionado con una disminución en la producción de leptina y un incremento en los niveles plasmáticos de corticosterona y aldosterona (Salzmann et al., 2004).

Además, Haller et al., (2014) nos muestra que el modelo de SM con una duración de más de tres horas diarias, incrementa la intensidad de agresión, es decir, incrementa las frecuencias de ataque a ratas inofensivas, como mordidas en el área del cuello, y la respuesta al estrés mediante medidas de los glucocorticoides tanto en ratas jóvenes como adultas.

En roedores, la presencia de la madre y la calidad de interacción entre madre-cría permite que la actividad del eje HPA se encuentre en niveles adecuados, durante este periodo los niveles de glucocorticoides y corticosterona bajos son necesario para el crecimiento normal y el desarrollo del SNC. Por lo tanto, el estrés durante ese periodo del desarrollo es un factor que desajusta la actividad del eje

HPA, demostrando que la SM incrementa los niveles de corticosterona en plasma en la edad adulta (Aisa et al., 2007; Nishi et al., 2014)(ver figura 2).

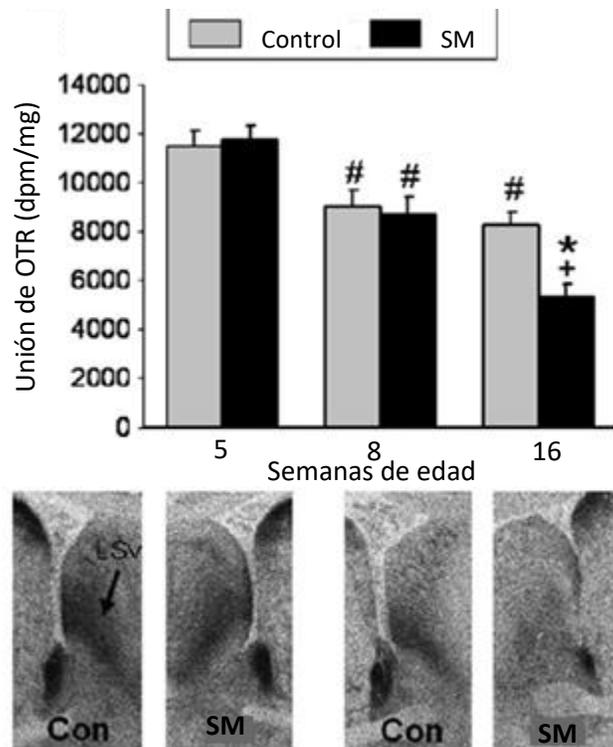


**Figura 2.** Niveles de corticosterona en plasma de ratón. Se observan cambios en los niveles de corticosterona en ratones que tuvieron el factor de separación materna repetida (Post-SMR) y en el grupo de separación materna de una sola ocasión (SM-única). El \* indica diferencias significativas con respecto al control y # diferencias significativas con respecto al grupo (Pre-SMR) antes de la separación materna repetida (Modificado de Nishi et al., 2014).

Se sabe que la SM durante la infancia, afecta sistemas de neurotransmisión como el endocannabinoide. Romano-López et al. (2012) observó que en la adultez las ratas con SM presentan una reducción del receptor CB1 y reducción del árbol dendrítico de las neuronas de la CPF; mientras que hay un aumento del CB1R y del árbol dendrítico en el núcleo accumbens (NAc) y cuando son expuestas al consumo voluntario de alcohol (solución al 10% v/v) lo consumen más.

Adicionalmente un estudio hecho por Lukas et al. (2010), señala que existen cambios en el cerebro, principalmente en el sistema oxitocinérgico, debido al factor

de la SM, en ciertas áreas del cerebro, con una disminución de la unión a los receptores a oxitocina (OXTR) en el septum lateral y el putamen, y un incremento en la unión de OXTR en el hipotálamo ventromedial (ver figura 3). Sin embargo, no se ha estudiado si hay cambios en el OXTR en la CPF, o NAc debido a la conjunción de dos factores, la separación materna y el aislamiento social.



**Figura 3.** Efectos de la separación materna en la unión del receptor de oxitocina en el septum lateral, de 5, 8 y 16 semanas de edad de ratas macho. Se observa un decremento en los niveles de unión del OXTR en las semanas 8 y 16. \* indica diferencias significativas con respecto al control y # diferencias significativas con respecto al grupo de 5 semanas de edad. (Modificado de Lukas et al., 2010).

#### 1.4 Socialización

La formación de un grupo es una estrategia que se ha establecido en algunas especies de mamíferos y vertebrados para la supervivencia de la especie. La formación de una sociedad requiere de la interacción entre pares que implican

conductas verbales y no verbales, tanto para el establecimiento de jerarquías y reglas, así como de estrategias para la resolución de problemas (De Jaegher et al., 2010; Kwak et al., 2018; Walker & McGlone, 2013).

La especie humana es altamente social, y tiene una clara relación entre la calidad de la socialización y la salud física y mental; por ejemplo, las buenas relaciones sociales se asocian a una disminución de riesgos cardiovasculares y enfermedades infecciosas, incremento resiliente al estrés, y una reducción de ansiedad y depresión. Por lo tanto, es indispensable fortalecer las relaciones sociales desde la infancia hasta la adultez para garantizar un desarrollo adecuado y saludable tanto psicológico como físico (Bosch & Young, 2018; Walker & McGlone, 2013). Estas relaciones sociales están constituidas por la familia, los amigos y las parejas románticas, y son importantes para la integración de la sociedad (Johnson & Young, 2015).

En ratas adolescentes se pueden observar interacciones sociales que se consideran como conductas de juego, y son de naturaleza enérgica. Contiene elementos de comportamiento agresivo, depredador y sexual, que son indispensables para el aprendizaje de las interacciones sociales en la adultez (Vanderschuren et al., 2016). Adicionalmente, son conductas motivadas que contribuyen al bienestar emocional. El juego social da forma al desarrollo adecuado del cerebro durante la infancia y adolescencia.

Por otro lado, se ha observado en humanos que las interacciones sociales disfuncionales durante etapas tempranas del desarrollo tienen un impacto negativo en las habilidades sociales y la función cognitiva en el adulto.

Debido a que la especie humana es fundamentalmente sociable, cuenta con un sustrato neuroanatómico especializado conocido como “cerebro social”. Las áreas asociadas son, la corteza prefrontal medial (CPFm), corteza cingulada anterior, surco temporal superior, Amígdala (AMY) e Ínsula anterior (Blakemore, 2008). Por ejemplo, la CPFm se activa cuando a sujetos les ponen tareas que implican pensar en estados mentales en relación con el yo (Johnson et al., 2002) o

juegos que involucran suponer los estados mentales de otros (Gallagher et al., 2002).

Love (2014) menciona que la formación y el mantenimiento de los vínculos sociales en mamíferos se da a partir de las interacciones entre los sistemas Oxitocinérgico-Dopaminérgico (OT-DA), mediante la activación de neuronas oxitocinérgicas que se dirigen al ATV estimulando las neuronas dopaminérgicas mesocorticolímbicas.

Se ha reportado que los niveles de oxitocina son máximos cuando el ratón expresa emociones positivas, por ejemplo, cuando tienen interacción social. Adicionalmente se ha observado que los ratones carentes del OXTR, muestran un incremento en las conductas relacionadas con la ansiedad, reducción en la interacción social, y un incremento en la respuesta de sobresalto (Cataldo et al., 2018), sugiriendo que el OXTR tiene una función en la conducta social, el estado de ánimo y la ansiedad.

Por otra parte, se ha demostrado que la oxitocina participa en la memoria de reconocimiento social, que es un tipo de memoria asociada a las relaciones sociales. Ferguson et al., (2000) sugieren que en los mecanismos de la memoria de reconocimiento social en la amígdala medial (MeA), son dependientes de la oxitocina, adicionalmente observaron que hay una disminución en la liberación de oxitocina cuando aislaron a ratas adultas por 7 días. Complementariamente se demostró con ratones *knock out* al gen que codifica para los receptores de oxitocina una pérdida de la memoria de reconocimiento social a corto plazo, en la tarea de habituación social y deshabituación, pero no a otros tipos de memoria (Mumtaz et al., 2018).

Estos estudios nos sugieren que la oxitocina participa específicamente en los mecanismos de memoria social, y no propiamente de los mecanismos de la memoria. Siendo así que cuando hay privación de socialización le impide un desarrollo adecuado que le permite una mejor habituación al medio ambiente.

## 1.5 Aislamiento Social

La socialización no es una etapa en el ser humano, más bien es una línea continua y hay un momento que es imprescindible que ocurra y la adolescencia es uno de estos periodos críticos en donde, la mayoría de los sistemas de neurotransmisión continúan madurando hasta edades tempranas de la adultez. Esta etapa se caracteriza por el aumento de las interacciones sociales, el desarrollo cognitivo y conductas riesgosas (Pais et al., 2019). Se ha sugerido que la falta de interacción social es un factor de estrés (Mumtaz et al., 2018).

Estudios en humanos sugieren que los factores estresantes durante estos periodos críticos de desarrollo están asociados a un incremento en la vulnerabilidad a desarrollar trastornos del estado de ánimo y/o consumo de sustancias (Butler et al., 2016; Meng et al., 2010, 2011), por ejemplo, consumo excesivo de etanol y síntomas de depresión (Ge et al., 2017).

Experimentar estrés en etapas tempranas del desarrollo como, por ejemplo, a través de la negligencia en el cuidado parental y el aislamiento social durante la adolescencia afecta la función de la corteza y el hipocampo involucradas en la regulación de las emociones (Mumtaz et al., 2018).

Se ha demostrado, en roedores, que la exposición al aislamiento social produce tanto alteraciones moleculares, estructurales y funcionales en diferentes áreas del cerebro. Por ejemplo, la disminución del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), que es una de las neurotrofinas más importantes ya que participa en el desarrollo del cerebro a través de regulación de la supervivencia de las neuronas, especialización, migración, sinaptogénesis, y densidad de las espinas dendríticas (Biggio et al., 2019).

