



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



FACULTAD DE
CIENCIAS

UDELAR | fcien.edu.uy

Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas

Subárea Neurociencias

**Bases neurales y endócrinas de la flexibilidad
comportamental de ratas madres**

MSc. Marcela Ferreño Vázquez

Orientadora

Natalia Uriarte Bálsamo

-Montevideo, 2018-

Índice

Agradecimientos	5
Abreviaturas	6
Resumen	7
Introducción y antecedentes	9
Comportamiento y motivación maternal	9
Flexibilidad comportamental durante el período posparto	12
Dinámica temporal del comportamiento maternal	12
Flexibilidad comportamental durante la superposición de camadas.....	13
Bases neurales y endócrinas del comportamiento maternal	15
Plasticidad en el Sistema Nervioso durante la maternidad	20
Plasticidad neural y matriz extracelular	22
Planteamiento del problema e hipótesis	25
Hipótesis 1	26
Hipótesis 2	27
Abordaje Metodológico	28
Capítulo I. Flexibilidad comportamental en ratas madres: modelo de camadas superpuestas	29
Experimento 1. Determinación del valor de incentivo de las crías neonatas relativo al de las crías juveniles para madres con camadas superpuestas.....	30
HIPÓTESIS 1A	31
OBJETIVO GENERAL	31
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
MATERIALES Y MÉTODOS	31
RESULTADOS	33
CONCLUSIONES	35
Experimento 2. Determinación de la influencia hormonal y de la experiencia maternal previa sobre el comportamiento de madres con camadas superpuestas.	36

HIPÓTESIS 1B	36
OBJETIVO GENERAL	37
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
MATERIALES Y MÉTODOS	37
RESULTADOS	40
CONCLUSIONES	45
Experimento 3. Rol del APOm en la adaptación comportamental de las madres en CS	46
HIPÓTESIS 1C	47
OBJETIVO GENERAL	47
OBJETIVO ESPECÍFICO	47
MATERIALES Y MÉTODOS	47
RESULTADOS	49
CONCLUSIÓN	55
Capítulo II. Plasticidad estructural del sistema nervioso central en ratas madres	56
Experimento 4. Caracterización de cambios estructurales en áreas neurales involucradas en la expresión y flexibilidad del comportamiento maternal en hembras primíparas	58
HIPÓTESIS 2A	59
OBJETIVO GENERAL	59
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	59
MATERIALES Y MÉTODOS	59
RESULTADOS	62
CONCLUSIÓN	67
Experimento 5. Influencia de los esteroides gonadales en la organización de las PNN	68
OBJETIVO GENERAL	68
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	68

MATERIALES Y MÉTODOS	69
RESULTADOS	69
CONCLUSIÓN	70
Experimento 6. Caracterización de la reorganización de la matriz extracelular en el APOm de madres con CS que difieren en la exposición hormonal de la gestación y en la experiencia maternal previa.	71
HIPOTESIS 2B	72
OBJETIVO GENERAL	72
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	72
MATERIALES Y MÉTODOS	73
RESULTADOS	74
CONCLUSIÓN	75
Discusión general	77
Principales resultados y conclusiones de esta tesis.....	77
Factores que modulan la motivación maternal en hembras con CS	78
El APOm y la respuesta maternal de las madres con CS.....	82
Rol funcional de APOm	82
Cambios estructurales en APOm.....	85
Perspectivas	91
ANEXO 1	93
Artículo: Incentive value of newborn pups relative to juveniles for mother rats raising overlapping litters	93
ANEXO 2	99
Evaluación del valor de incentivo de crías juveniles para hembras en posparto tardío	99
ANEXO 3	104
Valor de incentivo de crías juveniles propias vs ajenas para hembras en posparto tardío.	104
ANEXO 4	107

Artículo enviado a la revista <i>Journal of Neuroendocrinology</i>	107
Bibliografía general	134

Agradecimientos

A PEDECIBA por aceptarme en el programa

A mi tutora Dra. Natalia Uriarte por la generosidad, el cariño y la confianza que depositó en mí para realizar este trabajo.

Al Dr. Javier Nogueira del Departamento de Histología y Embriología de la Facultad de Medicina (UdelaR), junto a quién se pensaron y llevaron adelante parte importante los experimentos aquí presentados y que fue co-tutor de este trabajo aunque formalmente no fue posible así ingresarlo ante el programa PEDECIBA.

A la Dra. Daniella Agrati por su generosidad, por abrirme las puertas y enseñarme tanto durante todo este tiempo, así como por los aportes realizados a la tesis.

A la Dra. Annabel Ferreira por ser siempre inspiradora.

A todas mis compañeras de laboratorio que colaboraron con los experimentos, dando apoyo y contención siempre: María José Zuluaga, Gabriella Marín, Vanessa Athaíde.

A Héctor Rodríguez, Guillermo García y Diego Serantes por cuidar de los animales.

A la Dra. Gabriela Bedó de la sección Genética por permitirme utilizar las instalaciones de su laboratorio.

A los miembros del tribunal: Mariana Pereira, Patricia Lagos y Luciana Benedetto por aceptar evaluar este trabajo.

A mi familia y amigos que acompañaron todo este proceso.

A José y Mauro por el amor, la contención y la paciencia durante todo este camino, sin ellos no lo hubiera logrado.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por el apoyo financiero.

Abreviaturas

APOm – área preóptica media

ATV – área tegmental ventral

BNST – bed núcleo de la stría terminal

CM – comportamiento maternal

CPF – corteza pre frontal

CS – capas superpuestas

DA – dopamina

HVM – hipotálamo ventro medial

NAcc – núcleo accumbens

OXT - oxitocina

PNN – peri neuronal nets

PV – pálido ventral

SNC – sistema nervioso central

Resumen

Las bases neurales y endócrinas del comportamiento maternal han sido ampliamente estudiadas, sin embargo aún queda mucho por conocer; en particular, acerca de cuáles son los mecanismos que subyacen a las adaptaciones comportamentales exhibidas por las madres en diferentes contextos ambientales, sociales y temporales. El comportamiento maternal en la rata es flexible, permitiendo a las madres adaptar sus respuestas a las características de las crías, a sus propias necesidades internas y al contexto. En este sentido, el área preóptica media (APOm) es un área de integración hormonal y sensorial, clave en la orquestación de las respuestas maternas y podría jugar un papel importante en el control de estas adaptaciones. Siguiendo esta línea de pensamiento resulta interesante profundizar en los fenómenos de neuro plasticidad que ocurren durante la maternidad, particularmente en esta área. Esta tesis busca contribuir al conocimiento de las bases endócrinas y neurobiológicas del comportamiento maternal y de su flexibilidad y dinámica durante el período posparto así como aportar a la caracterización de los cambios estructurales del sistema nervioso y los mecanismos subyacentes. Con este fin, el trabajo experimental realizado se basa principalmente en dos modelos: 1) Ratas madres a lo largo de la gestación y período posparto y 2) Ratas madres que crían a camadas superpuestas, y fue llevado a cabo siguiendo dos grandes estrategias experimentales: 1) Análisis comportamental luego de a) manipular el perfil endócrino y de experiencia maternal previa y b) inactivación selectiva y transitoria del APOm y 2) Caracterización histológica de los cambios en la organización de la matriz extracelular en forma de redes peri neuronales (PNN) como indicador de cambios en la plasticidad estructural del APOm.

Las principales conclusiones obtenidas en esta tesis son:

. Para las madres que crían a camadas superpuestas, tanto las crías neonatas como las juveniles tienen valor de incentivo. Además, el valor de incentivo, o motivacional de las crías en este contexto no depende únicamente de las características de las crías, sino que también del estado endócrino de la hembra y la experiencia maternal previa.

. En este sentido, tanto los factores endócrinos como la experiencia maternal previa son necesarios para la adaptación comportamental exhibida por las madres que crían en camadas superpuestas. Sin embargo, la exposición hormonal asociada con la segunda

gestación y el parto es esencial para una expresión adecuada del comportamiento y la motivación maternas.

. Para las madres con camadas superpuestas, la integridad funcional del APOm es necesaria para la ejecución del comportamiento maternal hacia las crías neonatas y para la asignación de un mayor valor de incentivo de las mismas respecto a las crías juveniles.

. El APOm presenta PNN no descritas hasta la fecha, con un alto grado de organización en hembras gestantes y lactantes. Esta alta organización es máxima previo al parto, luego del cual comienza una desorganización estructural hacia el período de destete, denotando una fuerte dependencia de las mismas del perfil hormonal de la gestación.

. Al igual que en la expresión comportamental y motivacional en las madres con camadas superpuestas, si bien los factores endócrinos y la experiencia maternal reciente modulan la organización de las PNN, sin embargo la exposición hormonal de la gestación reciente es un factor crucial para la misma.

. La adaptación comportamental de las madres en un contexto de crianza desafiante, así como la re estructuración de áreas clave en el control de la maternidad, dependen de la interacción compleja de factores endócrinos, la experiencia maternal y las características de las crías. Sin embargo los cambios endócrinos asociados a la gestación resultan cruciales para la adecuación maternal ante una composición familiar más compleja.

Introducción y antecedentes

Comportamiento y motivación maternal

La parentalidad es una de las experiencias naturales más dramáticas experimentada por los mamíferos. Si bien en este grupo hay especies en que los padres exhiben cuidados parentales, en su gran mayoría quienes cuidan principalmente a las crías son sus madres, por lo que la transición a la maternidad ha motivado la mayoría de las investigaciones en esta área. Los cambios neuroendócrinos que ocurren durante la gestación, el parto y el posparto, junto a la experiencia adquirida durante la interacción con las crías desde el primer contacto, modifican el sistema nervioso. Como resultado, las hembras muestran altos niveles de respuesta maternal junto a cambios en la motivación, cognición, estado de ánimo y respuesta al estrés.

El establecimiento del vínculo entre la madre y sus crías es clave para la supervivencia de las mismas, pero además es muy reforzador y placentero para la madre. La calidad de los cuidados recibidos es fundamental para el desarrollo de las crías y determina no solo su supervivencia, sino cómo serán esas crías en su adultez, sus características emocionales y sus características como madres en el caso de las hembras (F. Champagne, Francis, Mar, & Meaney, 2003; A. S. Fleming et al., 2002; Francis, Diorio, Liu, & Meaney, 1999; Gonzalez, Lovic, Ward, Wainwright, & Fleming, 2001; V. Lovic, Gonzalez, & Fleming, 2001).

Las respuestas o comportamientos exhibidos por una hembra que promueven y sostienen el crecimiento y el desarrollo de su descendencia, constituyen un conjunto de respuestas denominadas comportamiento maternal. La capacidad de responder maternalmente está presente desde la pubertad hasta la adultez, sin embargo, la intensidad e incidencia de estas respuestas maternales se acentúan en el parto (Bridges, 2015). Llegado este momento, la madre muestra un gran interés por las crías así como por el líquido amniótico junto a una mayor motivación para responder positivamente a los neonatos (A. Fleming, Cheung, Myhal, & Kessler, 1989; Grota & Eik-Nes, 1967; Kristal, DiPirro, & Thompson, 2012; Magnusson & Fleming, 1995).

Estos cuidados suponen un repertorio de conductas integradas dirigidas a la alimentación, estimulación y protección de la prole. Incluyen actividades de

contacto directo (amamantamiento, lamidos, acarreos) y actividades de cuidado indirecto (construcción del nido, agresión a intrusos, incremento de la ingesta) (J. Rosenblatt, 1969). Para que esto ocurra, en el periparto las hembras experimentan cambios afectivos con respecto a las crías que pasan de ser estímulos aversivos a estímulos atractivos y fuertes reforzadores¹ positivos que promueven comportamientos de búsqueda y aproximación por parte de las madres (A. Fleming, et al., 1989; A. Fleming, Ruble, Flett, & Shaul, 1988; C.H Kinsley & Bridges, 1990; J. Rosenblatt, 1975).

La respuesta maternal hacia las crías es modulada por el contexto (M Pereira & Ferreira, 2015). En este sentido, las características del comportamiento maternal dependen de los estímulos en el entorno inmediato al nido e implican respuestas motoras que son reguladas por alteraciones en su estado motivacional, las interacciones entre los factores biológicos que lo subyacen y la experiencia (D Agrati, Fernández-Guasti, & Ferreira, 2008; D Agrati, Fernandez-Guasti, Ferreño, & Ferreira, 2011).

El comportamiento maternal es altamente motivado² y las crías poseen un gran valor de incentivo³ para las nuevas madres (A. Fleming, Korsmit, & Deller, 1994). En este sentido, las señales provenientes de las crías adquieren propiedades reforzadoras y esto ha sido evidenciado en numerosos modelos motivacionales. Las ratas lactantes desarrollan preferencia por un ambiente asociado a crías sobre uno neutro, mientras que las vírgenes no-maternales no (A. Fleming, et al., 1994; Wansaw, Pereira, & Morrell, 2008) y prefieren un ambiente asociado a crías que a cocaína (B. Mattson & Morrell, 2005; B. J. Mattson, Williams, Rosenblatt, & Morrell, 2001). A su vez, en modelos de condicionamiento operante las madres aprenden a apretar una palanca para tener acceso

¹ El término reforzador refiere a que la interacción con estos estímulos incrementa la probabilidad de ocurrencia de subsiguientes comportamientos (Salamone & Correa, 2002; Wise, 2004).

² Se entiende por motivación maternal a la inversión de tiempo y energía para aproximarse e interactuar con las crías. Se pone en evidencia no solo a través de los cuidados directos de las crías, sino a través del uso de estrategias flexibles para acceder a las mismas. A su vez, el estado motivacional de los individuos se refleja en respuestas endócrinas y autónomas que dan cuenta de los mismos (A Ferreira, 2008; Smotherman, 2004).

³ El valor de incentivo de un estímulo se asocia al concepto de motivación y es entendido como la propiedad de un estímulo de promover la aproximación e interacción o el alejamiento del mismo (Berridge, 2004; Bindra, 1972).

a las crías (Lee, Clancy, & Fleming, 2000). Este comportamiento es insaciable, ya que si se siguen proporcionando crías las madres pueden apretar la palanca para obtenerlas durante horas (Wilsoncroft, 1969). Además, durante el estro posparto en el que las madres también se encuentran sexualmente motivadas, en una prueba de preferencia por crías o un macho sexualmente activo, las madres prefieren a las crías sobre el macho y realizan esfuerzo por obtenerlas (D. Agrati et al., 2016; Ferreño, Uriarte, Zuluaga, Ferreira, & Agrati, 2018).

Las características del comportamiento maternal y la motivación maternal son moduladas tanto por el perfil endócrino del parto, como por la experiencia maternal previa. En este sentido, el comportamiento maternal exhibido por hembras sensibilizadas⁴ que no experimentaron los cambios endócrinos de la gestación tardía y el parto, es deficiente en comparación con el exhibido por hembras lactantes (A. Fleming & J. Rosenblatt, 1974; J. Lonstein, Wagner, & De Vries, 1999; M Pereira & Ferreira, 2006), al igual que son deficientes en su motivación maternal. Las hembras sensibilizadas muestran una menor preferencia por un ambiente previamente asociado a crías (A. Fleming, et al., 1994) y aprietan menos veces una palanca para tener acceso a ellas (Lee, et al., 2000) que las hembras lactantes. Además las hembras sensibilizadas sexualmente activas cuidan de las crías en la caja nido, pero prefieren al macho más que a las crías en una prueba de preferencia (D Agrati, Fernández-Guasti, et al., 2008). Por otro lado, hembras vírgenes con tratamiento que simula la gestación tardía y el parto (Bridges, 1984; Orpen, Furman, Wong, & Fleming, 1987) así como la administración de estradiol en el APOm (área clave en el circuito maternal, ver abajo) (S. Fahrbach & D. Pfaff, 1986; M Numan, Rosenblatt, & Komisaruk, 1977) facilitan la inducción y mejoran la expresión del comportamiento maternal de hembras sensibilizadas.

Por otro lado, la experiencia maternal previa, es decir la asociada a partos previos aumenta el valor de incentivo de las crías (D Agrati, Fernández-Guasti, et al., 2008; D. Agrati, et al., 2016) y facilita la expresión y mejora la calidad de la respuesta maternal de las ratas en posteriores experiencias maternas (D Agrati, Fernández-Guasti, et al., 2008; Bridges, 1975; Bridges et al., 1997; A. Fleming & Sarker, 1990; Lee, et al., 2000;

⁴ El proceso de sensibilización maternal consiste en inducir comportamiento maternal en animales que no atravesaron los cambios endócrinos de la gestación y el parto a través de la exposición continua a crías. Este modelo es muy útil para evaluar varios aspectos de la maternidad de forma relativamente independiente del perfil hormonal que la caracteriza (Bridges, Zarrow, Gandelman, & Denenberg, 1972; A. Fleming & J. Rosenblatt, 1974).

Orpen, et al., 1987). La dependencia de la estimulación hormonal se reduce con la experiencia maternal; el comportamiento maternal de las ratas multíparas es menos dependiente de la regulación hormonal que las hembras que son madres por primera vez (Anderson, Grattan, van der Ancker, & Bridges, 2006; Moltz, Levin, & Leon, 1969; Moltz & Wiener, 1966). Esto sugiere la existencia de una interacción entre el perfil endócrino de la gestación y el parto y la experiencia maternal previa.

Flexibilidad comportamental durante el período posparto

Clásicamente, el comportamiento maternal de la rata se consideraba una conducta estereotipada que declina a lo largo del posparto, principalmente por la disminución en la estimulación sensorial de las crías, que a medida que crecen, ganan independencia nutricional y fisiológica (Grotta & Ader, 1969; Reisbick, Rosenblatt, & Mayer, 1975; J. Rosenblatt, 1969). Sin embargo, recientemente la comunidad científica comenzó a prestar atención a la complejidad de este comportamiento y su modulación no únicamente por la estimulación sensorial de las crías, sino además por procesos motivacionales, afectivos y cognitivos (C. Kinsley et al., 2006; B. Leuner, Fredericks, Nealer, & Albin-Brooks, 2014; J. Lonstein, 2007; J. S. Lonstein, 2005; V Lovic & Fleming, 2004; J. L. Pawluski, Walker, & Galea, 2006; M Pereira & Ferreira, 2006, 2015).

Evidencia reciente indica que el comportamiento maternal es flexible y se adapta a las necesidades y características cambiantes de las crías y del ambiente, así como al estado neuroendócrino de la madre durante el transcurso del posparto (Grieb, Holschbach, & Lonstein, 2018; Wansaw, et al., 2008). La versatilidad exhibida por las madres se pone en evidencia en situaciones aún más complejas y en relación a otros estímulos biológicamente relevantes. Así, son capaces de co-expresar el comportamiento maternal y sexual durante el estro posparto (D Agrati, Fernández-Guasti, et al., 2008; D Agrati, et al., 2011) y el balance en esta co-expresión a su vez depende de la experiencia reproductiva y de la interacción con las crías (D Agrati, Fernández-Guasti, et al., 2008; D. Agrati, et al., 2016).

Dinámica temporal del comportamiento maternal

La expresión del comportamiento maternal es máxima luego el parto y cambia a medida que transcurre el posparto. A medida que la lactancia progresa y las crías crecen, las

madres disminuyen el tiempo de contacto con la camada, así como la duración y la frecuencia de amamantamiento, lamidos y acarreos, llegando a niveles mínimos en el período próximo al destete (Grotta & Ader, 1969; M Pereira, Seip, & Morrell, 2008; Reisbick, et al., 1975). Estos cambios en la respuesta maternal a lo largo del posparto, pueden asociarse a cambios de la motivación maternal subyacente. En este sentido, utilizando modelos específicos para evaluar motivación como la prueba de condicionamiento a lugar, se observa que mientras que en el posparto temprano las madres prefieren un ambiente asociado a crías frente a uno neutro (A. Fleming, et al., 1994; Wansaw, et al., 2008), en el posparto tardío no muestran preferencia entre ambos compartimientos cuando tienen la posibilidad de elegir por un compartimiento asociado a neonatos o juveniles en la misma prueba (Wansaw, et al., 2008).

Estos cambios se interpretan frecuentemente como un proceso pasivo durante el cual la motivación y el comportamiento maternal “declinan” hasta niveles mínimos, determinando el destete de los juveniles. Otra posible explicación para este fenómeno es que los cambios observados en la intensidad del comportamiento maternal no corresponden a una “extinción” a lo largo del tiempo, sino a un ajuste de este comportamiento a las necesidades de las crías a medida que éstas crecen y ganan independencia (M Pereira & Morrell, 2009). Además, tanto la naturaleza cambiante de las crías, como el momento en el posparto de la madre se acompañan; así a medida que las crías se desarrollan, presumiblemente impactan de manera diferente en el estado fisiológico y endócrino de las madres conforme avanza el posparto (Wansaw, et al., 2008). En este sentido, estudios recientes indican que durante el posparto tardío, los niveles de comportamiento maternal hacia neonatos son inferiores que los exhibidos hacia los mismos durante el posparto temprano (Grieb, et al., 2018), evidenciando la interacción entre el estado del posparto de las madres y el desarrollo de las crías.

Flexibilidad comportamental durante la superposición de camadas.

Otra situación en la cual se evidencia la plasticidad en el repertorio maternal es en el contexto reproductivo de madres que crían a sucesivas camadas superpuestas. Las ratas hembras son capaces de quedar preñadas en el estro posparto y gestar a una camada, mientras crían a la otra (Gilbert, Burgoon, Sullivan, & Adler, 1983; Gilbert, Pelchat, & Adler, 1980). Finalmente, al nacimiento de su segunda camada, la madre criará a dos camadas de diferentes edades (las provenientes de su primer parto y los recién nacidos)

con diferentes necesidades y demandas. Notablemente las hembras son capaces de responder adecuadamente a estas diferentes necesidades de las crías neonatas y juveniles que difieren en edad, características sensoriales, demandas fisiológicas y capacidades comportamentales (presencia o no de pelo, movilidad, capacidad de termorregulación y excreción de desechos), por lo que las madres deben modificar su comportamiento para adecuarse a las distintas necesidades de las mismas (N Uriarte, Ferreira, Rosa, & Lucion, 2009; N Uriarte, Ferreira, Rosa, Sebben, & Lucion, 2008). Las ratas con camadas superpuestas logran esta adaptación, cuidando en forma diferente a crías neonatas y crías juveniles, dirigiendo mayores cuidados a los individuos neonatos pero permitiendo el contacto con los juveniles (Uriarte et al., 2008). Podríamos pensar que esta mayor atención a los neonatos no se debe a una pérdida de interés en los juveniles, si no que el valor de incentivo de los neonatos relativo al de los juveniles es mayor debido a sus mayores demandas, lo que conduce a direccionar mayores cuidados a las mismas.

De forma interesante, en este modelo de camadas superpuestas las hembras tienen el perfil hormonal del posparto temprano como resultado de su segundo parto, sin embargo se encuentran criando y lactando a su primera camada en posparto tardío. ¿Qué factores median la adaptación comportamental de estas madres con camadas superpuestas? Podríamos sugerir que, en el caso de las camadas superpuestas los cambios endócrinos de la gestación tardía y del parto son necesarios para re-sensibilizar a las madres a estímulos de los neonatos y permitir una adaptación comportamental hacia ambos tipos de crías. Por otro lado, como se indicó anteriormente la experiencia maternal previa es otro factor que afecta la motivación y el comportamiento maternal (D Agrati, Fernández-Guasti, et al., 2008; Bridges, 1975; Bridges, et al., 1997; A. Fleming & Sarker, 1990; Lee, et al., 2000; Orpen, et al., 1987). Resulta interesante elucidar cómo interactúan los factores hormonales de la gestación tardía y el parto junto a la experiencia maternal previa para dar como resultado esta adaptación comportamental en las madres con camadas superpuestas. En línea con esto, sería interesante también observar si esta adaptación comportamental se manifiesta en la motivación maternal hacia ambos tipos de crías.

Bases neurales y endócrinas del comportamiento maternal

La exhibición inmediata de conductas maternas, así como el cambio de valor afectivo y de incentivo de las crías, depende en gran medida de los cambios endócrinos de la gestación y el parto, principalmente de las hormonas ováricas estrógenos y progestágenos (Mayer, Ahdieh, & Rosenblatt, 1990; J. Rosenblatt, 1969; J. S. Rosenblatt, Mayer, & Giordano, 1988).

En la rata, desde el inicio de la gestación los niveles de estrógenos son relativamente bajos desde la inseminación hasta el día 16 de gestación aproximadamente, después de lo cual se produce un aumento gradual hasta el parto. Poco después del parto, hay un breve aumento adicional durante el estro postparto (que conduce a la receptividad sexual ~9 h más tarde) y se mantienen bajos durante toda la lactancia (Bridges, 1990; Bridges, 2015). Los progestágenos aumentan gradualmente durante las dos primeras semanas de preñez, alcanza su punto máximo en la tercera semana de gestación y luego decae abruptamente previo al parto. Un alto nivel sostenido de progesterona es una de las características más notables del entorno endocrino de la gestación. Luego del parto, los progestágenos se elevan brevemente durante el estro posparto y se mantienen bajos durante los primeros 3 a 5 días, luego de lo cual comienzan a aumentar nuevamente y se mantienen elevados durante la segunda y tercer semana (Grotá & Eik-Nes, 1967; Hansen, Sodersten, & Eneroth, 1983; Pepe & Rothchild, 1974) (Fig. 1). Junto a estos esteroides gonadales, también se presentan cambios en hormonas peptídicas incluyendo prolactina, vasopresina y oxitocina. Los niveles de prolactina son altos en la gestación temprana y vuelven a elevarse previo al parto, para inmediatamente al parto volver a aumentar y mantenerse elevado con la estimulación de la succión durante el amamantamiento (Grattan, 2001). De forma similar los neuropéptidos hipotalámicos vasopresina y oxitocina se mantienen altos durante la lactancia (Bosch & Neumann, 2012). Estas fluctuaciones hormonales permiten la progresión de la gestación, preparan a la madre para responder maternalmente a sus crías luego del parto y sostienen la lactancia luego del mismo (Bridges, 2015; Grattan, 2001; Grotá & Eik-Nes, 1967; Hansen, et al., 1983).

Estos cambios endócrinos promueven el comportamiento maternal a través de actuar en áreas específicas del SNC (Bridges, 2015). En este sentido, varias áreas del cerebro son

claves para la expresión del comportamiento maternal, en particular el área preóptica media (APOm) (para una extensa revisión ver (Dulac, O'Connell, & Wu, 2014)

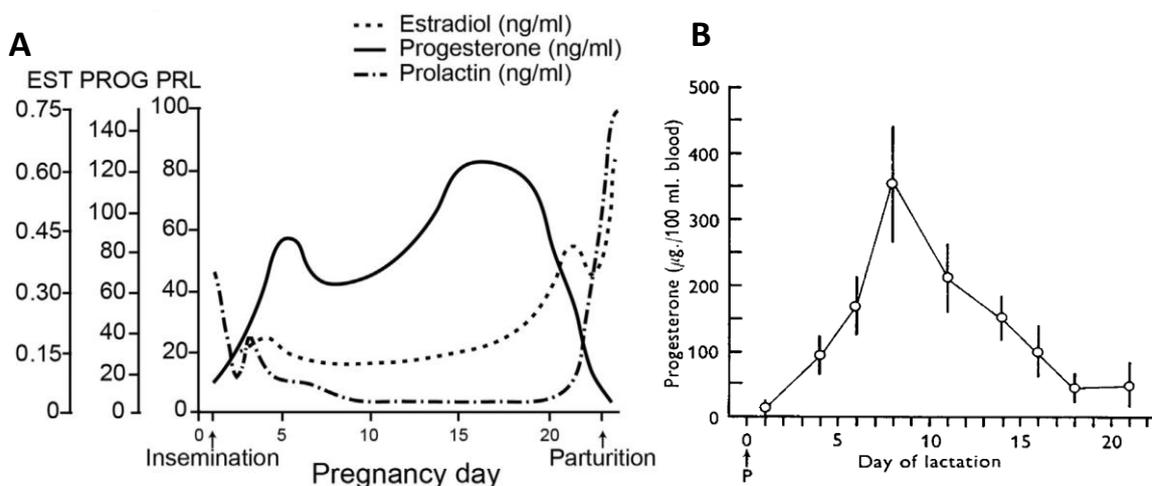


Figura 1. Representación esquemática de los niveles circulantes en plasma de estradiol, progesterona y prolactina durante la gestación en ratas (tomado de (J Lonstein, Pereira, Morrell, & Marler, 2014) (A). En B, representación de los niveles de progesterona en plasma durante la lactancia en ratas (tomado de (Tomogane, Ota, & Yokoyama, 1969).

Se ha propuesto que esta área es un sitio fundamental a través de la cual las hormonas estimulan el inicio del comportamiento maternal así como un área integradora del comportamiento maternal en curso (Bridges, et al., 1997; S. Fahrbach & D. Pfaff, 1986; Matthews-Felton, Corodimas, Rosenblatt, & Morrell, 1995; M Numan, 1974; M. Numan, 1994; M. Numan & Numan, 1997). En ella converge información relacionada a las crías desde múltiples modalidades sensoriales (A. Fleming et al., 1993; A. S. Fleming & J. S. Rosenblatt, 1974; Magnusson & Fleming, 1995; M Numan, 2006; M. Numan & Numan, 1995; R. Simerly & Swanson, 1988). A su vez esta área estimula al sistema dopaminérgico mesolímbico para modular la respuesta maternal motivacional (M. Numan, 2012; Michael Numan et al., 2005; M Numan & Stolzenberg, 2009; D Stolzenberg & Numan, 2011). En suma, actúa como un centro de integración primaria, orquestando la respuesta maternal.

Lesiones en el APOm incluyendo tanto eléctricas como excitotóxicas (Lee, et al., 2000; M Numan, 1974; M. Numan, Corodimas, Numan, Factor, & Piers, 1988), desafereciación (M. Numan & Callahan, 1980; J Terkel, Bridges, & Sawyer, 1979), inactivación química (Arrati, Carmona, Dominguez, Beyer, & Rosenblatt, 2006; M Pereira & Morrell, 2009) y la remoción genética de células específicas dentro de esta

área (Wu, Autry, Bergan, Watabe-Uchida, & Dulac, 2014) afectan tanto en la expresión como en el mantenimiento del comportamiento maternal.

Esta estructura para-hipotalámica heterogénea que contiene células que expresan varios neurotransmisores (GABA, dopamina, glutamato) y neuropéptidos (R. B. Simerly, Gorski, & Swanson, 1986), así como diversos receptores, particularmente receptores de estrógenos (Fang, Yamaguchi, Song, Tritsch, & Lin, 2018; Rainbow, Parsons, MacLusky, & McEwen, 1982). La administración de estrógenos en esta área, facilita la expresión del comportamiento maternal (S. E. Fahrbach & D. W. Pfaff, 1986; M Numan, et al., 1977). Se ha propuesto que este efecto facilitador se debe a que la estimulación hormonal permite a las neuronas de esta área responder a las señales de las crías con conductas maternas (S. Fahrbach & D. Pfaff, 1986; M Numan & Stolzenberg, 2009).

La integración hormonal y sensorial que ocurre en el APOm se traduce en una respuesta través de sus proyecciones eferentes al área tegmental ventral (ATV), con la consecuente liberación de dopamina (DA) en el núcleo accumbens (NAcc) (esta vía constituye el sistema dopaminérgico mesolímbico⁵) y también directamente al NAcc (M Numan et al., 2005b; M Numan et al., 2005a). El NAcc también recibe aferencias corticales desde la corteza pre-frontal (CPF) y límbicas desde la amígdala e hipocampo (Olazábal et al., 2013a). La principal salida del NAcc es hacia el pálido ventral (VP) que es quién habilita la respuesta motora (Fig. 2).

En este sentido, lesiones en estas áreas afectan severamente la expresión de los componentes activos del comportamiento maternal (Li & Fleming, 2003; Michael Numan, et al., 2005; M. Numan & Smith, 1984; M Numan, Stolzenberg, Dellevegne, Correnti, & Numan, 2009);(Jacobson, Terkel, Gorski, & Sawyer, 1980; J Terkel, et al., 1979).

⁵ El sistema dopaminérgico mesolímbico se ha propuesto como un sistema general de motivación que subyace a varias motivaciones primarias como la sexual, alimentaria y maternal (Salamone & Correa, 2002).

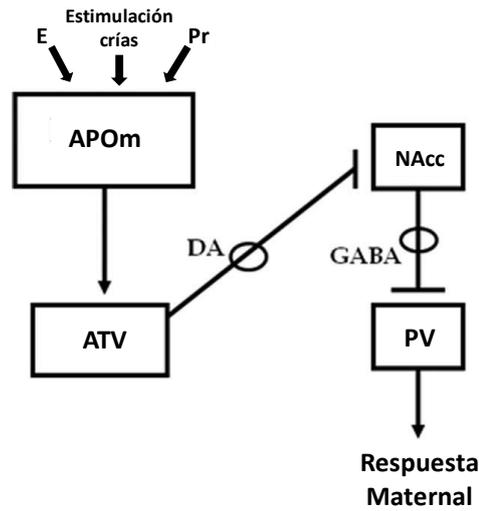


Figura 2. Modelo neural parcial que muestra como el APOm recibe la estimulación hormonal y sensorial de las crías e influencia los componentes proactivos del comportamiento maternal a través de interactuar con el sistema dopaminérgico mesolímbico. El APOm activa al área tegmental ventral (ATV) que a su vez envía proyecciones dopaminérgicas al NAcc deprimiendo su actividad. La depresión de la capacidad de respuesta de NAcc libera al PV de la inhibición GABAérgica derivada del NA, permitiendo al PV dar la respuesta maternal. Se propone que un PV completamente activo es necesario para la ocurrencia de respuestas proactivas voluntarias de la madre. Las líneas que finalizan en flecha indican excitación y las que finalizan en una barra indican inhibición. E, estradiol; OT, oxitocina; Pr, prolactina. Modificado de (M Numan & Stolzenberg, 2009).

Se ha propuesto que en hembras primíparas las hormonas de la gestación inicialmente activan circuitos críticos para la expresión del comportamiento maternal al actuar directamente sobre el APOm y sus eferencias, incluyendo al sistema dopaminérgico mesolímbico (B Leuner & Gould, 2010; Matthews-Felton, et al., 1995; M. Numan, 1994), e indirectamente al estimular el aumento de receptores de oxitocina (OT) en el ATV y APOm (Pedersen, Caldwell, Walker, Ayers, & Mason, 1994). Sin embargo, es aceptado en la literatura que la influencia hormonal es transitoria. Una vez que el comportamiento maternal se establece, el mantenimiento del mismo ya no dependería de las hormonas, sino principalmente de la interacción con las crías (M Numan & Insel, 2003; J. Rosenblatt, 1975; J. Terkel & Rosenblatt, 1971). Se ha propuesto que este cambio en el control del comportamiento maternal a lo largo del posparto se debe, en parte, a modificaciones funcionales en el APOm que se adapta a lo largo del posparto a los cambios endócrinos internos y a los cambios del estímulo externo, las crías (Benedetto, Pereira, Ferreira, & Torterolo, 2014; Olazábal et al., 2013b; M Pereira & Morrell, 2009; Wansaw, et al., 2008).

Muchos de los cambios a nivel del SNC que ocurren durante la maternidad, afectan la motivación y el comportamiento maternal en subsiguientes experiencias reproductivas. Así, la experiencia reproductiva previa reduce la latencia de sensibilización en hembras no-parturientas, mejora el comportamiento maternal de hembras sensibilizadas ciclantes y gestantes (A. Fleming & Sarker, 1990; Orpen, et al., 1987) y aumenta el valor de incentivo de las crías para madres en un segundo parto (D Agrati, Fernández-Guasti, et al., 2008). Este incremento de la motivación maternal y el fortalecimiento de la expresión del comportamiento maternal se ha asociado a cambios en los circuitos neuronales subyacentes (Bridges, 2016). Por ejemplo, las hembras lactantes que tuvieron al menos una experiencia maternal previa, son menos vulnerables que las hembras primíparas a los efectos disruptivos sobre el comportamiento maternal de lesiones en el bulbo olfatorio (Schwartz & Rowe, 1976) o en el APOm (Lee, et al., 2000; Perrin, Meurisse, & Lévy, 2007).

Esta evidencia ha conducido a proponer que la experiencia maternal y reproductiva reorganiza el circuito maternal generando cambios funcionales dentro del mismo. Específicamente, se ha demostrado en hembras primíparas que el rol del APOm cambia a lo largo del posparto, de un papel facilitador necesario para el inicio y la expresión de la conducta maternal en el posparto temprano, a un papel inhibitor durante el posparto tardío permitiendo que el comportamiento de la madre esté en sintonía con las necesidades en desarrollo de las crías (M Pereira & Morrell, 2009). Sin embargo, desconocemos el rol de esta área clave en la adaptación y flexibilidad comportamental de las madres con crías de diferentes edades que poseen diferentes demandas fisiológicas. También la CPFm adecúa su funcionamiento a lo largo del posparto. Mientras que durante el posparto temprano está implicada principalmente la CPFm infralímbica, hacia el posparto tardío cobra relevancia la subregión prelímbica (M Pereira & J Morrell, 2011). Estas transiciones neurales probablemente dependan de procesos de neuroplasticidad⁶ en estructuras corticales como estriado-límbicas que cambian con la experiencia continua de interacción con las crías.

⁶El término neuroplasticidad abarca los vastos cambios que ocurren en todos los componentes del SNC a lo largo de la vida de un individuo en respuesta a estímulos intrínsecos y extrínsecos (Cramer et al., 2011) Estos cambios incluyen tanto modificaciones funcionales como estructurales y se consideran fundamentales para el desarrollo (Berardi, Sale, & Maffei, 2015). Los cambios inducidos por la neuroplasticidad se han descrito a diferentes niveles del SNC:

Plasticidad en el Sistema Nervioso durante la maternidad

Sin dudas, la maternidad es uno de los períodos de mayor plasticidad neural en el ciclo de vida de las hembras adultas. Los cambios neuroendócrinos preparan a la nueva madre para responder adecuadamente a sus crías y al nuevo contexto y ocurren a varios niveles en el SN (Hillner, Jacobs, Fischer, & Aigner, 2014; M Pereira & Ferreira, 2015). Durante el período periparto el cerebro materno experimenta múltiples cambios a diferentes niveles de su organización.

Se ha postulado que alteraciones en la expresión de genes y síntesis de proteínas dentro de estructuras discretas del circuito cortico-limbico-estriatal contribuyen a la constelación de adaptaciones neurales y comportamentales de las madres (Akbari et al., 2013; A. Fleming & Korsmit, 1996; D. Stolzenberg & Champagne, 2016; D. Stolzenberg, Stevens, & Rissmans, 2014; Zhao, Saul, Driessen, & Gammie, 2012).

Esta expresión alterada de genes y consecuentemente sus proteínas es inicialmente modulada por las hormonas de la gestación tardía y el parto, especialmente estradiol, prolactina, oxitocina y progesterona que promueven varias formas de plasticidad, incluyendo cambios en la morfología neuronal, identidad del neurotransmisor, actividad electrofisiológica, conectividad, neurogénesis y función sináptica en muchas regiones incluidas la CPF, APOm, amígdala, septum lateral, bulbo olfatorio e hipocampo (Bridges, 2016; Hillner, et al., 2014). Pero no ocurren únicamente cambios a nivel neuronal, también otras células nerviosas que modulan el funcionamiento neuronal experimentan cambios plásticos como los astrocitos, oligodendrocitos y microglía (R.E. Featherstone, Fleming, & Go, 2000; Haim et al., 2017; Maheu, Akbari, & Fleming, 2009).

Las regiones que son particularmente afectadas por estas modificaciones asociadas al periparto, son áreas vinculadas a las adaptaciones comportamentales de la maternidad. En este sentido, se ha reportado un incremento del volumen de neuronas en el APOm que indica un aumento en la actividad celular, el día previo al parto –día 21 de gestación-, seguido de una disminución gradual desde el posparto temprano –día 5 de lactancia- y retorno a su tamaño pre preñez en el posparto tardío –día 21 de lactancia-

molecular, celular y de redes, todos los cuales están estrechamente entrelazados (ver revisión (Cohen, Quarta, Bravi, Granato, & Minciacchi, 2017).

(Keyser-Marcus et al., 2001). También el número de receptores de estrógeno y oxitocina aumentan en el APOm y otras regiones del SNC vinculadas al “circuito maternal” en el posparto temprano (Bale, Pedersen, & Dorsa, 1996; Meurisse et al., 2005). Por otra parte, los astrocitos que modulan la función neuronal aumentan en el APOm previo al parto y comienzan a disminuir al comienzo de la lactancia (Gómora-Arrati et al., 2010). Un incremento en espinas dendríticas se ha reportado en el APOm de hembras el día del parto en relación a vírgenes en los distintos estadios del ciclo (Frankfurt, Salas-Ramirez, Friedman, & Luine, 2011).

Durante el periparto se observan cambios estructurales y funcionales en otros núcleos del hipotálamo. Por ejemplo en el núcleo supraóptico, se observa un aumento del número de dendritas, así como de contactos sinápticos axo-axónicos como axo-dendríticos en el día 10 de lactancia y un aumento en su volumen (El Majdoubiet, Poulain, & Theodosis, 1997; Hatton & Tweedle, 1981). En el hipocampo se ha descrito una disminución en la proliferación celular en hembras lactantes en el día 1 posparto en comparación con vírgenes en diestro y esta diferencia ya no se observa en el día 14 de lactancia (Darnaudery et al., 2007). De forma interesante, esta disminución en la proliferación celular es dependiente de la interacción con las crías (B. Leuner, Miresco, Noiman, & Gould, 2007). Por otra parte se observa un aumento en la densidad de espinas dendríticas en el hipocampo de hembras en el periparto, seguido de una disminución gradual con el avance de la lactancia (C. Kinsley, et al., 2006). Se ha postulado que estos cambios neurales subyacen algunos de los componentes maternos directos hacia las crías y no directos (como por ejemplo la construcción del nido) y de otros comportamientos que soportan el comportamiento materno como la búsqueda de alimento o la memoria asociativa (C. Kinsley, et al., 2006).

En suma, los eventos hormonales de la gestación y el parto promueven la remodelación estructural (es decir, cambios en la morfología neuronal y el número de conexiones sinápticas funcionales) de estructuras cerebrales discretas, la reorganización de las vías cerebrales y la activación de los sistemas neuroquímicos (Hillerer, et al., 2014). Estos cambios neuronales median en consecuencia la mayor atracción y capacidad de respuesta de la madre a las claves y señales sensoriales de las crías permitiendo de esta forma un reconocimiento rápido de las crías y comenzando un ciclo de refuerzo positivo en el vínculo madre-cría (A. Fleming, et al., 1993; A. Fleming, et al., 1989).

Plasticidad neural y matriz extracelular

La matriz extracelular que rodea las neuronas y sus conexiones, podría ser uno de los componentes encargados del mantenimiento y regulación de la morfología neuronal así como de las complejas interacciones entre neuronas y moléculas (Levy, Omar, & Koleske, 2014), que finalmente dan como resultado la expresión de la motivación y comportamiento maternal. En este sentido, la matriz extracelular representa un 10-20% del volumen cerebral y los glucosaminoglicanos juegan un rol estructural crucial en esta matriz, siendo el ácido hialurónico su mayor componente.

En el SNC se distinguen tres tipos de matriz extracelular: membrana basal, matriz difusa y matriz condensada. La membrana basal es una capa similar a una lámina constituida por colágeno y laminina que forma un borde entre el tejido endotelial y las células fundamentales del SNC. La matriz difusa está presente en los intersticios neurales del parénquima cerebral, mientras que a la matriz condensada se la denomina redes perineuronales (PNN por su sigla en inglés *perineuronal nets*) y rodea ciertas poblaciones neuronales. Los últimos dos tipos de matriz, son ricas en proteoglicanos (Testa, Prochiantz, & Di Nardo, 2018).

Las PNN son estructuras bastante heterogéneas que envuelven los cuerpos celulares, segmentos iniciales de algunos axones y dendritas dejando huecos que permiten la formación de contactos sinápticos. Los componentes de la matriz extracelular se condensan a través de interacciones específicas alrededor de ciertas neuronas para formar las PNN. Así, el esqueleto de las PNN está formado por largas cadenas de glucosaminoglicanos a los que se unen proteoglicanos a través de proteínas link. Estos proteoglicanos, a su vez están conectados entre sí por proteínas de la familia de las tenascinas. Si bien estas numerosas interacciones forman una malla condensada, las PNN son dinámicas a través de modulaciones; en particular por las metaloproteasas secretadas localmente por la propia neurona, pero también por astrocitos y oligodendrocitos que degradan los proteoglicanos (Testa, et al., 2018).

La técnica histológica más común para detectar PNN consiste en el uso de la lectina *Wisteria floribunda aglutinina* (WFA), que reconoce la N-acetilgalactosamina de las cadenas de azúcar presentes en la mayoría de los PNN (> 80%). La histología de WFA ha revelado PNN en varias áreas del cerebro, principalmente en la corteza

cerebral, estructuras límbicas y ganglios basales las PNN rodean neuronas principalmente interneuronas parvalbúminas+ de descarga rápida (fast-spiking), que son neuronas muy activas que necesitan un microentorno especializado (Celio, 1993; Härtig, Brauer, & Brückner, 1992; Nakamura et al., 2009; Seeger, Lüth, Winkelmann, & Brauer, 1996).

Estas PNN conforman una estructura extracelular que se ha asociado a cambios plásticos y neuroprotección en el SNC a través de regular la estructura y estabilidad sináptica, la dinámica de las espinas dendríticas y la homeostasis iónica (Levy, et al., 2014; Wang & Fawcett, 2012).

La formación de las PNN se detecta relativamente tarde en el desarrollo de los individuos cuando el circuito sináptico del SNC se establece y madura (Celio, 1993). Tradicionalmente, se ha observado que las PNN se regulan en forma dinámica durante el desarrollo, a diferencia de lo que ocurre en la edad adulta cuando se consideran estructuras estables a menos que sean perturbadas por enfermedad o lesiones en regiones como la médula espinal (Fawcett, 2015). En contraste con la información acumulada con respecto a la formación de las PNN durante el desarrollo, se sabe relativamente menos acerca de si las PNN se vuelven activas en respuesta a la actividad neuronal en el cerebro adulto, y si es así, cómo la remodelación de las PNN puede estar involucrada en la plasticidad neuronal.

En este sentido, dado que las PNN limitan la plasticidad en el cerebro adulto se ha propuesto que participan en los procesos de almacenamiento de memoria. Se ha demostrado que en el condicionamiento por choque eléctrico, si bien la eliminación de las PNN no afecta la respuesta de miedo normal, evita la consolidación de la memoria de miedo (Gogolla, Caroni, Lüthi, & Herry, 2009). De forma similar, en el hipocampo se ha mostrado que las PNN son necesarias para convertir la memoria de corto a largo plazo en el aprendizaje de miedo (Hylín, Orsi, Moore, & Dash, 2013; Kochlamazashvili et al., 2010). En la CPFm, su remoción afecta la memoria a largo plazo así como la memoria de condicionamiento del miedo (Hylín, et al., 2013) y también disolverlas resulta en la promoción de la plasticidad en la corteza auditiva que previene la consolidación y el aprendizaje del miedo (Banerjee et al., 2017). Las PNN también limitan la habilidad de aprender. Por ejemplo, su disolución en la corteza peririnal mejora la capacidad de reconocimiento de objetos nuevos (Romberg et al., 2013).

Además, el vínculo entre las PNN y el aprendizaje y la memoria ha llevado a investigaciones sobre su papel en los comportamientos de adicción. Se ha sugerido que en animales adultos, la degradación de estas redes particularmente en la amígdala borraría la memoria persistente a drogas a través de abrir una nueva ventana de plasticidad (Xue et al., 2014). Cuando las PNN son completamente degradadas en la CPFm, el tono inhibitorio disminuye y la memoria inducida por la administración de cocaína se interrumpe (Slaker et al., 2015). Resultados similares se han encontrado en otras regiones relacionadas a los procesos de recompensa (Blacktop, Todd, & Sorg, 2017).

Más allá de la evidencia creciente que vincula a las PNN en diversos procesos de plasticidad neural, hasta el momento en adultos no se ha reportado que estas estructuras cambien asociadas al despliegue de comportamientos a los cuales subyacen motivaciones primarias, no aprendidas y que implican un remodelado drástico en el SNC, como es la maternidad. Por otra parte, si bien se postula que la gestación, el parto y la lactancia constituyen períodos de gran plasticidad en el ciclo de vida de las hembras, se desconoce cómo es la expresión de las PNN en regiones involucradas en la expresión del comportamiento maternal durante estos períodos, y si modificaciones en la expresión de las PNN conforman parte de los cambios estructurales de larga duración asociados a la experiencia reproductiva.

Planteamiento del problema e hipótesis

El comportamiento maternal es flexible, permitiendo a las madres adaptar su respuesta a las características de las crías, a sus propias necesidades internas y al contexto. Es esperable entonces, que la maternidad sea un período en la vida de los mamíferos de gran plasticidad en el sistema nervioso. Clásicamente en roedores se ha abordado el comportamiento maternal y su variabilidad en hembras con una camada homogénea de crías (A. Fleming & J. Rosenblatt, 1974; J. Rosenblatt, 1969, 1975; J. Terkel & Rosenblatt, 1971). Sin embargo, pocos estudios abordan este comportamiento en composiciones familiares más complejas (Branchi & Alleva, 2006; N. Uriarte et al., 2014; N Uriarte, et al., 2008). En esta línea, resulta sumamente interesante entender cómo el SNC regula esta flexibilidad comportamental permitiendo que las madres cuiden diferencialmente a crías con diferentes necesidades y demandas. Así, en este trabajo tratamos de comprender los cambios en el SNC que subyacen esta expresión comportamental y la relevancia que tienen el perfil endócrino de la gestación reciente y la experiencia maternal previa para dar como resultado el comportamiento y la motivación característicos de las madres con camadas superpuestas.

Luego del parto las hembras desarrollan una fuerte motivación maternal para interactuar con las crías que adquieren valor de incentivo para las madres, sin embargo este valor varía según el contexto, las necesidades de las crías, la experiencia maternal previa y el perfil endócrino de las hembras (M Pereira & Ferreira, 2015). Sobre esta base resulta interesante evaluar el valor de incentivo relativo de diferentes tipos de crías para las madres en este contexto de crianza de camadas superpuestas. A su vez, nos preguntamos cómo interactúa la experiencia maternal previa con el perfil hormonal para dar como resultado esta flexibilidad comportamental. Debido a que se ha propuesto que el APO es protagonista en integrar las señales sensoriales provenientes de las crías y el medio interno orquestando la respuesta maternal en forma dinámica (M Pereira & J Morrell, 2011) nos preguntamos si esta área posee un rol fundamental en la adaptación comportamental de madres con camadas superpuestas.

Por otra parte, el cerebro maternal experimenta cambios plásticos significativos tanto a nivel funcional como estructural como consecuencia del perfil endócrino propio de este período y de la experiencia maternal (M. Pereira, 2016). Estas modificaciones en el circuito maternal son muchas veces duraderas, condicionado las respuestas maternas

en futuras experiencias reproductivas (Bridges, 2016). En este sentido la matriz extracelular, particularmente las PNN han sido implicadas en varios procesos de plasticidad en el SNC principalmente durante el período posnatal. Sin embargo pocos estudios se han realizado durante la adultez (Gogolla, et al., 2009); (Hylín, et al., 2013; Kochlamazashvili, et al., 2010); (Banerjee, et al., 2017); (Xue, et al., 2014); Slaker et al., 2015; Blacktop, Todd, & Sorg, 2017) y hasta donde sabemos, no se ha explorado la organización de estas estructuras extracelulares en condiciones fisiológicas cambiantes. En esta línea de pensamiento, los cambios endócrinos vinculados a la gestación y el parto, y las diversas experiencias maternas adquiridas durante este período, tornan a la hembra un modelo natural de gran relevancia etológica para explorar los cambios plásticos que puede experimentar el SNC durante la adultez.

En base a lo expuesto, este proyecto propone las siguientes hipótesis:

Hipótesis 1

La adaptación del comportamiento maternal exhibido por las ratas madres con camadas superpuestas depende de la interacción entre el perfil hormonal de la gestación y la experiencia maternal previa, así como de la actividad de áreas del SNC involucradas en el procesamiento de las características de las crías.

Hip.1A: La asignación diferencial de cuidados maternos de las madres que crían camadas superpuestas, refleja una adaptación a las características y necesidades específicas de los dos tipos de crías.

Hip.1B: La expresión adecuada del comportamiento y motivación maternal hacia dos tipos de crías durante la superposición de camadas, depende de la exposición hormonal de la gestación inmediatamente previa, así como de la experiencia maternal obtenida durante la lactancia de la primera camada.

Hip. 1C: La adaptación del comportamiento y de la motivación maternal en madres con camadas superpuestas es mediada por el APOm.

Hipótesis 2

Los cambios a nivel del circuito maternal de las ratas madres que subyacen la flexibilidad comportamental, se vinculan a modificaciones estructurales en la matriz extracelular, que son fuertemente moduladas por el perfil hormonal de la gestación y la experiencia maternal previa.

Hip. 2A: La organización de la matriz extracelular en forma de PNN cambia a lo largo del proceso de gestación y lactancia en áreas del circuito maternal, asociado a los cambios hormonales que subyacen el ciclo reproductivo.

Hip. 2B: La experiencia reproductiva modifica de forma duradera la expresión de las PNN, evidenciándose este efecto en los subsiguientes ciclos reproductivos de las hembras.

Abordaje Metodológico

La rata lactante es un excelente modelo para estudiar los fenómenos de flexibilidad comportamental y plasticidad del sistema nervioso ya que durante la maternidad estos ocurren naturalmente en forma fisiológica. Esta etapa además posee una gran relevancia biológica ya que el comportamiento maternal es indispensable para asegurar la continuidad de la especie. Por otra parte, el ciclo de gestación, parto y posparto que supone cambios significativos a nivel comportamental, fisiológico, celular y molecular tiene lugar en relativamente poco tiempo lo cual facilita el abordaje experimental. Finalmente, existe un gran cuerpo de conocimiento sobre las bases neurales y endócrinas, fundamentalmente del inicio del comportamiento maternal mientras que en otros momentos del posparto y en diferentes contextos, queda aún mucho por explorar.

En base a esto, este trabajo se formuló con dos grandes abordajes metodológicos que se ordenan en dos capítulos descritos a continuación. En el Capítulo I, exploramos factores que median la flexibilidad comportamental así como el rol del APOm en ratas madre en el modelo de camadas superpuestas (CS). Evaluamos el comportamiento de hembras con CS, manipulando su perfil endócrino y su experiencia maternal previa, y multíparas con camadas simples en pruebas específicas que nos permiten medir conductas de cuidado hacia las crías así como su valor de incentivo o motivacional. Además evaluamos la funcionalidad del APOm mediante su inactivación transitoria sobre el comportamiento y la motivación maternal. Este cuerpo de experimentos fue realizado en las instalaciones del Laboratorio de Experimentación Animal (LEA) de la Facultad de Ciencias (UdelaR).

En el segundo capítulo, exploramos la plasticidad estructural en el SNC durante el ciclo reproductivo de la hembra, haciendo foco en la maternidad. Evaluamos cambios en las redes perineuronales (PNN) mediante técnicas citoquímicas en el SNC de hembras, ciclantes vírgenes y pos lactantes; gestantes y lactantes primíparas; lactantes multíparas con camada simple y camadas superpuestas. Estos experimentos fueron realizados en colaboración con el Dr. Javier Nogueira, del Departamento de Histología y Embriología de la Facultad de Medicina (UdelaR).

CAPÍTULO I

Flexibilidad comportamental en ratas madres: Modelo de camadas superpuestas

Como se mencionó en la introducción general, lejos de ser una conducta estereotipada y rígida, el comportamiento maternal es flexible permitiendo a las madres adaptar su conducta a las necesidades cambiantes de las crías, a sus propias necesidades, su experiencia y al contexto. Esta flexibilidad comportamental es fuertemente evidenciada en las madres que crían en CS (Gilbert, et al., 1983). Esta conformación familiar que se observa frecuentemente en roedores (Calhoun, 1963), es posible reproducirla en condiciones de laboratorio y ha sido desarrollada por nuestro grupo de investigación (N Uriarte, et al., 2008). Notablemente las hembras son capaces de responder adecuadamente a estas diferentes necesidades de las crías neonatas y juveniles que difieren en edad, características sensoriales, demandas fisiológicas y capacidades comportamentales (N Uriarte, et al., 2009; N Uriarte, et al., 2008). Así, las madres con CS cuidan en forma diferente a crías neonatas y crías juveniles, dirigiendo mayores cuidados a los individuos neonatos pero permitiendo el contacto con los juveniles (Uriarte et al., 2009).

Los experimentos que componen este capítulo buscan ahondar en la comprensión de la flexibilidad comportamental de madres con CS a través de: a. explorar los aspectos motivacionales que acompañan esta expresión comportamental característica (Experimento 1), b. dilucidar la influencia de la experiencia hormonal de la segunda gestación y parto, así como la experiencia de maternidad previa en esta expresión (Experimento 2) y c. determinar cuál es el rol del APOm (área clave para la flexibilidad comportamental a lo largo del posparto) en esta adaptación comportamental y motivacional tan conspicua (Experimento 3).

Los resultados del Experimento 1 dieron lugar a la publicación: *Incentive value of newborn pups relative to juveniles for mother rats raising overlapping litters*. Ferreño M, Pose S, Agrati D, Zuluaga MJ, Ferreira A, Uriarte N. *Behavioural Processes*, 157, 2018, 333-336, ISSN 0376-6357, <https://doi.org/10.1016/j.beproc.2018.07.016>., que se adjunta en el ANEXO 1 de esta tesis.

Experimento 1

Determinación del valor de incentivo de las crías neonatas relativo al de las crías juveniles para madres con camadas superpuestas.

En este experimento evaluamos el valor de incentivo de las crías neonatas y juveniles para hembras con CS a través de medir el tiempo y esfuerzo invertidos junto ellas en una prueba de preferencia en Y. Otros paradigmas han sido utilizados para evaluarla motivación de las ratas madre por la búsqueda de un estímulo reforzador como las crías a través de cuantificarla respuesta operante de aprender a apretar una palanca para obtenerlas (Lee, et al., 2000; Wilsoncroft, 1969); o de analizar la preferencia a un lugar asociado a crías y/o cocaína, como el condicionamiento a lugar (B. Mattson & Morrell, 2005; B. J. Mattson, Williams, Rosenblatt, & Morrell, 2003; B. J. Mattson, et al., 2001; K. Seip & Morrell, 2007, 2009; Wansaw, et al., 2008). En ambos procedimientos, si las madres no pueden interactuar con las crías durante la fase de aprendizaje, el condicionamiento no se desarrolla (A. Fleming, et al., 1994; Lee, et al., 2000; Magnusson & Fleming, 1995). Por lo tanto, estos modelos están influenciados por procesos de aprendizaje y memoria y además la interacción con las crías incrementa su valor de incentivo (A. Ferreira, Agrati, Uriarte, Pereira, & Zuluaga, 2012).

En cambio, el modelo de laberinto en Y, nos permite evaluar la motivación primaria, no aprendida por estímulos reforzadores naturales (Salamone & Correa, 2002) como las crías. Además, no está afectada por la interacción física ya que los estímulos se encuentran detrás de una placa transparente perforada a través de la cual pueden ver, oler y escucharlas pero no tocarlas. Este modelo ha sido ampliamente utilizado en nuestro laboratorio (D Agrati, Fernández-Guasti, et al., 2008; D. Agrati, et al., 2016; Ferreño, et al., 2018; M Pereira & Ferreira, 2006).

Para explorar los aspectos motivacionales de la maternidad en las madres con este sistema de crianza (a partir de la hipótesis 1), se utilizaron 3 grupos de hembras experimentales: hembras multíparas en posparto temprano, con crías de 2-4 días de edad, hembras multíparas en posparto tardío, con crías de 22-24 días de edad y hembras con camadas superpuestas, con crías de 2-4 y 22-24 días de edad simultáneamente.

HIPÓTESIS 1A

La asignación diferencial de cuidados maternos directos de las madres que crían camadas superpuestas, refleja una adaptación a las características y necesidades específicas de los dos tipos de crías y no la falta de interés en las crías juveniles.

OBJETIVO GENERAL

Explorar aspectos motivacionales del comportamiento maternal de madres con camadas superpuestas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el valor de incentivo relativo de crías neonatas y crías juveniles para madres con camadas superpuestas en una prueba de preferencia.
2. Determinar si el valor de incentivo relativo de ambos tipos de crías para madres con CS es similar respecto a madres multíparas que crían solo a crías neonatas o solo a crías juveniles.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para cumplir con estos objetivos, evaluamos la preferencia hacia neonatos o juveniles en una prueba de preferencia en los siguientes grupos experimentales:

- Hembras multíparas en posparto temprano (MPTemp) con crías de 2-4 días de edad, N=8
- Hembras multíparas en posparto tardío (MPTard) con crías de 22-24 días de edad, N=12
- Hembras con camadas superpuestas (CS) con crías de 2-4 y 22-24 días de edad simultáneamente, N=14

Animales y obtención de los grupos experimentales

Se utilizaron ratas hembras y machos de la cepa Wistar (*Rattus norvegicus*) de aproximadamente 3 a 4 meses de edad y crías de 0 a 24 días de vida. Las ratas se alojaron en un cuarto con un ciclo de luz-oscuridad 12/12 h (las luces se encienden a las

3:30 AM), temperatura controlada (22 ± 1 °C) y humedad controlada (60%) en el Laboratorio de Experimentación Animal (LEA) de la Facultad de Ciencias.

Las hembras de todos los grupos experimentales recibieron el mismo tratamiento previo (seguimiento de ciclo estral, sincronización de preñez, alojamiento individual una semana antes del parto e igualación de camadas: 4 hembras y 4 machos). Este tratamiento también fue realizado para las hembras lactantes donantes no experimentales que proveyeron las crías para los grupos experimentales.

En el caso de las CS, las ratas gestantes convivieron con el mismo macho de la primera cópula desde una semana antes del primer parto. Al día siguiente al parto, se verificó la presencia de espermatozoides en el exudado vaginal, se retiró el macho y las camadas fueron unificadas. A los 21 días de edad, las crías juveniles fueron destetadas, excepto dos (un macho y una hembra) que fueron los juveniles de las CS.

En el caso de las hembras multíparas, las mismas fueron destetadas en el día 21 posparto de su primera lactancia y luego de la reanudación de la ciclicidad (generalmente una semana después del destete), fueron re preñadas. En el día 16 de su segunda gestación las hembras se alojaron individualmente y a partir del día 21 de gestación se chequeó la presencia de crías diariamente. La camada fue igualada a 4 hembras y 4 machos en el día 1 posparto.

En todos los grupos se sustituyó las crías propias por ajenas para la realización de las pruebas, en el caso de las CS fueron sustituidas por las crías de otras hembras del mismo grupo con edades pareadas.

Procedimiento experimental

Las pruebas se llevaron a cabo entre las 10:00 y 12:00 hs durante la fase de luz del ciclo luz/oscuridad.

Modelo de preferencia (D Agrati, Fernández-Guasti, et al., 2008; M Pereira & Ferreira, 2006).

El modelo consiste en un laberinto en forma de Y construido con acrílico transparente con 3 cámaras de igual tamaño (25 x 30 x 18 cm) al final de cada brazo (10 x 30 x 10 cm). Cada cámara presenta una división de acrílico transparente perforada, que permite

percibir los estímulos ubicados en ellas, sin permitir el contacto físico con los mismos. Los animales experimentales se ubicaron en el centro de un laberinto y pudieron explorar el modelo vacío por 15 min para habituarse. Posteriormente, se colocaron en dos de las cámaras los estímulos a evaluar de manera contrabalanceada, mientras que la tercera cámara permaneció vacía (cámara neutra). Durante 15 min se registró: tiempo de permanencia en cada cámara, exploración (número total de entradas a las cámaras + número de entradas a los brazos) y el número de comportamientos de acicalamiento e intentos de obtener acceso a los estímulos (mordeduras y arañazos de la pared divisoria). Las medidas de preferencia a utilizar incluyen: 1. el porcentaje de hembras en cada grupo que permanezca más del 50% del tiempo total en uno de los tres compartimientos, con la condición adicional de que este tiempo debe ser 25% mayor que el tiempo de permanencia en cualquier de los otros 2 compartimientos y 2. el porcentaje de tiempo total de la prueba en cada compartimiento.

Análisis estadístico

Los datos de comportamiento generalmente no siguen una distribución normal por lo que para su análisis se utilizaron métodos estadísticos no paramétricos (Siegel & Castellan, 1988). Los datos provenientes del mismo animal se compararon utilizando el análisis de Wilcoxon para muestras dependientes y la prueba de Friedman en el caso de más de dos grupos. Las comparaciones entre grupos independientes se realizaron mediante la prueba de U de Mann Whitney en el caso de 2 grupos y la prueba de Kruskal-Wallis en el caso de más de dos grupos.

RESULTADOS

Independientemente del estado hormonal o la composición de la camada, los tres grupos de hembras prefirieron los compartimientos donde se encontraban las crías tanto juveniles como neonatas, sobre el neutro. A su vez, el tiempo invertido en el compartimiento neutro no cambió entre los tres grupos ($H_{(34)}=2,98$, $p=NS$; Fig. 3A).

Como se esperaba, las hembras del grupo MPTemp. invirtieron más tiempo en el compartimiento de los neonatos que en el de juveniles ($T_{(8)}=1,0$, $p<0,05$), mientras que las hembras del grupo MPTard., si bien no exhiben diferencias significativas en el tiempo de permanencia junto a neonatos o juveniles, mostraron una disminución significativa en el compartimiento de los neonatos ($U_{(8,12)}=4,0$, $p<0,05$) y un aumento en

el compartimiento de los juveniles en comparación con las MPTemp ($U_{(8,12)}=18,0$, $p<0,05$, Fig. 3A).

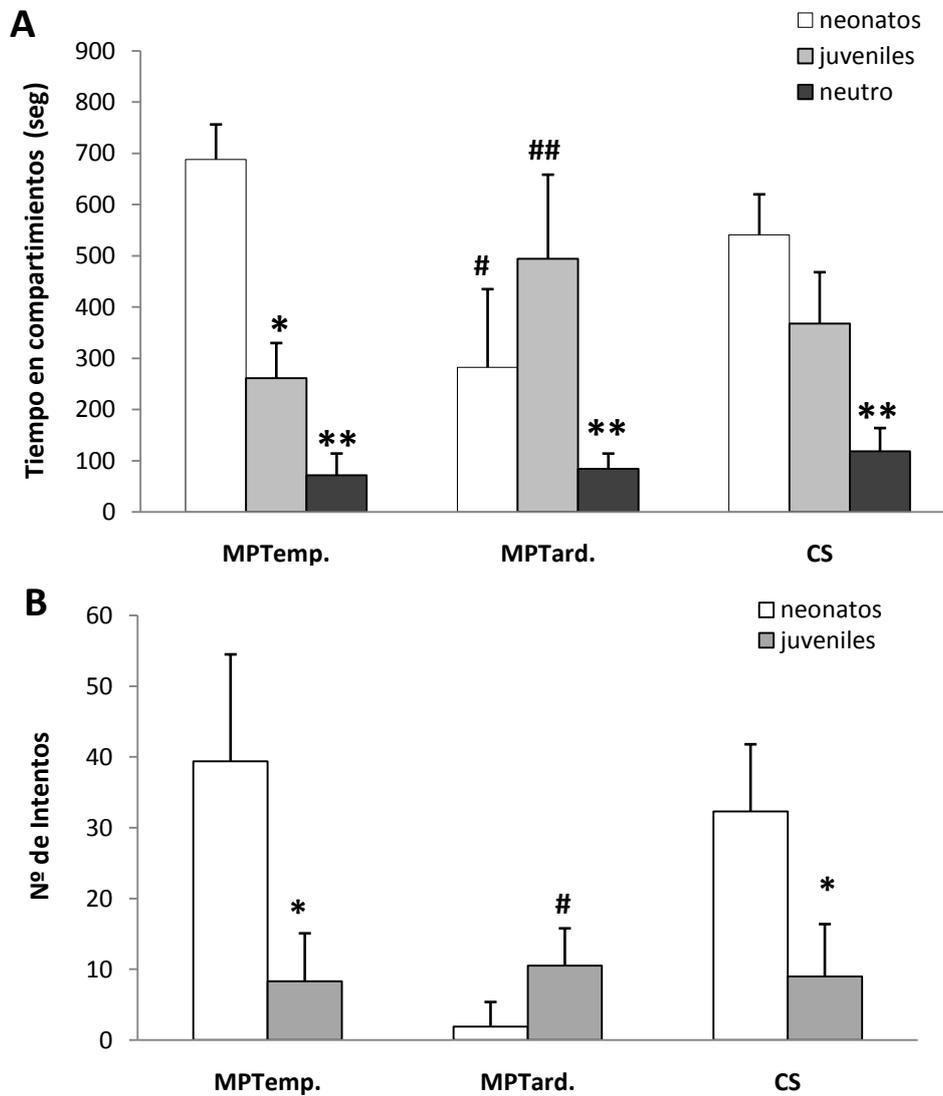


Figura 3.(A) Tiempo (seg) invertido en los compartimientos de las crías neonatas, juveniles y en el compartimiento neutro y (B) número de intentos por obtener los estímulos –neonatos o juveniles- de hembras multíparas en posparto temprano (MPTemp.), multíparas en posparto tardío (MPTard.) y hembras con camadas superpuestas (CS). * $p<0,05$ vs. neonatos, ** $p<0,01$ vs. neonatos y juveniles, prueba pareada de Wilcoxon; # $p<0,01$ vs. el mismo compartimiento de los grupos MPTemp. y CS y ## $p<0,01$ vs. el mismo compartimiento del grupo MPTemp., prueba U de Mann-Whitney. Los datos se expresan como medianas (RSIC).

En línea con esto, el 88% de las hembras MPTemp. prefirió a los neonatos, mientras que únicamente el 8% de las hembras MPTard. los prefirieron (Tabla1). De forma interesante, las hembras CS invirtieron una alta cantidad de tiempo junto a los neonatos y juveniles (Fig. 1A); lo que se reflejó en que la mayoría (71%) de las hembras no

preferió entre ambos estímulos reforzadores mientras solo el 29% prefirió a los neonatos (Tabla 1).

Sin embargo, las CS exhibieron un perfil único en la prueba de preferencia al compararlas con las MPTemp. Y MPTard., ya que el tiempo invertido en el compartimiento de los neonatos fue similar al de las MPTemp. ($U_{(8,14)}=28,0$, $p=NS$) y el tiempo invertido junto a los juveniles fue similar al mostrado por las hembras MPTard. ($U_{(12,14)}=50,5$, $p=NS$).

De forma interesante, observamos que a pesar de que las hembras CS invirtieron cantidades de tiempo similares entre los compartimientos de los estímulos reforzadores, realizaron significativamente más intentos por obtener a los neonatos que a los juveniles ($T_{(14)}=14,0$, $p<0,01$, Figura 3B) y esta conducta fue similar a la exhibida por las hembras MPTemp. ($U_{(8,14)}=45,5$, $p=NS$, Figura 3B).

Tabla 1. Preferencia de las hembras multíparas en posparto temprano (MPTemp), posparto tardío (MPTard) y con camadas superpuestas (CS) en la prueba de preferencia en el laberinto en Y.

<i>Preferencia</i>			
	<i>MPTemp.</i>	<i>MPTard.</i>	<i>CS</i>
neonatos	7/8	1/12	4/14
juveniles	0/8	4/12	0/14
no prefieren	1/8	7/12	10/14

Los datos se expresan como proporciones (número de hembras que muestran preferencia/número total).

CONCLUSIONES

Estos resultados sugieren que para las madres que crían en CS, tanto las crías neonatas como las juveniles tienen valor de incentivo para ellas. Sin embargo, el mayor esfuerzo de las madres por entrar en contacto con los neonatos sugiere un mayor valor de éstos.

Además, la falta de preferencia por neonatos de las hembras MPTard. indica que no solo las características de las crías sino que también el momento del posparto de la hembra modulan el valor de incentivo de las mismas.

Experimento 2

Determinación de la influencia hormonal y de la experiencia maternal previa sobre el comportamiento de madres con camadas superpuestas.

A partir del experimento anterior concluimos que si bien tanto las crías neonatas como las crías juveniles tienen valor de incentivo para las madres con CS, el valor de los neonatos es mayor. Los cambios endócrinos asociados a la gestación y al parto, así como la experiencia maternal previa, fortalecen la expresión del comportamiento y motivación maternal de las hembras a través de modificar la percepción y el valor de incentivo de las crías neonatas, entre otros procesos. Sin embargo desconocemos cuál es la importancia de estos eventos endócrinos y de la experiencia maternal previa en la flexibilidad comportamental y motivacional observada en madres que cuidan simultáneamente a dos camadas de diferentes edades, o con diferentes demandas, como ocurre en el modelo de CS.

Para determinar la influencia de la exposición hormonal de la gestación y el parto y de la experiencia maternal previa sobre el comportamiento maternal de las madres de camadas superpuestas, se diseñaron 3 grupos experimentales: hembras con CS que tienen experiencia junto a la primer camada y gestaron y parieron ambas (grupo control), hembras con CS que no tienen experiencia de crianza de su primer camada pero que gestaron y parieron ambas y hembras con CS que tienen experiencia con su primer camada pero no gestaron la segunda. De esta forma en relación al grupo control, un grupo no tiene experiencia maternal, CS exp-, mientras que el otro grupo no tiene los cambios asociados a la segunda gestación y parto, CS gest-.

A su vez, exploramos si la interacción maternal con ambos tipos de crías -neonatas y juveniles- modula el impacto de estos factores (experiencia maternal y perfil endócrino) sobre el comportamiento de las madres, evaluándolo en dos tiempos: a los 2 y a los 5 días posparto.

HIPÓTESIS 1B

La expresión adecuada del comportamiento y motivación maternal hacia dos tipos de crías durante la superposición de camadas, depende de la exposición hormonal de la

gestación inmediatamente previa, así como de la experiencia maternal obtenida durante la lactancia de la primera camada.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la influencia de la exposición hormonal ocurrida durante la gestación y el parto y de la experiencia maternal previa sobre la adaptación del comportamiento maternal hacia las crías neonatas y juveniles en ratas madres con camadas superpuestas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Comparar el comportamiento maternal, así como el valor de incentivo relativo de crías neonatas y juveniles para madres con CS que difieren en la exposición hormonal y experiencias reproductiva y maternal previas en el día 2 posparto.
2. Comparar el comportamiento maternal, así como el valor de incentivo relativo de crías neonatas y juveniles para madres con CS que difieren en la exposición hormonal y experiencias reproductiva y maternal previas en el día 5 posparto.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para determinar la influencia de la exposición hormonal de la gestación y el parto y de la experiencia maternal previa sobre la respuesta maternal de las madres de camadas superpuestas, se diseñaron 3 grupos experimentales que fueron evaluados en su comportamiento maternal y preferencia en el laberinto en Y frente a neonatos y juveniles.

Grupos experimentales (Ver esquema en Figura 4)

1. Camadas Superpuestas control, CS control, (control, n=9): ratas lactantes que gestaron y parieron la primer camada y fueron preñadas durante el estro posparto por lo que gestaron la segunda camada, mientras lactaban la primera. Finalmente, luego del segundo parto tienen simultáneamente en la caja nido, juveniles de la primera camada y neonatos de la segunda.

2. Camadas Superpuestas sin experiencia maternal, CS exp-, (ausencia de experiencia maternal con primera camada, n=9): ratas que fueron expuestas al perfil endócrino de la gestación y el parto de la primera y segunda camada pero que no tuvieron la experiencia maternal de cuidarla. A estas hembras se les retiraron las crías

de la primera camada al parto y se aparearon durante el estro posparto. Se introdujeron crías juveniles al parto de la segunda camada.

3. Camadas sin gestación ni parto, CS gest-, (ausencia de segunda gestación y parto, n=9): ratas lactantes que pasaron por la gestación y parto de la primera camada pero fueron apareadas con un macho estéril en el estro posparto. De esta forma, las hembras cuidaron la primera camada sin estar gestando una segunda como ocurre en el grupo CS control. En la fecha correspondiente a los partos del grupo CS se introdujeron crías neonatas provenientes de madres donantes, recambiándolas diariamente para evitar posibles cambios en el comportamiento maternal debido a déficits en la estimulación proveniente de las crías.

Animales y obtención de los grupos experimentales

Los animales utilizados y las condiciones de alojamiento fueron descritos en el Experimento 1.

En todos los grupos se sustituyó las crías propias por ajenas.

Dos días previos a la fecha estimada del segundo parto, todos los grupos de hembras quedaron con 2 crías juveniles (1 macho y 1 hembra). En el caso de las CS exp-, se introdujeron dos juveniles provenientes de madres donantes en fechas pareadas al primer parto de las hembras CS control.; en el caso de las CS control y CS gest- juveniles fueron intercambiados por juveniles de otras hembras del mismo grupo con edades pareadas. Se corroboró que las hembras en posparto tardío no eligen entre juveniles propios y ajenos para descartar diferencias entre los grupos en esta manipulación de sustitución de crías (ver ANEXO 3).

En el caso de los neonatos, en el grupo CS gest- al momento correspondiente al segundo parto se introdujeron 8 crías (4 hembras y 4 machos) provenientes de madres donantes y se recambiaron cada 12 horas por crías nuevas para mantener el estímulo de las crías en un nivel adecuado (M Pereira & Ferreira, 2006). En el caso de las CS control y CS exp- los neonatos fueron intercambiados por neonatos de otras hembras del mismo grupo con edades pareadas también cada 12 hs para equiparar la manipulación realizada en el grupo CS gest-.