El modelo de aislamiento social (AS) posnatal en roedores crea una condición de estrés capaz de inducir cambios duraderos en la actividad del eje HPA y un incremento de la actividad locomotora, exacerbación de la agresión, conductas tipo ansiosas observadas en tareas como laberinto elevado en cruz, campo abierto, entre otras, además, propensión a desarrollar enfermedades físicas (Biggio et al.,

2019), demostrando que la naturaleza de algunas especies de roedores es vivir en grupo.

Se ha observado que el sistema dopaminérgico y serotoninérgico incrementan la liberación de su neurotransmisor en la corteza prefrontal de ratones macho aislados, estos cambios, inducen comportamientos anormales, por ejemplo, hiperlocomoción, conductas agresivas, déficits en la prueba de inhibición previa al prepulso, deterioro cognitivo, decremento en el contacto social y conductas tipo ansiosas y depresivas (Ago et al., 2013).

Adicionalmente, se ha encontrado un aumento en la liberación de DA (dopamina) en Núcleo Accumbens (NAc) bajo el aislamiento social, después de inyecciones sistémicas de cocaína y anfetamina (Mumtaz et al., 2018).

## **1.6 Sistema Oxitocinérgico**

La Oxitocina (OXT) es un péptido que consta de 9 aminoácidos (secuencia: Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-GlyNH<sub>2</sub>) sintetizado principalmente en neuronas magnocelulares y menormente en neuronas parvocelulares del núcleo paraventricular (PVN) y el núcleo supraóptico (SON) del hipotálamo y es llevado por un transportador axonal a la glándula pituitaria posterior y liberado en el torrente sanguíneo (Bakos et al., 2018; Busnelli & Chini, 2018; Lin & Hsu, 2018; Neumann, 2008). Los objetivos diana de la OXT son la amígdala, hipocampo, estriado, núcleo supraquiasmático, núcleo cama de la estría terminal y tallo cerebral, actuando como neuromodulador o neurotransmisor (Lin & Hsu, 2018).

### **Síntesis**

El gen que codifica a la proteína precursora de OXT y su neurofisiña asociada, contiene 3 exones y 2 intrones. El primer exón (5´) contiene la región promotora no codificante, péptido señal, el nonapéptido OXT y la N-terminal, la región variable de la neurofisiña. El segundo exón codifica la región central de la neurofisiña; y el tercer

exón, codifica el extremo restante C-terminal de la neurofisiina. En los humanos, el gen OXT está ubicado en el cromosoma 20 separado por 8 centimorgans del centrómero (en la rata por 11 kb) (Busnelli & Chini, 2018; Gimpl & Fahrenholz, 2001; Jurek & Neumann, 2018). En el caso del gen OXT, la secuencia de ADN reguladora reside en el -216 a -100 pb corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción, en donde opera un activador de la transcripción específico.

La traducción del ARNm de OXT se produce en los ribosomas del retículo endoplásmico rugoso como parte de la proteína precursora (prepropéptido) que consiste en el péptido señal, el nonapéptido y la neurofisiina en el soma neuronal. El péptido señal apoya la transferencia de proteínas al aparato de golgi, donde se produce la concentración y el empaquetamiento en vesículas neurosecretoras recién formadas y un procesamiento postraduccional. Dicho procesamiento postraduccional intravesicular de la proteína precursora incluye la escisión proteolítica secuencial por enzimas convertidoras especiales y la conversión en partes más pequeñas de OXT y neurofisiina, y varias modificaciones de proteínas, entre ellas glicosilación, fosforilación, acetilación y amidación. Mientras se someten al proceso de maduración postraduccional en vesículas neurosecretoras, estas llamadas vesículas de núcleo denso grandes se dirigen a sus sitios de liberación a través del transporte axonal. Una vez que llegan a las terminales neurohipofisiales, las vesículas que contienen OXT se almacenan y liberan de las terminales neuronales a los capilares neurohipofisiales y, por lo tanto, al torrente sanguíneo periférico a través de las llamadas zonas de contacto neurohemal (Jurek & Neumann, 2018).

Además, se sabe que en los axones y las dendritas existe la presencia de ARNm de OXT, sin embargo, solo las dendritas son capaces de sintetizar proteínas de manera local. Por lo tanto, la síntesis de OXT en los somas de las neuronas magnocelulares de OXT es necesaria para la liberación de nonapéptidos desde las terminales axonales a la sangre (o dentro de las regiones diana centrales de las proyecciones axonales) y para la liberación somática dentro de SON y PVN,

mientras que para la liberación dendrítica de OXT como se encuentra en SON y PVN se sintetiza en dendritas (Bakos et al., 2018).

Una vez finalizada la síntesis de OXT y su empaquetamiento en vesículas, se transporta y se almacena en las terminales neurohipofisiales, pero también dentro de las dendritas de neuronas magnocelulares hipotalámicas. Posteriormente, OXT es liberada desde axones terminales neurohipofisiales de axones y/o axones terminales de neuronas que proyectan centralmente, y de somas y dendritas dentro del SON y PVN hipotalámicos.

La síntesis hipotalámica de OXT en SON, PVN y en sangre son desencadenadas por varios estímulos fisiológicos específicos, como la succión durante la lactancia, el nacimiento, la estimulación sexual, estrés. Y su degradación se da a partir de la enzima oxitocinasa, que pertenece a la subfamilia de las aminopeptidasas (Jurek & Neumann, 2018; Sue Carter, 2018).

La oxitocina cuenta con un receptor (Bakos et al., 2018; Lukas et al., 2010; Neumann, 2008), que tiene el aminoácido Isoleucina en la posición 3 de su secuencia, que es el sitio activo del receptor (Gimpl & Fahrenholz, 2001; Jurek & Neumann, 2018). OXTR pertenece a la familia de los receptores acoplados a proteínas G, específicamente a la rodopsina clase A que está comprendida por siete hélices transmembranales conectadas por tres bucles extracelulares y tres bucles intracelulares agrupados en un paquete. Se ha demostrado que este receptor se une a proteínas G de inhibición (Gq/11 y Gi/o) (Busnelli & Chini, 2018).

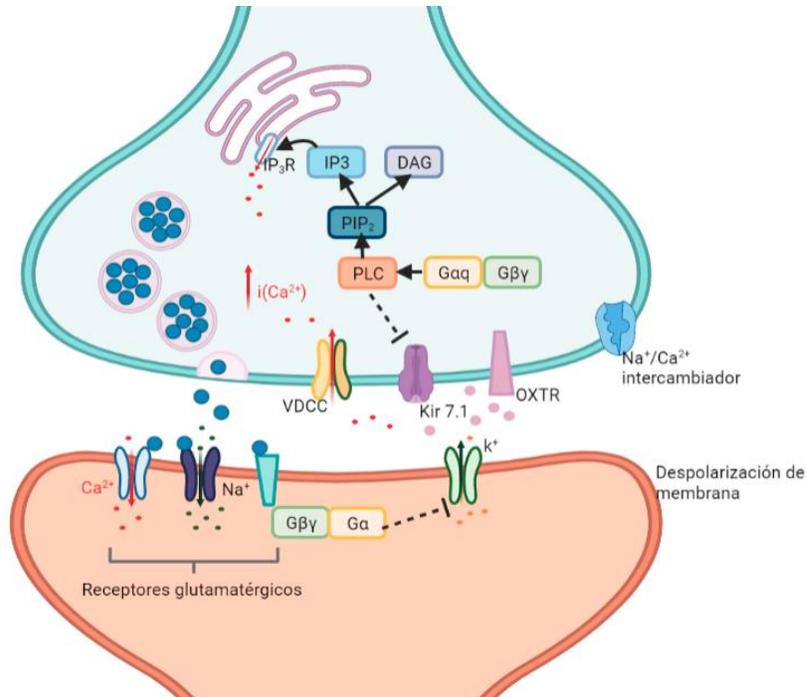
Los receptores de oxitocina se encuentran tanto en la membrana presináptica como en la postsináptica, teniendo diferentes modulaciones en el sistema, por ejemplo, los receptores presinápticos pueden tener una modulación excitadora e inhibitoria (Bakos et al., 2018).

La activación del receptor de oxitocina en la membrana presináptica da como resultado un aumento de la concentración de calcio intracelular, que aumenta la secreción del neurotransmisor en la hendidura sináptica. Existen dos mecanismos principales por los cuales la oxitocina participa en el aumento de calcio (Ca<sup>2+</sup>). El

primero es a través de una proteína Gαq que activa al efector primario fosfolipasa C (PLC), esta enzima hidroliza el fosfolípido fosfatidilinositol bifosfato (PIP2) teniendo como producto dos segundos mensajeros, el diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP3). A su vez el IP3 activa a su receptor IP3R teniendo como resultado la liberación de Ca<sup>2+</sup> intracelular de las reservas internas, mientras que DAG activa la proteína quinasa C (PKC). El segundo mecanismo es a través de la inhibición del canal de potasio (K) Kir7.1, lo cual induce la despolarización de membrana y la entrada de Ca<sup>2+</sup> por medio de canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje (Bakos et al., 2018) (ver figura 4).

La activación las proteínas Gi inhibe la actividad de la adenilato ciclasa, reducen la concentración de adenosín monofosfato cíclico (AMPC), activan la fosfatidilinositol-4,5 bisfosfato 3-quinasa (PI3K) y las rutas de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) y regulan directamente la actividad del canal iónico de potasio (Bakos et al., 2018; Busnelli & Chini, 2018). Finalmente, esto lleva a la disminución de la probabilidad de la liberación del neurotransmisor (Bakos et al., 2018).

Los efectos del mecanismo de las proteínas Go están acoplados a la regulación de diferentes tipos de canales de Ca<sup>2+</sup>, Sodio (Na<sup>+</sup>) y potasio (K<sup>+</sup>), contribuyendo a la regulación de la excitabilidad, secreción, liberación de neurotransmisores y por lo tanto plasticidad sináptica de la membrana (Bakos et al., 2018; Busnelli & Chini, 2018).



**Figura 4.** Receptores presinápticos de oxitocina acoplados a proteínas G modulan la polaridad de la membrana. OXTR: receptor de oxitocina; VDCC: canales de calcio dependientes de voltaje; PIP<sub>2</sub>: fosfatidilinositol bifosfato; IP<sub>3</sub>: 1,4,5-trifosfato de inositol; DAG: diacilglicerol (Modificado de Bakos et al., 2018).

Se ha demostrado que la modulación sináptica excitadora a partir de activación de los receptores de oxitocina presinápticos mejora la liberación de glutamato evocado por la despolarización en el hipocampo, o en la medula espinal. Por ejemplo, esta liberación de glutamato excita a las neuronas GABAérgicas de la medula espinal que inhiben a las neuronas serotoninérgicas que están involucrados en la transmisión del dolor.

Adicionalmente, los OXTR están expresados postsinápticamente y se ha descrito que estos regulan los comportamientos sociales (Bakos et al., 2018; Bosch & Young, 2018; Neumann, 2008), como el septum lateral, ATV, NAc, AMY, CPF (Jurek & Neumann, 2018).

Mediante estudios de autoradiografía se ha demostrado que las células gliales y astrocitos expresan OXTR. En los astrocitos el receptor está acoplado a una proteína Gq, aumenta la concentración de calcio intracelular movilizado desde

las reservas sensibles a IP3 (Bakos et al., 2018), lo que implica que los receptores de oxitocina podrían modular el crecimiento celular.

Tribollet et al. (1989), han demostrado que la expresión de OXTR tiene cambios específicos en el cerebro a lo largo del desarrollo, y Jones et al. (2017) sugieren que este receptor desempeña un papel en la maduración de los comportamientos sociales. De hecho, se ha descrito su función en las interacciones sociales, incluidas la agresión, filiación, cuidado parental, comportamientos sexuales y cognición social, además de la formación de vínculos, la memoria social y el estrés social (Haller et al., 2014; Heinrichs et al., 2009; Heinrichs & Domes, 2008; Jones et al., 2017; Lukas et al., 2010; Olf et al., 2013), promoviendo la confianza inicial, la interacción y la cooperación con terceros. También se ha observado que tiene efectos ansiolíticos, reduce las respuestas inmunes e inflamatorias y desempeña un papel en el aprendizaje de la memoria social y la reducción del dolor (Leong et al., 2018).

Por otra parte, debido a que los vínculos sociales y las relaciones estables están asociados con niveles altos de oxitocina, posiblemente tengan una función de prevención contra las adicciones a sustancias de abuso, ya que se ha observado que las personas consumidoras a drogas de abuso muestran conductas antisociales y una pobre toma de decisiones en el factor social (McGregor & Bowen, 2012).

Asimismo, se ha descrito que el maltrato infantil es un factor de riesgo reconocido para el desarrollo de agresión y violencia excesiva (Lukas et al., 2010) y se ha observado que las experiencias tienen influencia en el sistema oxitocinérgico en edades tardías (Olf et al., 2013).

## **1.7 Corteza prefrontal**

La CPF es una región cortical crucial que integra información de numerosas áreas corticales y subcorticales, y converge información actualizada con estructuras de salida de la información. Está involucrada en las funciones ejecutivas como, el control cognitivo (Goyal et al., 2008), la planeación, el razonamiento, el lenguaje, la

conducta social compleja (Grossmann, 2013), la toma de decisiones, la anticipación, inhibición de los impulsos y la flexibilidad cognitiva (Funahashi, 2017).

Esta área se refiere a las regiones de la corteza cerebral que son anteriores a la corteza premotora y el área motora suplementaria, y se divide en tres áreas principales, CPFm, la corteza prefrontal lateral (CPF) y la corteza orbitofrontal (COF). Cada una de estas subdivisiones participa en funciones específicas, la primera está involucrada en la coordinación bimanual, tareas cognitivas que necesitan atención, memoria espacial, resolución de conflictos (Goyal et al., 2008; Grossmann, 2013) y tiene conexiones con las regiones del cerebro que están involucradas en el procesamiento emocional (AMY), la memoria (hipocampo) y las regiones sensoriales de orden superior (región temporal). La segunda, en el lenguaje, atención, memoria explícita y de trabajo, procesamiento de nueva información, responsable del orden temporal de los eventos, la orientación, media la actitud, y el proceso de razonamiento espacial (Goyal et al., 2008), además recibe conexiones de regiones del cerebro que están implicadas en el control motor (ganglios basales, corteza premotora, área motora suplementaria) y el monitoreo (corteza cingulada) (Grossmann, 2013).

Por último, la COF desempeña un papel en las expectativas de recompensa, en el procesamiento de la emoción, integración sensorial, en la anticipación y procesamiento de los resultados. Recibe proyecciones del tálamo dorsomedial. El daño o lesión en la CPF puede tener como consecuencia anomalías conductuales, disfunción ejecutiva, trastornos psiquiátricos y neurológicos (Xu et al., 2019).

Se sabe que la CPFm en roedores es anatómicamente diferente a la del humano, dado que en los primeros está dividida en tres subregiones, corteza cingulada anterior, prelímbica e infralímbica sin embargo, su funcionalidad es muy similar (Heidbreder & Groenewegen, 2003; Ko, 2017).

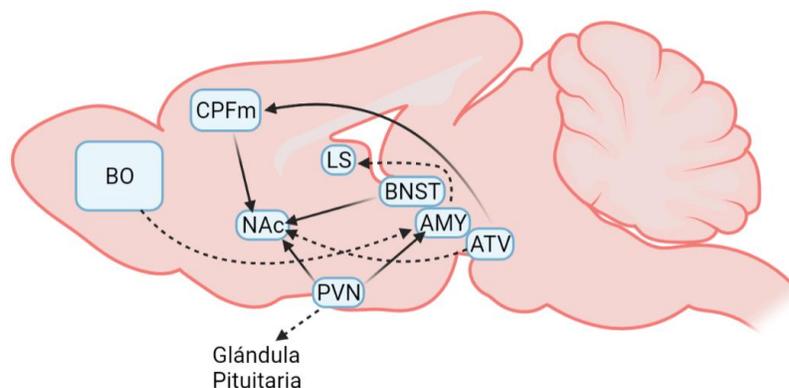
También se ha observado que los OXTR se encuentran en interneuronas GABAérgicas en la CPFm, principalmente en el área prelímbica, teniendo como función, inhibir conductas ansiosas. Esto nos sugiere que los receptores de OXT

están participando en la regulación de conductas tipo ansiosas, y depresivas, debido a estresores como la SM y el AS.

### 1.8 Núcleo Accumbens

El NAc ocupa parte del estriado ventral. Este núcleo juega un papel importante en la motivación, recompensa, el reforzamiento, las adicciones, la cognición, el miedo y la agresión. Está conformado por 2 subregiones, la zona central (Core) y la corteza (Shell), con dos tipos de poblaciones neuronales, las espinosas medianas que representan el 90% de todas las neuronas del cuerpo estriado con tono GABAérgico; y tres poblaciones de interneuronas, como las colinérgicas. Con aferencias de la ínsula rostral medial, ATV, CPF, y AMY (Castro & Bruchas, 2019; Ko, 2017). El NAc tiene proyecciones excitadoras al hipocampo, amígdala basolateral (ABL) y CPF.

Al ser esta un área de motivación y recompensa se ha observado que también participa en el reforzamiento de las interacciones sociales. Se sabe que el OXTR está expresado en esta área, sin embargo, desconocemos qué función tiene en la socialización.



**Figura 5.** Circuitos neuronales relacionados con conducta social. Estructuras involucradas en el apego social y sus proyecciones, en cerebro de roedor. Las flechas en negro indican las proyecciones directas y las flechas discontinuas indican las proyecciones indirectas. BO: Bulbo olfatorio; PVN: Núcleo paraventricular; BNST: Núcleo cama de la estría terminal; LS: Septum Lateral; AMY: Amígdala; ATV: Área tegmental ventral; CPFm: Corteza prefrontal medial (Modificado de Ko, 2017).

## **2. Justificación**

La separación materna y el aislamiento social afectan la conducta y el desarrollo neurológico, siendo factores de vulnerabilidad para desarrollar trastornos mentales como la depresión, la esquizofrenia y el abuso de sustancias. Por lo que resulta importante explorar los mecanismos que subyacen el cuidado parental y la socialización, particularmente el involucro del receptor de oxitocina durante la adolescencia y contribuir a sentar las bases para determinar la manera en la que el cuidado parental y socialización podrían prevenir enfermedades mentales.

## **3. Planteamiento del problema**

Se sabe que la OXT es el principal componente relacionado con las interacciones sociales, el vínculo madre-hijo, cuidado parental, relaciones de pareja. Se ha reportado que los estresores en la vida temprana, como la negligencia parental o el aislamiento social, pueden generar cambios en expresión del sistema oxitocinérgico, predisponiendo a conductas relacionadas con la ansiedad y abuso de sustancias en la edad adulta. A la fecha no se ha descrito si la separación materna y el aislamiento en la adolescencia, impactan en la expresión del OXTR en áreas del cerebro como la CPFm y NAc en la rata adulta.

## **4. Pregunta de Investigación**

¿La separación materna en la infancia y el aislamiento social durante la adolescencia impactará en la expresión del receptor de oxitocina de la CPFm y el NAc de la rata adulta?

## **5. Objetivos generales**

Describir el impacto que genera la separación materna en la infancia y el aislamiento social durante la adolescencia, en la expresión del receptor de oxitocina en la corteza prefrontal y el núcleo accumbens, de la rata macho adulta (DPN90).

### **5.1 Objetivos específicos**

Cuantificar mediante la técnica de inmunofluorescencia, la expresión del OXTR medida por inmunoreactividad por área, en la CPFm (prelimbica e infralimbica) de ratas macho adultas que fueron sometidas a los protocolos de separación materna y aislamiento social.

Cuantificar mediante la técnica de inmunofluorescencia, la expresión del OXTR medida por inmunoreactividad por área, en la NAc (core y shell) de ratas macho adultas que fueron sometidas a los protocolos de separación materna y aislamiento social.

## **6. Hipótesis**

La separación materna durante la infancia y el aislamiento social en la adolescencia decrementará la expresión del receptor de oxitocina en la adultez en la corteza prefrontal medial y el núcleo accumbens.