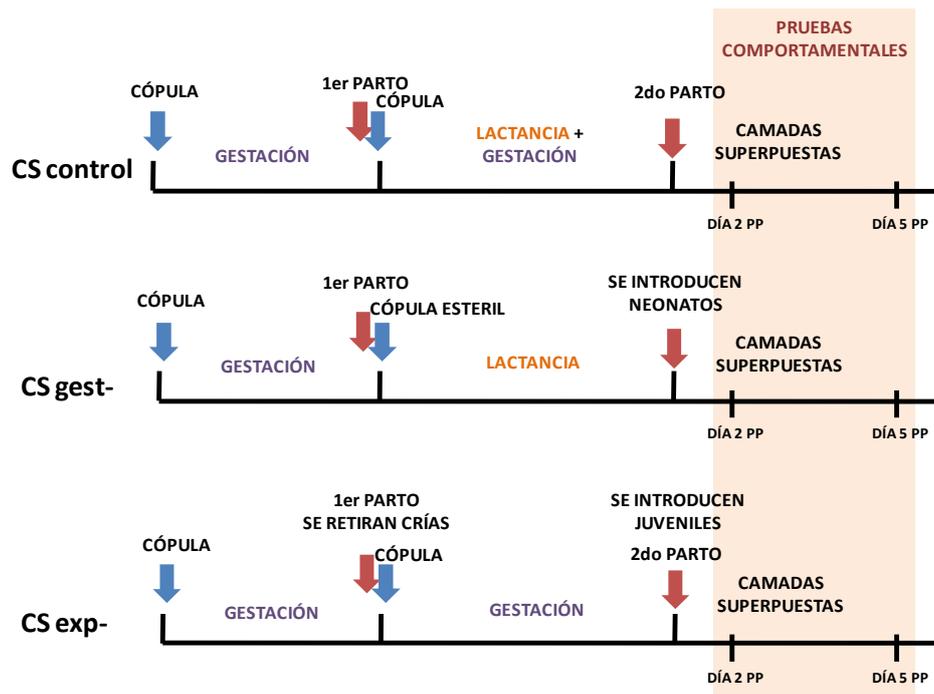


Figura 4. Procedimiento de obtención de los grupos experimentales utilizados en el Experimento 2.

Pruebas comportamentales

Prueba de comportamiento maternal (M Pereira & Ferreira, 2006)

Previo al comienzo de la prueba, se retiraron las crías de la caja materna y se reintrodujeron a los 10 min. Durante 15 minutos se registró el número de los siguientes comportamientos: acarreo, arreglo de las crías en el nido, lamidos corporales y ano genitales, olfateos y construcción del nido. A su vez, se registró el tiempo que la hembra permaneció en hovering over (sobre las crías realizando diversas conductas motoras), en postura de amamantamiento y fuera del nido, así como la latencia al primer acarreo, a la reunión de toda la camada en el nido, al primer hovering over y a la postura de amamantamiento.

Prueba de preferencia (M Pereira & Ferreira, 2006).

Se describe en el Experimento 1.

Procedimiento experimental

Luego de un período de separación de 10 min, se introdujeron las crías en la caja nido y se registró el comportamiento maternal durante 15 min. Al finalizar esta prueba, se

habituó a las hembras al laberinto por 10 min luego de lo cual se introdujeron los estímulos en los compartimientos y se registró la preferencia por 15 min hacia crías neonatas o juveniles en los días 2 y 5 posparto en los tres grupos experimentales (Fig. 5). Las pruebas se llevaron a cabo entre las 10:00 y 12:00 hs durante la fase de luz del ciclo luz/oscuridad. Para homogeneizar las condiciones en los tres grupos, todas las crías utilizadas fueron provistas por madres donantes y mantenidas con ellas hasta el momento de la prueba.

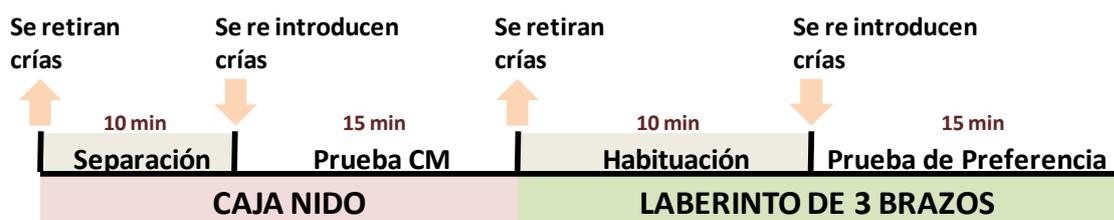


Figura 5. Procedimiento de pruebas experimentales realizadas en los días 2 y días 5 posparto.

Análisis estadístico

Se utilizaron métodos estadísticos no paramétricos (Siegel & Castellan, 1988). Los datos provenientes del mismo animal se compararon utilizando el análisis de Wilcoxon para muestras dependientes en el caso de 2 grupos y la prueba de Friedman en el caso de más de dos grupos. Las comparaciones entre grupos independientes se realizaron mediante la prueba de U de Mann Whitney en el caso de 2 grupos y la prueba de Kruskal-Wallis en el caso de más de dos grupos.

RESULTADOS

Comportamiento maternal

Como se muestra en la figura 6, en el día 2 posparto los grupos presentaron diferencias en los principales componentes activos del comportamiento maternal hacia neonatos (lamidos: $H_{(2,27)} = 13,82$, $p < 0,05$ y acarreos: $H_{(2,27)} = 8,07$, $p < 0,05$ análisis de varianza de Kruskal Wallis).

En comparación al grupo CS control, las hembras de los grupos CS exp- y CS gest- mostraron una reducción significativa de los lamidos (CS control vs. CS exp- $U_{(9,9)} =$

3,0, $p < 0,05$; CS control vs. CS gest- $U_{(9,9)} = 8,0$, $p < 0,05$) y acarreo hacia neonatos (CS control vs. CS exp- $U_{(9,9)} = 18,5$, $p < 0,05$; CS control vs. CS gest- $U_{(9,9)} = 11,5$, $p < 0,05$), prueba U de Mann Whitney, mientras que entre ambos grupos (CS exp- y CS gest-) no se observaron diferencias en estas conductas (Fig. 6A). Además, mientras que 7/9 hembras CS control completaron la reunión de la camada en el nido, solo 2/9 lo hicieron en los grupos CS exp- y CS gest-.

Cuando observamos las latencias al inicio del comportamiento maternal, constatamos que los tres grupos iniciaron antes el comportamiento maternal hacia los neonatos que hacia los juveniles (CS control: $T_{(9)} = 0,00$, $p < 0,05$; CS exp-: $T_{(9)} = 0,00$, $p < 0,05$; CS gest-: $T_{(9)} = 0,00$, $p < 0,05$). A pesar de esto, las hembras del grupo CS control lo iniciaron antes que las hembras de los grupos CS exp- y CS gest- (CS control vs. CS exp- $U_{(9,9)} = 4$, $p < 0,05$; CS control vs. CS gest- $U_{(9,9)} = 16,0$, $p < 0,05$), prueba U de Mann Whitney, Tabla 2).

Luego de 5 días de interacción con ambos tipos de crías, solamente las hembras CS exp- mostraron un aumento en los lamidos hacia neonatos en relación al día 2 posparto (CS exp- día 2 PP vs día 5PP: $T_{(9)} = 2,5$, $p < 0,05$, prueba pareada de Wilcoxon), mientras que los otros dos grupos no mostraron cambios. A diferencia del día 2, el comportamiento del grupo de hembras CS exp- fue similar al del grupo CS control, tanto en el número de lamidos como de acarreo hacia los neonatos (lamidos: CS control vs. CS exp- $U_{(9,9)} = 38$, $p = \text{NS}$; acarreo: CS control vs. CS exp- $U_{(9,9)} = 31,5$, $p = \text{NS}$, prueba U de Mann Whitney). Por otra parte el grupo CS gest- continuó difiriendo del grupo CS control en el número de acarreo (CS control vs. CS gest- $U_{(9,9)} = 13,5$, $p < 0,05$) aunque no en la expresión de los lamidos hacia neonatos (lamidos: CS control vs. CS gest- $U_{(9,9)} = 28,0$, $p = \text{NS}$, Fig. 6B). Luego de 5 días de interacción, 6/9 hembras control completaron la reunión de la camada en el nido, 5/9 lo lograron en el grupo CS exp- y 2/9 lo hicieron en el grupo CS gest-.

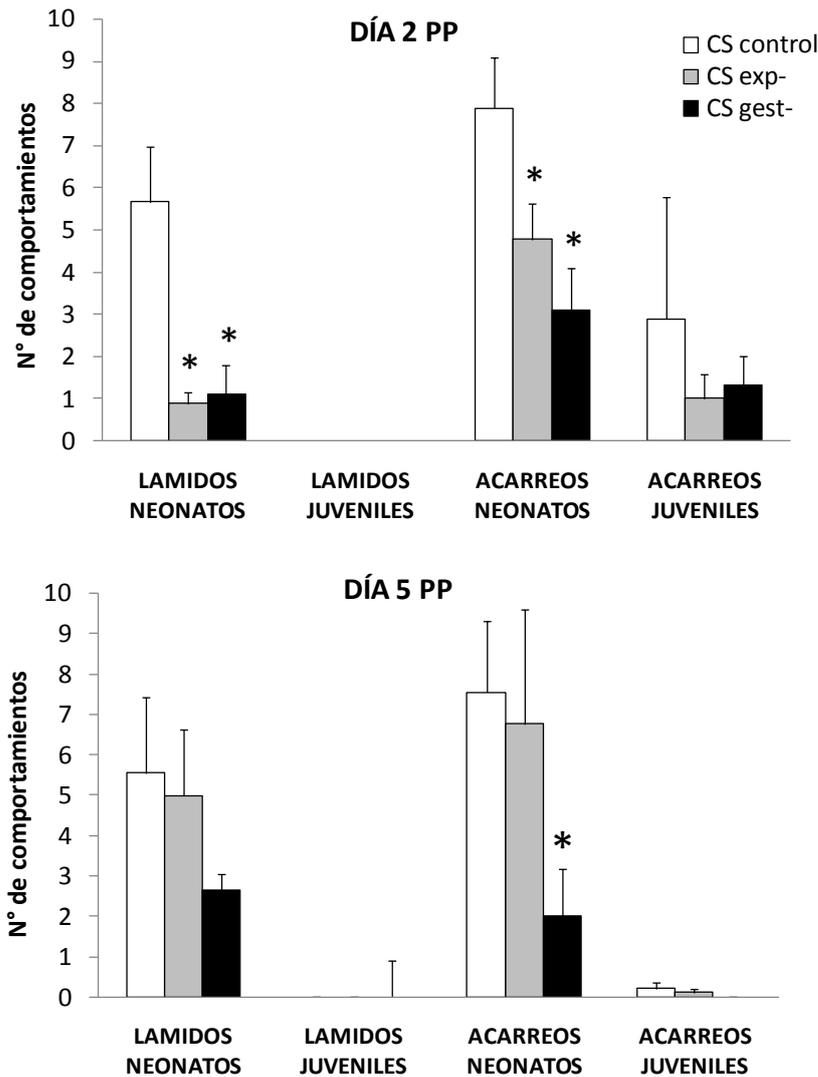


Figura 6. Número de lamidos (corporales y anogenitales) y acarreos hacia neonatos y juveniles en el total de la prueba de comportamiento maternal, en los días 2 (A) y 5 (B) posparto en los grupos CS control, CS exp- y CS gest-. * $p < 0,05$ vs. CS control, Kruskal-Wallis seguido de prueba U de Mann Whitney. Los datos se expresan como medianas (RSIC).

Al igual que en el día 2, en el día 5 posparto los tres grupos iniciaron la expresión de respuestas maternas antes hacia los neonatos (latencia maternal neonatos vs. latencia maternal juveniles: CS control $T_{(9)}=0,00$, $p < 0,05$; CS exp- $T_{(9)}=0,00$, $p < 0,05$; CS gest- $T_{(9)}=0,00$, $p < 0,05$, prueba pareada de Wilcoxon). Sin embargo no se observaron diferencias entre los grupos (Tabla 2).

Tabla 2. Latencias al inicio de conductas maternas activas hacia neonatos y juveniles de las madres en los grupos CS control, CS exp- y CS gest-.

	<i>Latencia a la respuesta maternal (seg)</i>			
	<i>Día 2 posparto</i>		<i>Día 5 posparto</i>	
	Neonatos	Juveniles	Neonatos	Juveniles
CS control	10,8±3,4#	830,8±69,2	131,2±97,2#	748,4±100,4
CS exp-	289,7±110,7*#	736,2±101,4	198,3±92,5#	881,1±18,9
CS gest-	368,7±128,8*#	706,8±91,9	408,3±133,2#	900,0±0,0

Los datos se expresan como Medianas (RSIC), * $p < 0.05$ vs. CS control, prueba U de Mann Whitney; # $p < 0.05$ vs. juveniles, prueba de Wilcoxon.

Prueba de Preferencia

Al evaluar la prueba de preferencia en el día 2 posparto, las hembras del grupo CS control invirtieron más tiempo en el compartimiento de los neonatos que en el de los juveniles ($T_{(9)} = 2,0$, $p < 0,05$) y a su vez más en el de los juveniles que en el neutro ($T_{(9)} = 0,0$, $p < 0,05$, Fig. 7). Sin embargo esta diferencia de tiempo entre los estímulos reforzadores no se observó en las hembras del grupo CS exp- ($T_{(9)} = 10,0$, $p = \text{NS}$), aunque invirtieron más tiempo en los reforzadores que en el neutro; mientras que las hembras del grupo CS gest- invirtieron el mismo tiempo en los tres compartimientos ($F_{(9,2)} = 2,6$, $p = \text{NS}$, prueba de Friedman, Fig. 7).

De forma interesante, luego de 5 días de interacción con los estímulos reforzadores, las hembras del grupo CS control siguieron invirtiendo el mismo tiempo junto a los estímulos que en el día 2 posparto (compartimiento neonatos d2 PP vs. compartimiento neonatos d5 PP: $T_{(9)} = 20,0$, $p = \text{NS}$; compartimiento juveniles d2 PP vs. compartimiento juveniles d5 PP: $T_{(9)} = 22,0$, $p = \text{NS}$). Lo mismo ocurrió con el tiempo en los compartimientos de las hembras del grupo CS exp- (compartimiento neonatos d2 PP vs. compartimiento neonatos d5 PP: $T_{(9)} = 15,0$, $p = \text{NS}$; compartimiento juveniles d2 PP vs. compartimiento juveniles d5 PP: $T_{(9)} = 18,0$, $p = \text{NS}$).

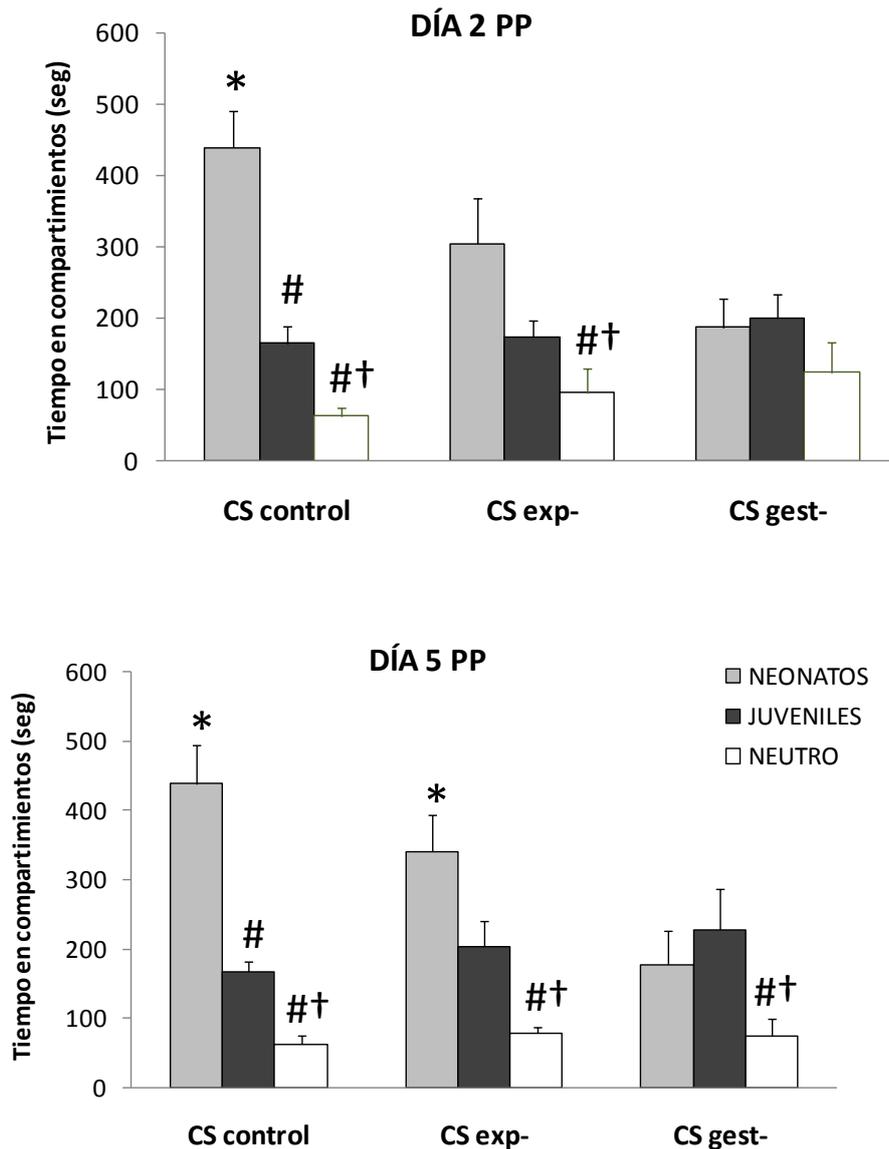


Figura 7. Tiempo de permanencia en los compartimientos de neonatos, juveniles y neutro de los 3 grupos experimentales de hembras. * $p < 0,05$ vs CS gest-, prueba de Kruskal-Wallis seguida de prueba U de Mann Whitney (para medidas independientes); # $p < 0,05$ vs neonatos, † $p < 0,05$ vs juveniles, prueba de Friedman seguida de prueba de Wilcoxon (para medidas dependientes). Los datos se expresan como medianas (RSIC).

Sin embargo luego de 5 días de interacción, las hembras del grupo CS gest- invirtieron más tiempo junto a los reforzadores que junto al estímulo neutro (Compartimiento neonatos vs. compartimiento neutro: $T_{(9)}=6,0$, $p < 0,05$; compartimiento juveniles vs. compartimiento neutro: $T_{(9)}=0,0$, $p < 0,05$, prueba pareada de Wilcoxon, Fig. 7).

Tabla 3. Preferencia de las hembras por neonatos, juveniles o que no prefieren en los días 2 y 5 posparto.

<i>Preferencia</i>	<i>Día 2 posparto</i>			<i>Día 5 posparto</i>		
	CS control	CS exp-	CS gest-	CS control	CS exp-	CS gest-
neonatos	7/9	4/9	1/9	8/9	5/9	2/9
juveniles	0/9	1/9	2/9	1/9	2/9	3/9
neutro	0/9	1/9	0/9	0/9	0/9	0/9
no prefieren	0/9	3/9	6/9	0/9	2/9	4/9

Los datos se expresan como proporciones (número de hembras que muestran preferencia/número total).

CONCLUSIONES

Los resultados de este experimento muestran que ninguno de los dos grupos, uno carente del perfil hormonal de la gestación y parto y el otro carente de experiencia maternal previa, logran la expresión de respuesta maternal observado en el grupo CS control. Esto pone en evidencia que tanto los factores endócrinos como la experiencia maternal previa, son necesarios para la adaptación comportamental exhibida por las hembras que crían en CS.

Sin embargo la exposición hormonal asociada con la segunda gestación parece tener un papel más relevante que la experiencia maternal previa para una expresión adecuada del comportamiento y la motivación maternal ya que solo el grupo que gestó la segunda camada logra mejorar su desempeño tanto en la prueba de comportamiento como en la de motivación maternal tras 5 días de interacción con las crías.

Finalmente, el hecho de que incluso el grupo que no gestó presenta una mejoría parcial en su comportamiento y la preferencia por ambos tipos de crías en el día 5, evidencia la importancia de la experiencia maternal reciente para la expresión de este comportamiento.

Experimento 3

Rol del APOm en la adaptación comportamental de las madres en CS

Si bien las hembras con CS dirigen pocos cuidados maternales hacia las crías juveniles (N Uriarte, et al., 2008), en el experimento 1 mostramos que las mismas representan estímulos con valor de incentivo, aunque el valor de los neonatos es mayor y a su vez, este perfil comportamental esta mediado por la experiencia maternal y principalmente por los cambios endócrinos asociados a la gestación previa (experimento 2). Dado que el APOm es un sitio clave de integración sensorial y hormonal que permite organizar la salida comportamental más adecuada de acuerdo a las necesidades de las crías (Jacobson, et al., 1980; Lee, Clancy, & Fleming, 1999; B Leuner & Gould, 2010; M. Numan, Corodimas, & Numan, 1988; M Pereira & Morrell, 2009). Así, mientras que en el posparto temprano el APOm tiene un rol facilitador a través de promover la respuesta maternal hacia las crías neonatas, en el posparto tardío se postula que tiene un rol inhibitor disminuyendo esta respuesta hacia los juveniles (M Pereira & Morrell, 2009). Sin embargo desconocemos la implicancia de esta área en la regulación de la flexibilidad comportamental de hembras con CS, que se encuentran en un momento del posparto temprano de acuerdo a su perfil endócrino, pero también tienen estímulos sensoriales del posparto tardío como los juveniles. Teniendo en cuenta los resultados de Pereira & Morrell (2009), esperamos que si la adaptación comportamental y motivacional en madres con CS esta mediada por el APOm, su inactivación interfiera con la capacidad de discriminar las características de ambos tipos de crías, disminuyendo la respuesta maternal hacia neonatos y aumentándola hacia juveniles.

Para probar esta hipótesis, se eligió inactivar farmacológicamente esta área en forma transitoria y reversible. Basándonos en los experimentos de Pereira & Morrell (2009), seleccionamos el uso de bupivacaína ya que este fármaco suprime la actividad neural a través del bloqueo de los canales de sodio dependientes de voltaje y por lo tanto la conducción del potencial de acción (Hille, 1966, 1977) durante la totalidad del período en que se realizan las pruebas comportamentales, a diferencia de la lidocaína que tiene una acción de menor rango de tiempo (Boehnke & Rasmusson, 2001; Pereira de Vasconcelos et al., 2006; Sandkühler, Maisch, & Zimmermann, 1987). La bupivacaína tiene ventaja sobre otros fármacos que boquean canales de sodio como TTX o muscimol (agonista de receptores GABA), por su tiempo de acción inmediato y su rango de acción

apropiado (hasta una hora) y una difusión funcional considerablemente menor lo que permite la administración de volúmenes más pequeños para afectar el área requerida. Además la bupivacaína permite una inactivación general del área y no específica según el neurotransmisor por ejemplo GABA (de (M Pereira & Morrell, 2009, 2010).

HIPÓTESIS 1C

La adaptación del comportamiento y de la motivación maternal en madres con camadas superpuestas es mediada por el APOm.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si el APOm participa en la asignación del valor de incentivo relativo de crías neonatas y juveniles para madres de camadas superpuestas, así como en la expresión de las respuestas maternas hacia las mismas.

OBJETIVO ESPECÍFICO

Determinar si el efecto de la inactivación funcional del APOm a través de la administración local del anestésico transitorio bupivacaína, sobre la preferencia y el comportamiento maternal hacia crías neonatas y juveniles de madres con CS.

MATERIALES Y MÉTODOS

Fármaco

La dosis de bupivacaína (Sigma) administrada fue de 20.0mg/ml en 0.9% solución salina/1.0µl, -5min prueba) y se seleccionó en base a trabajos previos que estimaron la difusión efectiva y el curso temporal de la inactivación neural causada por la infusión intra cerebral de bupivacaína (M Pereira & Morrell, 2009, 2010).

Procedimiento experimental

Se utilizaron hembras con CS que fueron obtenidas según lo descrito en los experimentos anteriores. Cada hembra fue implantada bilateralmente con cánulas en el APOm (ver procedimiento debajo), en el día 2luego del parto de la segunda camada. En los días 5 y 6 posparto cada madre recibió una micro inyección de bupivacaína con una dosis de 20mg/mL disuelto en solución salina estéril 0.9% o vehículo, en forma

contrabalanceada. Cada lado recibe 1.0 µl de bupivacaína o salina. Cinco minutos después de la administración de bupivacaína o de vehículo (se completan 10 minutos de separación de la madre de su camada) se realizó la prueba de comportamiento maternal hacia crías neonatas y juveniles, durante 30 minutos (prueba detallada en Experimento 2). Luego se evaluó la preferencia hacia crías neonatas y juveniles durante 15 minutos (prueba detallada en experimentos previos). De acuerdo a este diseño cada animal actuó como su propio control (N=8 para las pruebas de comportamiento maternal y N=7 para las pruebas de preferencia).

Para verificar la especificidad del tratamiento se analizó también el comportamiento de hembras con micro inyecciones de las mismas dosis y volúmenes de bupivacaína y vehículo, dorsalmente (-2mm) al área de interés, actuando cada animal como su propio control (N=6).

Implantación de cánula guía y administración de fármacos en APOm (Miller & Lonstein, 2005; M Pereira & Morrell, 2009)

En el día 2PP de la segunda lactancia, las hembras fueron anestesiadas (75,0 mg/kg de ketamina, 7,5 mg/kg de xylacina y 1,5 mg/kg de acedan), fijadas en el aparato de estereotaxia (Kopf Instruments) e implantadas bilateralmente con una cánula guía 22-gauge de acero inoxidable (Plastics One, Roanoke, VA) en el APOm (coordenadas: AP-0,5 mm de bregma, ML \pm 0,5 mm de la línea media y DV-6,5 mm de la superficie craneal, ubicándose dorsalmente a 2.0mm del lugar de inyección). Concluida la cirugía, las hembras recibieron tratamiento antibiótico (Benzil penicilina procaínica, 50.000 unidades/kg, i.p., Repen, Fatro) y analgésico (Ácido Tolfenámico, 0,06 mg/kg, i.p., Tolfedine, Vetoquinol). Diariamente se controló la salud de la madre y sus crías y el estado de la cánula guía.

Protocolo de inyección intracraneal

Un día antes del día de la prueba comportamental, las hembras fueron habituadas al procedimiento de inyección intracraneal. En el día de la prueba, se retiró la cánula “dummy” y se conectaron inyectoras bilaterales (protruyen 2mm debajo de la cánula guía conectados a jeringas Hamilton de 10ul. Mediante una bomba de infusión (Harvard) se inyectó bilateralmente la bupivacaína o su vehículo a una velocidad de 0,250µl/min. Luego de la infusión del fármaco, los inyectores permanecieron en la

cánula guía por 1 min para permitir su difusión completa. Así, el proceso de inyección se completó en 5 min, luego del cual los inyectores fueron retirados, se reinsertaron las cánulas “dummy” y se registró el comportamiento maternal en la caja nido seguido de la prueba de preferencia en el laberinto en Y.

Histología y análisis del sitio de implantación

Una vez concluido el experimento, las hembras fueron anestesiadas con tiopental sódico (100 mg/kg, ip.) y perfundidas de forma transcardíaca con solución salina heparinizada seguido de paraformaldehído (PAF) (4%). Posteriormente, el cerebro fue removido, conservado por 48h en una solución de PAF(4%), congelado y cortado en criostato. Los cortes obtenidos de las secciones cercanas a la zona de implantación se montaron y tiñeron con violeta de Cresyl. La verificación del sitio de implantación se realizó mediante microscopio óptico y de acuerdo al Atlas Neuroanatómico de(Paxinos & Watson, 1997).

Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante métodos estadísticos no paramétricos (Siegel & Castellan, 1988). Tanto los resultados de la prueba de comportamiento maternal como los de preferencia se compararon utilizando el análisis de Wilcoxon para muestras dependientes.

RESULTADOS

Respecto al sitio de implantación, en la figura 8 se representan las secciones transversales del cerebro de la rata que muestran la localización promedio de la inyección (al final del inyector) según el análisis microscópico de las secciones teñidas con violeta de cresil. La Fig. 8A muestra la ubicación de los sitios de infusión de APOm para el grupo de madres con CS analizadas durante los días 5 y 6 posparto (N= 8). El análisis histológico indicó que la mayoría de los sitios de infusión bilaterales están ubicados entre -0,80 y -0,92 mm posteriores a Bregma.

Las hembras CS incluidas en el grupo de control dorsal (N=6), mostraron localizaciones de la cánula bilateral dorsales a la comisura anterior, es decir por encima de APOm, entre -0,40 y -0,92 mm posterior a bregma (Fig. 8B).

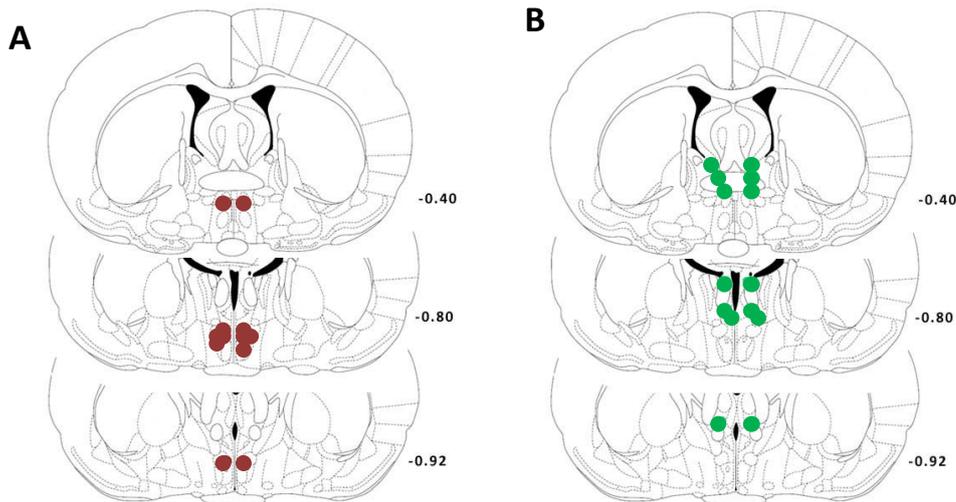


Figura 8. Esquema de los sitios de implantación de la cánula e inyección de bupivacaína/vehículo basado en el análisis microscópico de secciones teñidas con violeta de cresil, en APOM (A) y en sitio dorsal al APOM: control dorsal (B).

Comportamiento maternal

Luego de la inyección de bupivacaína en el APOM, las hembras con CS mostraron déficits en el comportamiento maternal. Así, luego de la inactivación de esta área, las hembras tardaron significativamente más tiempo en iniciar las conductas maternales hacia las crías neonatas (Tabla 4). En línea con este resultado, en la figura 9 se muestra que el tratamiento con bupivacaína produjo una disminución de los lamidos ($T_{(8)}= 2,0$; $p<0,05$) y de los acarreos hacia los neonatos ($T_{(8)}= 0,0$; $p<0,05$) respecto al tratamiento con vehículo. De hecho durante la inactivación del APOM, ninguna de las hembras completó la reunión de la camada en el nido (Tabla 4); 6 de 8 no acarrearón a ninguna cría y las dos restantes si realizaron acarreos pero no lograron reunir toda su camada en el nido.

Tabla 4. Latencias al inicio de conductas maternas activas hacia neonatos y juveniles de las madres con CS tratadas con vehículo o bupivacaína en el APOm.

	<i>Latencia (seg)</i>			<i>Duración (seg)</i>
	CM a neonatos	CM a juveniles	RCN	<i>Hovering over</i>
Vehículo	22,5 ± 23,3	1800 ± 0	173,5 ± 324,9	487 ± 145,25
Bupivacaína	145 ± 285,3 *	1800 ± 0	1800 ± 0 *	170 ± 278

Comportamiento materno (CM), reunión de la camada en el nido (RCN) y tiempo de permanencia en *hovering over* sobre los neonatos. Los datos se expresan como medianas (RSIC), *p<0,05 vs. vehículo, prueba pareada de Wilcoxon.

Si bien ninguna de las hembras con el APOm inactivada agrupó a sus crías en el nido, sí se acercaron, las investigaron y permanecieron en *hovering-over* (Tabla 4) sin observarse diferencias en la proporción de hembras que pasó sobre sus camadas en *hovering-over* entre los grupos (bupivacaína: 6/8 y vehículo: 5/8).

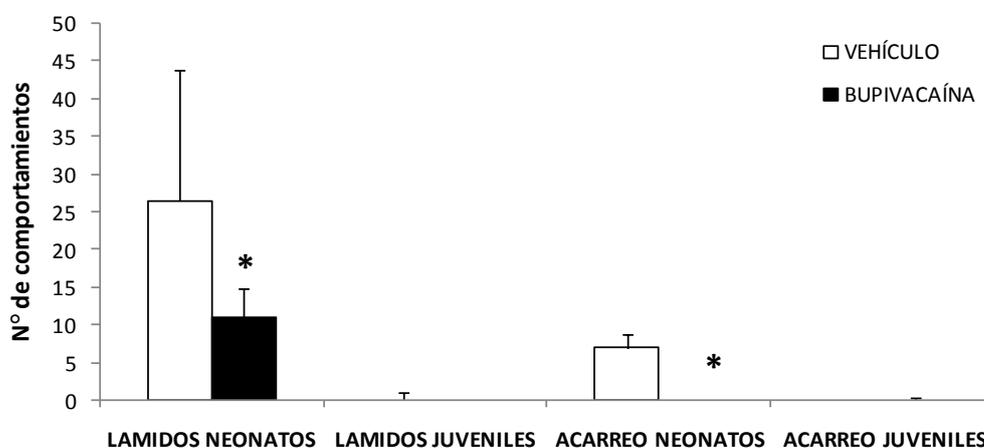


Figura 9. Número de de lamidos (corporales y anogenitales) y acarreos hacia neonatos y juveniles en el total de la prueba de comportamiento materno, durante la infusión de vehículo (blanco) o bupivacaína (negro) en las hembras con CS. *p<0,05 vs. vehículo, prueba pareada de Wilcoxon. Los datos se expresan como medianas (RSIC).

En contraste, las hembras con sitios de infusión que se localizaron dorsalmente al APOm, no mostraron cambios en el comportamiento materno luego de la inyección con bupivacaína o vehículo (Fig.10).

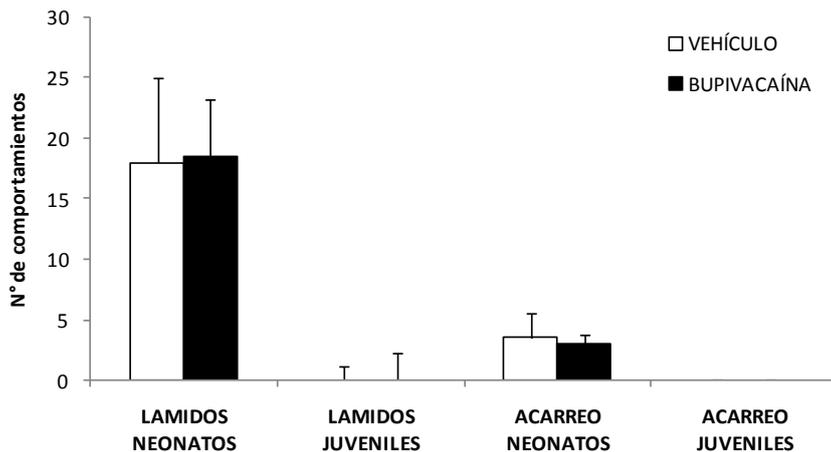


Figura 10. Número de lamidos (corporales y anogenitales) y acarreos hacia neonatos y juveniles en la total de la prueba de comportamiento maternal, durante la infusión dorsal a APOm de vehículo (blanco) o bupivacaína (negro) en las hembras con CS. Los datos se expresan como medianas (RSIC).

Prueba de Preferencia

En concordancia con lo observado en la prueba de comportamiento maternal, la inactivación del APOm afectó el comportamiento en la prueba de preferencia de las hembras con CS. Las hembras inyectadas con vehículo prefirieron mayoritariamente los neonatos (6 de 7) mientras que las inyectadas con bupivacaína redujeron su preferencia por neonatos a 1/7 (Tabla 5). Concomitantemente con esto, el tiempo de permanencia junto al compartimiento de los neonatos disminuyó cuando se inyectó bupivacaína en relación a la inyección de vehículo (Fig. 11).

Las hembras CS tratadas con vehículo invirtieron más tiempo junto a las crías neonatas que junto a los juveniles ($T_{(7)} = 1,0$; $p < 0,05$) y que junto al compartimiento neutro ($T_{(7)} = 0,0$; $p < 0,05$). A su vez, permanecieron más tiempo en el compartimiento de los juveniles que en el neutro ($T_{(7)} = 2,0$; $p < 0,05$, Fig. 11). Sin embargo cuando se inyectó bupivacaína las hembras ya no exhibieron preferencia por ninguno de los dos estímulos reforzadores ($T_{(7)} = 10,0$; $p = NS$, Fig. 11).

Tabla 5. Número de hembras que prefieren neonatos, juveniles, neutro o que no prefieren ninguno de los tres compartimientos sobre número total, de en hembras CS que fueron inyectadas con vehículo y bupivacaína.

	<i>Vehículo</i>	<i>Bupivacaína</i>
neonatos	6/7	1/7
juveniles	0/7	2/7
neutro	0/7	1/7
no prefiere	1/7	3/7

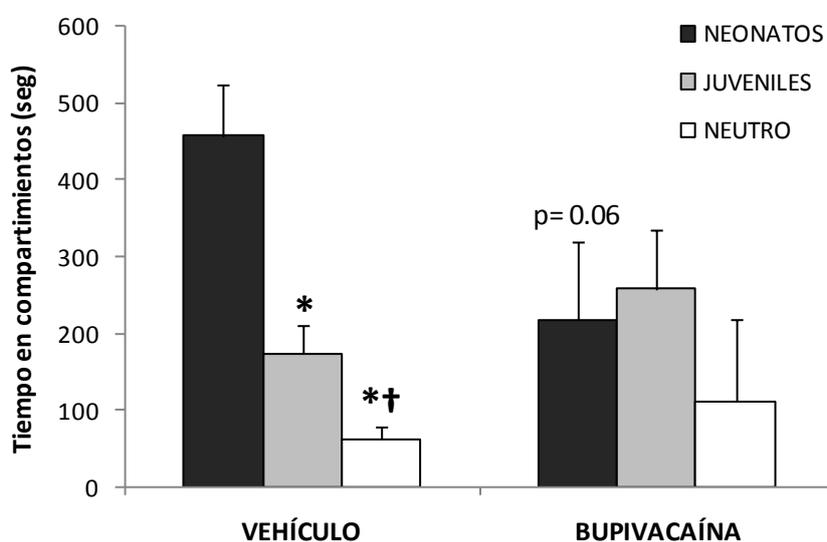


Figura 11. Tiempo de permanencia en los compartimientos de neonatos, juveniles y neutro de las hembras con CS que fueron tratadas con vehículo y bupivacaína. $p < 0,06$ vs. vehículo, (prueba pareada de Wilcoxon); * $p < 0,05$ vs neonatos y † $p < 0,05$ vs juveniles dentro del mismo grupo; prueba pareada de Wilcoxon. Los datos se expresan como Medianas (RSIC).

Por otra parte, la inactivación de APOm no afectó la locomoción de las hembras. Durante la infusión de bupivacaína o vehículo, no se observaron diferencias en su movilidad en el laberinto (Tab. 5).

Tabla 5. Número de cruces por los brazos durante la prueba de preferencia en el laberinto en Y durante la infusión de vehículo y bupivacaína en el APOm y en el sitio de inyección dorsal (control).

	<i>APOm</i>	<i>Control dorsal</i>
Vehículo	60 ± 14,25	64,5 ± 4,4
Bupivacaína	59 ± 13,5	73 ± 10,5

Los datos se expresan como Medianas (RSIC).