## **7. Método**

### **7.1. Sujetos**

Se utilizaron 7 ratas gestantes a término (Wistar), a partir del día de gestación 19-20, obtenidas del Bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM, las cuales se alojaron individualmente y se aclimataron a las condiciones del bioterio del laboratorio, con temperatura ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ) y humedad (52%) controladas con un ciclo de luz / oscuridad de 12 h / 12 h (se encienden a las 08:00 am) con acceso a comida

(Lab Chow, Purina) y agua purificada *ad libitum*, y se mantuvieron bajo vigilancia constante para registrar el alumbramiento de las crías.

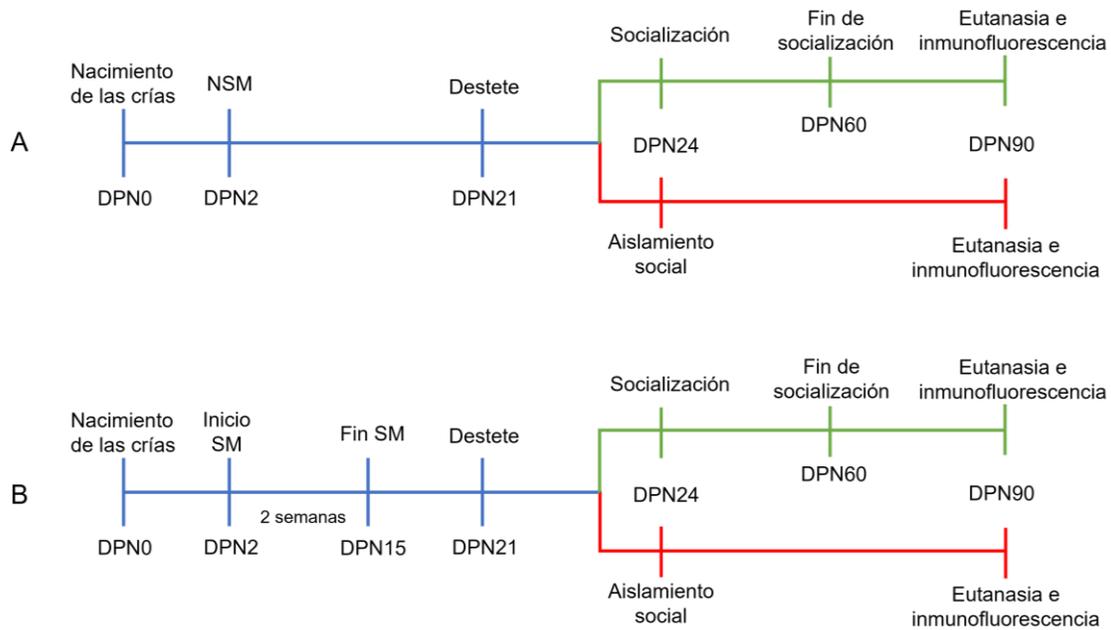
El día del nacimiento de las crías fue asignado como día postnatal (DPN) 0. El destete y el sexado se llevó a cabo el DPN 21 y a partir de este momento se seleccionaron únicamente a los machos. Se les continuó alimentando de Lab Chow y agua purificada al libitum y siguieron con las mismas condiciones del bioterio del laboratorio.

El cuidado y manejo de los animales se apegó estrictamente a las disposiciones establecidas en la Norma Oficial Mexicana sobre “Especificaciones Técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio” (NOM-062-ZOO-1999).

## **7.2 Protocolos de manipulación temprana**

### **7.2.1 Cuidado materno y separación materna (SM):**

Se utilizaron dos grupos, como grupo control (cuidado materno, NSM), la madre permaneció en la caja hogar con sus crías hasta el día del destete sin ninguna manipulación excepto por la limpieza de estas (Ver figura 8A). Al grupo experimental (con SM) se le retiró a la madre de la caja hogar dejando a las crías juntas pero solas, durante tres horas diarias (de 8:00 a 11:00 am) por 14 días (DPN 2 al DPN 15), donde se colocó en una caja individual alejada de sus crías y diferente estante, pero en la misma habitación (Amancio-Belmont et al., 2020) (Ver figura 8B).



**Figura 8.** Línea del tiempo de la metodología. Se muestra los días postnatales (DPN) de cada una de las manipulaciones del grupo control (A) y experimental (B), desde el nacimiento de las crías hasta la eutanasia de estas en su adultez. SM (separación materna), NSM (con cuidado materno).

### 7.2.2 Socialización y Aislamiento social:

Se utilizaron dos grupos, el primero fue el grupo control que consistió en socializar (SOC) de 9 a 10 machos (de una o diferentes camadas) del DPN24 hasta el DPN60. Se colocaron en una caja de plexiglás transparente (50x100x50cm). A partir del DPN 60 se colocaron en cajas individuales de acrílico transparente (25x37x20cm) hasta el DPN 90 (Amancio-Belmont et al., 2020) (ver figuras 6; 8 A y B).



**Figura 6.** Fotografía del protocolo de socialización. Se puede observar a diez ratas macho conviviendo dentro de la caja hogar de plexiglass (50x100x50cm), con una edad de 60DPN. Agua y alimento estuvieron dispuestos *ad libitum*.

La manipulación del grupo experimental consistió en aislar (AS) a 10 ratas en cajas individuales de plexiglás transparente (25x37x20cm) desde la adolescencia (DPN 24) hasta la adultez (DPN90) (Spear, 2000) (ver figuras 7; 8 A y B).

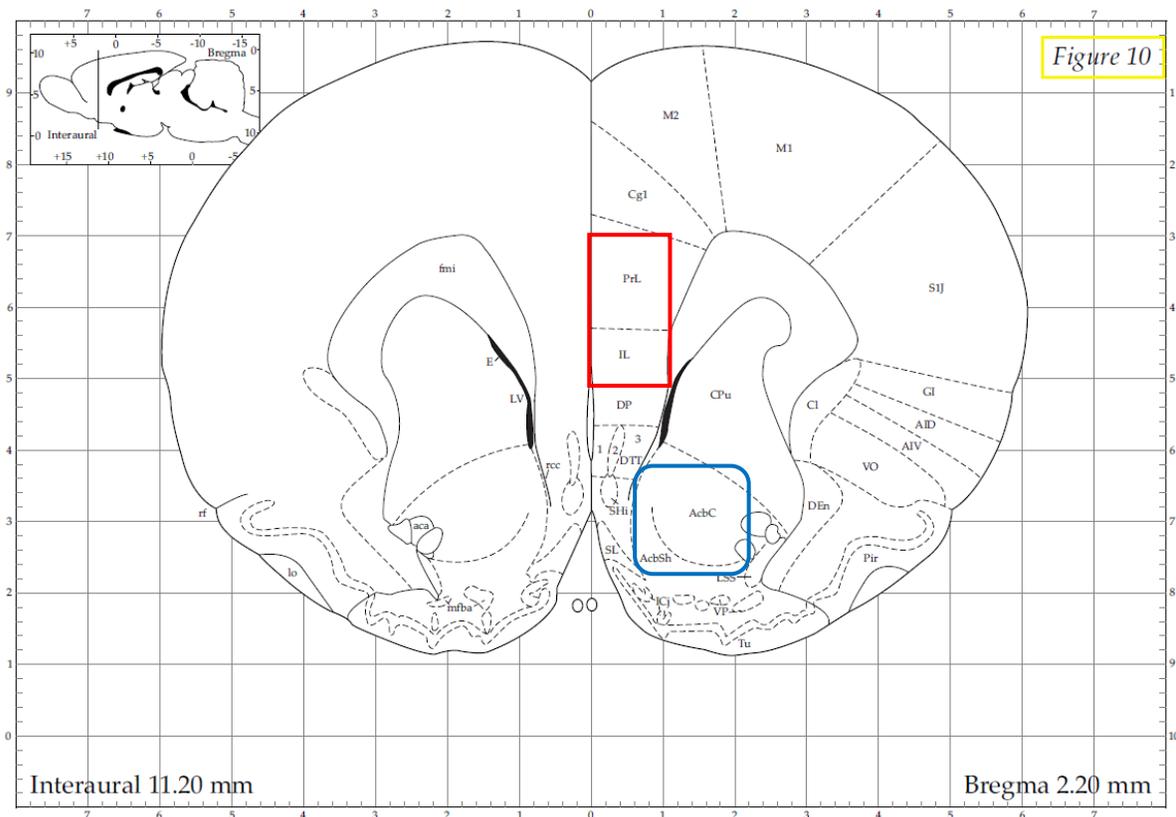


**Figura 7.** Fotografía del protocolo de aislamiento social. Se puede observar una rata macho en una caja hogar individual de acrílico (25x37x20cm), con una edad de 60DPN. Agua y alimento *ad libitum*.

### **7.3 Técnica de Inmunofluorescencia:**

Para evaluar la expresión de OXTR, se usó la técnica de inmunofluorescencia, que nos permitió cuantificar la expresión celular de los receptores. Adicionalmente se utilizó el marcador neuronal NeuN y DAPI (4,6-diamino-2-fenilidol) para marcar núcleos celulares.

Se anestesiaron a las ratas con pentobarbital sódico (126mg/kg, i.p) y una vez que mostraron los signos de anestesia profunda se perfundieron intracardialmente, con 250 ml de una solución de búfer de fosfatos al 0.1 M (PBS) y posteriormente con 250 ml de una solución de paraformaldehído (PFH) al 4% (Romano-López et al., 2012). Los cerebros fueron removidos y almacenados en PFH al 4% durante 24 horas. Posteriormente se sumergieron en diferentes soluciones de sacarosa al 10, 20 y 30 % 24 horas cada una. Se utilizó un criostato Leica (CM1510-3) para obtener las rebanadas de tejido a un grosor de 14 µm y se montaron en portaobjetos gelatinizados. Las regiones de interés fueron la CPFm y NAcc (ver figura 9), se tomó como referencia la línea media y la fimbria del fornix, así mismo se utilizó el atlas del cerebro de rata (Paxinos & Watson, 2013) para localizar las áreas anatómicas. Los cortes fueron almacenados en una caja para portaobjetos en un congelador de -20° hasta el momento de la realización de la inmunofluorescencia.



**Figura 9.** Nivel aproximado de los cortes cerebrales utilizados. Se muestra la corteza prefrontal medial (infralimbica y prelimbica) en rojo y el núcleo Accumbens (núcleo *core* y *shell*) en azul (Modificado de Paxinos & Watson, 2013).

### Protocolo de Inmunofluorescencia para OXTR

Antes de empezar el protocolo los cortes fueron sacados del congelador y aclimatado 5 minutos. A continuación, los cortes se delimitaron con un gel hidrofóbico ImmEdge (Vector Laboratories) y colocados dentro de una cámara húmeda, en donde se realizó la recuperación antigénica con buffer de citratos de sodio (pH 6.00), dos lavados de 5 min cada uno, a continuación, se hicieron tres lavados con PSB 5 min cada uno. Después se incubó el tejido por 3 horas en una solución de 1% de albúmina de suero bovino (BSA); preparado con Tritón al 0.2% y PBS. Posteriormente se realizaron dos lavados con PBS y se incubó el tejido durante 24 horas a 4°C sobre un agitador Benchrocker 3D (serie1203035), con una mezcla de 100ul de anticuerpo primario policlonal de cabra anti-receptor OXTR

(Abcam, ab87312) y el segundo anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-NeuN (Millipore, MAB377), diluido en BSA a una concentración de 1:100. Se realizaron tres lavados con PBS y se incubaron por 2 horas los anticuerpos secundarios: anti-cabra acoplado a un fluorocromo Alexa Flúor 647 a una concentración de 1:400 para el OXTR y el segundo anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a fluorocromo Alexa Flúor 594 a una concentración de 1:200, diluido con BSA. Nuevamente se realizaron 2 lavados con PBS de 10 min cada uno y un lavado de 5 min. Posteriormente, se agregó 20 microlitros de medio de montaje para fluorescencia Vectashield con DAPI, se colocó el cubreobjetos, sin dejar burbujas en el tejido, se secó el exceso de medio de montaje y se selló con barniz las orillas del cubreobjetos. Los cortes fueron almacenados en cajas para portaobjetos en el congelador de -20° hasta que se observaron en el microscopio.

Los cortes fueron observados en un microscopio confocal laser Leica TCS SP8 (Leica Microsystems, Mannheim, Germany), equipado con un objetivo apocromático para inmersión en aceite de 63x (N.A.1.4), con un láser de 405nm. Las imágenes fueron analizadas utilizando el software ImageJ 1.53c, que nos permitió cuantificar el porcentaje de área de inmunoreactividad o de fluorescencia de las células. El atlas del cerebro de rata de Paxinos & Watson, 2013, fue utilizado para localizar las áreas anatómicas de interés. El número de células positivas se cuantificó bilateralmente en ambas estructuras.

#### **7.4 Diseño Experimental**

Este experimento tuvo un diseño de 2x2 teniendo como primer factor la separación materna (SM/NSM), y como segundo factor el aislamiento social (AS/SOC).

##### **Variables independientes**

- Separación materna (NSM/SM)
- Socialización (SOC/AS)

##### **Variable dependiente**

- Porcentaje de inmunoreactividad por área del receptor de oxitocina

### **7.5 Análisis Estadístico**

Para el área de la CPFm, la prueba de Shapiro-Wilk demostró que los cuatro grupos cumplen con el principio de normalidad, pero según la prueba de Levene no cumplen con la homogeneidad de varianzas ( $F(3,26) = 6.22, p = 0.002$ ), mientras que para el área de NAc, la prueba de Shapiro-Wilk demostró que los cuatro grupos no cumplen con el principio de normalidad ni la homogeneidad de varianzas según la prueba de Levene ( $F(3,26) = 5.98, p = 0.003$ ), por lo tanto para ambas áreas se utilizaron pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis para el análisis de los datos.

Las pruebas estadísticas se realizaron mediante el programa de GraphPad Prisma versión 7.

### **8. Resultados**

En la figura 10 se muestran fotos representativas de laminillas con un corte coronal de la CPFm a una distancia aproximada de 2.20mm de bregma. Las fotos fueron tomadas en un microscopio de fluorescencia con una amplificación de 63x y los cerebros corresponden a los sujetos que pasaron por las manipulaciones de estrés temprano. La señal verde fluorescente marca el receptor de OXT, la cual se observa en la membrana plasmática, alrededor de los núcleos celulares marcados en color azul.

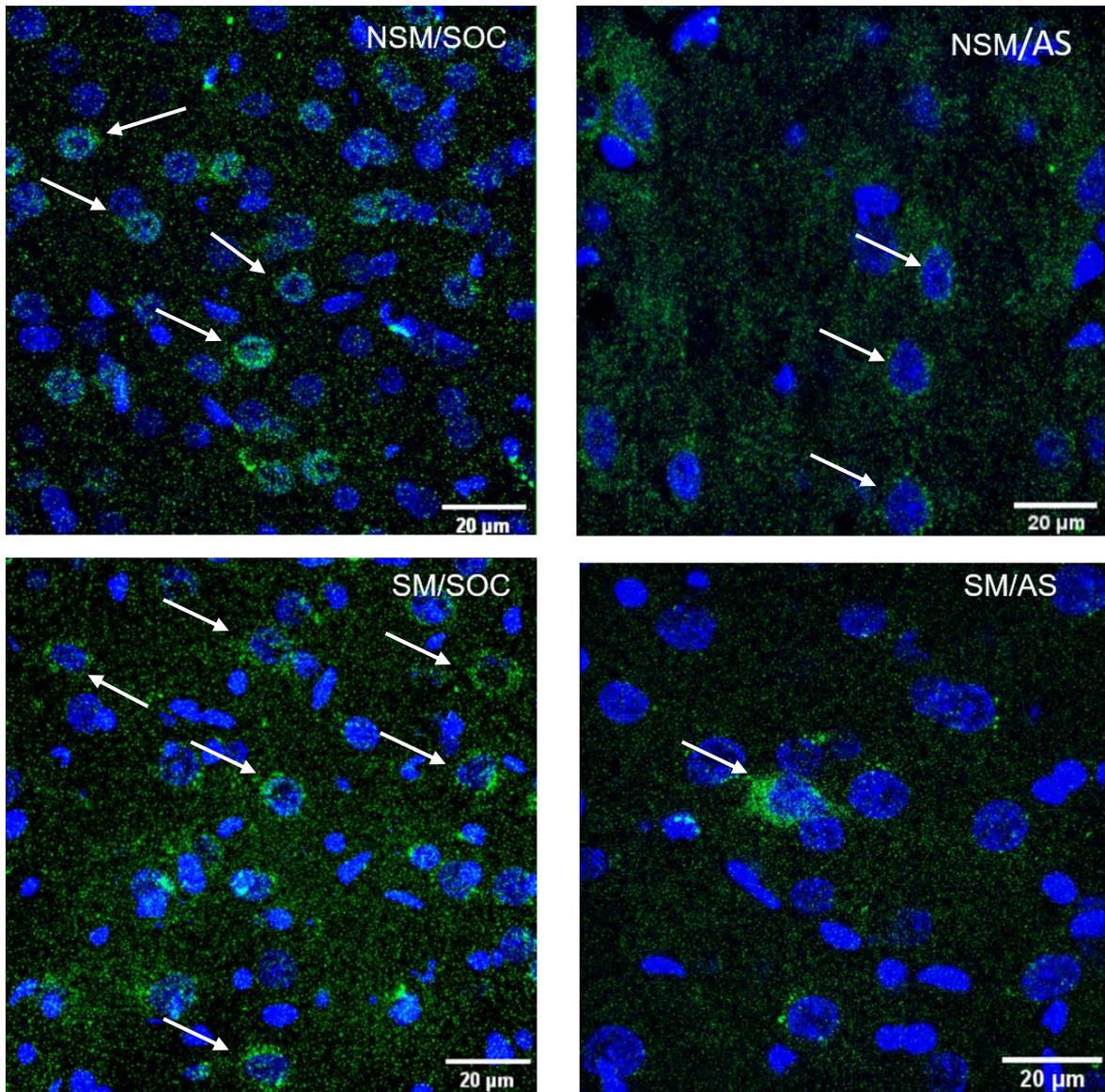


Figura 10. Fotografías representativas que muestran la sobreposición de la marca fluorescente (verde) de OXTR y DAPI (azul) para núcleos celulares, en un corte coronal de cerebro de un sujeto de cada grupo. Amplificación 63X de la CPFm (Prelimbica e Infralimbica). Las flechas blancas indican algunas células positivas a OXTR.

Para el área de CPFm (ver figura 11), se realizó un análisis kruskal-Wallis y se observaron diferencias significativas del porcentaje de inmunoreactividad ( $H(3) = 19.26, p = 0.0002$ ), con una mediana de 4.69 para NSM/SOC, 0.92 para NSM/AS, 1.41 para SM/SOC y 1.01 para SM/AS. Con un análisis de comparaciones múltiples de Dunn, se encontró que el porcentaje de inmunoreactividad de OXTR en CPFm

es menor en los grupos NSM/AS ( $p = 0.0002$ ) y SM/AS ( $p = 0.0074$ ) con respecto al grupo control (NSM/SOC).

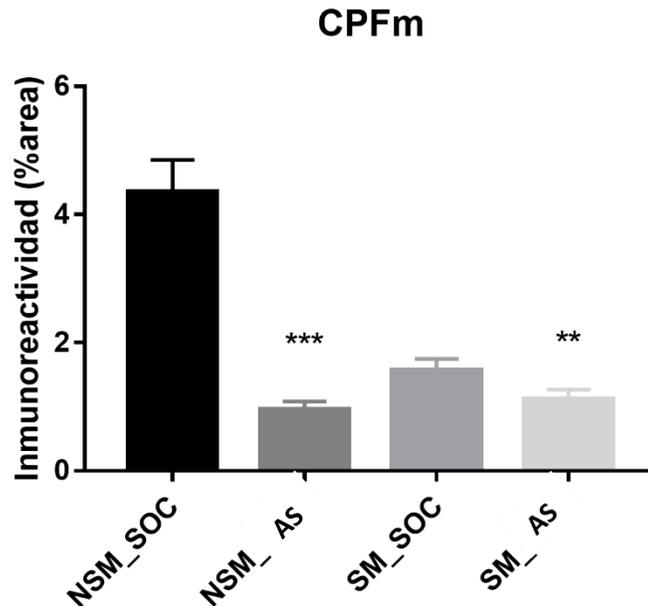


Figura 11. Comparación del porcentaje de inmunoreactividad de OXTR en el área CPFm, en los grupos NSM/SOC, NSM/AS, SM/SOC, SM/AS. Análisis de Kruskal-Wallis. El análisis de comparaciones múltiples de Dunn indica diferencias significativas entre NSM/AS y SM/AS contra el control (\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ). Las barras de error denotan el error estándar de la media (SEM).