El tiempo de permanencia en los compartimientos no cambió en hembras con sitios de infusión dorsal al APOm después de la inyección con bupivacaína o solución salina (Fig 12). Tampoco se observaron efectos sobre la locomoción en el laberinto en las hembras inyectadas dorsalmente al APOm luego de recibir solución salina o bupivacaína (Tabla 5).

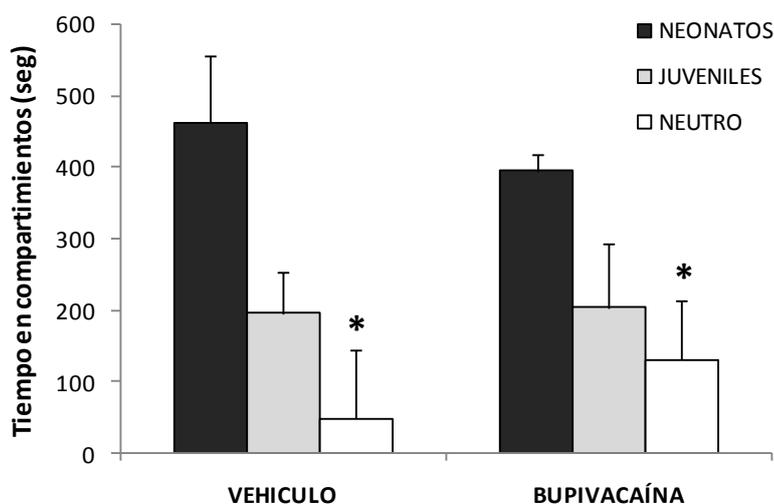


Figura 12. Tiempo de permanencia en los compartimientos de neonatos, juveniles y neutro de las hembras con CS que cuyas cánulas se localizaron a nivel dorsal del APOm, tratadas con vehículo y bupivacaína. * $p < 0,05$ vs neonatos; prueba pareada de Wilcoxon. Los datos se expresan como Medianas (RSIC).

CONCLUSIÓN

Al inactivar el APOM observamos una afectación de la respuesta maternal principalmente hacia neonatos, que es hacia quienes se dirige mayormente esta respuesta en esta etapa del posparto, pero no observamos cambios comportamentales con respecto a los juveniles. Mientras que en el laberinto en Y, la inactivación resultó en una pérdida de preferencia por los neonatos respecto a los juveniles. Esto sugiere que el APOM está implicada en el valor motivacional de las crías, pero no participa en la capacidad de hembras con CS de asignar cuidados diferenciales entre ambos tipos. Así, otras áreas implicadas en el circuito maternal asociadas a procesos atencionales y toma de decisiones como la CPF (Floresco, Block, & Tse, 2008; M Pereira & J Morrell, 2011; Ragozzino, Detrick, & Kesner, 1999; Rich & Shapiro, 2009; Romanides, Duffy, & Kalivas, 1999) podrían estar dando especificidad a la respuesta hacia ambos tipos de crías en las hembras que crían CS (Pose et al, en preparación, ver ANEXO 4).

CAPÍTULO II

Plasticidad estructural del sistema nervioso central en ratas madres

Como se desarrolla en la Introducción, la maternidad representa uno de los momentos más cruciales de plasticidad neural en el ciclo de vida de las hembras adultas (Hillner, et al., 2014; M. Pereira, 2016). Además de esta plasticidad funcional del APOm, existen antecedentes de aumento en la plasticidad estructural en áreas del SNC específicas del comportamiento maternal y comportamientos asociados (M Numan, 2006; J. Pawluski, Lambert, & Kinsley, 2016), incluyendo cambios en el volumen de neuronas (Keyser-Marcus, et al., 2001) y modificaciones en la expresión de receptores de estrógenos y oxitocina (Bale, et al., 1996; Meurisse, et al., 2005). A su vez, se han reportado modificaciones en otras células que regulan la función neuronal como los astrocitos (Gómora-Arrati, et al., 2010) y cambios en las espinas dendríticas durante el parto y el transcurso de la lactancia (C. Kinsley, et al., 2006).

Por otra parte, la matriz extracelular del SNC tiene un rol clave en los procesos de desarrollo neural, sinaptogénesis y neuroprotección, participando también en la regulación de la dinámica de las espinas dendríticas y la formación de sinapsis en individuos adultos, regulando la plasticidad y estabilidad neuronal, asociándose a procesos de plasticidad sináptica dependientes de la experiencia (Miyata & Kitagawa, 2017);(Levy, et al., 2014). Particularmente las PNN son un tipo de matriz extracelular especializada implicada en la regulación de estos procesos plásticos. Actúan como frenos funcionales o como barreras estructurales que limitan la plasticidad neural al regular la función celular o al impedir la remodelación de las espinas dendríticas(de Vivo et al., 2013; Frischknecht et al., 2009; Orlando, Ster, Gerber, Fawcett, & Raineteau, 2012). Sin embargo, trabajos recientes sugieren que las PNN tendrían una función dinámica en los procesos plásticos (Gogolla, et al., 2009; Hylin, et al., 2013; Kochlamazashvili, et al., 2010).

En esta línea, podemos pensar que si existe plasticidad funcional y estructural en las áreas de control del comportamiento maternal, la matriz extracelular que da soporte y regula muchos de estos procesos, también experimente cambios. Debido a que la gestación y la lactancia se caracterizan por un aumento considerable en la

neuroplasticidad (Härtig, et al., 1992; Hofer, Brunelli, & Shair, 1994; Petrovich, Canteras, & Swanson, 2001), en los experimentos que integran este capítulo, nos proponemos: a. evaluar si la expresión de esta matriz extracelular cambia en áreas implicadas en el control del comportamiento maternal durante la gestación y el posparto en hembras primíparas (Experimento 4), b. determinar cuál es el papel de factores endócrinos específicos de la gestación en este fenómeno (Experimento 5) y c. analizar si la expresión de esta matriz extracelular en áreas claves del circuito maternal cambia en sintonía con la flexibilidad maternal observada en madres en diferentes contextos reproductivos (Experimento 6).

Los resultados obtenidos en los Experimentos 4 y 5 integran el manuscrito: *“Reorganization of perineuronal nets in the rat’s medial Preoptic Area during gestation and lactation”* que se encuentra en fase de redacción.

Experimento 4

Caracterización de cambios estructurales en áreas neurales involucradas en la expresión y flexibilidad del comportamiento maternal en hembras primíparas

De acuerdo a lo planteado, es posible pensar que diferentes grados de organización de la matriz extracelular formen parte de los cambios neurales que subyacen al proceso de la maternidad, áreas del circuito maternal y particularmente en el APOm ya que es un área clave dentro del circuito maternal que experimenta cambios funcionales y estructurales en respuesta a las hormonas durante la gestación y lactancia; cambios que dan soporte a las adaptaciones comportamentales durante este período (M. Pereira, 2016).

Para explorar esta posibilidad, en este experimento evaluamos la presencia de PNN en áreas del circuito maternal de hembras adultas en diferentes puntos de su ciclo reproductivo: ciclo estral, gestación, período posparto. La elección de los días de gestación y posparto para el análisis de las PNN se realizó considerando los momentos de cambios hormonales y/o comportamentales relevantes en el transcurso de dichos procesos. Así, como se muestra en la figura 1, en el día 10 de gestación, tanto el estrógeno como la progesterona que se encuentran en niveles bajos hasta ese momento comienzan a aumentar. La secreción de progesterona se incrementa alrededor del día 14, alcanzando los valores más altos entre días 16-18, para luego descender de forma marcada en el día 21. Este descenso abrupto en los niveles de progesterona se acompaña de un incremento sustancial del estradiol en este día (J. S. Rosenblatt, et al., 1988). Por otra parte, se seleccionaron el día 2 de lactancia, como momento de posparto temprano en el que el CM está establecido y el día 7, momento del posparto en el cual la expresión del CM es máxima y además la progesterona incrementa sus niveles en sangre para bajar alrededor del día 14 de lactancia (K Taya & Greenwald, 1983). A su vez elegimos el día 22 de lactancia, ya que es un momento de lactancia tardía en que habitualmente se realiza el destete de las crías en el laboratorio. También se incluyó en el análisis un grupo de machos para comparar los resultados con los reportados en la literatura.

HIPÓTESIS 2A

La organización de la matriz extracelular en forma de PNN cambia a lo largo del proceso de gestación y lactancia en áreas del circuito maternal, asociado a los cambios hormonales que subyacen el ciclo reproductivo.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la organización temporal de las PNN en áreas del circuito maternal de ratas hembras en diferentes fases de su ciclo reproductivo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Analizar la organización de las PNN durante los períodos de gestación y lactancia, en áreas del SNC vinculadas a la regulación y el control del CM en hembras primigestas y primíparas en diferentes puntos de la gestación y lactancia.
- 2- Analizar la organización de las PNN en áreas del SNC vinculadas a la regulación y el control del CM en hembras vírgenes en diferentes estadios del ciclo estral.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para cumplir con los objetivos planteados se diseñaron los siguientes grupos experimentales:

1. Hembras vírgenes ciclantes en la fase de diestro (Di), N=5
2. Hembras vírgenes ciclantes en la fase de proestro (ProE), N=6
3. Hembras vírgenes ciclantes en la fase de estro (Est), N=5
4. Machos vírgenes, N=3
5. Hembras primigestas en el día 10 de gestación (G10), N=4
6. Hembras primigestas en el día 14 de gestación (G14), N=5
7. Hembras primigestas en el día 18 de gestación (G18), N=4
8. Hembras primigestas en el día 21/22 de gestación (G21), N=6

9. Hembras primíparas lactantes en el día 2 posparto (L2), N=6
10. Hembras primíparas lactantes en el día 7 posparto (L7), N=4
11. Hembras primíparas lactantes en el día 14 posparto (L14), N=4
12. Hembras primíparas lactantes en el día 22 posparto (L22), N=4

Animales

Se utilizaron ratas hembras y machos de la cepa Wistar (*Rattus norvegicus*). Las ratas se alojaron en un cuarto con un ciclo de luz-oscuridad 12/12 h, temperatura controlada (22 ± 1 °C) y humedad controlada (60%) en el Laboratorio de Experimentación Animal (LEA) de la Facultad de Ciencias. Todas las hembras tuvieron 4 meses de edad al momento de la extracción del encéfalo y este procedimiento se llevó a cabo entre las 10:00 y 12:00 hs durante la fase de luz del ciclo luz/oscuridad. El ciclo estral se monitoreó mediante frotis vaginales diarios (realizados entre las 09:00 y las 11:00 h). Se establecieron cuatro etapas de acuerdo con la citología vaginal de la siguiente manera: proestro tardío (células nucleadas redondas y células cornificadas), estro (células cornificadas), metaestro (leucocitos y células redondas nucleadas y cornificadas) y diestro (predominio de leucocitos) (Montes & Luque, 1988). Las hembras se utilizaron después de mostrar al menos dos ciclos regulares.

Extracción y preparación del tejido

Las hembras se anestesiaron con tiopental sódico (70 mg/kg, ip) y se perfundieron con PBS heparinizado seguido de PAF al 4%. Luego de removidos, los cerebros fueron pos-fijados en PAF y crioprotectados en solución de sacarosa 30%. Se realizaron cortes coronales en crióstato (40 μ m de espesor) de las áreas CPF, NAcc, APOM e hipotálamo ventromedial (HVM) en las siguientes coordenadas 3,72 a 2,76 mm posterior a Bregma para CPF, de 2,28 a 1,08 mm posterior a Bregma para NAcc, de -0,12 a -1,32 mm posterior a Bregma para APOM y BNST y -1,80 a -2,40 mm posterior a Bregma para HVM, utilizando como referencia el Atlas Paxinos & Watson (1997). Los cortes se almacenaron a -20°C en una solución anti-freeze (30% de ethyleneglycol) hasta la realización de la técnica.

Detección de PNN

Se utilizó la lectina de *Wisteria floribunda* (WFA) biotinilada (SIGMA L1516, USA) para revelar N-acetylgalactosamina-positivas PNN.

Las secciones se lavaron tres veces en PBS (PH 7,4) para remover el medio en el que estaban embebidos. Se bloquearon las peroxidases endógenas por 20 minutos en 45% etanol (100%), 0,3% H₂O₂, seguido de tres lavados en PBS. Luego se bloquearon los sitios de unión inespecíficos en solución de PB, 0,2% tritón x100, 3% BSA por 30 minutos. Posteriormente se realizó la incubación por 2 horas con WFA biotinilada con una concentración de 2 mg/ml (1:500, Vector Lab) en solución con PBS, 0,2% triton x100, 3% BSA, seguido por tres lavados en PBS. Inmediatamente después, se incubó en solución avidina-biotina peroxidasa, ABC kit (Vector Lab), durante 2 horas (50 µl de solución A, 50 µl de solución B cada 5 ml de PBS). Luego de tres lavados con PBS se procedió al revelado de WFA con el sistema 3,3'-diaminobenzidina, DAB kit (Vector Lab) durante 60 seg aprox, según indicaciones del fabricante.

Para la reacción de fluorescencia, luego de la incubación con WFA biotinilada y los posteriores lavados se incubó por 30 min con streptavidina conjugada a AlexaFluor633 (Invitrogen) (dilución 1:500). Finalmente, las secciones fueron lavadas en PBS durante 10 minutos para su posterior deshidratación y montaje en el caso de revelado con el cromógeno, y montaje en glicerol 80% en PBS en el caso de la fluorescencia.

Análisis de las PNN

Los cortes de tejido se analizaron utilizando un microscopio Nikon Eclipse E400 adosado a una cámara digital Micrometrics 319CU CMOS 3.2 Megapixel.

Las imágenes para la cuantificación fueron tomadas en lupa (NikonSMZ1000), 3x (NA 0.3) aumentos y se analizaron mediante el software *ImageJ* (NIH, <https://imagej.nih.gov/ij/>). Una vez que se adquirieron todas las imágenes, las mismas se exportaron como archivos de 8 bits en escala de grises, formato *tiff* al software de análisis y se transformaron de pixels a µm.

Se cuantificó el área ocupada por PNN dentro del APOm. Para esto se fijó una región de interés tomando el contorno que incluye toda la extensión de la señal detectada en el día de máxima extensión observada: G21. Esta área de interés fue de 809 µm². Para este

estudio se aplicó el umbral de máxima entropía pre-establecido en el programa de procesamiento Image-J. Se analizó un corte por cerebro correspondiente a la coordenada de mayor detección de PNN: -0,92 ~ -1,08 mm de Bregma. Se cuantificó la densidad de PNN en la región de interés de ambos hemisferios cerebrales que posteriormente fueron promediados.

Las comparaciones estadísticas se realizaron mediante test de t (2 grupos) o ANOVA de dos vías (más de dos grupos) seguida de Tukey para medidas pareadas o independientes según corresponda, con un nivel de $p < 0,05$ para indicar significancia estadística.

RESULTADOS

Estructura de la señal detectada

Luego del revelado de N-acetylgalactosamina con la lectina WFA, detectamos la presencia de PNN en áreas cerebrales discretas (fig.13)

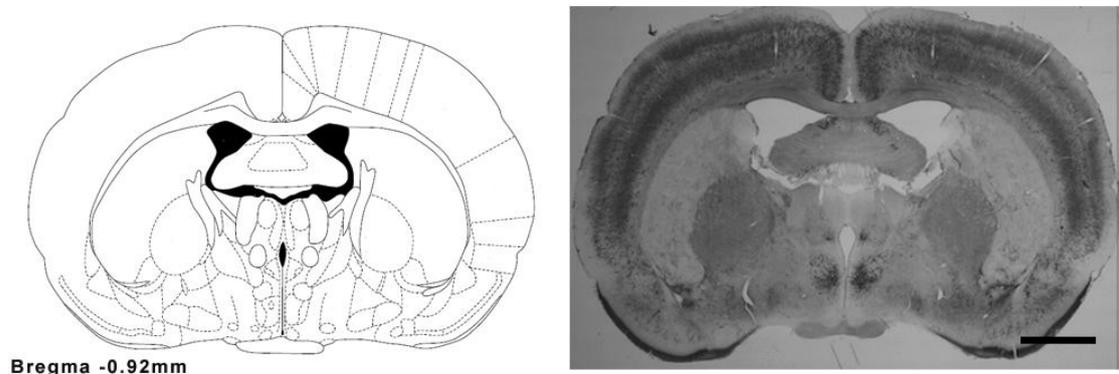


Figura 13. Expresión representativa de las PNN en áreas discretas del SNC de hembras. A la izquierda esquema de corte coronal de la micrografía mostrada a la derecha, -0,92 mm de Bregma, tomado de (Paxinos & Watson, 1997). Se observa expresión de PNN en corteza y APOm. Revelado con WFA unida a estreptavidina acoplada a peroxidasa. Aumento 0,8x. Escala de la barra= 2000 μ m.

Como se muestra en la figura 14, identificamos estas estructuras, con su patrón heterogéneo característico, con aspecto de malla con centros huecos, similar a una red alrededor de los somas celulares y con procesos radiales cortos en la corteza cerebral (Arnst et al., 2016; Härtig, et al., 1992; Miyata & Kitagawa, 2017) y en el APOm.

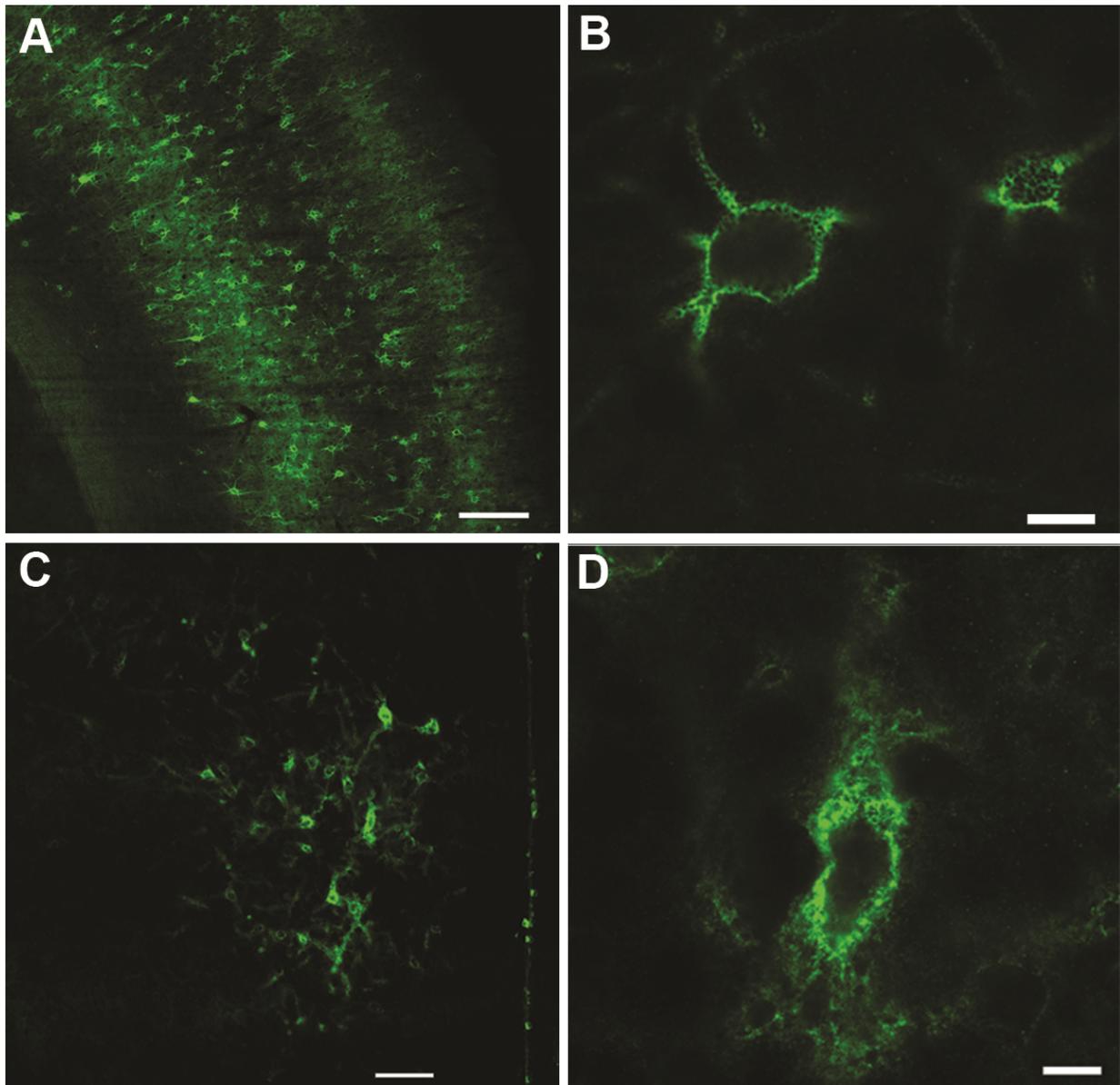


Figura 14. Expresión de las PNN asociadas a poblaciones neuronales en la corteza y el APOm de hembras en GD21. Se muestra corteza cerebral en A y B, APOm en C y D. Revelado de WFA con estreptavidina acoplada a Alexa Fluor 488. Escala de la barra en A= 100 μ m; C= 250 μ m; en B y D= 10 μ m.

Distribución de la señal

Cuando analizamos las áreas muestreadas en el encéfalo de las hembras, se detectaron diferencias entre los grupos en la densidad de la señal de las PNN, únicamente en el APOm. De forma interesante, en todos los grupos analizados, no se detectó marcación

de PNN en NAcc o en BNST; mientras que si se detectó una marca clara de PNN en CPF y HVM sin mostrar diferencias a lo largo del período reproductivo.

Luego de analizar cualitativamente las principales áreas implicadas en el circuito maternal, solo se observaron cambios evidentes en APOM por lo que se centró la cuantificación en esta área

Como se muestra en la figura 15, la marcación de las PNN en el APOM de hembras en G21, muestra un aumento gradual en el eje antero-posterior a partir de -0,80 mm de Bregma, observándose una expresión máxima en el APOM posterior (-1,08 mm de Bregma).

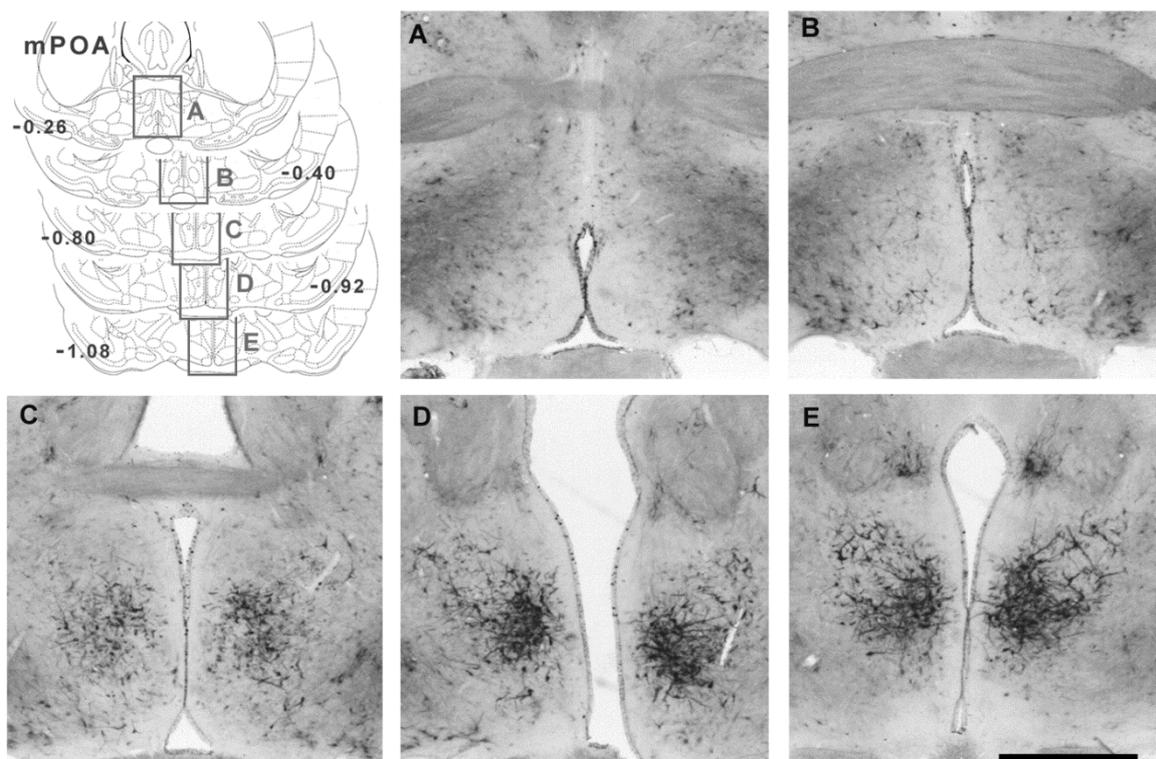


Figura15. Progresión de la señal de las PNN en el APOM de hembras gestantes en día 21. Se observa una señal máxima APOM posterior. Escala de la barra= 1000 μ m.

Al analizar el APOM de machos y de hembras durante diferentes etapas del ciclo estral y el ciclo reproductivo, encontramos diferencias notables. En este sentido, no se observó marcación de PNN en el APOM de hembras vírgenes ciclantes, en ninguna de las etapas analizadas: proestro, estro, diestro, ni machos (Fig. 17). Mientras que si se revelaron en los diferentes puntos analizados del ciclo gestación y lactancia ($F_{(8)}= 13,72$; $p<0,05$,

ANOVA) (Fig 16 y 18). Se observa un aumento en la densidad de PNN durante el progreso de la gestación, alcanzando una densidad máxima el día 21 de gestación. Luego del parto, la densidad de esta matriz disminuye significativamente para volver a elevarse el día 7 de lactancia y disminuir gradualmente hacia el destete (Fig 16 y 18).

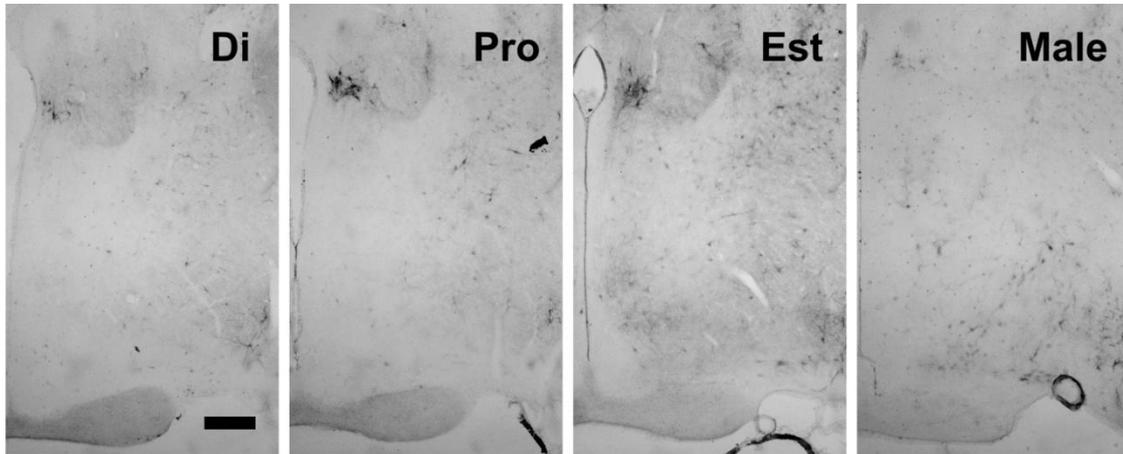


Figura 16. Micrografía del APOM (-1,08 mm de Bregma) de hembras en diestro, proestro, estro y machos, escala de la barra= 100 μ m.

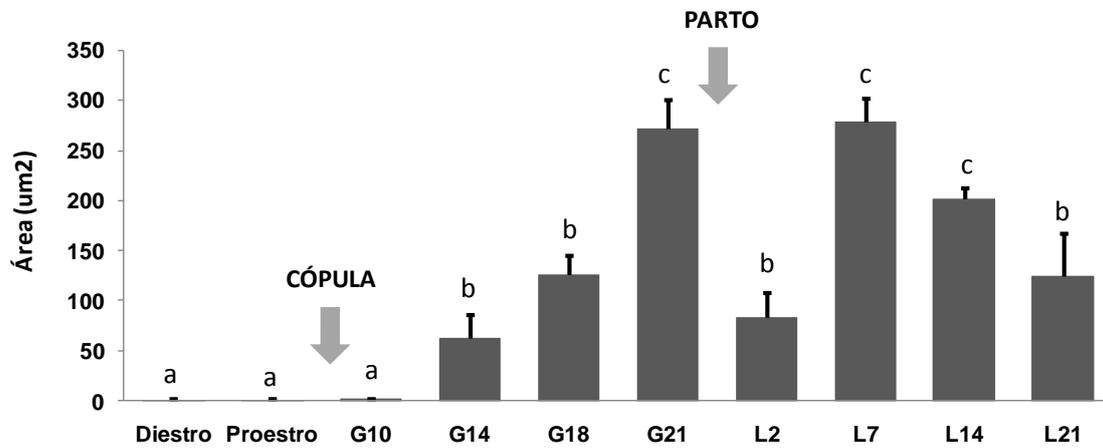


Figura 17. Área ocupada por las PNN en el APOM de hembras ciclantes, gestantes y lactantes. Los datos se muestran como media \pm SEM, letras diferentes indican diferencias significativas $p < 0,05$, prueba post hoc de Tukey.

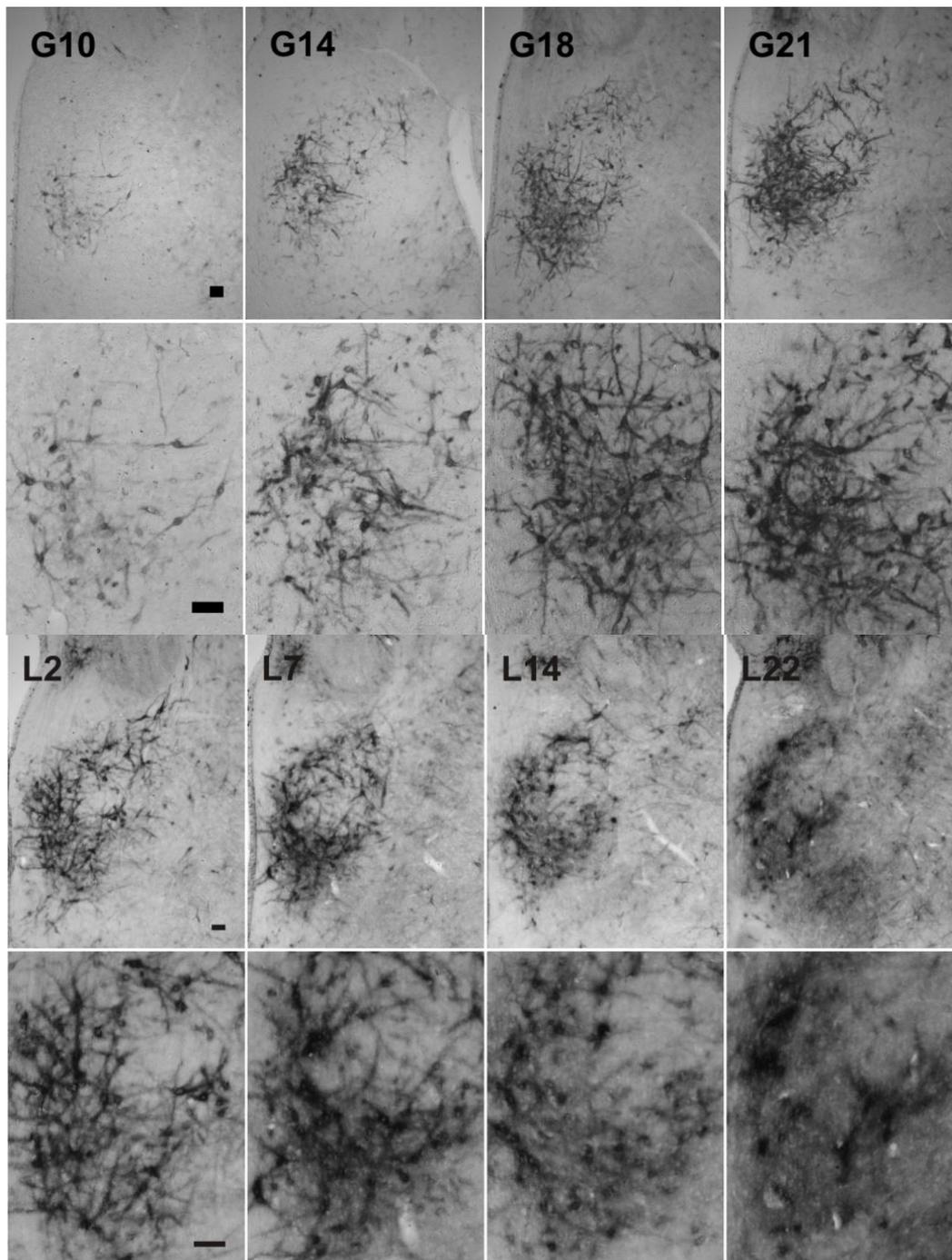


Figura 18. Micrografía del APOm (-1,08 mm de Bregma) en las que se muestran las PNN reveladas con WFA en G10 a L22. Cada día analizado se muestra en aumentos 40x imagen superior y 100x imagen inferior. Escala de la barra = 100 μ m.

CONCLUSIÓN

La expresión de PNN en el APOm de hembras adultas específicamente durante el ciclo reproductivo y no durante el ciclo estral, sugiere que esta matriz podría estar asociada a la plasticidad neural propia de este período. La densidad de las PNN varía a lo largo de la gestación y el posparto y podrían estar asociados a los cambios funcionales experimentados por esta área durante el ciclo reproductivo (Benedetto, et al., 2014; R.E. Featherstone, et al., 2000; A. Fleming & Walsh, 1994; Lee, et al., 2000; M. Numan, Corodimas, & Numan, 1988; M Numan, Marzella, & Palumbo, 1998; M Pereira & Morrell, 2009; Stack, Balakrishnan, Numan, & Numan, 2002; D. S. Stolzenberg et al., 2007; Tsuneoka et al., 2013). No se detectaron PNN en el APOm en las etapas del ciclo estral de hembras ni en machos, al igual que en estudios previos (Horii-Hayashi, Sasagawa, & Nishi, 2016; Seeger, et al., 1996). De forma interesante, si bien las principales hormonas esteroides que dirigen los cambios tanto durante el ciclo estral, como durante la gestación en las hembras son las mismas (estrógeno y progesterona), solo se observa expresión y cambios en el ensamblaje de las PNN durante el ciclo reproductivo, sugiriendo que esta expresión podría estar asociada al perfil de liberación característico de la gestación.

Experimento 5

Influencia de los esteroides gonadales en la organización de las PNN

Como vimos en el experimento anterior, la expresión de las PNN varía a lo largo del ciclo de gestación y lactancia en el APOM. Como ya se mencionó, esta área es un centro de integración hormonal (Bridges, et al., 1997; S. Fahrbach & D. Pfaff, 1986; Matthews-Felton, et al., 1995; M Numan, 1974; M. Numan, 1994; M. Numan & Numan, 1997) y la plasticidad neural observada en ella durante la maternidad, está dirigida principalmente por fluctuaciones en los niveles de los esteroides gonadales estrógenos y progesterona (C.H. Kinsley & Amory-Meyer, 2011; M Numan & Stolzenberg, 2009). De esta forma, es posible pensar que al igual que otros fenómenos de plasticidad observada en este núcleo clave para el comportamiento maternal, el estrógeno y progesterona se asocian al proceso de ensamblado y desensamblado de las PNN en esta área (a partir de la sub hipótesis 2A).

Debido a que la expresión de las PNN progresó durante la gestación, siendo máxima al final de la misma evaluamos la implicancia del perfil de esteroides gonadales de la gestación en la expresión de las PNN. Para esto utilizamos un modelo de simulación hormonal de la gestación, validado por Galea y colaboradores (Galea, Wide, & Barr, 2001) que se ha demostrado que simula los ciclos de las hormonas endógenas que acompañan la gestación natural en ratas (J. S. Rosenblatt, et al., 1988; Yoshinga, Hawkins, & Stocker, 1969). Este consiste en exponer a hembras ovariectomizadas a un régimen hormonal de estradiol y progesterona, a través de la inyección diaria y secuencial de ambas hormonas.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar si la organización de las PNN depende del perfil de esteroides gonadales propio de la gestación.

OBJETIVO ESPECÍFICO

Comparar la organización de las PNN en hembras ovariectomizadas luego de un tratamiento con estrógeno y progesterona o con vehículo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para cumplir con este objetivo se diseñaron los siguientes grupos experimentales:

- Hembras ovariectomizadas con tratamiento gestacional (día 21 de gestación) de estrógeno y progesterona (Ovx/E+P), N=5
- Hembras ovariectomizadas tratadas con vehículo por 21 días (Ovx/Veh), N=4

Ovariectomía y tratamiento hormonal

Las hembras fueron ovariectomizadas ventralmente con anestesia de 75,0 mg/kg de ketamina, 7,5 mg/kg dexylacina y 1,5 mg/kg de acedan. Luego de un período de recuperación de dos semanas, se inició el régimen de administración de hormonas. Diariamente se inyectó subcutáneamente vehículo u hormona a cada rata por 21 días. Al grupo control se le administró 0,1 ml de aceite diariamente durante los 21 días de tratamiento. Al grupo E+P se le administró dosis bajas de estradiol benzoato (2,5 µg) combinado con una alta dosis de progesterona (4 mg) disuelto en 0,1 ml de aceite por 16 días. Del día 17 al 21 las ratas recibieron altas dosis de estradiol benzoato (50 µg) disuelto en 0,1 ml de aceite (Galea, et al., 2001) (Fig. 19).

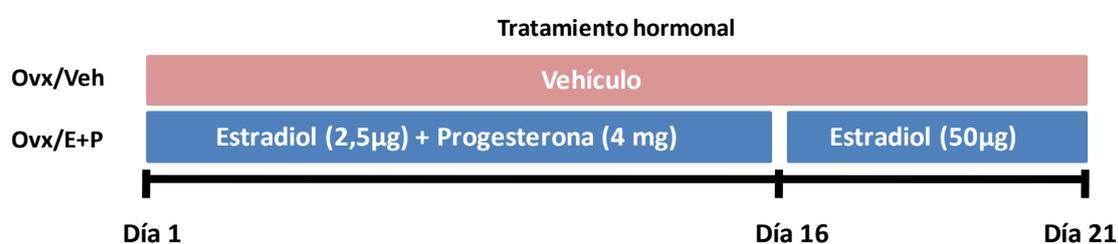


Figura 19. Representación esquemática del tratamiento hormonal de simulación gestacional realizado en hembras ovariectomizadas tratadas con vehículo (Ovx/Veh) o con estrógeno y progesterona (Ovx/E+P).

Análisis de las PNN

El análisis de las PNN se realizó de acuerdo a lo descrito para el experimento 4.

RESULTADOS

Las hembras que fueron sometidas al tratamiento hormonal de simulación de gestación, expresaron PNN en el APOm en relación al grupo tratado con vehículo ($T_{(7)} = 2,979$, $p < 0,05$ prueba t de Student; Fig. 10). Esta expresión mostró el mismo patrón en

gradiente antero-posterior que el observado en los grupos del experimento 4, con una densidad máxima hacia la parte posterior del APOm.