En la figura 12 se muestran fotos representativas de laminillas con un corte coronal de NAc a una distancia aproximada de 2.20mm de bregma. Las fotos fueron tomadas en un microscopio de fluorescencia con una amplificación de 63x y los cerebros corresponden a los sujetos que pasaron por las manipulaciones de estrés temprano. La señal verde fluorescente marca el receptor de OXT, la cual se observa en la membrana plasmática, alrededor de los núcleos celulares marcados en color azul.

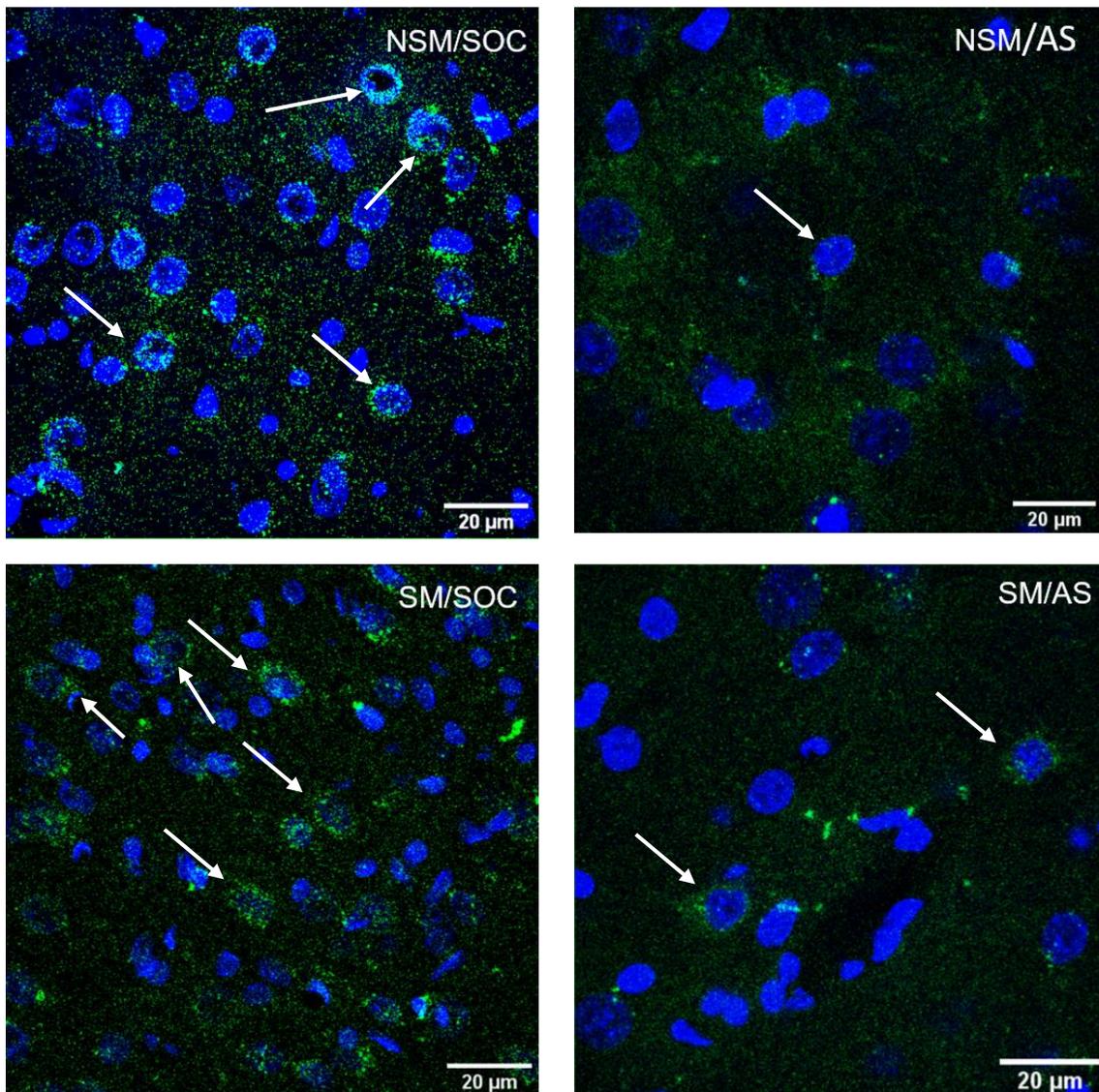


Figura 12. Fotografías representativas que muestran la sobreposición de la marca fluorescente (verde) de OXTR y DAPI (azul) para núcleos celulares, en un corte coronal de cerebro de un sujeto de cada grupo. Amplificación 63X del NAc (Core y Shell). Las flechas blancas indican algunas células positivas a OXTR.

Para el área de NAc (ver figura 13), se realizó un análisis kruskal-Wallis y se observaron diferencias significativas del porcentaje de inmunoreactividad ( $H(3) = 17.88, p = 0.0005$ ), con una mediana de 2.75 para NSM/SOC, 1.20 para NSM/AS, 1.50 para SM/SOC y 0.77 para SM/AS. Con un análisis de comparaciones múltiples de Dunn, se encontró que el porcentaje de inmunoreactividad de OXTR en NAc es

menor en los grupos NSM/AS ( $p = 0.011$ ) y SM/AISL ( $p = 0.0003$ ) con respecto al grupo control (NSM/SOC).

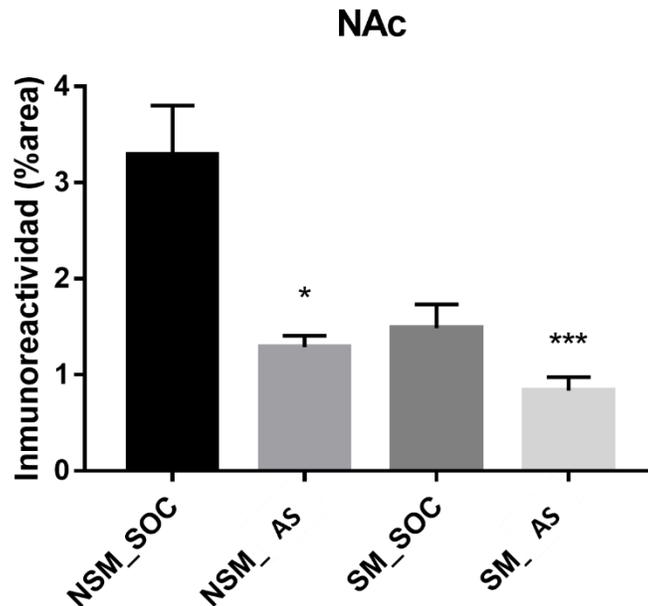


Figura 13. Comparación del porcentaje de inmunoreactividad de OXTR en el área NAc, en los grupos NSM/SOC, NSM/AS, SM/SOC, SM/AS. Análisis de Kruskal-Wallis. El análisis de comparaciones múltiples de Dunn indica diferencias significativas entre NSM/AS y SM/AS contra el control (\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ ). Las barras de error denotan el error estándar de la media (SEM).

## 9. Discusión

Con base en nuestros resultados demostramos que el AS tiene un impacto sobre la expresión del OXTR en la CPFm y el NAc. Los resultados demuestran que hay una disminución significativa en la expresión de OXTR en la CPFm y el NAc, en los grupos NSM/AS y SM/AS comparado con el control. Estos resultados sugieren que el AS tiene un mayor impacto sobre la expresión del OXTR que la SM.

Si bien autores como Lukas et al., (2010) y Sandi & Haller, (2015) muestran que la SM de más de tres horas diarias por dos semanas después del parto, reduce la expresión de OXTR en NAc, AMY medial y septum lateral, nuestros datos sugieren que la SM no tiene un efecto en la expresión de los receptores de oxitocina

en el NAc y CPFm en la adultez, no obstante, no podemos descartar que la OXT y sus receptores no estén expresándose diferencialmente en otras áreas debido a estos estresores. Sin embargo, las diferencias que hay entre el protocolo de SM de Sandi y Haller y el nuestro, es que estos autores retiran a las crías de su caja hogar, mientras que nosotros retiramos a la mamá de la caja hogar y las duraciones son diferentes ellos hacen más de 3 horas y nosotros 3 horas exactas.

Por otra parte, hemos descrito anteriormente que la socialización, es decir, la interacción con conespecíficos facilita el desarrollo de las funciones ejecutivas, lo que garantiza que los sujetos se adapten al entorno social y pueda contender con las demandas del grupo y las propias para alcanzar el éxito social, por ejemplo, mejores decisiones financieras, aceptación en grupos sociales, éxito en el trabajo resolución de problemas, planificación de la jubilación o uso de créditos (Tangney et al., 2004).

Por lo que la interacción social durante el desarrollo en los mamíferos es de suma importancia, cuando estamos aislados socialmente durante el periodo crítico de la adolescencia, que es cuando se crean las estrategias para socializar que continúan hasta la adultez temprana. Nuestros resultados sugieren que las consecuencias neuroanatómicas de la disfunción del sistema oxitocinérgico, y sugerimos que expresarían afecciones en la conducta como muestran Butler et al., 2016; Ge et al., 2017, en una exacerbación de la agresión, adicciones a sustancia, enfermedades mentales, como la depresión y la ansiedad.

Adicionalmente, los receptores de OXT están expresados en las neuronas de la CPFm (Bakos et al., 2018), por lo que sugerimos que la baja expresión de estos receptores que nosotros encontramos después del aislamiento social ante la adolescencia, podría ser el responsable de la expresión de la disfunción prefrontal.

Además, la exposición al estrés por aislamiento social induce una variedad de cambios endocrinológicos que incluyen la activación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA), liberación de catecolaminas, que culmina en la liberación de glucocorticoides (GC), la activación del sistema simpático-adrenomedular, aunque en algunos otros estudios reportan lo contrario, así como también una

disminución en la expresión del BDNF impidiendo un correcto desarrollo del cerebro en la sinaptogénesis (Biggio et al., 2019).

La CPFm es una estructura involucrada en las funciones cognitivas relacionadas con la toma de decisiones y regulación de las emociones (Mumtaz et al., 2018). Se ha observado que la disfunción prefrontal facilita conductas tipo ansiosas, conductas agresivas, un decremento en las interacciones sociales (Ko, 2017; Mumtaz et al., 2018), así mismo se ha encontrado una desregulación en los sistemas dopaminérgicos y serotoninérgicos (Love, 2014).

Como podemos observar en nuestros resultados el AS es el factor que impacta más que la SM, ya que tanto los roedores como los humanos somos una especie fundamentalmente social, que, al privarlos de este componente a temprana edad, están afectando áreas del cerebro como la CPFm, siendo esta un área que proyecta a otras áreas como la AMY, el hipotálamo y el NAc, de hecho, es quien regula el control ejecutivo y coordinación de comportamientos sociales. Un ejemplo de esto en pacientes que sufrieron lesiones en la CPFm teniendo como resultado un deterioro social severo y una flexibilidad conductual reducida (Ko, 2017).

Adicionalmente, se ha demostrado que la administración sistémica de cocaína y anfetamina un aumento en la liberación de DA en NAc bajo el aislamiento social (Mumtaz et al., 2018). Con base en lo anterior sugerimos que el aislamiento social, favorece el efecto reforzante y por lo tanto la búsqueda por sustancias y como consecuencia que el sujeto más fácilmente se vuelva adicto.

## **10. Conclusión**

El aislamiento social tiene un mayor impacto sobre los receptores de oxitocina en la corteza prefrontal y el núcleo accumbens del cerebro de la rata adulta, sugiriendo que impacta con mayor facilidad en conductas reguladas por otras estructuras.

## **11. Limitaciones**

Para complementar este estudio faltaron pruebas conductuales que demostraran si los sujetos tenían conductas tipo depresivas, ansiosas o agresivas, sin embargo, debido a la pandemia por la COVID-19, no se pudieron terminar de realizar las que estaban en proceso.

En el presente estudio no se diferenció la corteza prelímbica e infralímbica en la toma de fotos para una mayor especificidad en la participación de OXTR, así como también de los núcleos del NAc, pero en futuros estudios es recomendable hacer la diferenciación debido a que se ha observado una diferenciación en la funcionalidad de las subregiones. Adicionalmente, el anticuerpo usado para marcar el OXTR dejó de fabricarse por lo que no se pudieron obtener más muestras de inmunofluorescencia con NeuN, esto se planea solucionar con la búsqueda otro anticuerpo de la misma marca y funcionalidad.

## **12. Propuesta**

Investigar la participación de OXY y OXTR en sujetos aislados socialmente en otras áreas del circuito que participa en la conducta social, como la AMY, el VTA, y la Habénula medial y lateral utilizando el mismo diseño experimental descrito anteriormente. Adicionalmente, demostrar vulnerabilidad a la búsqueda y consumo de sustancias, utilizando los protocolos de condicionamiento de preferencia de lugar (CPL), autoadministración de anfetamina y manipular farmacológicamente la conducta con antagonistas y agonistas de OXTR. Además, evaluar conductas de interacción social cuando estén interaccionando entre pares. También usar el modelo de SM por un modelo de madre alta cuidadora y baja cuidadora (Meaney,2000), y medir conductas maternas.

### 13. Referencias

- Aisa, B., Tordera, R., Lasheras, B., Del Río, J., & Ramírez, M. J. (2007). Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity after maternal separation in rats. *Psychoneuroendocrinology*, *32*(3), 256–266.  
<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2006.12.013>
- Amancio-Belmont, O., Becerril Meléndez, A. L., Ruiz-Contreras, A. E., Méndez-Díaz, M., & Prospéro-García, O. (2020). Maternal separation plus social isolation during adolescence reprogram brain dopamine and endocannabinoid systems and facilitate alcohol intake in rats. *Brain Research Bulletin*, *164*, 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2020.08.002>
- Atzil, S., Gao, W., Fradkin, I., & Barrett, L. F. (2018). Growing a social brain. In *Nature Human Behaviour* (Vol. 2, Issue 9, pp. 624–636). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41562-018-0384-6>
- Bakos, J., Srancikova, A., Havranek, T., & Bacova, Z. (2018). Molecular Mechanisms of Oxytocin Signaling at the Synaptic Connection. In *Neural plasticity* (Vol. 2018, p. 4864107). NLM (Medline).  
<https://doi.org/10.1155/2018/4864107>
- Biggio, F., Mostallino, M. C., Talani, G., Locci, V., Mostallino, R., Calandra, G., Sanna, E., & Biggio, G. (2019). Social enrichment reverses the isolation-induced deficits of neuronal plasticity in the hippocampus of male rats. *Neuropharmacology*, *151*, 45–54.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.03.030>
- Blakemore, S. J. (2008). The social brain in adolescence. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 9, Issue 4, pp. 267–277). Nat Rev Neurosci.  
<https://doi.org/10.1038/nrn2353>
- Bosch, O. J., & Young, L. J. (2018). Oxytocin and social relationships: From attachment to bond disruption. In *Current Topics in Behavioral Neurosciences* (Vol. 35, pp. 97–117). Springer Verlag. [https://doi.org/10.1007/7854\\_2017\\_10](https://doi.org/10.1007/7854_2017_10)

- Busnelli, M., & Chini, B. (2018). Molecular basis of oxytocin receptor signalling in the brain: what we know and what we need to know. In *Current Topics in Behavioral Neurosciences* (Vol. 35, pp. 3–29). Springer Verlag.  
[https://doi.org/10.1007/7854\\_2017\\_6](https://doi.org/10.1007/7854_2017_6)
- Butler, T. R., Karkhanis, A. N., Jones, S. R., & Weiner, J. L. (2016). Adolescent Social Isolation as a Model of Heightened Vulnerability to Comorbid Alcoholism and Anxiety Disorders. In *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* (Vol. 40, Issue 6, pp. 1202–1214). Blackwell Publishing Ltd.  
<https://doi.org/10.1111/acer.13075>
- Castro, D. C., & Bruchas, M. R. (2019). A Motivational and Neuropeptidergic Hub: Anatomical and Functional Diversity within the Nucleus Accumbens Shell. In *Neuron* (Vol. 102, Issue 3, pp. 529–552). Cell Press.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.03.003>
- Cataldo, I., Azhari, A., Lepri, B., & Esposito, G. (2018). Oxytocin receptors (OXTR) and early parental care: An interaction that modulates psychiatric disorders. In *Research in Developmental Disabilities* (Vol. 82, pp. 27–38). Elsevier Inc.  
<https://doi.org/10.1016/j.ridd.2017.10.007>
- De Jaegher, H., Di Paolo, E., & Gallagher, S. (2010). Can social interaction constitute social cognition? *Trends in Cognitive Sciences*, 14(10), 441–447.  
<https://doi.org/10.1016/j.tics.2010.06.009>
- Dunbar, R. I. M., & Shultz, S. (2007). Evolution in the social brain. *Science*, 317(5843), 1344–1347. <https://doi.org/10.1126/science.1145463>
- Ferguson, J. N., Young, L. J., Hearn, E. F., Matzuk, M. M., Insel, T. R., & Winslow, J. T. (2000). Social amnesia in mice lacking the oxytocin gene. *Nature Genetics*, 25(3), 284–288. <https://doi.org/10.1038/77040>
- Funahashi, S. (2017). Prefrontal contribution to decision-making under free-choice conditions. In *Frontiers in Neuroscience* (Vol. 11, Issue JUL, p. Prefrontal). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00431>

- Gallagher, H. L., Jack, A. I., Roepstorff, A., & Frith, C. D. (2002). Imaging the intentional stance in a competitive game. *NeuroImage*, 16(3 I), 814–821. <https://doi.org/10.1006/nimg.2002.1117>
- Ge, L., Yap, C. W., Ong, R., & Heng, B. H. (2017). Social isolation, loneliness and their relationships with depressive symptoms: A population-based study. *PLoS ONE*, 12(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182145>
- Gimpl, G., & Fahrenholz, F. (2001). The oxytocin receptor system: Structure, function, and regulation. In *Physiological Reviews* (Vol. 81, Issue 2, pp. 629–683). American Physiological Society. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.2.629>
- Goyal, N., Siddiqui, S., Chatterjee, U., Kumar, D., & Siddiqui, A. (2008). Neuropsychology of prefrontal cortex. *Indian Journal of Psychiatry*, 50(3), 202. <https://doi.org/10.4103/0019-5545.43634>
- Grossmann, T. (2013). The role of medial prefrontal cortex in early social cognition. In *Frontiers in Human Neuroscience* (Vol. 7, Issue JUL). Frontiers Media S. A. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2013.00340>
- Haller, J., Harold, G., Sandi, C., & Neumann, I. D. (2014). Effects of adverse early-life events on aggression and anti-social behaviours in animals and humans. In *Journal of Neuroendocrinology* (Vol. 26, Issue 10, pp. 724–738). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/jne.12182>
- Heidbreder, C. A., & Groenewegen, H. J. (2003). The medial prefrontal cortex in the rat: Evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 27, Issue 6, pp. 555–579). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2003.09.003>
- Heinrichs, M., & Domes, G. (2008). Neuropeptides and social behaviour: effects of oxytocin and vasopressin in humans. In *Progress in Brain Research* (Vol. 170, pp. 337–350). Prog Brain Res. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(08\)00428-7](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(08)00428-7)