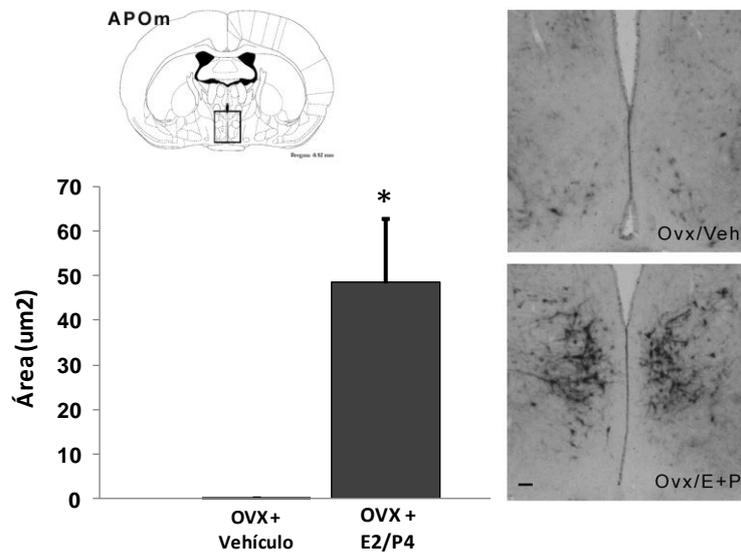


Figura 20. El gráfico muestra el área ocupada por PNN en el APOm de hembras ovariectomizadas tratadas con vehículo (Ovx/Veh) y tratadas con estrógeno y progesterona (tratamiento de simulación de gestación) (Ovx/E+P). Los datos se expresan como media±SEM, * $p < 0,05$ prueba t de Student. En el esquema del APOm se indica la ubicación de la señal máxima detectada, -0,92 mm de Bregma. A la derecha, se muestran micrografías del APOm en ambos grupos. Escala de la barra = 100µm.

CONCLUSIÓN

Los resultados del presente experimento nos sugieren que los cambios en la organización de las PNN observados en el APOm durante la gestación, dependen del perfil de hormonas gonadales característico de este período. Sin embargo, la fluctuación de estas hormonas durante el ciclo estral no induce la organización de las PNN (Experimento 4) lo que nos indica que para que esta matriz se estructure de la forma observada en hembras gestantes, es necesario niveles de estrógeno y progesterona sostenidos (como ocurre en la gestación) y no cíclicos (como ocurre en el ciclo estral). Este resultado resalta el rol de las hormonas en la dirección de los cambios estructurales que experimenta el SNC durante la transición a la maternidad.

Experimento 6

Caracterización de la reorganización de la matriz extracelular en el APOm de madres con CS que difieren en la exposición hormonal de la gestación y en la experiencia maternal previa.

La experiencia reproductiva previa incrementa la respuesta maternal en futuras exposiciones a crías (Bridges, 2016). En este sentido, hembras multíparas prefieren a las crías neonatas sobre un macho durante el estro posparto más que hembras primíparas (D Agrati, Fernández-Guasti, et al., 2008; D. Agrati, et al., 2016), aprietan más veces una palanca para obtenerlas (Lee, et al., 2000) y su comportamiento maternal es más resistente que en primíparas al efecto deletéreo de la denervación olfatoria (Schwartz & Rowe, 1976). A su vez, hembras ciclantes que tuvieron una experiencia maternal previa sensibilizan más rápido ante la re exposición a crías (Bridges, 1975). La experiencia reproductiva contribuye al remodelado del cerebro maternal; se alteran los niveles circulantes de hormonas y la expresión de sus receptores en el APOm, resultando en modificaciones en los procesos neurales y el soporte glial (Bridges, 2016). Esto indica que el cerebro de una madre cambia con la experiencia de la maternidad volviéndose más sensible al estímulo crías permaneciendo de alguna manera, una memoria maternal (R.E. Featherstone, et al., 2000; A. Fleming & Korsmit, 1996; A. Fleming, O'Day, & Kraemer, 1999; A. Fleming & Sarker, 1990; A. S. Fleming & J. S. Rosenblatt, 1974).

Sobre esta base nos propusimos analizar si las PNN constituyen parte de estos cambios en el SNC de larga duración asociados a la experiencia reproductiva, evaluando si una vez concluida la etapa de cuidado de las crías, las hembras primíparas mantienen cambios estructurales a nivel de esta matriz en el APOm. A su vez, para profundizar sobre la posible implicancia de la experiencia maternal previa en los cambios estructurales experimentados por las PNN en el APOm en futuras experiencias reproductivas, analizamos su expresión en esta área en hembras que cuentan con una experiencia maternal previa y en hembras que superponen dos ciclos de maternidad como es el caso de las hembras que crían en camadas superpuestas durante el posparto. Finalmente, teniendo en cuenta que la organización de las PNN en el APOm puede mediar aspectos del comportamiento maternal de las hembras y que esta organización es dependiente del perfil hormonal de la gestación (Experimento 5) y podría ser modulada a su vez por la experiencia nos preguntamos cómo afectan ambos factores –perfil

endócrino de la gestación y experiencia maternal- a la expresión y organización de las PNN en el APOm de madres con CS.

Evaluamos la expresión de las PNN en el día 5 de posparto, en hembras multíparas (hembras que tuvieron una experiencia previa de gestación y lactancia, fueron destetadas y vueltas a preñar), así como en hembras con CS (que gestaron y lactaron dos camadas simultáneamente) y hembras con CS que difieren en la exposición hormonal de la gestación y el parto y de la experiencia maternal previa (grupos del experimento 2), así como de hembras primíparas alejadas del período de destete.

HIPOTESIS 2B

La experiencia reproductiva modifica de forma duradera la expresión de las PNN, evidenciándose este efecto en los subsiguientes ciclos reproductivos de las hembras.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la expresión de las PNN el APOm de hembras que poseen experiencia maternal y reproductiva así como determinar la implicancia de la exposición hormonal de la gestación y la experiencia maternal previa en esta expresión.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analizar la expresión de las PNN en el APOm de hembras que cuentan con una experiencia maternal previa, diez días luego del destete y en fase de diestro.
- Evaluar la expresión de las PNN en el APOm de hembras multíparas con camada simple.
- Evaluar la expresión de las PNN en el APOm de hembras con CS y que difieren en la exposición hormonal y maternal previas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para cumplir con estos objetivos, se diseñaron los siguientes grupos:

- **Múltiparas:** ratas lactantes con camada simple de neonatos. N=4
- **Camadas Superpuestas (CS control):** ratas lactantes con camadas superpuestas (neonatos y juveniles). N=4
- **Camadas Superpuestas sin Experiencia Maternal (CS exp-):** ausencia de experiencia maternal con la primera camada. N=5
- **Camadas Superpuestas sin Gestación y Parto (CS gest-):** ausencia de segunda gestación y parto. N=6
- **Hembras primíparas en diestro, 8-10 días luego del destete – destete en día 22 posparto- (Destetada),** N=5

Animales

Los animales se obtuvieron de igual manera que lo descrito en los experimentos 4 y 5. Se utilizaron los encéfalos de hembras del experimento 2 que fueron perfundidos y procesados para realizar la técnica citoquímica una vez que se concluyeron las pruebas comportamentales y según lo explicado en el experimento 4. Las hembras múltiparas se obtuvieron de preñar nuevamente a hembras que cumplieron con un ciclo de gestación y lactancia, fueron destetadas y vueltas a preñar. Todas las hembras tuvieron 4 meses de edad al momento de la extracción del encéfalo y 5 días posparto. Los encéfalos de las hembras destetadas se obtuvieron luego de la comprobación de dos ciclos estrales después del reinicio de la ciclicidad, 10 días post destete aproximadamente. Este procedimiento se llevó a cabo entre las 10:00 y 12:00 hs durante la fase de luz del ciclo luz/oscuridad

Análisis de las PNN

El análisis se realizó de acuerdo a lo descrito en experimentos anteriores.

RESULTADOS

Cómo se muestra en la Figura 21, las hembras en diestro con experiencia maternal y reproductiva previa exhibieron marcación de WFA en el APOm, aunque débil y difusa, a diferencia de la ausencia de marca observada en las hembras vírgenes en diestro del experimento 4. Una segunda gestación y parto incrementó significativamente la densidad de las PNN (Destetadas vs Multíparas, CS control, CS exp- y CS gest- $p < 0,05$, prueba de Tukey, Fig. 21).

Las hembras con CS control mostraron una densidad alta de PNN en el APOm al igual que las hembras con CS que tuvieron segunda gestación, pero no experiencia previa con crías (CS exp-). De forma interesante las hembras que tuvieron experiencia maternal previa pero no gestaron su segunda camada (CS gest-), expresaron menos PNN en el APOm respecto a las hembras CS control y las CS exp- (CS control y CS exp- vs. CS gest- $p < 0,05$, prueba de Tukey, Fig. 21).

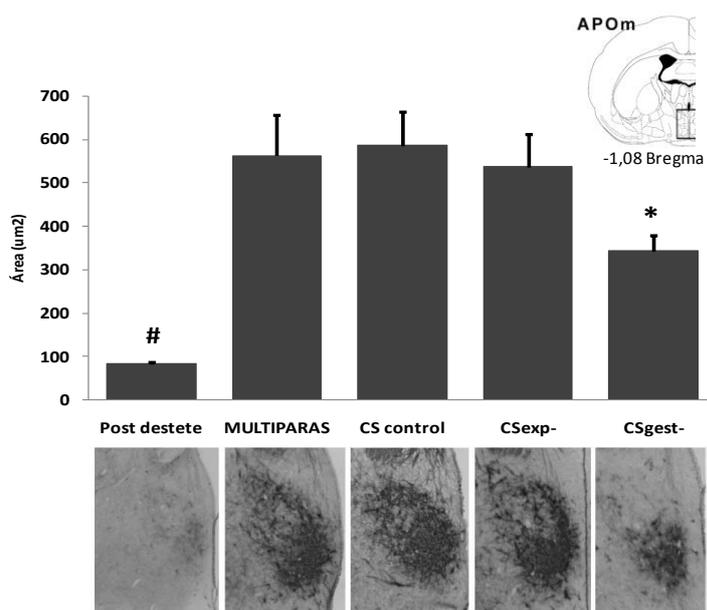


Figura 21. Área de la señal de las PNNs en el APOm de hembras primíparas en diestro (Destetadas), multíparas con camada simple (Multíparas) y con camadas superpuestas que tuvieron una segunda gestación y experiencia maternal previa (CS control), hembras con camadas superpuestas que no tuvieron experiencia maternal previa (CS exp-) y hembras con camadas superpuestas que no gestaron a la segunda camada (CS gest-). Los datos se expresan como media \pm SEM, * $p < 0,05$ vs Multíparas, CScontrol y CSexp-, # $p < 0,05$ vs destetadas, Multíparas, CS control y CS exp-, prueba de Tukey. En las micrografías inferiores se muestra la expresión de PNN en el APOm de estos grupos; -1,08 mm de Bregma, escala de la barra = 100 μ m.

En un análisis complementario, comparamos la expresión de PNN en los grupos de hembras que experimentaron dos gestaciones y partos, Multiparas y CS control, con la observada en primíparas en días similares de posparto: primíparas en día 7 vs multíparas y CS control en día 5. Observamos que la densidades mayor en ambos grupos de hembras multíparas respecto a las primíparas ($F_{(3)}= 4,98$, $p<0,05$, ANOVA, Fig. 22). Notablemente al comparar la expresión de PNN en hembras CS gest-, que no tuvieron una segunda gestación ni parto pero se mantienen con crías neonatas y juveniles(cronológicamente en período de destete),con hembras cuidando camadas simples en el día L22, observamos que las CSgest- exhiben una densidad mayor que las L22 ($T_{(7)}= 3,77$, $p<0,05$, Fig 22).

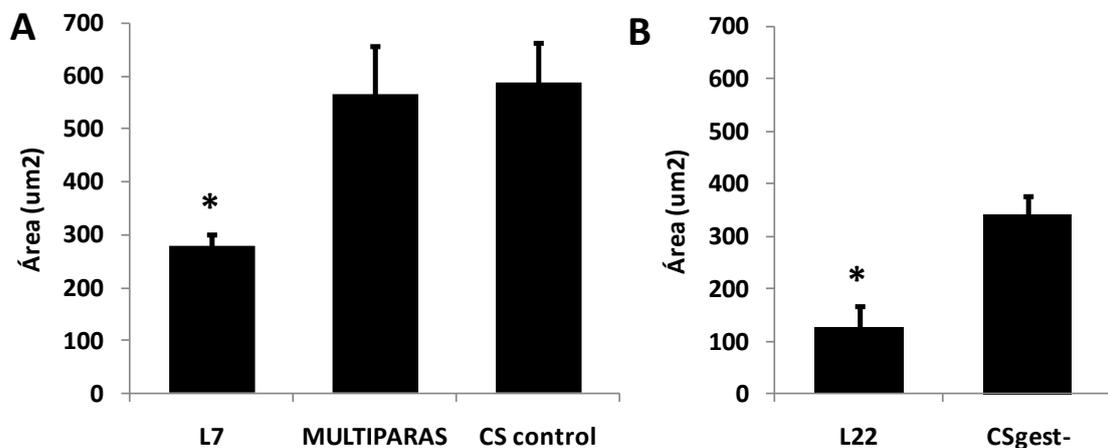


Figura 22. Área de la expresión de PNN en el APOm, en hembras primíparas en día 7 del posparto (hembras del experimento 4) y de hembras Multiparas y CS control (A) y de hembras primíparas en día 22posparto (grupo del experimento 4) y hembras CSgest- (B). Los datos se expresan como media±SEM, * $p<0,05$ prueba pos hoc de Tukey para la comparación en panel A y prueba t de Student para la comparación en panel B.

CONCLUSIÓN

De forma interesante, las PNN en el APOm-aunque a niveles mínimos-, persisten aún luego de transcurrida la maternidad cuando las hembras han vuelto a presentar ciclicidad ovárica, en línea con varios trabajos que indican que la maternidad provoca cambios a largo plazo en el SNC de las hembras (Bridges, 2016). El incremento en la expresión de las PNN luego de un segundo parto (al comparar con las primíparas en días similares del posparto, indican que la experiencia reproductiva previa y la re

exposición hormonal de la segunda gestación potencian su expresión. Esto puede estar facilitado por el nivel latente de componentes de la matriz extracelular que permanecen en esta área aún después del destete de la primera camada.

En una nueva experiencia maternal, las hembras CS exp- que gestaron y parieron una segunda vez exhibieron mayor densidad de PNN en el APOm que las hembras que no gestaron la segunda camada (CS gest-), señalando el papel crucial de los cambios endócrinos de la gestación en la organización de la matriz extracelular y reafirmando los resultados previos en los que observamos que la exposición al perfil hormonal de la gestación, es necesario para la organización de este tipo de matriz extracelular en el APOm. Sin embargo, el hecho de que las CS gest-, que se encuentran en un posparto tardío similar al L22, muestren una expresión mayor de PNN que las primíparas, indica que la interacción con las crías neonatas también juega un papel en el mantenimiento de esta estructura.

Discusión general

Principales resultados y conclusiones de esta tesis

- Para las madres que crían a camadas de forma superpuesta, con diferentes edades y demandas fisiológicas, tanto los juveniles como los neonatos tienen valor de incentivo, sin embargo el valor de las crías neonatas es mayor.
- Este perfil particular de expresión del comportamiento maternal, no está mediado únicamente por las características de las crías, sino también por factores endócrinos y la experiencia maternal previa. Ambos factores son necesarios para la adaptación comportamental exhibida por las madres que crían en CS, sin embargo la exposición hormonal asociada con la segunda gestación resulta crítica para la expresión adecuada del comportamiento y la motivación maternal.
- A su vez, si bien el APOm tiene un rol fundamental en la regulación de la respuesta maternal, la flexibilidad comportamental de las madres con CS podría estar mediada por otras áreas del circuito maternal implicadas en procesos vinculados a la toma de decisión, elección de estrategias y procesos atencionales como la CPFm.
- Además de exhibir cambios funcionales durante el progreso de la gestación y el parto, el APOm experimenta una remodelación de la matriz extracelular condensada: PNN. Este cambio estructural depende fundamentalmente del perfil hormonal de la gestación que a su vez, sensibiliza y potencia su expresión en futuras experiencias reproductivas. Por otra parte, las crías también ejercen un rol potenciador en la expresión de las PNN.

Factores que modulan la motivación maternal en hembras con CS

En el primer experimento demostramos que, independientemente de sus características hormonales o de las características en la composición de la camada, las crías, tanto neonatas como juveniles, tienen un fuerte valor de incentivo para las hembras lactantes. Los tres grupos de hembras, tanto multíparas en posparto temprano y tardío, como hembras con camadas superpuestas, prefieren a los compartimientos que contienen crías frente al neutro. Estos resultados van en línea con estudios previos sobre la motivación maternal en otros contextos o paradigmas comportamentales (D. Agrati, et al., 2016; Ferreño, et al., 2018; A. Fleming, et al., 1994; Lee, et al., 2000; B. J. Mattson, et al., 2001; M Pereira & Ferreira, 2006; Wansaw, et al., 2008). En este sentido, es importante destacar que la elección de las crías juveniles no se debe a que estas representan simplemente un estímulo social, ya que hembras primíparas en postparto tardío prefieren a las crías juveniles frente a un estímulo social neutro (como se muestra en experimento anexo de esta tesis: ANEXO 2). En conjunto estos experimentos indican que más allá de que el comportamiento maternal disminuya a medida que el posparto progresa y las crías crecen y ganan independencia, las crías juveniles siguen siendo estímulos con valor de incentivo.

El valor de incentivo de las crías no está determinado únicamente por sus características ya que de ser así, las madres que se encuentran en el posparto tardío deberían preferir a las crías neonatas sobre las juveniles. Sin embargo, este no fue el caso y las hembras en posparto tardío (MPTard) no establecieron una preferencia entre ambos tipos de crías e invirtieron más tiempo junto a los juveniles que las hembras en posparto temprano (MPTemp.) Esto sugiere que factores intrínsecos a las hembras, más allá de las características de las crías, están jugando un papel fundamental en la asignación del valor de incentivo relativo de estos estímulos. Apoyando esta idea, las hembras con CS, invirtieron tiempos similares junto a ambos tipos de crías sugiriendo que en este contexto reproductivo ambos estímulos poseen valor de incentivo para ellas. Este resultado, a su vez, apoya la hipótesis de que los bajos niveles de comportamiento maternal de madres con CS hacia los juveniles observados en estudios previos (N Uriarte, et al., 2008), se deben a un ajuste de esta conducta hacia crías que poseen menores demandas más que a una pérdida de interés en ellos.

No obstante, las hembras CS exhiben un perfil motivacional único cuando ambos tipos de crías están presentes. Así, mientras que no observamos diferencias en la cantidad de tiempo junto a los compartimientos de ambas crías en este grupo de madres, invierten un tiempo similar al de las hembras multíparas MPTemp junto a neonatos y al de las multíparas MPTard. junto a juveniles. A pesar de esto, realizaron más intentos por obtener a los neonatos que a los juveniles lo que sugiere que si bien ambos tipos de crías tienen valor de incentivo para las madres CS, el valor relativo de los neonatos frente a los juveniles es mayor. Podemos especular que esta diferencia observada en el esfuerzo realizado hacia los neonatos por las madres CS podría deberse a una liberación diferencial de DA en el NAcc provocada por el procesamiento de las características diferentes de ambos tipos de crías. La liberación de DA en esta región se ha asociado a los aspectos activacionales de la motivación, o sea a aquellos aspectos asociados al esfuerzo que hacen los animales por obtener el estímulo (Cousins & Salamone, 1994; Salamone & Correa, 2012). En esta línea, se ha demostrado que las ratas lactantes exhiben un aumento en los niveles de DA en el NAcc cuando interactúan con las crías (FA Champagne et al., 2004; Hansen, Bergvall, & Nyiredi, 1993; Robinson, Zitzman, & Williams, 2011; Shnitko et al., 2017), incluso aunque las puedan oler, ver y escuchar pero no tocarlas (Afonso, Shams, Jin, & Fleming, 2013) como ocurre en el laberinto Y en este trabajo. Curiosamente, Hansen y colaboradores (1993) observaron que las crías embadurnadas con tierra provocan respuestas maternas más activas y un aumento mayor de los niveles de DA en el NAcc que las crías limpias. En esta línea, las hembras lactantes prefieren crías que tienen sus demandas aumentadas a través de la separación de la madre por un período de 12hs sobre crías no demandantes (M Pereira & Ferreira, 2006). A la luz de estos trabajos previos, tomando en cuenta que los neonatos poseen mayores demandas fisiológicas que los juveniles, es posible que sus características sensoriales evoquen una mayor liberación de DA en el NAcc en las madres CS y en consecuencia, un mayor esfuerzo para tener acceso a las mismas.

A partir de los resultados obtenidos en el Experimento 2 concluimos que este perfil motivacional único de las hembras con CS, depende principalmente de las hormonas de la gestación y el parto, más que de la experiencia de crianza de la primera camada. En este experimento, en ninguna de las dos condiciones en las que faltaba un factor u otro – perfil endócrino de segunda gestación o experiencia maternal previa- se alcanzaron los niveles de expresión comportamental y motivacional observados en las hembras CS. Sin

embargo el efecto de no haber gestado una segunda camada y por consiguiente no haber experimentado los cambios hormonales de la gestación reciente, fue más deletéreo para esta expresión, que no haber experimentado la crianza de la segunda camada. Esta superposición de la gestación y lactancia se asocia a un perfil endócrino característico que difiere del observado en hembras con camada simple (Grotá & Eik-Nes, 1967; Hansen, et al., 1983; Smith & Neill, 1977; K. Taya & Greenwald, 1982). Así, los niveles y el perfil de estrógeno y prolactina en animales que gestan una segunda camada mientras amamantan a la primera, son diferentes en comparación con los animales que solo lactan a una camada. En ratas que solo lactan, se observa una disminución en los niveles de estrógeno en el día 14 en comparación con los días anteriores, mientras que en ratas gestantes y lactantes esta disminución no se observa y además éstos son más altos que los observados en ratas que solamente se encuentran lactando. Los niveles de prolactina se mantienen elevados en ambos tipos de hembras a partir de la primera semana de lactancia y decaen hacia el período de destete, sin embargo esta disminución es menor en el grupo que gesta y lacta simultáneamente. Es decir, existe una marcada diferencia en estas dos condiciones reproductivas, mientras que la progesterona muestra niveles constantes con ligeras diferencias no significativas entre ambos grupos (Camacho-Arroyo et al., 2018). Sea el perfil endócrino particular de la gestación conjunto con la lactancia o el hecho de pasar por los cambios endócrinos de una gestación y parto reciente, los resultados de este experimento muestran que los factores endócrinos tienen un rol más relevante que la experiencia maternal previa en esta adaptación. En este sentido, si bien hembras que tuvieron experiencia maternal reciente sensibilizan más rápido ante la re-exposición a crías que hembras inexperientes (A. Fleming & Sarker, 1990), la administración de esteroides en el APOM provoca la sensibilización inmediata (S. E. Fahrback & D. W. Pfaff, 1986).

Por otro lado, la experiencia maternal reciente, es decir el tiempo de interacción madre-crías, también refuerza el vínculo y promueve el comportamiento maternal, ya que luego de 5 días de interacción posparto con crías neonatas y juveniles, tanto las madres CSgest- como las CSexp- mejoraron la expresión de algunos componentes del maternal (como los lamidos) y de la motivación evaluada en el laberinto en Y. Así las CSexp- aumentan el tiempo junto a neonatos en relación a las CSgest- y éstas comienzan a preferir a ambos estímulos reforzadores, algo que no ocurre en el día 2 posparto. En esta línea, clásicamente se ha demostrado que la exposición continua a crías resulta en el

desarrollo de comportamiento maternal en hembras vírgenes sorteando la dependencia hormonal (A. Fleming & J. Rosenblatt, 1974; J. S. Rosenblatt, 1967; J. Terkel & Rosenblatt, 1971). A su vez, se ha propuesto que la interacción madre-crías luego del parto no solo es fundamental para consolidar el comportamiento maternal, sino para reforzarlo (Alison S. Fleming et al., 1994; Magnusson & Fleming, 1995; M Pereira & Morrell, 2011). De todos modos, existe evidencia de que la sensibilización es promovida durante el proestro del ciclo estral cuando ocurre el pico pre-ovulatorio de estrógeno, progesterona y prolactina (Savoy-Moore, Schwartz, Duncan, & Marshall, 1980), resaltando la importancia de las hormonas reproductivas en facilitar la inducción y mejorar la calidad del comportamiento maternal en hembras (D Agrati, Zuluaga, Fernández-Guasti, Meikle, & Ferreira, 2008; Bridges, 1984; Bridges, et al., 1997; M Numan, et al., 1977; M Numan & Stolzenberg, 2009; J. M. Stern & McDonald, 1989).

Si bien el perfil hormonal de la gestación reciente parece estar modulando de forma más significativa la expresión comportamental y motivacional en las madres CS, estos resultados también ponen en evidencia la sinergia entre el perfil hormonal y la interacción con las crías para una adecuada expresión del comportamiento maternal.

Cuando evaluamos la implicancia del perfil endócrino asociado a la gestación, así como la experiencia de crianza asociada al primer parto en la motivación maternal de las hembras con CS, observamos que además de los intentos por obtener a los neonatos, las hembras con CS invierten más tiempo junto a ellos en el laberinto en Y. Es posible que esta diferencia con respecto al resultado obtenido en el primer experimento (ausencia de preferencia entre ambos tipos de crías), se deban a las diferencias en los protocolos experimentales utilizados. Mientras que en el Experimento 1, las hembras fueron evaluadas únicamente en el modelo de preferencia, en el Experimento 2 fueron evaluadas previamente en una prueba de comportamiento maternal que se realizó con un período previo de separación de 10 minutos, con el fin de estimular la expresión del comportamiento maternal (M Pereira & Ferreira, 2006; J. Stern & Keer, 1999). Esta estimulación del comportamiento maternal podría promover la preferencia de las crías neonatas que son quienes tienen mayores demandas.

Este procedimiento estimula la ejecución del comportamiento maternal e incrementa las demandas de las crías (Hofer, Brunelli, Masmela, & Shair, 1996; Hofer, et al., 1994; Lin, Galindo-Leon, Ivanova, Mappus, & Liu, 2013).

En el Experimento 2, durante la prueba de maternal no se registraron casi conductas maternas hacia juveniles, a diferencia de lo observado previamente en un registro continuo (N Uriarte, et al., 2008). Cuando se evalúa el comportamiento maternal con el método de registro continuo en el que se mantiene a la hembra con su camada en el nido sin provocar alteraciones, se observan conductas maternas hacia juveniles, aunque sensiblemente menos que hacia los neonatos (N Uriarte, et al., 2008). Es posible pensar que para estimular el comportamiento maternal hacia los juveniles, es necesario un período de separación maternal mayor. En este sentido Wansaw y colaboradores (2008), concluyen que para visualizar una preferencia a lugar robusta asociada a crías juveniles durante el posparto tardío (de edad pareada al período posparto evaluado, 12 a 15 días PP), es necesario un período de separación maternal de al menos 22 hs, aún cuando se ha reportado que en el posparto tardío las hembras invierten poco tiempo en contacto con los juveniles (Grotta & Ader, 1969; Reisbick, et al., 1975). Así, la interacción entre la madre y sus crías es dinámica y la estrategia de cuidado, se adapta al contexto y a las necesidades de la dñada.

El APOM y la respuesta maternal de las madres con CS

Rol funcional de APOM

El hecho de que la inactivación de manera transitoria el APOM de hembras con CS disminuyera significativamente el cuidado maternal hacia los neonatos sin modificar las escasas actividades de cuidado dirigidas hacia los juveniles, no apoya nuestra hipótesis inicial que sostenía que la inhibición de la actividad del APOM en hembras con CS disminuiría el CM hacia neonatos y al mismo tiempo aumentaría hacia las crías juveniles. Esta hipótesis se sustenta en la propuesta de Pereira & Morrell (2009) de que el APOM regula la expresión del comportamiento maternal a través de integrar los estímulos provenientes de las crías, promoviendo de esta forma el CM hacia crías neonatas que presentan altas demandas, e inhibiendo el CM hacia crías con un grado de desarrollo mayor (M Pereira & Morrell, 2009). En este sentido, si bien la disminución de CM hacia neonatos observada en esta tesis luego de la inactivación de APOM coincide con lo reportado por Pereira & Morrell (2009) durante el posparto temprano, en este trabajo la inactivación en el posparto tardío aumenta el CM hacia los juveniles, efecto que no fue observado en esta tesis.

Es importante señalar que la inactivación de APOm en hembras en CS a los 5 días del segundo parto tuvo un efecto similar a la misma manipulación en hembras primíparas durante el posparto temprano, lo que sugiere que las adaptaciones del SNC que subyacen la expresión del CM de madres con CS está mediada principalmente por el perfil hormonal de la gestación y si bien se encuentran en un posparto tardío comportamental (con los juveniles del primer parto), prima el control neuroendócrino del posparto temprano. Esta idea se reafirma con los resultados del Experimento 2 que destacan la importancia del perfil endócrino de la segunda gestación y parto para la expresión del comportamiento y la motivación maternal en el contexto reproductivo de CS.

La disminución de la ejecución de componentes activos del CM hacia neonatos junto con la reducción de su preferencia luego de inactivar APOm, indica que esta área estaría promoviendo respuestas maternas activas hacia las crías. En este sentido, se ha postulado que la proyección de APOm al sistema dopaminérgico mesolímbico media los aspectos motivacionales del CM (M. Numan, 2012; M Numan & Stolzenberg, 2009). De todas formas, es interesante destacar que en estudios realizados en nuestro laboratorio observamos que a pesar de que las hembras con CS realizan escasas conductas maternas hacia los juveniles en una prueba de comportamiento maternal, la actividad neural del APOm (medida a través de la expresión de la proteína c-Fos) es similar a la observada cuando las hembras con CS son expuestas a neonatos en el día 5 posparto; mientras que sí se observa un expresión diferencial en las diferentes subregiones de la CPFm y el núcleo de la estria terminalis ventral (Pose et al, manuscrito en preparación ANEXO 4). Podemos pensar entonces que independientemente de las características de las crías, durante el posparto temprano en las hembras con CS este estímulo es procesado en el APOm como un único estímulo: “crías”. Por otra parte, otras áreas implicadas en el circuito neural maternal modularían la especificidad de la salida comportamental frente a ambos tipos de crías, probablemente de forma dependiente de las demandas de éstas (Afonso, et al., 2013; Hansen, et al., 1993) Pose et al., en preparación). Una región que podría ser clave para esta función es la CPFm, ya que sus diferentes subregiones, han sido implicadas en el reconocimiento de estímulos, la selección atencional, flexibilidad y toma de decisiones en torno a estímulos incentivos complejos (Floresco, et al., 2008; M. Pereira & J. Morrell, 2011; Ragozzino, et al., 1999; Rich & Shapiro, 2009; Romanides, et al., 1999)

Pose et al., en preparación). De forma interesante, observamos que madres con CS exhiben una activación mayor de la subregión infralímbica luego de exposición a crías neonatas y de la subregión prelímbica luego de la exposición a crías juveniles (ver ANEXO 4), indicando que estas regiones pueden mediar la adaptación comportamental de estas madres.

En esta línea, la maternidad mejora la capacidad cognitiva. Por ejemplo, aumenta la memoria espacial de las ratas, que involucra una neuroplasticidad notable del hipocampo (C.H. Kinsley et al., 1999; Love et al., 2005). Además, mejora la atención y flexibilidad comportamental, habilidad que depende de la CPFm donde ocurre un incremento en la densidad de espinas dendríticas durante el posparto (Albin-Brooks, Nealer, Sabihi, Haim, & Leuner, 2017; B Leuner & Gould, 2010). Esta área también ha sido implicada en la organización secuencial de comportamientos desencadenados a partir de estímulos con valor de incentivo como el comportamiento maternal (Afonso, Sison, Lovic, & Fleming, 2007). También, se ha demostrado que la promoción de las habilidades cognitivas se producen no solo en madres primíparas, sino también en multíparas, lo que sugiere que la maternidad en general estimula las funciones cognitivas (Barha, Lieblich, Chow, & Galea, 2015; Macbeth, Scharfman, Maclusky, Gautreaux, & Luine, 2008; Paris & Frye, 2008; J. L. Pawluski, et al., 2006) y estaría asociado a altos niveles de respuesta maternal (V Lovic & Fleming, 2004). Así, el contexto de crianza de las madres que tienen camadas superpuestas es más complejo y exigente y requieren adaptar su comportamiento y adecuarlo a la nueva conformación de la camada de crías con diferentes necesidades y demandas. Para lograr esto, es posible que las madres CS desarrollen una mayor flexibilidad cognitiva en relación a las madres que crían en camada simple.

Cambios estructurales en APOm

Expresión de PNN y factores endócrinos

Si bien la maternidad es un período de gran plasticidad estructural y funcional del SNC (R.E. Featherstone, et al., 2000; Hillerer, et al., 2014), hasta ahora, no se habían analizado los posibles cambios en la matriz extracelular, fuertemente implicada en la regulación de los procesos de plasticidad neural, en este período tan relevante del ciclo de vida de las hembras. Nuestros resultados mostrando cambios drásticos en la densidad y organización de las PNN en el APOm a lo largo del ciclo de gestación y lactancia, sugieren que esta estructura de la matriz extracelular posee un papel en las adaptaciones asociadas a la maternidad. Así, podemos especular que la alta organización de las PNN previo al parto permitiría estabilizar nuevas conexiones en el circuito maternal y su remodelación permitiría la adaptación comportamental a lo largo del posparto así como la transición hacia el destete. Si bien en nuestro estudio hasta el momento no podemos establecer una relación causal con la maternidad, los cambios en la organización de las PNN van en paralelo con los cambios observados en el perfil de las hormonas esteroides gonadales de las hembras durante el transcurso del proceso gestacional y el posparto; perfil endócrino que ha sido asociado al despliegue del CM (Bridges, 2015). En este sentido, los esteroides gonadales parecen ser quienes dirigen la expresión de las PNN ya que hembras ovariectomizadas que fueron sometidas a un tratamiento hormonal de estrógeno y progesterona que simula el proceso de gestación, exhibieron un alto patrón de expresión. Además, pudimos establecer que para que se exprese esta matriz, es necesario un patrón sostenido de estas hormonas como ocurre en la gestación, y no cíclico como ocurre durante el ciclo estral ya que no observamos en hembras vírgenes (en ninguna de las etapas del ciclo), la expresión de este tipo de organización en la matriz extracelular. Así, las alteraciones crónicas en las hormonas reproductivas probablemente tienen efectos más sobresalientes en el sistema nervioso y el comportamiento de las hembras, que las fluctuaciones transitorias observadas a lo largo del ciclo estral.

Particularmente, los cambios observados durante la progresión de la gestación y el posparto, tienen una remarcada similitud con los cambios en los niveles de progesterona durante este ciclo, ya que al igual que la expresión de las PNN, la concentración de progesterona en plasma comienza a aumentar en el día 10 de gestación y se mantiene a niveles máximos sostenidos entre los días 14 y 18 de gestación (Bridges, 1984; J. S.

Rosenblatt, et al., 1988). Previo al parto, esta hormona disminuye drásticamente, luego se mantiene estable durante los primeros 2 días posparto y aumentan significativamente hacia el día 3 manteniéndose elevada hasta el día 14 en el que disminuye gradualmente hasta el día 21 cuando se observan niveles similares a los del periparto (Grota & Eiknes, 1967; Hansen, et al., 1983). Existe evidencia previa que establece que otros cambios estructurales en el APOm de hembras maternas, como son cambios en la densidad de espinas dendríticas asociadas al establecimiento de nuevas conexiones sinápticas (Pascual-Leone, Amedi, Fregni, & Merabet, 2005), son dependientes de la progesterona (D.D. Murphy & Segal, 1996; D.D. Murphy & Segal, 2000; Sakamoto, Ukenaa, & Tsutsui, 2002; Woolley & McEwen, 1993). Por otra parte, dentro de las 24 hs seguidas al parto las ratas madres tienen una mayor densidad de espinas en APOm que hembras vírgenes (Frankfurt, et al., 2011), momentos en los niveles de progesterona son bajos; mientras que esta complejidad dendrítica es baja en esta área el día 10 posparto (Parent et al., 2017), cuando los niveles de progesterona se encuentran elevados. En base a esta evidencia podríamos especular que esta plasticidad estructural del APOm, podría estar dirigida principalmente por progesterona. Sería interesante evaluar experimentalmente el papel de la progesterona sobre la expresión de esta matriz.

Expresión de PNN y experiencia reproductiva y maternal

El presente trabajo evidencia a su vez que parte de los cambios en la matriz extracelular son de larga duración. Así, en hembras con una experiencia reproductiva previa, 10 días luego del destete de su camada, aún se detectan niveles discretos de estas estructuras en APOm, con una densidad de PNN similar a lo observado en el día 2 posparto. Estas hembras ciclantes, a pesar de estar en diestro no exhiben el perfil de expresión observado en hembras vírgenes en diestro, sugiriendo que la experiencia maternal genera una “huella” a nivel de la matriz extracelular en el APOm. Este resultado está en concordancia con estudios que muestran que aún alejado del período de destete, el cerebro de las hembras permanece preparado para futuras respuestas maternas (Bridges, 2016). Notablemente las hembras que tuvieron dos experiencias reproductivas: MULTIP, CScontrol, CSexp-, expresan mayor densidad de PNN en el APOm que las primíparas en períodos similares del posparto (día 5 posparto en primíparas vs. día 7 posparto). Es posible suponer que la densidad de PNN en hembras múltiparas es mayor, porque el punto de partida o nivel basal de PNN es mayor que en primíparas (hembras vírgenes en diestro vs. hembras destetadas en diestro). Sustentando

esta idea, se ha demostrado que un tiempo mínimo de interacción con crías durante el posparto es suficiente para exhibir una rápida expresión del CM ante la re-exposición a crías, incluso 25 días posparto (Bridges, 1975). Tal vez sumado a otros cambios estructurales y funcionales en el circuito neural (Bridges, 2016; Elyada & Mizrahi, 2015) esta “huella” en la matriz extracelular generada luego de la primera maternidad, facilite la expresión maternal en futuras experiencias reproductivas.

Muchos de los cambios a nivel de plasticidad, son a largo plazo o quizá permanentes y probablemente explican las diferencias observadas entre el comportamiento y motivación maternal de hembras con una experiencia maternal y hembras multíparas. La experiencia reproductiva previa incrementa la respuesta maternal hacia crías en futuras exposiciones (Bridges, 2016) y se vuelve más robusto frente a alteraciones en el sistema de control sensorial (Schwartz & Rowe, 1976) u hormonal (Moltz & Wiener, 1966). Además, las hembras multíparas exhiben una robusta preferencia por las crías frente a otro estímulo con fuerte valor de incentivo como un macho durante el estro posparto, más que las primíparas (D Agrati, Fernández-Guasti, et al., 2008). En este sentido, la liberación de DA en NAcc frente a crías es mayor en multíparas que en hembras primíparas (Afonso, et al., 2013) y la sensibilidad de los receptores dopaminérgicos es mayor en multíparas que en hembras primíparas (Byrnes, Byrnes, & Bridges, 2001). Otros sistemas de neurotransmisión como el opioide también experimentan modificaciones en función de la experiencia reproductiva. Los efectos disruptivos de la morfina sobre el CM en hembras multíparas, son menores en hembras con experiencia reproductiva y maternal previa que en hembras primíparas (C.H. Kinsley & Bridges, 1988) y la densidad de receptores opioides es mayor en el APOm de lactantes multíparas que de hembras primíparas. (Bridges & Hammer, 1992). La experiencia reproductiva también altera la expresión de otros receptores como de prolactina (Anderson, et al., 2006) y estrógeno (Byrnes, Babb, & Bridges, 2009) en el APOm. A la luz de estos cambios comportamentales y neuroendócrinos que caracterizan a las hembras con experiencia maternal, no es sorprendente observar una mayor expresión en la densidad de las PNN en las hembras con más de una experiencia de gestación y lactancia.