- Heinrichs, M., von Dawans, B., & Domes, G. (2009). Oxytocin, vasopressin, and human social behavior. In *Frontiers in Neuroendocrinology* (Vol. 30, Issue 4, pp. 548–557). Front Neuroendocrinol. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2009.05.005>
- Johnson, S. C., Baxter, L. C., Wilder, L. S., Pipe, J. G., Heiserman, J. E., & Prigatano, G. P. (2002). Neural correlates of self-reflection. *Brain*, *125*(8), 1808–1814. <https://doi.org/10.1093/brain/awf181>
- Johnson, Z. V., & Young, L. J. (2015). Neurobiological mechanisms of social attachment and pair bonding. In *Current Opinion in Behavioral Sciences* (Vol. 3, pp. 38–44). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.cobeha.2015.01.009>
- Jones, C., Barrera, I., Brothers, S., Ring, R., & Wahlestedt, C. (2017). Oxytocin and social functioning. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, *19*(2), 193–201. <https://doi.org/10.31887/dcns.2017.19.2/cjones>
- Jurek, B., & Neumann, I. D. (2018). The oxytocin receptor: From intracellular signaling to behavior. *Physiological Reviews*, *98*(3), 1805–1908. <https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2017>
- Ko, J. (2017). Neuroanatomical substrates of rodent social behavior: The medial prefrontal cortex and its projection patterns. In *Frontiers in Neural Circuits* (Vol. 11, p. 41). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fncir.2017.00041>
- Kwak, S., Joo, W. T., Youm, Y., & Chey, J. (2018). Social brain volume is associated with in-degree social network size among older adults. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *285*(1871). <https://doi.org/10.1098/rspb.2017.2708>
- Leong, K. C., Cox, S., King, C., Becker, H., & Reichel, C. M. (2018). Oxytocin and Rodent Models of Addiction. In *International Review of Neurobiology* (Vol. 140, pp. 201–247). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.irn.2018.07.007>
- Lin, Y. T., & Hsu, K. Sen. (2018). Oxytocin receptor signaling in the hippocampus: Role in regulating neuronal excitability, network oscillatory activity, synaptic

- plasticity and social memory. In *Progress in Neurobiology* (Vol. 171, pp. 1–14). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2018.10.003>
- Love, T. M. (2014). Oxytocin, motivation and the role of dopamine. In *Pharmacology Biochemistry and Behavior* (Vol. 119, pp. 49–60). <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2013.06.011>
- Lukas, M., Bredewold, R., Neumann, I. D., & Veenema, A. H. (2010). Maternal separation interferes with developmental changes in brain vasopressin and oxytocin receptor binding in male rats. *Neuropharmacology*, *58*(1), 78–87. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2009.06.020>
- McGregor, I. S., & Bowen, M. T. (2012). Breaking the loop: Oxytocin as a potential treatment for drug addiction. In *Hormones and Behavior* (Vol. 61, Issue 3, pp. 331–339). *Horm Behav.* <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2011.12.001>
- Meaney, M. J. (2001). Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. In *Annual Review of Neuroscience* (Vol. 24, Issue 1, pp. 1161–1192). Annual Reviews. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.1161>
- Meng, Q., Li, N., Han, X., Shao, F., & Wang, W. (2010). Peri-adolescence isolation rearing alters social behavior and nociception in rats. *Neuroscience Letters*, *480*(1), 25–29. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.05.067>
- Meng, Q., Li, N., Han, X., Shao, F., & Wang, W. (2011). Effects of adolescent social isolation on the expression of brain-derived neurotrophic factors in the forebrain. *European Journal of Pharmacology*, *650*(1), 229–232. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.09.061>
- Moore, C. L. (1984). Maternal contributions to the development of masculine sexual behavior in laboratory rats. *Developmental Psychobiology*, *17*(4), 347–356. <https://doi.org/10.1002/DEV.420170403>
- Mumtaz, F., Khan, M. I., Zubair, M., & Dehpour, A. R. (2018). Neurobiology and consequences of social isolation stress in animal model—A comprehensive

- review. In *Biomedicine and Pharmacotherapy* (Vol. 105, pp. 1205–1222). Elsevier Masson SAS. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.05.086>
- Neumann, I. D. (2008). Brain oxytocin: A key regulator of emotional and social behaviours in both females and males. In *Journal of Neuroendocrinology* (Vol. 20, Issue 6, pp. 858–865). J Neuroendocrinol. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2008.01726.x>
- Nishi, M. (2020). Effects of Early-Life Stress on the Brain and Behaviors: Implications of Early Maternal Separation in Rodents. In *International journal of molecular sciences* (Vol. 21, Issue 19). NLM (Medline). <https://doi.org/10.3390/ijms21197212>
- Nishi, M., Horii-Hayashi, N., & Sasagawa, T. (2014). Effects of early life adverse experiences on the brain: Implications from maternal separation models in rodents. In *Frontiers in Neuroscience* (Vol. 8, Issue 8 JUN). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00166>
- Numan, M. (2015). Neurobiology of Social Behavior. In *Neurobiology of Social Behavior* (1st Editio). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/c2011-0-06892-8>
- Nylander, I., & Roman, E. (2013). Is the rodent maternal separation model a valid and effective model for studies on the early-life impact on ethanol consumption? In *Psychopharmacology* (Vol. 229, Issue 4, pp. 555–569). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00213-013-3217-3>
- Olf, M., Frijling, J. L., Kubzansky, L. D., Bradley, B., Ellenbogen, M. A., Cardoso, C., Bartz, J. A., Yee, J. R., & van Zuiden, M. (2013). The role of oxytocin in social bonding, stress regulation and mental health: An update on the moderating effects of context and interindividual differences. *Psychoneuroendocrinology*, 38(9), 1883–1894. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2013.06.019>
- Pais, A. B., Pais, A. C., Elmisurati, G., Park, S. H., Miles, M. F., & Wolstenholme, J. T. (2019). A novel neighbor housing environment enhances social interaction and rescues cognitive deficits from social isolation in adolescence. *Brain*

*Sciences*, 9(12). <https://doi.org/10.3390/brainsci9120336>

Paxinos, G., & Watson, C. (2013). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates : Hard Cover Edition*. 466.

Portero-Tresserra, M., Gracia-Rubio, I., Cantacorps, L., Pozo, O. J., Gómez-Gómez, A., Pastor, A., López-Arnau, R., de la Torre, R., & Valverde, O. (2018). Maternal separation increases alcohol-drinking behaviour and reduces endocannabinoid levels in the mouse striatum and prefrontal cortex. *European Neuropsychopharmacology*, 28(4), 499–512. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2018.02.003>

Rees, S. L., Lovic, V., & Fleming, A. S. (2009). Maternal Behavior. In *The Behavior of the Laboratory Rat: A Handbook with Tests*. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780195162851.003.0027>

Romano-López, A., Méndez-Díaz, M., Ruiz-Contreras, A. E., Carrisoza, R., & Prospéro-García, O. (2012). Maternal separation and proclivity for ethanol intake: A potential role of the endocannabinoid system in rats. *Neuroscience*, 223, 296–304. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.07.071>

Salzmann, C., Otis, M., Long, H., Roberge, C., Gallo-Payet, N., & Walker, C. D. (2004). Inhibition of steroidogenic response to adrenocorticotropin by leptin: Implications for the adrenal response to maternal separation in neonatal rats. *Endocrinology*, 145(4), 1810–1822. <https://doi.org/10.1210/en.2003-1514>

Sandi, C., & Haller, J. (2015). Stress and the social brain: Behavioural effects and neurobiological mechanisms. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 16, Issue 5, pp. 290–304). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrn3918>

Spear, L. P. (2000). The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 24(4), 417–463. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(00\)00014-2](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(00)00014-2)

Sue Carter, C. (2018). Oxytocin and human evolution. In *Current Topics in Behavioral Neurosciences* (Vol. 35, pp. 291–319). Springer Verlag.

[https://doi.org/10.1007/7854\\_2017\\_18](https://doi.org/10.1007/7854_2017_18)

Tanaka, K., Osako, Y., & Yuri, K. (2010). Juvenile social experience regulates central neuropeptides relevant to emotional and social behaviors.

*Neuroscience*, 166(4), 1036–1042.

<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.01.029>

Tangney, J. P., Baumeister, R. F., & Boone, A. L. (2004). High Self-Control Predicts Good Adjustment, Less Pathology, Better Grades, and Interpersonal Success. *Journal of Personality*, 72(2), 271–324.

<https://doi.org/10.1111/j.0022-3506.2004.00263.x>

Tata, D. A. (2012). Maternal separation as a model of early stress: Effects on aspects of emotional behavior and neuroendocrine function. *Hellenic Journal of Psychology*, 9(1), 84–101.

[https://www.researchgate.net/publication/273062075\\_Maternal\\_separation\\_as\\_a\\_model\\_of\\_early\\_stress\\_Effects\\_on\\_aspects\\_of\\_emotional\\_behavior\\_and\\_neuroendocrine\\_function](https://www.researchgate.net/publication/273062075_Maternal_separation_as_a_model_of_early_stress_Effects_on_aspects_of_emotional_behavior_and_neuroendocrine_function)

Tribollet, E., Charpak, S., Schmidt, A., Dubois-Dauphin, M., & Dreifuss, J. J. (1989). Appearance and transient expression of oxytocin receptors in fetal, infant, and peripubertal rat brain studied by autoradiography and electrophysiology. *Journal of Neuroscience*, 9(5), 1764–1773.

<https://doi.org/10.1523/jneurosci.09-05-01764.1989>

Vanderschuren, L. J. M. J., Achterberg, E. J. M., & Trezza, V. (2016). The neurobiology of social play and its rewarding value in rats. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 70, pp. 86–105). Elsevier Ltd.

<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.07.025>

Walker, S. C., & McGlone, F. P. (2013). The social brain: Neurobiological basis of affiliative behaviours and psychological well-being. In *Neuropeptides* (Vol. 47, Issue 6, pp. 379–393). Neuropeptides.

<https://doi.org/10.1016/j.npep.2013.10.008>

Xu, P., Chen, A., Li, Y., Xing, X., & Lu, H. (2019). Medial prefrontal cortex in

neurological diseases. In *Physiological Genomics* (Vol. 51, Issue 9, pp. 432–442). American Physiological Society.

<https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00006.2019>