Más allá del papel del perfil endócrino en la expresión de las PNN, la interacción con las crías *per se* parece modular a su vez su expresión, ya que esta organización es mayor en el APOm de hembras que no tuvieron una segunda gestación (es decir tuvieron solo

una experiencia reproductiva), pero sí una nueva exposición a neonatos (CS gest-) respecto a una hembra primípara en posparto tardío (período fisiológico de la lactancia similar)(Fig. 22). Este aumento superior al esperado (niveles equivalentes a los observados en hembras primíparas L7), sugiere que la interacción con crías neonatas también afecta la expresión de esta matriz y es posible que esté comenzando un proceso de re sensibilización maternal hacia los neonatos. Para elucidar estas interrogantes y establecer la relación entre la expresión de PNN y el estímulo crías, sería interesante evaluar cómo es su expresión en un proceso de sensibilización maternal en hembras con diferentes experiencias reproductivas.

Posibles fenotipos celulares asociadas a las PNN

Notablemente, la reorganización de la matriz extracelular fue detectada únicamente en el APOm y no en otras áreas relevantes del circuito maternal que expresan PNN de forma similar en las condiciones analizadas como CPF y HVM o que no expresan PNN como BNST y NAcc. En trabajos previos en los que exploran la expresión de PNN en todo el cerebro de ratones macho, curiosamente observan que la zona lateral del hipotálamo expresa PNN (reveladas con WFA), mientras que la zona medial no (Horii-Hayashi, Sasagawa, Matsunaga, & Nishi, 2015). Estos investigadores atribuyen la ausencia a que la zona medial (APOm) es una zona pobre en fibras mielinizadas, siendo la mielinización un importante factor de plasticidad neural (McGee, Yang, Fischer, Daw, & Strittmatter, 2005). Además, podría no expresar PNN dado que funcionalmente la zona medial contiene neuronas implicadas en el sistema neuroendócrino que requiere altos niveles de plasticidad para responder a los niveles cambiantes de hormonas circulantes. Si bien estos resultados son coincidentes con los obtenidos en machos y hembras ciclante en nuestro trabajo, la estructuración de las PNN en el APOm durante la gestación y la lactancia y luego de las mismas sugiere que las PNN podrían ser necesarias en estos períodos para estabilizarla nueva configuración del sistema que habilite la expresión de la maternidad en las hembras.

Un paso esencial para comprender la función de las PPN en la maternidad, es identificar la población de neuronas implicada y su identidad fenotípica. El APOm es un área heterogénea que contiene células que expresan varios neurotransmisores tradicionales (ej., glutamato, GABA, y dopamina) y neuropéptidos (R. B. Simerly, et al., 1986; Tsuneoka, et al., 2013; Tsuneoka et al., 2017). Además presenta una alta densidad de neuronas que expresan receptores de estrógeno α (ER α), claves en facilitar la respuesta

maternal (Bloch, Kurth, Akesson, & Micevych, 1992; Mitra et al., 2003; Shughrue, Lane, & Merchenthaler, 1997). Estudios recientes sugieren que las células que expresan este receptor de estrógeno, median el comportamiento maternal (Fang, et al., 2018; J. Lonstein, Greco, De Vries, Stern, & Blaustein, 2000).

Una detallada caracterización del patrón de expresión de neuropéptidos en el APOm revela que estas neuronas ($ER\alpha^+$) se superponen parcialmente con varios neuropéptidos, como neurotensina y galanina (Tsuneoka, et al., 2013; Tsuneoka, et al., 2017). De forma interesante las células que expresan este receptor de estrógeno, también son inmunoreactivas para galanina en el APOm (Tsuneoka, et al., 2017). Esta sub población neuronal, expresa a su vez c-Fos durante la ejecución del comportamiento maternal y su remoción a través de manipulaciones genéticas que permiten la destrucción específica de las células, deteriora el CM (Wu, et al., 2014). Si bien desconocemos qué fenotipo neuronal es rodeado por PNN en el APOm, las neuronas que expresan $ER\alpha$ y galanina podrían ser potenciales candidatas. Sobre la base de un posible rol de la progesterona en la formación de las PNN durante la gestación, sería interesante conocer a su vez si estas neuronas expresan receptores de progesterona.

Por otro lado, la dinámica de remodelado de las PNN se ha asociado estrechamente a las células gliales, específicamente a los astrocitos (Lau, Cua, Keough, Haylock-Jacobs, & Yong, 2013; Testa, et al., 2018). Estos a su vez, se han vinculado a los cambios en plasticidad neural en varias áreas incluida el APOm, observados durante la gestación e inicio de la maternidad (R.E. Featherstone, et al., 2000; Gómora-Arrati, et al., 2010; C.H. Kinsley & Lambert, 2008), así como a los cambios asociados a la experiencia maternal. Específicamente, en el día 5 posparto de hembras multíparas que han tenido experiencia con crías, se ha reportado un mayor contenido de GFAP (proteína glial fibrilar ácida, GFAP por su sigla en inglés, el mayor componente proteico del citoesqueleto de astrocitos), comparado con hembras lactantes primíparas en el mismo día posparto (R.E. Featherstone, et al., 2000). En este sentido, dados los cambios observados en las PNN a lo largo del ciclo reproductivo, luego de la experiencia maternal y en subsiguientes partos, así como los cambios reportados en el contenido de GFAP en varias áreas neurales de hembras durante en estas etapas y el estrecho vínculo propuesto entre ambos, sería interesante evaluar la co-expresión de estos componentes durante estos períodos en el ciclo de vida de las hembras.

En suma, los experimentos realizados en esta tesis nos permitieron profundizar sobre los factores implicados en el desarrollo de la maternidad en las ratas hembras que les confiere la capacidad de adaptación a contextos de crianza desafiantes. A su vez, por primera vez, revelamos la presencia de un componente estructural fundamental implicado fuertemente en la plasticidad neural como son las PNN, y mostramos la remodelación de su organización durante el ciclo reproductivo de las hembras así como sus cambios con la experiencia maternal. Este es el primer reporte de que la matriz extracelular cambia asociada a la expresión de una condición reproductiva natural más allá del período de desarrollo posnatal y de la implicancia de las hormonas asociadas a este período, en su remodelado.

Finalmente los resultados de esta tesis habilitan el planteo de nuevas interrogantes que nos permitirán seguir buscando respuestas en esta línea.

PERSPECTIVAS

A partir de los resultados obtenidos en esta tesis nos planteamos las siguientes perspectivas para continuar este trabajo:

- Determinar si el mayor valor de incentivo de los neonatos relativo a los juveniles para madres con CS es sustentado por una liberación diferencial de DA en NAcc. Para esto evaluaremos por microdiálisis el contenido de DA en el NAcc frente a crías neonatas y juveniles de madres con CS.
- Evaluar si la flexibilidad comportamental observada en madres CS se refleja en una mayor flexibilidad cognitiva, habilidad que depende principalmente de la CPFm. Para esto se realizarán pruebas de atención y memoria espacial a madres con CS
- Evaluar si la CPFm está implicada en esta flexibilidad. En este sentido, la adecuación comportamental observada podría estar ocurriendo a través de la CPF, más que el APOm ya que no observamos un efecto diferencial hacia neonatos o juveniles cuando inactivamos esta área, pero sí se observa una expresión diferencial de c-fos frente a ambos estímulos. Para esto inactivaremos de forma transitoria la CPFm y evaluaremos el comportamiento y motivación maternal en hembras con CS.
- Establecer una relación directa entre la organización de las PNN y el comportamiento maternal en ratas. Para esto nos proponemos evaluar el efecto de disolver esta matriz, sobre la expresión de la maternidad.
- Evaluar si la progesterona que exhibe un patrón de liberación que acompaña los cambios observados en las PNN durante la gestación y posparto, es quien dirige estos cambios. Para esto se analizarán diferentes manipulaciones sistémicas y locales que alteren la progesterona disponible.
- Identificar si la expresión de las PNN, además de la dependencia hormonal está vinculada a la interacción con las crías, a través de evaluar esta matriz en hembras sensibilizadas que no experimentan los cambios hormonales de hembras gestantes.

- Identificar el fenotipo neuronal que está expresando PNN durante esta etapa reproductiva. Identificar si las neuronas del APOm que están activas durante el comportamiento maternal y que expresan RE α y galanina, son las neuronas rodeadas por las PNN durante este período.
- Analizar la expresión de las PNN en el APOm y su remodelado en función de su asociación con los astrocitos.

ANEXO 1

Artículo: Incentive value of newborn pups relative to juveniles for mother rats raising overlapping litters, Marcela Ferreño, Sabrina Pose, Daniella Agrati, María José Zuluaga, Annabel Ferreira, Natalia Uriarte.



Incentive value of newborn pups relative to juveniles for mother rats raising overlapping litters



Marcela Ferreño^a, Sabrina Pose^a, Daniella Agrati^b, María José Zuluaga^b, Annabel Ferreira^b, Natalia Uriarte^{a,*}

^a Laboratorio de Neurociencias, Sección Biomatemática, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay

^b Sección Fisiología y Nutrición, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Uruguay

ARTICLE INFO

Keywords:

Overlapping-litters
Newborns vs. juveniles preference
Maternal motivation
Maternal behavior
Lactating rats

ABSTRACT

In rats, successful mating during the postpartum estrus results in the temporal overlapping of successive litters within the maternal nest. Mothers with two overlapping-litters (OLM) simultaneously take care of neonate and juvenile pups; however, they mostly direct their attention to the neonates. We hypothesized that these differences reflect an adaptation to the specific characteristics and needs of the two litters and not a lack of interest in the juveniles. To test this hypothesis, we assessed the relative incentive value of newborns and juveniles for OLM in a preference test and compared it with that exhibited by mothers in early (EPM) and late (LPM) postpartum, which were raising only newborns or only juveniles, respectively. Results showed that OLM spent similar time in the newborns and juveniles compartments and did not prefer the newborns as did the EPM, however, similarly to them, OLM made more attempts to get access to the newborns than the juveniles. On the other hand, OLM and LPM did not exhibit a clear preference between the stimuli. These results indicate that both neonates and juveniles have incentive value for OLM, although these mothers invest more effort in the newborns. These results point out to a unique behavioral profile of OLM, which shows similarities with EPM and LPM on different behavioral measures. They also support the idea that motivational processes underlying maternal behavior are complex and dynamic, adapting the response of the mother to pups' needs and the context.

1. Introduction

Maternal behavior in mammals is a highly motivated behavior, which ensures the survival and well-being of the young and shapes their behavioral and neural development. In the rat, maternal care-taking activities consist of several direct (retrieving, mouthing, licking, nursing) and indirect (nest building, protective behaviors, affective changes) behavioral components (Kinsley et al., 2014; Ferreira et al., 1987; Fleming and Luebke, 1981) whose quantity, quality and organization varies as the postpartum period progresses (Reisbick et al., 1975; Pereira and Morrell, 2009). For instance, maternal motivation seems to change throughout the postpartum period, as early postpartum mothers preferred the pup-associated chamber over a non-pup associated chamber when tested in the conditioned place preference (Fleming et al., 1994; Wansaw et al., 2008), while later in the postpartum period most females preferred the non-pup associated chamber (Wansaw et al., 2008). This behavioral flexibility relies on changes in the functional role of areas involved in the expression and regulation of maternal

behavior, such as the medial preoptic area (mPOA) and the medial prefrontal cortex (Pereira and Morrell, 2011, 2009). Thus, transient inactivation of mPOA in early postpartum abolishes the active components of maternal behavior, while inactivation of this area on postpartum days 13–14 augments these behaviors to levels exhibited in the early postpartum period (Pereira and Morrell, 2009).

Maternal motivation and behavior are modulated by the mothers' internal milieu (Pereira and Ferreira, 2016; Bridges, 2015; Rosenblatt et al., 1988) and the characteristics of the pups (Pereira and Ferreira, 2006). For instance, mother rats prefer demanding pups (with augmented physiological demands) than non-demanding pups in a preference test, indicating that demanding pups have a higher incentive value (Pereira and Ferreira, 2006). Also, maternal females, both virgin and lactating, exhibit more maternal responses to demanding than to non-demanding pups (Pereira and Ferreira, 2006).

Interestingly, maternal behavior also changes according to the family composition (Uriarte et al., 2008). In natural conditions, successful mating during the postpartum estrus results in the temporal

* Corresponding author at: Laboratorio de Neurociencias, Sección Biomatemática, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Iguá 4225, CP 11400, Montevideo, Uruguay.

E-mail address: natiuria@fcien.edu.uy (N. Uriarte).

<https://doi.org/10.1016/j.beproc.2018.07.016>

Received 22 April 2018; Received in revised form 24 July 2018; Accepted 26 July 2018

Available online 27 July 2018

0376-6357/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

overlapping of successive litters within the maternal burrow (Calhoun, 1963; Gilbert et al., 1983). Thus, the mother will raise pups from different ages, with dissimilar sensory traits, physiological demands and behavioral capabilities (i.e., mobility, thermoregulation capacity, waste excretion) at the same time. We have previously shown in laboratory settings that mothers with two overlapping litters take care of juveniles, although they mostly direct their attention to the neonates (Uriarte et al., 2008). However, as far as we are aware, there is no data showing the relative incentive value of pups in different development stages for rats with overlapping litters.

As pups' characteristics strongly modulate the maternal response (Hansen, 1993; Pereira and Ferreira, 2006), we hypothesized that this different allocation of maternal behavior of mothers raising overlapping litters reflects an adaptation to the specific characteristics and needs of the two different-aged litters and not to a lack of interest in the juveniles. If this is the case, we will expect mothers with overlapping litters to exhibit interest for pups from both litters in tasks specifically designed to assess incentive value of different stimuli (Ferreño et al., 2018). Thus, this study aimed to assess the relative incentive value of neonate and juvenile pups for mothers raising overlapping litters and to determine if the behavior of these mothers in a neonates vs. juveniles preference test differs from the one exhibited by females raising only neonates or only juveniles. Therefore, we tested the maternal preference towards neonates or juveniles in a three-choice preference Y-maze test, of rats exposed to different postpartum stages and pups traits: mothers with overlapping-litters (OLM, raising 2–4 and 22–24 days-old pups simultaneously), and multiparous females in early (EPM, 2–4 days-old pups) and late (LPM, 22–24 days-old pups) postpartum period.

2. Material and methods

2.1. Animals

Male and female rats (*Rattus norvegicus*, Wistar strain, from 0 to 140 days old) were housed under controlled temperature, humidity and light conditions, with free access to food and water. All procedures were in accordance with the National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and Uruguayan law (N°18 611). The experimental protocol was approved by the local Ethical Committee on Animal Care and Protocols (Exp. 240011-001541-17).

2.2. Breeding procedures

2.2.1. Multiparous mothers

Primiparous dams were weaned on postpartum day (PPD) 21 and following resumption of estrous cyclicity (usually one week later) were re-mated. On gestation day 16 (GD16) of their second gestation, females were individually housed and starting from GD21 the presence of pups was checked twice a day. Newborn litters were culled to eight individuals (four of each sex) on PPD 1.

2.2.2. Overlapping-litters mothers

On GD16, pregnant nulliparous females were housed until parturition together with the same males they had previously mated with. After the postpartum estrus, vaginal smears were performed to confirm pregnancies and the males were removed. On GD21 of the second pregnancy, the juveniles from the first litter, except one male and one female, were weaned. These two juveniles remained in the maternal cage for ten days after the birth of the second litter when the newborn litters. Starting on GD21 of the second pregnancy the presence of pups was checked twice a day. On PPD1 newborn litters were culled to eight individuals (four of each sex) as in the multiparous females groups.

2.3. Experimental procedure

Tests were performed between 10:00 and 12:00 h during the light phase of the light/dark cycle (lights on at 5:30 AM). Females' preference between juvenile and newborn pups was assessed in an acrylic transparent "three-point star"-shaped maze, consisting of three equal-sized chambers (25 × 30 × 18 cm) at the end of each arm (10 × 60 × 10 high). Two chambers contain either eight neonate pups (newborns chamber) or two juvenile pups (juveniles chamber), while the third chamber remained empty (neutral chamber). To homogenize the testing conditions between the three groups, all pups used were provided by donor mothers and remained with their mothers until the time of testing. Each chamber has a clear perforated division allowing the females to see, hear and smell the stimuli without physical contact. Rats were placed in the center of the maze and allowed to explore the empty maze for a 15-min habituation period. After that, the stimuli were placed in the chambers and the cumulative time the females spent in each chamber was recorded during a 15-min testing period. Additionally, we measured the number of attempts to gain access to each stimulus (bouts of biting and scratching the division) performed by the females. The entire maze was cleaned with a 50% ethanol/water solution and dried thoroughly between tests. The locations of the stimuli were randomly counterbalanced between subjects. Measures of preference included (1) the percentage of animals in each group investing in a particular chamber at least 50% of the total time of the test, with the additional caveat that this time had to be at least 25% greater than that spent in either of the two remaining chambers, and (2) the time spent in each chamber (Agrati et al., 2008; Pereira and Ferreira, 2006).

2.4. Statistics

Data are expressed as medians and semi-interquartile ranges (SIQR). As variances were not homogeneous, behavioral data were analyzed by means of non-parametric tests. Kruskal-Wallis one-way analysis of variance followed by Mann-Whitney *U* test were employed for comparisons of independent samples (between groups), while Friedman two-way analysis of variance followed by Wilcoxon matched pairs test were used for comparisons of dependent data (within groups) (Siegel and Castellan, 1988).

3. Results and discussion

Present results show that the three groups of mothers, regardless of their hormonal milieu or litter composition, preferred the compartments with pups over the neutral one. Moreover, the time spent in the neutral chamber remained unchanged through the three groups ($H_{(34)} = 2.98$, $p = \text{NS}$; Fig. 1). This result is in accordance with previous reports showing the high incentive value that pups have for lactating mothers (Agrati et al., 2016; Ferreño et al., 2018; Wansaw et al., 2008; Fleming et al., 1994; Lee et al., 2000).

As expected, EPM spent significantly more time in newborns' chamber than in juveniles compartment ($T_{(8)} = 1.0$, $p < 0.05$) whilst LPM showed a significant decrease in newborns chamber compared to EPM ($U_{(8,12)} = 4.0$, $p < 0.05$) and an increase in the time spent in the juveniles compartment ($U_{(8,12)} = 18.0$, $p < 0.05$) (Fig. 1). In accordance, 88% of EPM preferred the newborns, while only 8% of LPM preferred them (Table 1). These results agree with the literature that shows that although postpartum rats remain highly responsive to young for a prolonged period after parturition, their maternal behavior changes along lactation (Grota and Ader, 1974; Pereira and Morrell, 2009). Thus, both in typical laboratory housing conditions (Reisbick et al., 1975; Rosenblatt, 1975; Pereira and Morrell, 2009) and in more complex housing environments where dams can choose to spend time with the pups (Grota and Ader, 1974; Pereira et al., 2008), a reduction in the expression of maternal behavior and in the time spent with the

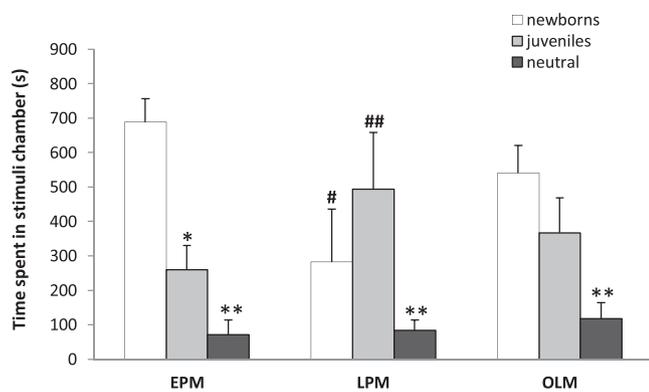


Fig. 1. Time (s) spent in newborns chamber (white bars), juveniles chamber (gray bars) and neutral chamber (black bars) by Early postpartum mothers (EPM), n = 8, Late postpartum mothers (LPM), n = 12 and Overlapping litters mothers (OLM), n = 14. *p < 0.05 compared to newborn and **p < 0.01 compared to newborns and juveniles chambers, Wilcoxon matched pairs test; # p < 0.01 compared to the same chamber of the EPM and OLM groups and ## p < 0.01 compared to the same chamber of EPM group, Mann-Whitney U test. Data are expressed as median (SIQR).

Table 1

Females' preference and the number of attempts to reach the stimuli in the Y maze preference test.

	EPM	LPM	OLM
Preference			
Newborns chamber	7/8	1/12	4/14
Juveniles chamber	0/8	4/12	0/14
No preference	1/8	7/12	10/14
Number of attempts			
Newborns	39.4 (15.1)	1.9 (3.5)#	32.3 (9.5)
Juveniles	8.3 (6.8)*	10.5 (5.3)	9.0 (7.4)

* p < 0.01 compared to newborn attempts, Wilcoxon matched pairs test.
 # p < 0.01 compared to the number of attempts of the EPM and OLM, Mann-Whitney U test. Data are expressed as proportions (number of females that expressed a preference/total number) or in median (SIQR).

litter occurs as postpartum period advances (Reisbick et al., 1975; Grotta and Ader, 1970; Pereira et al., 2008). In accordance, as mentioned previously, maternal motivation assessed in the conditioned place preference paradigm seems to decrease throughout the postpartum. Thus, during the first postpartum week most mothers preferred the pup-associated chamber over a non-pup- (Fleming et al., 1994; Wansaw et al., 2008) or even a cocaine-associated chamber (Mattson et al., 2001; Seip and Morrell, 2007), while later in the postpartum period opposite results were found (Wansaw et al., 2008; Mattson et al., 2001).

Interestingly, OLM spent high amounts of time both in the newborns' and in the juveniles' chambers (Fig. 1), and while 29% of females preferred the newborns, the majority (71%) did not display a preference for any of the pups chambers (Table 1). These results suggest that both neonates and juveniles have high incentive value for OLM, supporting the view that the low levels of MB of OLM towards juveniles reported previously (Uriarte et al., 2008) represent a maternal adjustment to take care of "less demanding" pups rather than a lack of interest for them. Moreover, OLM exhibited a unique behavioral profile in the Y-maze when compared to EPM and LPM, as they spent a similar amount of time in the newborns chamber to that of the EPM ($U_{(8,14)} = 28.0$, p = NS) and in juveniles compartment to that of the LPM ($U_{(12,14)} = 50.5$, p = NS).

Despite that the amounts of time that OLM spent near pups from both litters did not differ, they significantly performed more attempts to reach the newborn than the juvenile pups ($T(14) = 14.0$, p < 0.01), suggesting that although both types of offspring have incentive salience

for these mothers, the relative value of newborn vs. juveniles is greater. As dopamine (DA) release in nucleus accumbens (Nacc) has been implicated in the activational aspects of motivated behaviors, that is, the effort that individuals are willing to do to achieve a specific goal (Salamone et al., 1994; Salamone and Correa, 2012), we can speculate that the difference observed in OLM effort for neonates vs. juveniles could be due to a differential release of DA in the Nacc elicited by both kinds of pups. In this line, it has been demonstrated that maternal females exhibit an increase in DA levels in the Nacc when they interact with pups (Hansen et al., 1993; Champagne et al., 2004; Robinson et al., 2011; Shnitko et al., 2017), even if physical contact is precluded but the mothers can smell, see, and hear the pups (Afonso et al., 2013) as occurs in the Y maze in the present study. Interestingly, Hansen and co-workers (1993) observed that pups soiled with flowerpot earth evoked more active maternal responses and elicited a higher increase of maternal DA levels in the Nacc than clean pups. As neonates have increased physiological demands when compared to juveniles, it is possible that their sensory characteristics evoke a greater DA release in OLM, and consequently more effort to try to get them. It would be interesting to assess if neonates and juveniles elicit a differential DA response in the Nacc of OLM.

The high levels of effort exhibited by OLM to get in physical contact with the newborns were similar to those displayed by EPM ($U_{(8,14)} = 45.5$, p = NS). As only these groups of mothers had experienced a recent parturition, we posit that the hormonal exposure during gestation and parturition is crucial for the allocation of incentive value of the stimulus by mothers and is important for its capacity to adapt their care-taking behavior to the high demands of the newborn pups. Accordingly, it has been shown that pups' presence elicits a DA increment in the Nacc of virgin females exposed to a hormonal regimen that mimics pregnancy and parturition (Afonso et al., 2013, 2009), attributing a role of gestational steroids in the sensitivity of the mesolimbic dopaminergic system to pups cues.

The lack of preference between newborns and juveniles of the OLM, together with the differential response to pups of the two litters in the Y-maze, are in line with, and contribute to the idea that motivational processes underlying maternal response to pups contribute to the adaptation of the response of the mother to pups' needs and the context (Pereira and Ferreira, 2016). Also, behavioral similarities and differences between OLM, EPM, and LPM point out to a principal role of endocrine factors in the adaptation of the maternal behavior and motivation to different contexts (Wansaw et al., 2008).

In conclusion, in the model of overlapping litters, both neonates and juveniles have an incentive value for the mothers, although they make more effort for the neonates. Also, maternal motivation appears to be modulated not only by the characteristics of the pups but also by the female's endocrine status and maternal experience. Future experiments investigating whether this behavioral adaptation is hormone-dependent (i.e., testing mothers with sham-overlapping litters -with their own juveniles and foster newborns, without going through a new pregnancy and parturition-) or experience-dependent (testing: mothers with overlapping litters without previous maternal experience) would contribute to elucidate this issue.

Conflict of interest

None.

Funding

This study was supported by the Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) [grant FCE2014_1_104678], PEDECIBA and SNB/SNI-ANII.

Acknowledgements

We wish to thank Héctor Rodríguez, Joel González and Enzo Cavalli for the excellent animal care.

References

- Afonso, V.M., King, S., Chatterjee, D., Fleming, A.S., 2009. Hormones that increase maternal responsiveness affect accumbal dopaminergic responses to pup- and food-stimuli in the female rat. *Horm. Behav.* 56, 11–23.
- Afonso, V.M., Shams, W.M., Jin, D., Fleming, A.S., 2013. Distal pup cues evoke dopamine responses in hormonally primed rats in the absence of pup experience or ongoing maternal behavior. *J. Neurosci.* 33, 2305–2312.
- Agrati, D., Fernández-Guasti, A., Ferreira, A., 2008. The reproductive stage and experience of sexually receptive mothers alter their preference for pups or males. *Behav. Neurosci.* 122, 998.
- Agrati, D., Ferreño, M., Marin, G., Uriarte, N., Zuluaga, M.J., Fernandez-Guasti, A., Ferreira, A., 2016. Previous and recent maternal experiences modulate pups' incentive value relative to a male without affecting maternal behavior in postpartum estrous rats. *J. Physiol. Paris* 110, 140–148.
- Bridges, R.S., 2015. Neuroendocrine regulation of maternal behavior. *Front. Neuroendocrinol.* 36, 178–196.
- Calhoun, J.B., 1963. *The Ecology and Sociology of the Norway Rat*. U.S. Dept. of Health, Education, and Welfare, Public Health Service, Washington, pp. 188.
- Champagne, F.A., Chretien, P., Stevenson, C.W., Zhang, T.Y., Gratton, A., Meaney, M.J., 2004. Variations in nucleus accumbens dopamine associated with individual differences in maternal behavior in the rat. *J. Neurosci.* 24, 4113–4123.
- Ferreira, A., Dahlöf, L.G., Hansen, S., 1987. Olfactory mechanisms in the control of maternal aggression, appetite, and fearfulness: effects of lesions to olfactory receptors, mediodorsal thalamic nucleus, and insular prefrontal cortex. *Behav. Neurosci.* 101, 709–717 746.
- Ferreño, M., Uriarte, N., Zuluaga, M.J., Ferreira, A., Agrati, D., 2018. Dopaminergic activity mediates pups' over male preference of postpartum estrous rats. *Physiol. Behav.* 188, 134–139.
- Fleming, A.S., Luebke, C., 1981. Timidity prevents the virgin female rat from being a good mother: emotionality differences between nulliparous and parturient females. *Physiol. Behav.* 27, 863–868.
- Fleming, A.S., Korsmit, M., Deller, M., 1994. Rat pups are potent reinforcers to the maternal animal: Effects of experience, parity, hormones, and dopamine function. *Psychobiology* 22, 44–53.
- Gilbert, A.N., Burgoon, D.A., Sullivan, K.A., Adler, N.T., 1983. Mother-weanling interactions in Norway rats in the presence of a successive litter produced by postpartum mating. *Physiol. Behav.* 30, 267–271.
- Grota, L.J., Ader, R., 1970. Adrenocortical function in pregnant rats: handling and the 24-hour rhythm. *Physiol. Behav.* 5, 739–741.
- Grota, L.J., Ader, R., 1974. Behavior of lactating rats in a dual-chambered maternity cage. *Horm. Behav.* 5, 275–282.
- Hansen, S., 1993. Effect of clonidine on the responsiveness of infant rats to maternal stimuli. *Psychopharmacology (Berl)* 111, 78–84.
- Hansen, S., Bergvall, A.H., Nyiredi, S., 1993. Interaction with pups enhances dopamine release in the ventral striatum of maternal rats: a microdialysis study. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 45, 673–676.
- Kinsley, C.H., Blair, J.C., Karp, N.E., Hester, N.W., McNamara, I.M., Orthmeyer, A.L., McSweeney, M.C., Bardi, M.M., Karelina, K., Christon, L.M., Sirkin, M.R., Victoria, L.W., Skurka, D.J., Fyfe, C.R., Hudepohl, M.B., Felicio, L.F., Franssen, R.A., Meyer, E.E.A., da Silva, I.S., Lambert, K.G., 2014. The mother as hunter: significant reduction in foraging costs through enhancements of predation in maternal rats. *Horm. Behav.* 66, 649–654.
- Lee, A., Clancy, S., Fleming, A.S., 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, 215–231.
- Mattson, B.J., Williams, S., Rosenblatt, J.S., Morrell, J.I., 2001. Comparison of two positive reinforcing stimuli: pups and cocaine throughout the postpartum period. *Behav. Neurosci.* 115, 683–694.
- Pereira, M., Ferreira, A., 2006. Demanding pups improve maternal behavioral impairments in sensitized and haloperidol-treated lactating female rats. *Behav. Brain Res.* 175, 139–148.
- Pereira, M., Ferreira, A., 2016. Neuroanatomical and neurochemical basis of parenting: dynamic coordination of motivational, affective and cognitive processes. *Horm. Behav.* 77, 72–85.
- Pereira, M., Morrell, J.I., 2009. The changing role of the medial preoptic area in the regulation of maternal behavior across the postpartum period: facilitation followed by inhibition. *Behav. Brain Res.* 205, 238–248.
- Pereira, M., Morrell, J.I., 2011. Functional mapping of the neural circuitry of rat maternal motivation: effects of site-specific transient neural inactivation. *J. Neuroendocrinol.* 23, 1020–1035.
- Pereira, M., Seip, K.M., Morrell, J.I., 2008. Maternal motivation and its neural substrate across the postpartum period. In: Bridges, R.S. (Ed.), *The Neurobiology of the Parental Mind*. Elsevier Academic Press, San Diego.
- Reisbick, S., Rosenblatt, J.S., Mayer, A.D., 1975. Decline of maternal behavior in the virgin and lactating rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 89, 722–732.
- Robinson, D.L., Zitzman, D.L., Williams, S.K., 2011. Mesolimbic dopamine transients in motivated behaviors: focus on maternal behavior. *Front. Psychiatry* 2, 23.
- Rosenblatt, J.S., 1975. Selective retrieving by maternal and nonmaternal female rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 88, 678–686.
- Rosenblatt, J.S., Mayer, A.D., Giordano, A.L., 1988. Hormonal basis during pregnancy for the onset of maternal behavior in the rat. *Psychoneuroendocrinology* 13, 29–46.
- Salamone, J.D., Correa, M., 2012. The mysterious motivational functions of mesolimbic dopamine. *Neuron* 76, 470–485.
- Salamone, J.D., Cousins, M.S., Bucher, S., 1994. Anhedonia or anergia? Effects of haloperidol and nucleus accumbens dopamine depletion on instrumental response selection in a T-maze cost/benefit procedure. *Behav. Brain Res.* 65, 221–229.
- Seip, K.M., Morrell, J.I., 2007. Increasing the incentive salience of cocaine challenges preference for pup- over cocaine-associated stimuli during early postpartum: place preference and locomotor analyses in the lactating female rat. *Psychopharmacology (Berl)* 194, 309–319.
- Shnitko, T.A., Mace, K.D., Sullivan, K.M., Martin, W.K., Andersen, E.H., Williams Avram, S.K., Johns, J.M., Robinson, D.L., 2017. Use of fast-scan cyclic voltammetry to assess phasic dopamine release in rat models of early postpartum maternal behavior and neglect. *Behav. Pharmacol.* 28, 648–660.
- Siegel, S., Castellan, N.J., 1988. *Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences*. McGraw-Hill, New York, pp. 399–xxiii.
- Uriarte, N., Ferreira, A., Rosa, X.F., Sebben, V., Lucion, A.B., 2008. Overlapping litters in rats: effects on maternal behavior and offspring emotionality. *Physiol. Behav.* 93, 1061–1070.
- Wansaw, M.P., Pereira, M., Morrell, J.I., 2008. Characterization of maternal motivation in the lactating rat: contrasts between early and late postpartum responses. *Horm. Behav.* 54, 294–301.

ANEXO 2

Evaluación del valor de incentivo de crías juveniles para hembras en posparto tardío

JUSTIFICACIÓN

En ratas y muchos otras especies de roedores, las madres muestran comportamiento maternal hacia las crías inmediatamente luego del parto (J. Rosenblatt, 1969). Estos cuidados se van adaptando a medida que el posparto avanza y las crías crecen y ganan independencia mostrando que el posparto es dinámico y cambiante (Grota & Ader, 1974; Grota & Eik-Nes, 1967). Este ajuste del comportamiento maternal es regulado principalmente por la estimulación recibida de las crías (A. Fleming & J. Rosenblatt, 1974; J. Rosenblatt, 1969, 1975; J. Terkel & Rosenblatt, 1971) que juegan un importante rol en el mantenimiento del comportamiento maternal y en su decline a partir de la segunda semana posparto (R.E Featherstone, Fleming, & Ivy, 2000).

Además del repertorio conductual maternal característico cuando están con las crías, las madres invierten tiempo y esfuerzo por estar cerca y lograr el acceso a las mismas (Lee, et al., 1999). Además, las madres prefieren un ambiente asociado a crías sobre uno neutro o asociado a comida a diferencia de hembras vírgenes (A. Fleming & Korsmit, 1996; A. Fleming, et al., 1994); y prefieren un ambiente asociado a crías frente a otros estímulos reforzadores como cocaína en el posparto temprano (B. J. Mattson, et al., 2001; K. Seip & Morrell, 2007), mientras que en el posparto tardío no muestran preferencia por un lugar asociado a crías o uno neutro (de edad pareada al momento del posparto) (A. Fleming & Korsmit, 1996) y prefieren un ambiente asociado a cocaína frente a uno asociado a crías (B. J. Mattson, et al., 2001). De forma interesante, la preferencia por un ambiente asociado a cocaína frente a un ambiente asociado a salina (neutro) se mantiene estable a lo largo del período posparto analizado: días 8 a 18 posparto mostrando que mientras otros estímulos reforzadores se mantienen invariables, el valor de incentivo de las crías cambia a través del posparto otorgando una notable especificidad al flexible repertorio maternal. Sin embargo, no podemos asegurar que durante el posparto tardío los juveniles no posean valor de incentivo para las madres. Por un lado los trabajos de Wansaw y cols (2008) evalúan la motivación de las hembras en un paradigma de condicionamiento en ausencia del estímulo y sus claves sensoriales.

En este sentido, la ausencia de preferencia por juveniles y un objeto no indica su valor de incentivo relativo a otro estímulo de similares características biológicas. De forma interesante crías de 16 días de edad de la cepa Wistar prefieren el olor de una hembra lactante frente a una nulípara (Leon & Moltz, 1971) y crías de hasta 26 días de edad de la cepa Sprague-Dawley prefieren el olor de su propia madre frente al de otras hembras lactantes (Holinka & Carlson, 1976). El vínculo madre-crías es modulado y ajustado recíprocamente (A. Fleming, et al., 1999; A. Fleming, et al., 1988; M Numan & Insel, 2003). Si las crías de avanzada edad son capaces de sentir atracción y preferir las claves sensoriales como el olor de una madre, sería posible pensar que las madres prefieran a crías juveniles frente a un estímulo social neutro.

HIPÓTESIS

Los juveniles son estímulos con valor de incentivo para una hembra lactante primípara en posparto tardío.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la preferencia por juveniles de hembras primíparas en posparto tardío.

OBJETIVO ESPECÍFICO

Comparar la elección de hembras primíparas entre crías juveniles y un estímulo social neutro durante el posparto tardío en el laberinto en Y.

MATERIALES Y MÉTODOS

Con este objetivo, evaluamos la preferencia hacia juveniles o hembra en diestro en una prueba de preferencia en Y, de hembras primíparas en posparto tardío, día 22 a 25 posparto (N=8).

La obtención de animales se realizó de acuerdo al procedimiento general descrito en el Experimento 1.

Cada hembra fue testeada con crías propias, 1 hembra y un macho para evitar sesgo por sexo. Las hembras en diestro utilizadas como estímulo social neutro, fueron hembras vírgenes de 3 meses de edad de 250 g aprox. Alojadas en las condiciones descritas en el

Experimento 1 y seleccionadas en ese estadio del ciclo estral a través de frotis vaginal. Cada hembra en diestro fue utilizada solo una vez.

La prueba de preferencia se realizó según el procedimiento para el “*Modelo de preferencia*” descrito en el Experimento 1.

RESULTADOS

Las hembras primíparas lactantes en posparto tardío mayoritariamente prefirieron a las crías juveniles propias (de edad correspondiente al momento del posparto) que a un estímulo social neutro como una hembra en diestro (Tab. 6).

Así mismo, el tiempo que invirtieron en el compartimiento de los juveniles es mayor que el invertido en el compartimiento de la hembra en diestro y a su vez, más que en el neutro (Fig. 22). Por otra parte, visitaron los tres compartimientos y lo hicieron más veces al de los juveniles (Tab. 6).

Tabla 6. En la parte superior de la tabla se muestran el número de hembras que prefieren juveniles, hembra en diestro, neutro o que no prefieren ninguno de los tres compartimientos sobre el total de hembras del grupo. En la parte inferior de la tabla se muestra el número de entradas de las hembras a los cada uno de los tres compartimientos durante la duración de la prueba.

	<i>Preferencia</i>	<i>N° de entradas</i>
Crías juveniles	6/8	8,0 (2,3)
Hembra en diestro	1/8	7,0 (0,6)
Neutro	0/8	4,5 (2,0)*
No prefieren	1/8	

* $p < 0.05$ vs juveniles, prueba de Friedman seguida de prueba de Wilcoxon (para medidas dependientes). Los datos se expresan como Medianas (RSIC).

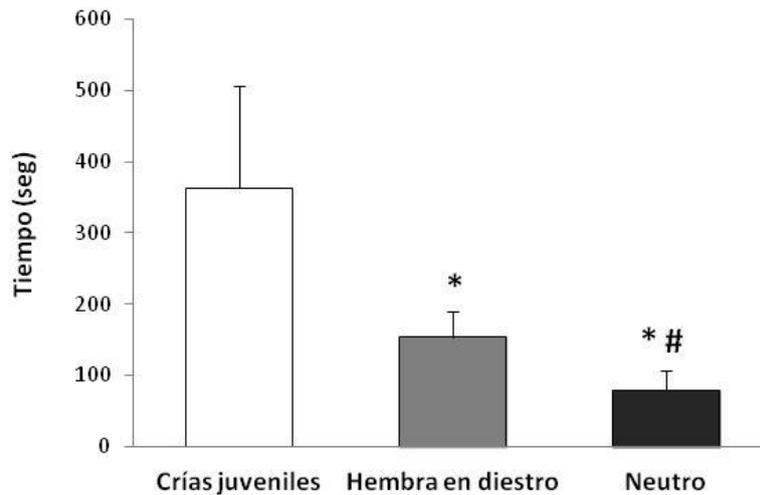


Figura 22. Tiempo de permanencia en los compartimientos de juveniles, hembra en diestro y neutro de las hembras primíparas en posparto tardío. * $p < 0.05$ vs juveniles y # $p < 0.05$ vs hembra en diestro, prueba de Friedman seguida de prueba de Wilcoxon (para medidas dependientes). Los datos se expresan como edianas (RSIC).

CONCLUSIONES

En este experimento, mostramos que las crías juveniles son estímulos con valor de incentivo para las madres en el posparto tardío. Sabemos que las crías neonatas durante el posparto temprano son estímulos con fuerte valor de incentivo y las madres muestran una motivación selectiva para interactuar con ellas (A. Fleming, et al., 1994; Lee, et al., 1999; B. J. Mattson, et al., 2001). Y aunque el comportamiento maternal cambia y disminuye a lo largo del posparto (M Pereira & Morrell, 2009), así como la motivación maternal ajustándose a las necesidades de las crías y el estado fisiológico de las hembras (A. Fleming & Korsmit, 1996; B. J. Mattson, et al., 2001), las crías juveniles siguen teniendo valor de incentivo para las madres.

La evidencia que indica que durante el posparto tardío la motivación maternal disminuye, comparan las propiedades reforzadoras de las crías con estímulos de diferente naturaleza y procesamiento (B. J. Mattson, et al., 2001; Wansaw, et al., 2008). Además, evalúan este proceso en paradigmas de condicionamiento que conllevan aprendizaje como el “condicionamiento de preferencia a lugar” comparando estímulos reforzadores naturales a los cuales subyace un proceso de motivación primaria –no aprendida- (Salamone & Correa, 2012), con estímulos de otras características sensoriales, no naturales y que son sustentados por procesamientos neurales diferentes

(K. Seip & Morrell, 2009; K. Seip et al., 2008). Por otro lado, el valor de incentivo de las crías es altamente dependiente del estado maternal de las hembras (A. Fleming, et al., 1994; A. Fleming & Luebke, 1981) mientras que la cocaína no e incluso se mantiene invariable a través del posparto (K. Seip, et al., 2008).

Estos resultados a la luz de los estudios previos, revelan la importancia del tipo de análisis que se hace, con qué se compara y la “fortaleza” de la maternidad incluso en etapas tardías.

ANEXO 3

Valor de incentivo de crías juveniles propias vs ajenas para hembras en posparto tardío.

JUSTIFICACIÓN

El comportamiento maternal exhibido por las ratas hacia las crías neonatas luego del parto, no es selectivo, ya que es dirigido tanto hacia las crías propias como hacia crías ajenas durante el período posparto. Es decir que las crías neonatas conespecíficas son reconocidas como un estímulo positivo independientemente de si forman parte de la camada propia (A. Fleming & Luebke, 1981; Siegel & Rosenblatt, 1975). La mayoría de los trabajos que evalúan diferentes aspectos de la maternidad, lo hacen en la primera etapa del posparto (días 1 al 14 posparto) (A Ferreira, Pereira, Agrati, Uriarte, & Fernández-Guasti, 2002; M Pereira & Ferreira, 2006; M Pereira & Morrell, 2009; Wansaw, et al., 2008) y desconocemos si esta no selectividad maternal se mantiene cuando se acerca el período de destete. Sabemos que las crías juveniles son capaces de reconocer las claves sensoriales de su madre sobre otra madre (Holinka & Carlson, 1976; Leon & Moltz, 1971) y que a su vez los juveniles son estímulos que poseen valor de incentivo para las madres en posparto tardío (Anexo 2). Sin embargo, a medida que crecen y el vínculo se refuerza, podría ocurrir que las hembras sean capaces de identificar a sus crías juveniles y que el valor de incentivo de éstas sea mayor que el de crías juveniles ajenas de la misma edad; o por el contrario, cualquier cría juvenil conespecífica podría tener valor de incentivo para las madres.

HIPÓTESIS

Los juveniles son estímulos con valor de incentivo para una hembra lactante primípara en posparto tardío independientemente de si son propios o ajenos.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la preferencia por juveniles propios de hembras primíparas en posparto tardío.

OBJETIVO ESPECÍFICO

Comparar la elección de hembras primíparas entre crías juveniles propias y crías juveniles ajenas en el posparto tardío en el laberinto en Y.

MATERIALES Y MÉTODOS

Con este objetivo, evaluamos la preferencia hacia crías juveniles propias o crías juveniles ajenas en una prueba de preferencia en Y, de hembras primíparas en posparto tardío, día 25 posparto (N=7). La obtención de animales se realizó de acuerdo al procedimiento general descrito en el Experimento 1. Cada hembra fue testada con crías propias, 1 hembra y 1 macho para evitar sesgo por sexo; o crías ajenas, 1 hembra y 1 macho, provenientes de otra madre en el mismo día posparto del pool de madres del bioterio. Cada par de crías ajenas fue utilizado solo una vez.

La prueba de preferencia se realizó según el procedimiento para el “*Modelo de preferencia*” descrito en el Experimento 1.

RESULTADOS

Las hembras primíparas en posparto tardío invierten tiempos similares en los compartimientos de crías juveniles propias o ajenas en relación al compartimiento neutro ($F_{(7, 2)}=10,57$, $p=NS$; prueba de Friedman) (Fig 23). A su vez, el número de veces que visitan los compartimientos, no difiere entre ambos tipos de crías (Tab 7).

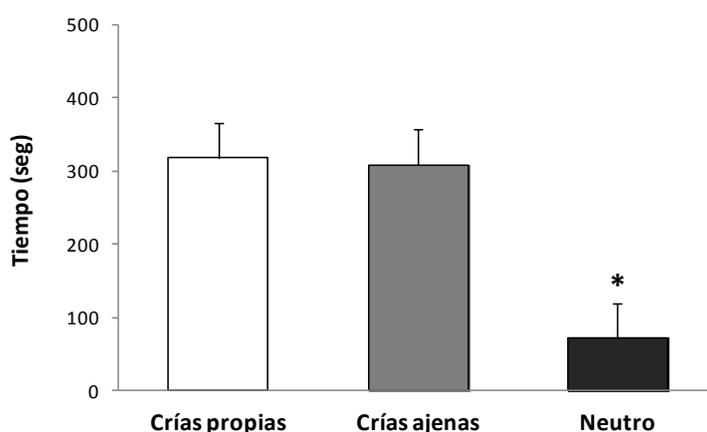


Figura 23. Tiempo de permanencia en los compartimientos de crías juveniles propias, crías juveniles ajenas y neutro de las hembras primíparas en posparto tardío. * $p<0.05$ vs juveniles propios y ajenos, prueba de Friedman seguida de prueba de Wilcoxon (para medidas dependientes). Los datos se expresan como Medianas (RSIC).

En línea con esto, la mayoría de las hembras no mostraron preferencia por ninguno de los estímulos (Tab. 7).

Tabla 7. Número de hembras que prefieren juveniles propios, juveniles ajenos, neutro o que no prefieren ninguno de los tres compartimientos sobre el total de hembras del grupo número de entradas de las hembras a los cada uno de los tres compartimientos.

	<i>Preferencia</i>	<i>N° de entradas</i>
Crías propias	1/8	10 (1,8)
Crías ajenas	1/8	10 (1,3)
Neutro	0/8	4 (1,8)*
No prefieren	5/8	

* $p < 0.05$ vs juveniles propios y ajenos, prueba de Friedman seguida de prueba de Wilcoxon (para medidas dependientes). Los datos se expresan como Medianas (RSIC).

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos evidencian que las crías juveniles, independientemente de si son propias o ajenas son un estímulo con valor de incentivo para una madre en posparto tardío.

Sabemos que durante el posparto temprano las hembras poseen una fuerte motivación maternal para interactuar con las crías y en este sentido las crías poseen un fuerte valor de incentivo para las madres (Afonso, et al., 2013; D Agrati, Fernández-Guasti, et al., 2008; A. Fleming, et al., 1989; A. Fleming, et al., 1994; A. S. Fleming, et al., 2002). Esta fuerte atracción, ocurre tanto si esas crías neonatas fueron paridas por esa madre, o si son ajenas, es decir que provienen de una camada de otra madre (A. Fleming & Luebke, 1981; Lee, et al., 2000). Hasta el momento desconocíamos si esto ocurría durante el progreso del posparto. En este sentido, aunque la motivación maternal disminuye en el posparto tardío, las crías juveniles siguen siendo estímulos con valor de incentivo (ANEXO 2) independientemente de si son crías juveniles propias o ajenas.

ANEXO 4

Artículo enviado a la revista *Journal of Neuroendocrinology*.

Raising overlapping litters: An approach towards understanding maternal flexibility and its neural circuitry. Pose S., Zuluaga M. J., Ferreño M., Agrati D., Bedó G., Uriarte N.

Journal of Neuroendocrinology

Interaction with newborn or juvenile pups differentially activates the maternal circuitry of mother rats raising overlapping litters

Journal:	<i>Journal of Neuroendocrinology</i>
Manuscript ID	JNE-18-0207-OA
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	11-Dec-2018
Complete List of Authors:	Pose, Sabrina; Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Laboratorio de Neurociencias Zuluaga, María José; Centro Universitario Regional Norte, sede Salto. Universidad de la República, PDU Bioquímica Ferreño, Marcela; Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Laboratorio de Neurociencias Agrati, Daniella; Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Sección Fisiología y Nutrición Bedo, Gabriela; Facultad de Ciencias, Universidad de la República., Sección Genética Evolutiva Uriarte, Natalia; Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Laboratorio de Neurociencias
Keywords:	maternal behavior, overlapping litters, behavioral flexibility, lactating rats, c-Fos immunoreactivity

1
2
3 **THIS MANUSCRIPT IS BEING SUBMITTED FOR THE PARENTAL BRAIN**
4
5 **SPECIAL EDITION OF THE JOURNAL OF NEUROENDOCRINOLOGY.**
6
7

8
9
10 **Interaction with newborn or juvenile pups differentially activates the maternal**
11 **circuitry of mother rats raising overlapping litters**
12
13

14
15
16
17 Pose S.¹, Zuluaga M. J.², Ferreño M.¹, Agrati D.³, Bedó G.⁴, Uriarte N.¹ *

18
19
20
21 ¹Laboratorio de Neurociencias, Sección Biomatemáticas, Facultad de Ciencias,
22 Universidad de la República, Uruguay.

23
24
25
26 ²PDU Biofísicoquímica, Centro Universitario Regional Norte – sede Salto, Universidad
27 de la República, Uruguay.

28
29
30
31 ³Sección Fisiología y Nutrición, Facultad de Ciencias, Universidad de la República,
32 Uruguay.

33
34
35
36 ³Sección Genética Evolutiva, Facultad de Ciencias, Universidad de la República,
37 Uruguay.

38
39
40
41
42
43
44
45 **Corresponding author:*

46 Natalia Uriarte Bálsamo, PhD

47 Laboratorio de Neurociencias, Sección Biomatemáticas,

48 Facultad de Ciencias, Universidad de la República.

49 Iguá 4225, CP 11400, Montevideo, Uruguay

50
51
52
53
54
55
56 +598 25258618/7151

57
58 natiuria@fcien.edu.uy
59
60

Abstract

The maternal behavior of a rat dynamically changes during the postpartum period, adjusting to the sensory traits and physiological needs of the pups. This adaptation has been attributed to functional modifications in the maternal circuitry. Maternal behavior can also flexibly adapt according to the family composition. Thus, mothers with two overlapping litters can simultaneously take care of neonate and juvenile pups; mostly directing their attention to the newborns. We hypothesized that the maternal circuitry of these mothers would show a differential activation pattern depending on the pup stimuli presented. Thus, we evaluated the participation of several areas of the maternal circuitry in mothers of overlapping litters, by using c-Fos immunoreactivity as a marker of neuronal activation. Results showed that mothers with overlapping litters display different behavioral responses towards their newborn and their juvenile pups. Interestingly, these behavioral displays were associated with specific patterns of activation of the maternal neural circuitry. Thus, a similar expression of c-Fos was observed in some key areas, such as the medial preoptic area and the nucleus accumbens, while a differential activation was quantified in the ventral region of the bed nucleus of the stria terminalis, the infralimbic and prelimbic subregions of the medial prefrontal cortex and the basolateral and medial nuclei of the amygdala. These particular profiles of activation of the neural circuitry that controls maternal behavior in mothers with overlapping litters, with elements that seem to resemble early and late postpartum periods, could be allowing them to respond adequately to the newborns and the juveniles.

Keywords

Maternal behavior; overlapping litters; behavioral flexibility; lactating rats; c-Fos immunoreactivity

1. Introduction

Maternal behavior in rats, as in most mammalian species, implicates a complex repertoire of activities that ensure the survival of the progeny and shapes its neural and behavioral development [1, 2]. Its neural basis involves several brain regions, including key areas such as the medial preoptic area (mPOA) and the ventral portion of the bed nucleus of the stria terminalis (vBNST), as well as regions implicated in processing biologically relevant stimuli, such as the amygdala (Amy). Other important regions are general motivational systems, such as the dopaminergic mesolimbic system, which includes the nucleus accumbens (NA), and areas implicated in selective attention and decision making such as the medial prefrontal cortex (mPFC) [3, 4].

Several studies have highlighted the importance of these areas in the regulation of maternal behavior by showing that lesions in the mPOA or in the vBNST [5-9], as well as the impairment of the connectivity between the mPOA/vBNST and the mesolimbic dopaminergic system [10-12], abolish its expression. Based on these and other studies, Numan proposed that mPOA/vBNST efferents to the ventral tegmental area (VTA) facilitate dopaminergic inputs to the NA, which in turn release the ventral pallidum from the inhibitory influence of this nucleus, promoting the expression of voluntary maternal response towards pups [3, 13]. In this neural model, the activity of the circuit is modulated by inputs from different amygdala nuclei and the mPFC, which carries information related to pup's stimuli [14, 15].

In accordance, studies employing c-Fos as a marker of neural activation have documented that the main areas of this circuitry are activated in maternal rats after interacting with pups [15]. Moreover, the pups- over cocaine- choice of lactating rats in a

1
2
3 conditioned place preference test is associated with elevated c-Fos-like
4
5 immunoreactivity expression within the infralimbic (IL) and cingulate (Cg1)
6
7 subregions of the mPFC^[16].
8
9

10
11
12 Interestingly, maternal behavior dynamically changes throughout the progression of the
13
14 postpartum period, adjusting to the sensory traits and physiological needs of the pups
15
16 ^[17-20], and this adaptation has been attributed to functional modifications in the maternal
17
18 circuitry^[19, 21]. Thus, the transient inactivation of the mPOA in early postpartum, when
19
20 maternal behavior is maximal, abolishes its expression, while inactivation of this area
21
22 on postpartum days 13–14, when the maternal response is reduced, augments its
23
24 expression ^[19]. Moreover, by the transient inactivation of mPFC subregions during early
25
26 and late postpartum, Pereira & Morrell^[21] propose that the IL subregion promotes the
27
28 expression of maternal behavior during early postpartum, while later the PrL subregion
29
30 acquires a more relevant role in regulating maternal responsiveness. Together, these
31
32 studies suggest that functional changes in the mPOA and the mPFC sustain the
33
34 appropriate maternal response to the needs of offspring throughout the postpartum
35
36 period.
37
38
39
40
41
42
43
44

45 Lactating females are also able to flexibly adapt their maternal behavior according to
46
47 family composition ^[22, 23]. In natural conditions, successful mating during the
48
49 postpartum estrus results in the temporal overlapping of successive litters within the
50
51 maternal burrow^[24, 25]. Thus, in this unique reproductive context, the mother will raise
52
53 pups from different ages with different sensory traits, physiological demands and
54
55 behavioral capabilities (i.e., mobility, thermoregulation capacity, waste excretion) at the
56
57 same time. We have previously shown that mothers with two overlapping litters (OL)
58
59
60

1
2
3 take care of both newborns and juveniles, and do not choose between them in a
4 preference test [22, 23]. However, they mostly direct their attention [22] and effort towards
5 the newborns [23]. Hence, these dams show a unique behavioral profile, simultaneously
6 taking care of pups in different developmental stages. As far as we are aware, there is
7 currently no data showing how their maternal neural circuitry activates when they are
8 exposed to either the newborns or the juveniles litter.
9

10
11
12 Based on this evidence, we hypothesized that the maternal circuitry would show a
13 differential activation pattern depending on the pup stimuli presented to the OL
14 mothers. Thus, this study aimed to evaluate the participation of areas previously known
15 to be involved in the maternal circuitry of mothers with single litters, in OL mothers,
16 using c-Fos immunoreactivity as a marker of neuronal activation.
17
18

19 **2. Materials and methods**

20 **2.1. Animals**

21 Male and female rats (*Rattus norvegicus*, Wistar strain, from 0-140 days old) were
22 housed under controlled temperature, humidity and light conditions, with free access to
23 food and water. All procedures were in accordance with the National Institute of Health
24 Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 8023, revised
25 1978) and Uruguayan law (N°18.611). The experimental protocol was approved by the
26 local Ethical Committee on Animal Care and Protocols (Exp. 240011-001541-17).
27
28

29 **2.2. Experimental groups**

30 In order to detect how is the activation of different areas of the maternal neural circuitry
31 associated with the maternal behavior of lactating rats raising overlapping litters, we
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 assessed c-Fos immunoreactivity in OL dams after a maternal behavior test 1) with
4 newborn pups (5 to 6 days old) (n=6), 2) with juvenile pups (26 to 27 days old) (n=6),
5
6 and 3) without re-exposition to pups (no exposure group) (n=5).
7
8
9
10
11

12 **2.3. Breeding procedures**

13
14 The breeding procedure was performed following Uriarte et al. (2008)^[22]. Briefly, on
15 gestation day (GD) 16, pregnant nulliparous females were housed until parturition
16 together with the same males they had previously mated with. After the postpartum
17 estrus, vaginal smears were performed to confirm pregnancies, and the males were
18 removed. On GD21 of the second pregnancy, the juveniles from the first litter, except
19 one male and one female, were weaned. Starting on GD21 of the second pregnancy the
20 presence of pups was checked twice a day. The day of parturition was considered
21 postpartum day (PPD) 1. On PPD2 newborn litters were culled to eight individuals (four
22 of each sex).
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37

38 **2.4. Behavioral procedures**

39
40 On PPD 5 the OL mothers with their pups were transported in their home cages to the
41 testing room, where they were left undisturbed for 60 minutes. Afterward, all the pups
42 were removed and left outside the room. After 10 minutes, mothers were tested for
43 maternal behavior with either newborns or juveniles. Selected behaviors - retrieving of
44 pups to the nest, mouthing, body and anogenital licking behaviors and sniffing -, as well
45 as the latency to retrieve the first pup were recorded for 15 minutes ^[26]. For the no
46 exposure group, the pups were removed, and following 10 minutes the cage was
47 manipulated in the same manner of the other groups, but no pups were introduced. All
48 the dams remained under the testing conditions for 90 minutes.
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

2.5. Tissue preparation

Ninety minutes after testing, the dams were injected intraperitoneally with an overdose of sodium thiopental (100mg/kg) and perfused transcardially with ice-cold heparinized phosphate-buffered saline (PBS) followed by 4% paraformaldehyde (PFA, Sigma-Aldrich Co.) in PBS. Brains were removed and post-fixed in PFA for 12 h at 4 °C, followed by 15% and then 30% sucrose solutions at 4 °C for cryoprotection. The brains were stored at -80 °C and were sectioned coronally in a cryostat (40µm thickness). The sections of the areas of interest were collected into four adjacent series, which were 40µm apart and stored at -20 °C in an anti-freeze solution (pH 7) made with 1% de PVP-10, 30% ethylene glycol, 30% sucrose and PBS. One series per animal was used for the immunohistochemical processing, and one adjacent series was Nissl stained to identify specific brain areas^[27].

2.6. Immunohistochemistry

c-Fos protein expression was determined by immunohistochemistry on free-floating sections. Sections were processed following Phillips-Farfán & Fernandez-Guasti (2007)^[27] protocol. Briefly, the sections were transferred from the anti-freeze solution to a 0.05 M Tris buffer (TB, pH 7.6) for rinsing. Then they were incubated with TB plus 0.5% H₂O₂, followed by TB plus 1% H₂O₂ and finally TB plus 0.5% H₂O₂; these incubations were done for 30 minutes in order to inactivate the endogenous peroxidase enzymes. After rinsing with TB, TB plus 0.9 % NaCl (TBS, pH 7.6) and TBS plus 0.5 % Triton X-100 (Sigma-Aldrich Co.) (TBST), the sections were blocked with a solution containing 5% horse serum and 3% bovine serum albumin diluted in TBST. After rinsing, the sections were incubated for 36 h at 4 °C in primary antibody, goat

1
2
3 polyclonal antibody directed against the amino-terminal end of the c-Fos human protein
4 (sc-52-G, Santa Cruz Biotechnology Inc.), diluted 1:2600 in TBST with 1% horse
5
6 serum, 2% bovine serum albumin. Afterwards, they were rinsed and incubated in the
7
8 secondary antibody (biotinylated horse polyclonal antibody directed against goat serum
9
10 proteins, Vector Laboratories) at a 1:200 dilution for three hours. Finally, the sections
11
12 were incubated in avidin-biotin complex (ABC kit, Vectastain Elite, Vector
13
14 Laboratories, Burlingame, CA) at a 1:800 dilution for 3 h and processed using the
15
16 diaminobenzidine-peroxidase method of visualizing antigen binding sites (DAB kit,
17
18 Vector Laboratories, Burlingame, CA). Stained sections were mounted on poli-L-
19
20 lysine-covered slides, dehydrated in alcohol and xylene, and coverslipped. All
21
22 experimental groups were assayed together and in all immunohistochemical procedures
23
24 were included sections that served as negative controls (the primary antibody was not
25
26 added; otherwise all the other procedures were exactly the same).
27
28
29
30
31
32
33
34

35 **2.7. Immunoreactive c-Fos expression analysis**

36
37 Based on previous studies analyzing the maternal circuitry the selected areas were:
38
39 mPFC (cingulate-Cg1-, prelimbic-PrL- and infralimbic-IL- areas), NA (shell and core),
40
41 mPOA, vBNST, and Amy (central –CeA-, medial-MeA-, and basolateral-BLA). They
42
43 were identified using both Nissl-stained adjacent-sections and “The rat brain in
44
45 stereotaxic coordinates” atlas [28]. The region of interest (ROI) for a particular brain
46
47 region was kept constant for all c-Fos determinations and was defined from the Nissl-
48
49 stained adjacent-section. The anteroposterior limits (referred to as Bregma) of the
50
51 counted brain regions and their ROI were: mPFC: 3.24 to 3.00 mm (Cg1 ROI =
52
53 0.2mm², PrL ROI = 0.2mm² and IL ROI = 0.2mm²); NA: 1.92 to 1.44 mm (Core ROI =
54
55 0.5mm² and Shell ROI = 0.4mm²); mPOA and vBNST: 0.12 to -0.48 mm (mPOA ROI
56
57
58
59
60

1
2
3 = 0.5mm², vBNST ROI = 0.16 mm²); Amy: -2.76 to -3.12 mm (CeA ROI = 0.2 mm²,
4
5 BLA ROI = 0.15 mm², MeA ROI = 0.4 mm²).
6
7
8
9

10 Sections were visualized under a Nikon Eclipse 80i 241 epifluorescence microscope
11 with a 10X objective. Images of the selected brain region were taken bilaterally with a
12 Nikon DS-5Mc-U2 digital cooled camera using Nikon Nis Elements 3.1 Advanced
13 Nikon DS-5Mc-U2 digital cooled camera using Nikon Nis Elements 3.1 Advanced
14 Research software. To optimize detection and analysis of c-Fos-positive cells, images
15 were converted into 8-bit images using FIJI software [29]. A cell was labeled c-Fos-
16 positive when the immunoreactivity was nuclear (verified visually) and the nucleus had
17 the following characteristics (restricted with the FIJI software filters): it was 70–100%
18 black, 10-100µm in size and roughly circular (ratio between 0.5-1.0). The number of c-
19 Fos positive cells is reported as the mean from both sides for each brain area.
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32

33 **2.8. Statistical analysis**

34 Behavioral data are expressed as medians (semi-interquartile ranges, SIQR) and
35 comparisons of the maternal behavior between dams exposed to newborns and juveniles
36 were performed by the Mann–Whitney U-test. The number of c-Fos-positive cells is
37 expressed as means ± standard error of the mean (SEM) and was analyzed by the one-
38 way ANOVA test, followed by Fisher LSD post-hoc test. In all cases, the level of
39 statistical significance selected was p < 0.05.
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

3. Results

3.1. Maternal behavior

Table 1 shows the maternal behaviors carried out by the OL mothers towards the newborn or the juvenile pups during the 15 minutes maternal behavior test. OL mothers explored both types of pups, and no differences were observed in sniffing behavior of dams toward newborns and juveniles ($U_{(6,6)}=13.5$, $p=0.73$). However, mothers directed more maternal care toward newborns than juveniles. Thus, newborn pups elicited higher levels of body licking ($U_{(6,6)}=4.5$, $p<0.05$), anogenital licking ($U_{(6,6)}=5.5$, $p<0.05$), mouthing ($U_{(6,6)}=6.0$, $p<0.05$) and retrieving ($U_{(6,6)}=0.0$, $p<0.01$) than juveniles. Moreover, only mothers tested in the presence of newborns showed nest building behavior ($U_{(6,6)}=0.0$, $p<0.05$) and reunited all the pups in the nest (0/6 juvenile group vs. 6/6 newborn group).

3.2. Quantification of c-Fos expression in brain areas related to the control of maternal behavior

Staining obtained in the sections processed was exclusively nuclear and resembled previous reports of c-Fos expression [27]. Sections processed for c-Fos immunohistochemistry without the primary antibody (negative controls) were completely unstained. Due to problems related to tissue conservation, one brain of the dams tested with newborns and one brain of the dams tested with juveniles were discarded from the c-Fos analysis.

3.2.1. Medial Preoptic Area and Bed Nucleus of the Stria Terminalis

As it is shown in Figure 1, c-Fos activation levels in the mPOA and vBNST varied among the groups ($F_{(2,15)}= 8.44$; $p<0.05$ and $F_{(2,11)}= 30.04$; $p<0.05$, respectively). Thus,

1
2
3 the exposure of OL mothers to newborns or juveniles exerted similar c-Fos levels in the
4
5 mPOA ($p= 0.97$), which were significantly higher than those observed in the no
6
7 exposure group ($p<0.05$ vs. newborns and juveniles groups).
8
9

10
11
12 However, in the vBNST, although the presence of both types of pups elicited a higher
13
14 number of c-Fos-positive cells than the lack of exposure to these stimuli ($p<0.05$
15
16 newborns and juveniles vs. no exposure), mothers exposed to newborns presented more
17
18 c-Fos cells than those who interacted with juveniles ($p<0.05$ vs. juveniles and no
19
20 exposure groups).
21
22
23
24
25

26 **3.2.2. Medial Prefrontal Cortex**

27
28 Figure 2A illustrates the c-Fos expression on the medial prefrontal cortex, where
29
30 significant differences in the number of c-Fos-positive cells were observed among the
31
32 groups in the PrL ($F_{(2,13)}=209.31$, $p<0.001$) and the IL ($F_{(2,13)}=9.93$, $p<0.01$) subregions.
33
34 In this sense, the number of c-Fos-positive cells in the PrL area was significantly higher
35
36 in the dams exposed to newborns and juveniles than in the no exposure groups ($p<0.05$
37
38 newborns and juveniles vs. no exposure). Interestingly, in this area the interaction with
39
40 juveniles was associated with a higher expression of c-Fos than the interaction with
41
42 neonates ($p<0.05$). In the IL area, although newborns and juveniles elicited a higher c-
43
44 Fos expression than the no exposure condition ($p<0.05$ newborns and juveniles vs. no
45
46 exposure), the exposure to newborns exerted a higher expression of c-Fos when
47
48 compared to the juveniles ($p<0.05$). The quantitative analysis of the c-Fos expression
49
50 levels in the Cg1 area showed no significant difference among the experimental groups
51
52 ($F_{(2,13)}=1.19$; $p= 0.34$) (Fig. 2A).
53
54
55
56
57
58
59
60

3.2.3. *Nucleus Accumbens*

The levels of c-Fos activation in the NA (Figure 2C) varied among groups both in the core ($F_{(2,13)}= 4.28$; $p<0.05$) and the shell subregions ($F_{(2,13)}= 4.51$; $p<0.05$).

Both in NA core and NA shell, the exposure of the mother to newborn or juvenile pups exerted a higher c-Fos expression than the no exposure group (newborn and juvenile vs. no exposure: core: $p<0.05$ and shell: $p<0.05$). The levels of c-Fos expression in both subregions did not differ between OL mothers that interacted with newborns or juveniles (newborns vs juveniles: core: $p=0.98$ and shell: $p=0.98$).

3.2.4. *Amygdala*

As shown in Figure 2E no differences were observed in the levels of c-Fos activation in the CeA ($F_{(2,12)}=1.55$; $p= 0.25$) between groups. In contrast, both in the MeA and BLA areas, the expression of c-Fos differed among groups (MeA: $F_{(2,12)}=1.55$; $p<0.05$ and BLA: $F_{(2,12)}=1.55$; $p<0.05$). In this sense, the c-Fos levels in the MeA were higher in the OL mothers tested with juveniles when compared to the other groups ($p<0.05$ vs. newborn and no exposure), while no difference was found between the newborn and the no exposure groups ($p=0.65$). Also, in the BLA, the number of c-Fos-positive cells was significantly higher in the juvenile group compared to the newborn group and the no exposure group ($p<0.05$ vs. newborns and no exposure).

4. Discussion

In line with previous research ^[22], the present study shows that OL mothers display different behavioral responses towards their newborn and their juvenile pups.

Interestingly, these behavioral displays were associated with specific patterns of activation throughout the maternal neural circuitry. Thus, a similar expression of c-Fos

1
2
3 was observed in some key areas, such as the mPOA and the NA, while a differential
4
5 activation was quantified in the vBNST, the IL and PrL subregions of the mPFC and the
6
7 basolateral and medial nuclei of the amygdala.
8
9

10
11
12 The high levels of c-Fos expression observed in the mPOA and vBNST of OL mothers
13
14 exposed to either newborns or juveniles are in accordance with several previous studies
15
16 that show that maternal females exhibit an increase in the activation of these areas as a
17
18 result of the interaction with their pups [15, 30-33]. Interestingly, in our study the newborns
19
20 exerted a greater activation of the vBNST of OL dams than juveniles, which might, at
21
22 least partially, underly the variations in maternal responsiveness observed in the
23
24 maternal behavior test. Although both the mPOA and vBNST have been implicated in
25
26 the multisensory processing of infant cues, and are considered critical components for
27
28 the expression of maternal behavior [3, 30, 34], differences in how these areas connect with
29
30 other relevant regions for maternal behavior have been found. Numan and Numan
31
32 (1997) determined that after a mother-litter interaction, the highest proportion of c-Fos
33
34 labeled neurons in the mPOA project to the lateral septum and the medial
35
36 hypothalamus, while in the vBNST the c-Fos positive neurons predominantly project to
37
38 the medial hypothalamus, the retrorubral field (RRF) and the VTA^[31]. As the RRF and
39
40 VTA contain dopaminergic neurons that innervate the NA, we can speculate that the
41
42 higher activation of the vBNST by the newborns, when compared to juveniles,
43
44 promoted the active maternal response of OL mothers observed in the maternal behavior
45
46 test through its projections to these areas.
47
48
49
50
51
52
53
54
55

56 On the other hand, the similar activation of the mPOA of OL mothers when interacting
57
58 with neonate or juvenile pups can be related to the functional role that has been assigned
59
60

1
2
3 to this area. Pereira and Morrell demonstrated that the mPOA is differentially engaged
4 throughout lactation in the expression of maternal behavior, from a necessary
5
6 facilitatory role during the early postpartum period to an inhibitory role during the late
7
8 postpartum [19, 21], suggesting that this area processes pups' sensory stimuli to adapt the
9
10 maternal response to their specific needs. Under this framework, the fact that OL
11
12 mothers presented a similar activation of mPOA while their maternal response differed
13
14 depending on the pup's developmental characteristics, supports the idea that the reduced
15
16 maternal care of OL mothers to juveniles responds to a maternal adaptation to their
17
18 needs rather than a lack of motivation to take care of them. Accordingly, we previously
19
20 determined that although OL mothers direct more caretaking activities towards the
21
22 newborns [22], they do not prefer them over the juveniles in a preference task [23].
23
24
25
26
27
28
29

30
31 In line with this idea, we found that the NA, which represents a main projection of the
32
33 mPOA/vBNST, was similarly activated when OL mothers were presented with
34
35 newborns or juveniles. Accordingly, several studies have shown that the exposure to
36
37 pups induces c-Fos expression in the NA [15, 33, 35]. Moreover, Stack et al. (2002) showed
38
39 that unilateral knife cuts or NMDA-induced lesions in the MPOA/vBNST caused an
40
41 ipsilateral reduction in maternal behavior-induced c-Fos expression in the NA shell,
42
43 indicating that the activity in this region depends on the functional connection with
44
45 these critical regions for the expression of maternal care [36].
46
47
48
49

50
51 Based on the fact that the activity of the mesolimbic dopaminergic system has been
52
53 related to the motivational aspects of maternal behavior [13, 37, 38] and that OL mothers
54
55 exhibited more maternal responses towards neonates and c-Fos expression on vBNST
56
57 than toward juveniles, we would have expected a different activation in the NA in
58
59
60

1
2
3 mothers exposed to both kinds of pups. However, the relationship between an increase
4 in maternal motivation and care and the c-Fos expression in the NA is not linear. Thus,
5
6 Zhao et al. (2010) found that the administration of the dopaminergic antagonist
7
8 haloperidol, which reduces the expression of the active components of maternal
9
10 behavior, increases c-Fos levels in the NA of maternal females [39]. Moreover, the
11
12 exposure of experienced postpartum females to pups exerts a higher c-Fos expression in
13
14 the mPOA, but not in the NA, when compared to inexperienced females [40]. Similarly,
15
16 lactating dams that preferred pup-related cues in a conditioned place preference test
17
18 exhibited a higher c-Fos expression in the mPOA, but lower in the NA when compared
19
20 to mothers who preferred a cocaine-related environment^[18]. Further studies analyzing
21
22 the dopaminergic activity in the NA or its electrophysiological response when OL
23
24 mothers are confronted to newborn or juvenile pups should be performed to clarify this
25
26 issue.
27
28
29
30
31
32
33
34

35 If both kinds of pups similarly activated the mPOA and NA, then the selection of the
36
37 appropriate behavioral response displayed by OL mothers towards newborns and
38
39 juveniles could have been mediated by other specific areas of the maternal neural
40
41 circuitry such as the vBNST, but also by the mPFC, which plays an essential role in
42
43 behavioral flexibility^[41]. Pereira and Morrell (2011)^[21] proposed that the distinct
44
45 subregions of the mPFC have different roles in the expression of maternal behavior
46
47 throughout the postpartum period. These authors demonstrated that the IL region has a
48
49 central role in the expression of maternal behavior during early postpartum and wanes
50
51 as it progresses, while the PrL subregion is recruited later in the postpartum. In line with
52
53 these results, in the present study we observed that the IL mPFC of OL mothers
54
55 exhibited the highest c-Fos expression when presented with newborns, whereas in the
56
57
58
59
60

1
2
3 PrL area the highest levels of c-Fos were found in dams presented with juveniles.
4
5 Together, results from both studies suggest that the IL subregion of the mPFC is
6
7 necessary for an adequate maternal response towards newborns, while the PrL
8
9 subregion contributes to the expression of maternal care towards more developed pups.
10
11 Thus, OL mothers exhibited a particular profile of activation of the mPFC over the
12
13 expression of maternal behavior with elements that seem to resemble early and late
14
15 postpartum periods, and this could allow them to respond adequately to the newborn
16
17 and the juvenile pups.
18
19
20
21
22

23
24 The lack of activation of the neurons in the Cg1 contrasts with the results obtained by
25
26 previous studies employing transient inactivation of the area, which propose that the
27
28 Cg1 is responsible for the organizational aspects of maternal behavior during early and
29
30 late postpartum [21]. One putative explanation for this discrepancy might be that OL
31
32 dams are multiparous females, while the ones employed in the inactivation study were
33
34 primiparous. It would be interesting to explore the influence of previous maternal
35
36 experience on the activity of the different subregions of mPFC after mother-litter
37
38 interaction. Also, even though c-Fos is a good indicator of neural activation [42, 43], not
39
40 all activated neurons express Fos proteins [44, 45], and therefore other neural activation
41
42 markers or approaches may be necessary to reveal the state of activation of this region.
43
44
45
46
47
48

49 The higher number of activated neurons in the MeA and the BLA of OL mothers
50
51 exposed to juveniles when compared to newborns suggests a differential emotional
52
53 processing of both kinds of pups. The MeA is considered one of the most important
54
55 brain areas involved in the processing of olfactory social stimulus in rodents [46, 47]. Thus,
56
57 it has been shown that the MeA relays pups' chemosensory information [15] coming from
58
59
60

1
2
3 the olfactory and the vomeronasal systems through the mPOA/vBNST^[48, 49]. Moreover,
4
5 this nucleus has been implicated in social recognition in rodents^[50, 51]. On the other
6
7 hand, the BLA which is known to be necessary for the appropriate expression of goal-
8
9 directed maternal responses ^[52], has also been involved in the formation of associative
10
11 learning^[53]. Therefore, it can be speculated that the high activation of these amygdaloid
12
13 nuclei is related to neural processing associated with the individual recognition of the
14
15 juvenile pups.
16
17
18
19
20

21
22 Contrary to what has been observed in other studies ^[32, 54], but in accordance to Lonstein
23
24 et al., (1998)^[33], we did not find an increase of c-Fos levels in the MeA or the BLA of
25
26 OL females after interacting with the newborns when compared to the no exposure
27
28 condition. This discrepancy can be attributed to differences in the experimental design
29
30 used in the present study, such as the physiological state of the lactating females
31
32 employed, while OL dams are multiparous, previous studies used primiparous females.
33
34 Additionally, to avoid disrupting the dynamic of the mother-litter interaction in this
35
36 complex family composition, mother-infant separation of OL dams before maternal
37
38 testing was significantly shorter than that employed in previous c-Fos studies.
39
40

41
42 Although in the present experimental conditions, the exposure to newborns did not
43
44 generate c-Fos expression in MeA and BLA, the significant differences in the activation
45
46 of these nuclei as well as the mPFC subregions after interacting with newborns or
47
48 juveniles, points toward a role of these structures in the discrimination between both
49
50 kinds of pups.
51
52
53
54
55

56
57 This study constitutes a first approach to explore the neural basis of maternal flexibility
58
59 in the particular context of mothers raising overlapping litters. Present results show that
60

1
2
3 the interaction of OL mothers with newborns or with juveniles induces specific patterns
4
5 of activation of the maternal circuitry according to pups' age; indicating that these
6
7 neural differences may underlie the maternal selection of the adequate response to pups
8
9 with different physiological demands. Further studies are needed in order to determine
10
11 the relevance of the areas that exhibited differential activation in relation with the OL
12
13 mothers' maternal flexibility when presented with pups in different developmental
14
15 stages, as well as the putative role of experiential and endocrine factors in the neural and
16
17 physiological adaptations of these mothers.
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 **Conflicts of interest:** The authors report no conflict of interest, financial, or otherwise.
4
5
6

7
8 **Funding**
9

10 This study was supported by the Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII)
11
12 [grant FCE2014_1_104678], PEDECIBA and SNB/SNI-ANII.
13
14
15

16
17 **Acknowledgments**
18

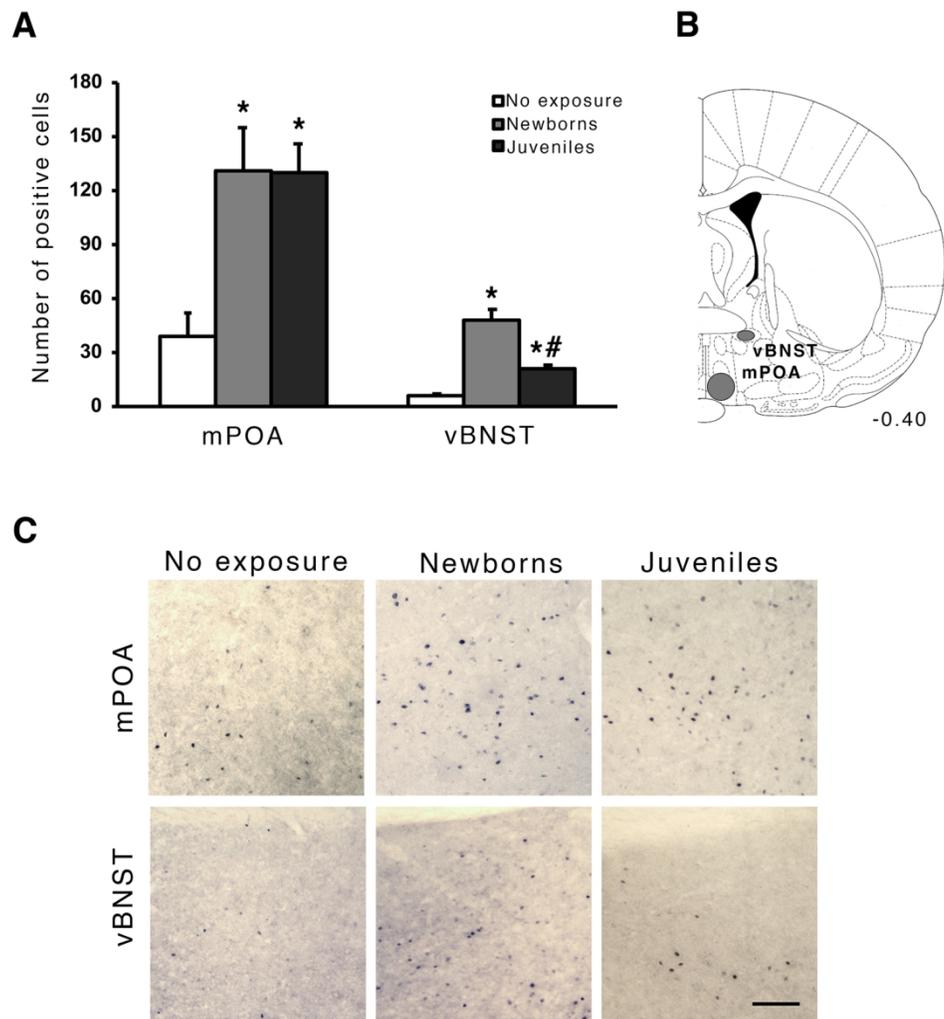
19 We wish to thank Héctor Rodríguez and Diego Serantes for the excellent animal care.
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

5. References

1. Zuluaga, M.J., et al., *Social aversive stimuli presented to the mother produce the precocious expression of fear in rat pups*. Dev Psychobiol, 2014. **56**(6): p. 1187-98.
2. Uriarte, N., et al., *Maternal and affective behaviors of lactating rats reared in overlapping litters*. J Physiol Paris, 2014. **108**(2-3): p. 221-30.
3. Numan, M., *Hypothalamic neural circuits regulating maternal responsiveness toward infants*. Behav Cogn Neurosci Rev, 2006. **5**(4): p. 163-90.
4. Pereira, M. and A. Ferreira, *Neuroanatomical and neurochemical basis of parenting: Dynamic coordination of motivational, affective and cognitive processes*. Horm Behav, 2016. **77**: p. 72-85.
5. Numan, M., et al., *Axon-sparing lesions of the preoptic region and substantia innominata disrupt maternal behavior in rats*. Behav Neurosci, 1988. **102**(3): p. 381-96.
6. Numan, M., *Long-term effects of preoptic area knife cuts on the maternal behavior of postpartum rats*. Behav Neural Biol, 1990. **53**(2): p. 284-90.
7. Lee, A., S. Clancy, and A.S. Fleming, *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, 1999. **100**(1-2): p. 15-31.
8. Oxley, G. and A.S. Fleming, *The effects of medial preoptic area and amygdala lesions on maternal behavior in the juvenile rat*. Dev Psychobiol, 2000. **37**(4): p. 253-65.
9. Hansen, S., et al., *Mesotelencephalic dopamine system and reproductive behavior in the female rat: effects of ventral tegmental 6-hydroxydopamine lesions on maternal and sexual responsiveness*. Behav Neurosci, 1991. **105**(4): p. 588-98.
10. Numan, M. and H.G. Smith, *Maternal behavior in rats: evidence for the involvement of preoptic projections to the ventral tegmental area*. Behav Neurosci, 1984. **98**(4): p. 712-27.
11. Numan, M. and M.J. Numan, *Preoptic-brainstem connections and maternal behavior in rats*. Behav Neurosci, 1991. **105**(6): p. 1013-29.
12. Numan, M., et al., *Medial preoptic area interactions with the nucleus accumbens-ventral pallidum circuit and maternal behavior in rats*. Behavioural Brain Research, 2005. **158**(1): p. 53-68.
13. Numan, M. and D.S. Stolzenberg, *Medial preoptic area interactions with dopamine neural systems in the control of the onset and maintenance of maternal behavior in rats*. Front Neuroendocrinol, 2009. **30**(1): p. 46-64.
14. Sheehan, T., et al., *Evidence that the medial amygdala projects to the anterior/ventromedial hypothalamic nuclei to inhibit maternal behavior in rats*. Neuroscience, 2001. **106**(2): p. 341-56.
15. Fleming, A.S. and C. Walsh, *Neuropsychology of maternal behavior in the rat: c-fos expression during mother-litter interactions*. Psychoneuroendocrinology, 1994. **19**(5-7): p. 429-43.
16. Mattson, B.J. and J.I. Morrell, *Preference for cocaine- versus pup-associated cues differentially activates neurons expressing either Fos or cocaine- and amphetamine-regulated transcript in lactating, maternal rodents*. Neuroscience, 2005. **135**(2): p. 315-28.
17. Reisbick, S., J.S. Rosenblatt, and A.D. Mayer, *Decline of maternal behavior in the virgin and lactating rat*. J Comp Physiol Psychol, 1975. **89**(7): p. 722-32.
18. Mattson, B.J., et al., *Comparison of two positive reinforcing stimuli: pups and cocaine throughout the postpartum period*. Behav Neurosci, 2001. **115**(3): p. 683-94.
19. Pereira, M. and J.I. Morrell, *The changing role of the medial preoptic area in the regulation of maternal behavior across the postpartum period: facilitation followed by inhibition*. Behav Brain Res, 2009. **205**(1): p. 238-48.

- 1
 - 2
 - 3
 - 4
 - 5
 - 6
 - 7
 - 8
 - 9
 - 10
 - 11
 - 12
 - 13
 - 14
 - 15
 - 16
 - 17
 - 18
 - 19
 - 20
 - 21
 - 22
 - 23
 - 24
 - 25
 - 26
 - 27
 - 28
 - 29
 - 30
 - 31
 - 32
 - 33
 - 34
 - 35
 - 36
 - 37
 - 38
 - 39
 - 40
 - 41
 - 42
 - 43
 - 44
 - 45
 - 46
 - 47
 - 48
 - 49
 - 50
 - 51
 - 52
 - 53
 - 54
 - 55
 - 56
 - 57
 - 58
 - 59
 - 60
20. Grieb, Z.A., M.A. Holschbach, and J.S. Lonstein, *Interaction between postpartum stage and litter age on maternal caregiving and medial preoptic area orexin*. *Physiol Behav*, 2018. **194**: p. 430-436.
21. Pereira, M. and J.I. Morrell, *Functional mapping of the neural circuitry of rat maternal motivation: effects of site-specific transient neural inactivation*. *J Neuroendocrinol*, 2011. **23**(11): p. 1020-35.
22. Uriarte, N., et al., *Overlapping litters in rats: effects on maternal behavior and offspring emotionality*. *Physiol Behav*, 2008. **93**(4-5): p. 1061-70.
23. Ferreno, M., et al., *Incentive value of newborn pups relative to juveniles for mother rats raising overlapping litters*. *Behav Processes*, 2018.
24. Gilbert, A.N., et al., *Mother-weanling interactions in Norway rats in the presence of a successive litter produced by postpartum mating*. *Physiol Behav*, 1983. **30**(2): p. 267-71.
25. Calhoun, J.B., *The ecology and sociology of the Norway rat*. 1963, Washington: U.S. Dept. of Health, Education, and Welfare, Public Health Service. 188.
26. Pereira, M. and A. Ferreira, *Demanding pups improve maternal behavioral impairments in sensitized and haloperidol-treated lactating female rats*. *Behav Brain Res*, 2006. **175**(1): p. 139-48.
27. Phillips-Farfan, B.V. and A. Fernandez-Guasti, *c-Fos expression related to sexual satiety in the male rat forebrain*. *Physiol Behav*, 2007. **91**(5): p. 609-19.
28. Paxinos, G. and C. Watson, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 2007, London: Academic Press.
29. Schindelin, J., et al., *Fiji: an open-source platform for biological-image analysis*. *Nature Methods*, 2012. **9**: p. 676.
30. Walsh, C.J., et al., *The effects of olfactory and somatosensory desensitization on Fos-like immunoreactivity in the brains of pup-exposed postpartum rats*. *Behav Neurosci*, 1996. **110**(1): p. 134-53.
31. Numan, M. and M.J. Numan, *Projection sites of medial preoptic area and ventral bed nucleus of the stria terminalis neurons that express Fos during maternal behavior in female rats*. *J Neuroendocrinol*, 1997. **9**(5): p. 369-84.
32. Numan, M. and M.J. Numan, *Expression of Fos-like immunoreactivity in the preoptic area of maternally behaving virgin and postpartum rats*. *Behav Neurosci*, 1994. **108**(2): p. 379-94.
33. Lonstein, J.S., et al., *Forebrain expression of c-fos due to active maternal behaviour in lactating rats*. *Neuroscience*, 1998. **82**(1): p. 267-81.
34. Numan, M., *Motivational systems and the neural circuitry of maternal behavior in the rat*. *Dev Psychobiol*, 2007. **49**(1): p. 12-21.
35. Matsushita, N., et al., *Comparison of c-Fos expression in brain regions involved in maternal behavior of virgin and lactating female mice*. *Neuroscience Letters*, 2015. **590**: p. 166-171.
36. Stack, E.C., et al., *A functional neuroanatomical investigation of the role of the medial preoptic area in neural circuits regulating maternal behavior*. *Behav Brain Res*, 2002. **131**(1-2): p. 17-36.
37. Stolzenberg, D.S. and M. Numan, *Hypothalamic interaction with the mesolimbic DA system in the control of the maternal and sexual behaviors in rats*. *Neurosci Biobehav Rev*, 2011. **35**(3): p. 826-47.
38. Ferreño, M., et al., *Dopaminergic activity mediates pups' over male preference of postpartum estrous rats*. *Physiology & Behavior*, 2018. **188**: p. 134-139.
39. Zhao, C. and M. Li, *C-Fos identification of neuroanatomical sites associated with haloperidol and clozapine disruption of maternal behavior in the rat*. *Neuroscience*, 2010. **166**(4): p. 1043-1055.

- 1
 - 2
 - 3
 - 4
 - 5
 - 6
 - 7
 - 8
 - 9
 - 10
 - 11
 - 12
 - 13
 - 14
 - 15
 - 16
 - 17
 - 18
 - 19
 - 20
 - 21
 - 22
 - 23
 - 24
 - 25
 - 26
 - 27
 - 28
 - 29
 - 30
 - 31
 - 32
 - 33
 - 34
 - 35
 - 36
 - 37
 - 38
 - 39
 - 40
 - 41
 - 42
 - 43
 - 44
 - 45
 - 46
 - 47
 - 48
 - 49
 - 50
 - 51
 - 52
 - 53
 - 54
 - 55
 - 56
 - 57
 - 58
 - 59
 - 60
40. Fleming, A.S. and M. Korsmit, *Plasticity in the maternal circuit: effects of maternal experience on Fos-Lir in hypothalamic, limbic, and cortical structures in the postpartum rat*. Behav Neurosci, 1996. **110**(3): p. 567-82.
41. Floresco, S.B., A.E. Block, and M.T. Tse, *Inactivation of the medial prefrontal cortex of the rat impairs strategy set-shifting, but not reversal learning, using a novel, automated procedure*. Behav Brain Res, 2008. **190**(1): p. 85-96.
42. Hoffman, G.E., M.S. Smith, and J.G. Verbalis, *c-Fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems*. Front Neuroendocrinol, 1993. **14**(3): p. 173-213.
43. Sagar, S.M., F.R. Sharp, and T. Curran, *Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level*. Science, 1988. **240**(4857): p. 1328-31.
44. McReynolds, J.R., et al., *What does the Fos say? Using Fos-based approaches to understand the contribution of stress to substance use disorders*. Neurobiology of Stress, 2018. **9**: p. 271-285.
45. Morgan, J.I. and T. Curran, *Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun*. Annu Rev Neurosci, 1991. **14**: p. 421-51.
46. Curtis, J.T. and Z. Wang, *Forebrain c-fos expression under conditions conducive to pair bonding in female prairie voles (Microtus ochrogaster)*. Physiology & Behavior, 2003. **80**(1): p. 95-101.
47. Ferguson, J.N., et al., *Oxytocin in the Medial Amygdala is Essential for Social Recognition in the Mouse*. The Journal of Neuroscience, 2001. **21**(20): p. 8278.
48. Scalia, F. and S.S. Winans, *The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals*. Journal of Comparative Neurology, 1975. **161**(1): p. 31-55.
49. Simerly, R.B. and L.W. Swanson, *The organization of neural inputs to the medial preoptic nucleus of the rat*. J Comp Neurol, 1986. **246**(3): p. 312-42.
50. Noack, J., R. Murau, and M. Engelmann, *Consequences of temporary inhibition of the medial amygdala on social recognition memory performance in mice*. Front Neurosci, 2015. **9**: p. 152.
51. Wang, Y., et al., *Effects of the medial or basolateral amygdala upon social anxiety and social recognition in mice*. Turk J Med Sci, 2014. **44**(3): p. 353-9.
52. Numan, M., et al., *The importance of the basolateral/basomedial amygdala for goal-directed maternal responses in postpartum rats*. Behav Brain Res, 2010. **214**(2): p. 368-76.
53. Everitt, B.J., et al., *The basolateral amygdala-ventral striatal system and conditioned place preference: further evidence of limbic-striatal interactions underlying reward-related processes*. Neuroscience, 1991. **42**(1): p. 1-18.
54. Fleming, A.S., et al., *Activation of Fos-like immunoreactivity in the medial preoptic area and limbic structures by maternal and social interactions in rats*. Behav Neurosci, 1994. **108**(4): p. 724-34.



42 Figure 1. c-Fos expression in the medial preoptic area (mPOA) and the ventral bed nucleus of the stria
43 terminalis (vBNST) of OL mothers in the no exposure, newborn and juvenile groups. A) Graph shows the
44 number of c-Fos positive cells in the mPOA and vBNST. Data are shown as the mean \pm S.E.M. of the number
45 of c-Fos neurons. * $p < 0.05$ vs. no exposure group; # $p < 0.05$ vs. newborn group, one-way ANOVA test,
46 followed by Fisher LSD post-hoc test; B) Schematic representation of the ROI quantified in the mPOA and
47 vBNST based on Paxinos & Watson stereotaxic coordinates atlas[28]. Numbers beside each plate indicate
48 the distance from Bregma in millimeters. C) Representative photomicrographs of c-Fos expression in the
49 mPOA and vBNST of OL mothers in the three groups assessed. Scale Bar: 100 μ m. Magnification: 10X.

50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

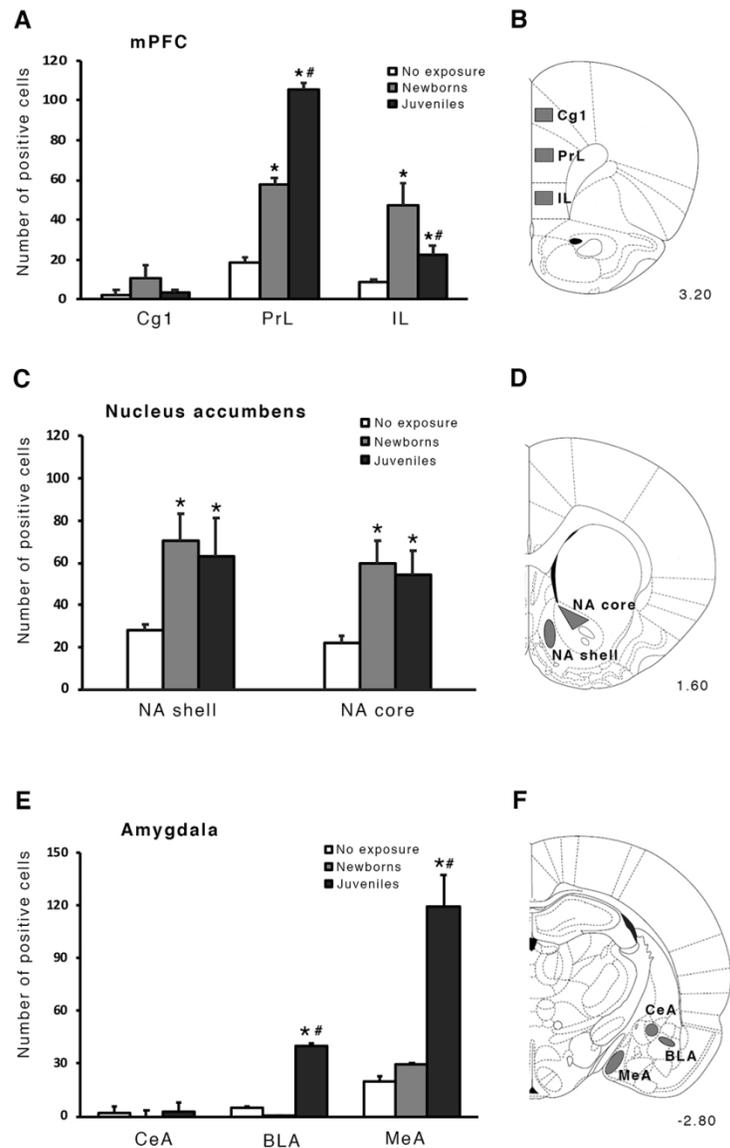


Figure 2. c-Fos quantification in the cingulate (Cg1), prelimbic (PrL) and infralimbic (IL) subregions of the medial prefrontal cortex (mPFC) (A); nucleus accumbens (NA) shell and core (C) and in central (CeA), basolateral (BLA) and medial (MeA) portions of the amygdala (E) of OL mothers in the no exposure condition, and the newborn and juvenile exposure conditions. Data are expressed as the mean \pm SEM of the number of c-Fos positive cells in each region. * $p < 0.05$ vs. no exposure group; # $p < 0.05$ vs. newborn group, one-way ANOVA test, followed by Fisher LSD post-hoc test; in sections B, D and F the schematic representations of the ROIs quantified in each region are shown, based on Paxinos & Watson stereotaxic coordinates atlas[28]. Numbers beside each plate indicate the distance from Bregma in millimeters.

Table 1. Behavioral components displayed by females with overlapping litters during a 15-min maternal behavior test performed with one of either litter (newborns or juveniles).

<i>Maternal behavior of females with overlapping litters</i>							
	Sniffing	Retrieving	Mouthing	Body licking	Anogenital licking	Nest building	Latency to retrieve pups
<i>Newborn pups</i>	4.0 (2.9)	6.5 (1.1)	1.0 (0.1)	5.0 (1.1)	2.5 (1.9)	4.5 (2.4)	31.5 (24.6)
<i>Juvenile pups</i>	6.0 (2.0)	0.0 (0.1)*	0.0 (0.0)*	0.0 (0.0)*	0.0 (0.0)*	0.0 (0.0)*	900 (0.0)*

Data are shown as medians (SIQR). * $p < 0.05$ between-group comparisons by Mann-Whitney U test.

Bibliografía general

- Afonso, V., Shams, W., Jin, D., & Fleming, A. (2013). Distal pup cues evoke dopamine responses in hormonally primed rats in the absence of pup experience or ongoing maternal behavior. *The Journal of Neuroscience* 33(6), 2305-2312. doi: 10.1523/jneurosci.2081-12.2013
- Afonso, V., Sison, M., Lovic, V., & Fleming, A. (2007). Medial prefrontal cortex lesions in the female rat affect sexual and maternal behavior and their sequential organization. *Behav Neurosci*, 121, 515-526.
- Agrati, D., Fernández-Guasti, A., & Ferreira, A. (2008). The reproductive stage and experience of sexually receptive mothers alter their preference for pups or males. *Behavioral Neuroscience*, 122(5), 998-1004. doi: 10.1037/a0012585
- Agrati, D., Fernandez-Guasti, A., Ferreño, M., & Ferreira, A. (2011). Coexpression of sexual behavior and maternal aggression: the ambivalence of sexually active mother rats toward male intruders. *Behavioural Neuroscience*, 125(3), 446-451. doi: 10.1037/a0023085
- 2011-08240-001 [pii]
- Agrati, D., Ferreño, M., Marin, G., Uriarte, N., Zuluaga, M. J., Fernandez-Guasti, A., & Ferreira, A. (2016). Previous and recent maternal experiences modulate pups' incentive value relative to a male without affecting maternal behavior in postpartum estrous rats. *J. Physiol. Paris*, 110, 140–148.
- Agrati, D., Zuluaga, M., Fernández-Guasti, A., Meikle, A., & Ferreira, A. (2008). Maternal condition reduces fear behaviors but not the endocrine response to an emotional threat in virgin female rats. *Hormones and Behavior*, 53(1), 232-240. doi: 10.1016/j.yhbeh.2007.10.002
- Akbari, E. M., Shams, S., Belay, H. T., Kaiguo, M., Razak, Z., & Kent, C. F. (2013). The effects of parity and maternal behavior on gene expression in the medial preoptic area and the medial amygdala in postpartum and virgin female rats: a microarray study. *Behavioral Neuroscience*, 127(6), 913-922.
- Albin-Brooks, C., Nealer, C., Sabihi, S., Haim, A., & Leuner, B. (2017). The influence of offspring, parity, and oxytocin on cognitive flexibility during the postpartum period. *Horm Behav*, 89, 130-136.
- Anderson, G. M., Grattan, D. R., van der Ancker, W., & Bridges, R. S. (2006). Reproductive experience increases prolactin responsiveness in the medial preoptic area and arcuate nucleus of female rats. *Endocrinology*, 147, 4688-4694.
- Arnst, N., Kuznetsova, S., Lipachev, N., Shaikhutdinov, N., Melnikova, A., Mavlikeev, M., . . . Paveliev, M. (2016). Spatial patterns and cell surface clusters in perineuronal nets. *Brain Research* 1648.
- Arrati, P., Carmona, C., Dominguez, G., Beyer, C., & Rosenblatt, J. (2006). GABA receptor agonists in the medial preoptic area and maternal behavior in lactating rats. *Physiology & Behavior*, 87(1), 51-65. doi: 10.1016/j.physbeh.2005.08.048

- Bale, T., Pedersen, C., & Dorsa, D. (1996). CNS oxytocin receptor mRNA expression and regulation by gonadal steroids. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *395*, 269-280.
- Banerjee, S. B., Gutzeit, V. A., Baman, J., Aoued, H. S., Doshi, N. K., & Liu, R. C. (2017). Perineuronal Nets in the Adult Sensory Cortex Are Necessary for Fear Learning *Neuron*, *91*(1), 169-179.
- Barha, C. K., Lieblich, S. E., Chow, C., & Galea, L. A. (2015). Multiparity-induced enhancement of hippocampal neurogenesis and spatial memory depends on ovarian hormone status in middle age. *Neurobiol Aging*, *36*, 2391-2405.
- Benedetto, L., Pereira, M., Ferreira, A., & Torterolo, P. (2014). Melanin-concentrating hormone in the medial preoptic area reduces active components of maternal behavior in rats. *Peptides*, *58*, 20-25.
- Berardi, N., Sale, A., & Maffei, L. (2015). Brain structural and functional development: genetics, experience and epigenetics. *Dev Med Child Neurol*, *57*(2), 4-9.
- Berridge, K. (2004). Motivation concepts in behavioral neuroscience. *Physiology & Behavior*, *81*(2), 179-209.
- Bindra, D. (1972). Neuropsychological interpretation of the effect of drive and incentive motivation on general and instrumental behavior. *Psychology Reviews*, *75*, 1-22.
- Blacktop, J. M., Todd, R. P., & Sorg, B. A. (2017). Role of perineuronal nets in the anterior dorsal lateral hypothalamic area in the acquisition of cocaine-induced conditioned place preference and self-administration. *Neuropharmacology*, *118*, 124-136.
- Bloch, G. J., Kurth, S. M., Akesson, T. R., & Micevych, P. E. (1992). Estrogen-concentrating cells within cell groups of the medial preoptic area: sex differences and co-localization with galanin-immunoreactive cells. *Brain research*, *595*(2), 301-308.
- Boehnke, S. E., & Rasmusson, D. D. (2001). Time course and effective spread of lidocaine and tetrodotoxin delivered via microdialysis: an electrophysiological study in cerebral cortex. *Journal of Neuroscience Methods*, *105*, 133-141.
- Bosch, O. J., & Neumann, I. D. (2012). Both oxytocin and vasopressin are mediators of maternal care and aggression in rodents: from central release to sites of action. *Horm. Behav*, *61*, 293-303.
- Branchi, I., & Alleva, E. (2006). Communal nesting, an early social enrichment, increases the adult anxiety-like response and shapes the role of social context in modulating the emotional behavior. *Behavioural Brain Research*, *172*(2), 299-306.
- Bridges, R. S. (1975). Long-term effects of pregnancy and parturition upon maternal responsiveness in the rat. *Physiology and Behavior*, *14*(3), 245-249.
- Bridges, R. S. (1984). A quantitative analysis of the roles of dosage, sequence and duration of estradiol and progesterone exposure in the regulation of maternal behavior in the rat. *Endocrinology*, *114*, 930-940.

- Bridges, R. S. (1990). Endocrine regulation of parental behavior in rodents. In: Krasnegor, N.A., Bridges, R.S. (Eds.). *Mammalian Parenting*. Oxford University Press, New York, 215-242.
- Bridges, R. S. (2015). Neuroendocrine regulation of maternal behavior. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 36, 178-196.
- Bridges, R. S. (2016). Long-term alterations in neural and endocrine processes induced by motherhood in mammals. *Horm. Behav*, 77, 193-203.
- Bridges, R. S., & Hammer, R. P. (1992). Parity-associated alterations in medial preoptic opiate receptors in female rats. *Brain research*, 578, 269-274.
- Bridges, R. S., Robertson, M. C., Shiu, R. P., Sturgis, J. D., Henriquez, B. M., & Mann, P. E. (1997). Central lactogenic regulation of maternal behavior in rats: steroid dependence, hormone specificity, and behavioral potencies of rat prolactin and rat placental lactogen I. *Endocrinology*, 138(2), 756-763.
- Bridges, R. S., Zarrow, M. X., Gandelman, R., & Denenberg, V. H. (1972). Differences in maternal responsiveness between lactating and sensitized rats. *Dev Psychobiology*, 5, 123-127.
- Byrnes, E. M., Babb, J. A., & Bridges, R. S. (2009). Differential expression of oestrogen receptor α following reproductive experience in young and middle-aged female rats. *Journal of neuroendocrinology*, 21, 550-557.
- Byrnes, E. M., Byrnes, J. J., & Bridges, R. S. (2001). Increased sensitivity of dopamine systems following reproductive experience in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 68, 481-489.
- Calhoun, J. B. (1963). The ecology and sociology of the Norway rat. *Public Health Service. Washington: U.S. Dept. of Health, Education, and Welfare*.
- Camacho-Arroyo, I., González-Arenas, A., Jiménez-Arellano, C., Morimoto, S., Galván-Rosas, A., Gómora-Arrati, P., . . . González-Flores, O. (2018). Sex hormone levels and expression of their receptors in lactating and lactating pregnant rats. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 178, 213–220.
- Celio, M. R. (1993). Perineuronal nets of extracellular matrix around parvalbumin-containing neurons of the hippocampus. *Hippocampus*, 3, 55-60.
- Cohen, E. J., Quarta, E., Bravi, R., Granato, A., & Minciacchi, D. (2017). Neural plasticity and network remodeling: From concepts to pathology. *Neuroscience*, 344, 326-345.
- Cousins, M., & Salamone, J. (1994). Nucleus Accumbens Dopamine Depletions in Rats Affect Relative Response Allocation in a Novel Cost/Benefit Procedure. *Pharmacology Biochemistry Behavior*, 49(1), 85-91.
- Cramer, S. C., Sur, M., Dobkin, B. H., O'Brien, C., Sanger, T. D., Trojanowski, J. Q., . . . Vinogradov, S. (2011). Harnessing neuroplasticity for clinical applications. *Brain*, 134(6), 1591-1609.

- Champagne, F., Chretien, P., Stevenson, C., Zhang, T., Gratton, A., & Meaney, M. (2004). Variations in nucleus accumbens dopamine associated with individual differences in maternal behavior in the rat. *Journal of Neuroscience* 24(17), 4113-4123.
- Champagne, F., Francis, D. D., Mar, A., & Meaney, M. (2003). Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. *Physiol Behav*, 79, 359-371.
- Darnaudery, M., Perez-Martin, M., Del Faveroa, F., Gomez-Roldanb, C., Garcia-Segurac, L., & Maccari, S. (2007). Early motherhood in rats is associated with a modification of hippocampal function. *Psychoneuroendocrinology*, 32, 803-812.
- de Vivo, L., Landi, S., Panniello, M., Baroncelli, L., Chierzi, S., Mariotti, L., . . . Ratto, G. M. (2013). Extracellular matrix inhibits structural and functional plasticity of dendritic spines in the adult visual cortex. *Nature Communication*, 4, 1484.
- Dulac, C., O'Connell, L. A., & Wu, Z. (2014). Neural control of maternal and paternal behaviors. *Science*, 345, 765-770.
- El Majdoubiet, M., Poulain, D. A., & Theodosis, D. T. (1997). Lactation-induced plasticity in the supraoptic nucleus augments axodendritic and axosomatic gabaergic and glutamatergic synapses: an ultrastructural analysis using the disector method. *Neuroscience*, 80, 1137-1147.
- Elyada, Y. M., & Mizrahi, A. (2015). Becoming a mother-circuit plasticity underlying maternal behavior. *Curr Opin Neurobiol.*, 35, 49-56.
- Fahrbach, S., & Pfaff, D. (1986). Effect of preoptic region implants of dilute estradiol on the maternal behavior of ovariectomized, nulliparous rats. *Hormones and Behavior*, 20(3), 354-363.
- Fahrbach, S. E., & Pfaff, D. W. (1986). Effect of preoptic region implants of dilute estradiol on the maternal behavior of ovariectomized, nulliparous rats. *Hormones and Behavior*, 20, 354-363.
- Fang, Y. Y., Yamaguchi, T., Song, S. C., Tritsch, N. X., & Lin, D. (2018). A Hypothalamic Midbrain Pathway Essential for Driving Maternal Behaviors *Neuron*, 98(1), 192-207.
- Fawcett, J. W. (2015). The extracellular matrix in plasticity and regeneration after CNS injury and neurodegenerative disease. . *Prog. Brain Res.*, 218, 213-226.
- Featherstone, R. E., Fleming, A. S., & Go, I. (2000). Plasticity in the maternal circuit: effects of experience and partum condition on brain astrocyte number in female rats. 114(158-172).
- Featherstone, R. E., Fleming, A. S., & Ivy, G. O. (2000). Plasticity in the maternal circuit: effects of experience and partum condition on brain astrocyte number in female rats. *Behavioral Neuroscience*, 114(1), 158-172.
- Ferreira, A. (2008). Amor maternal y sexual: una visión psicobiológica *Aproximaciones al estudio de la Psicobiología del comportamiento*, 190-205.

- Ferreira, A., Agrati, D., Uriarte, N., Pereira, M., & Zuluaga, M. J. (2012). The rat as a model for studying maternal behavior. In: Behavioral Animal Models. *Research Signpost*. Editors: S.E. Cruz-Morales and J.C. Pedro Arriaga-Ramírez, 73-88.
- Ferreira, A., Pereira, M., Agrati, D., Uriarte, N., & Fernández-Guasti, A. (2002). Role of maternal behavior on aggression, fear and anxiety. *Physiology and Behavior*, 77, 197-204.
- Ferreño, M., Uriarte, N., Zuluaga, M. J., Ferreira, A., & Agrati, D. (2018). Dopaminergic activity mediates pups' over male preference of postpartum estrous rats. *Physiology & Behavior*, 188, 134–139.
- Fleming, A., Corter, C., Franks, P., Surbey, M., Schneider, B., & Steiner, M. (1993). Postpartum factors related to mother's attraction to newborn infant odors. *Dev. Psychobiol*, 26(2), 115-132.
- Fleming, A., Cheung, U., Myhal, N., & Kessler, Z. (1989). Effects of maternal hormones on 'timidity' and attraction to pup-related odors in female rats. *Physiology & Behavior*, 46(3), 449-453.
- Fleming, A., & Korsmit, M. (1996). Plasticity in the maternal circuit: effects of maternal experience on Fos-Lir in hypothalamic, limbic, and cortical structures in the postpartum rat. *Behav Neurosci*, 110(3), 567-582.
- Fleming, A., Korsmit, M., & Deller, M. (1994). Rat pups are potent reinforcers to the maternal animal: effect of experience, parity, hormones, and dopamine function. *Psychobiology*, 22, 44-53.
- Fleming, A., & Luebke, C. (1981). Timidity prevents the virgin female rat from being a good mother: Emotionality differences between nulliparous and parturient females. *Physiology and Behavior*, 27(5), 863-868.
- Fleming, A., O'Day, D., & Kraemer, G. (1999). Neurobiology of mother-infant interactions: experience and central nervous system plasticity across development and generations. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 23(5), 673-685.
- Fleming, A., & Rosenblatt, J. (1974). Maternal behavior in the virgin and lactating rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 85(5), 957-972.
- Fleming, A., Ruble, D., Flett, G., & Shaul, D. (1988). Postpartum adjustment in first-time mothers: Relations between mood, maternal attitudes, and mother-infant interactions. *Developmental Psychology*, 24(1), 71-81.
- Fleming, A., & Sarker, J. (1990). Experience-hormone interactions and maternal behavior in rats. *Physiology & Behavior*, 47(6), 1165-1173.
- Fleming, A., & Walsh, C. (1994). Neuropsychology of maternal behavior in the rat: c-fos expression during mother-litter interactions. *Psychoneuroendocrinology*, 19, 429-443.
- Fleming, A. S., Kraemer, G. W., Gonzalez, A., Lovic, V., Rees, S., & Melo, Á. (2002). Mothering begets mothering: the transmission of behavior and its neurobiology across generations. *Pharmacol Biochem Behav*, 73, 61-75.

- Fleming, A. S., & Rosenblatt, J. S. (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*, 221-232.
- Floresco, S. B., Block, A. E., & Tse, M. T. (2008). Inactivation of the medial prefrontal cortex of the rat impairs strategy set-shifting, but not reversal learning, using a novel, automated procedure. *Behavioral Brain Research*, *190*(1), 85-96.
- Francis, D. D., Diorio, J., Liu, D., & Meaney, M. (1999). Nongenomic transmission across generations of maternal behavior and stress responses in the rat. *Science*, *286*, 1155-1158.
- Frankfurt, M., Salas-Ramirez, K., Friedman, E., & Luine, V. (2011). Cocaine Alters Dendritic Spine Density in Cortical and Subcortical Brain Regions of the Postpartum and Virgin Female Rat. *Synapse*, *65*, 955-961.
- Frischknecht, R., Heine, M., Perrais, D., Seidenbecher, C. I., Choquet, D., & Gundelfinger, E. D. (2009). Brain extracellular matrix affects AMPA receptor lateral mobility and short-term synaptic plasticity. *Nature Neuroscience*, *12*, 897-904.
- Galea, L. A., Wide, J. K., & Barr, A. M. (2001). Estradiol alleviates depressive-like symptoms in a novel animal model of post-partum depression. *Behavioral Brain Research*, *122*, 1-9.
- Gilbert, A. N., Burgoon, D. A., Sullivan, K. A., & Adler, N. T. (1983). Mother-weanling interactions in Norway rats in the presence of a successive litter produced by postpartum mating. *Physiology and Behavior*, *30*, 267-271.
- Gilbert, A. N., Pelchat, R. J., & Adler, N. T. (1980). Postpartum copulatory and maternal behaviour in Norway rats under seminatural conditions. *Animal Behavior*, *28 Pt 4*, 989-995.
- Gogolla, N., Caroni, P., Lüthi, A., & Herry, C. (2009). Perineuronal nets protect fear memories from erasure. *Science*, *325*, 1258-1261.
- Gómora-Arrati, P., González-Arenas, A., Balandrán-Ruiz, M. A., Mendoza-Magaña, M. L., González-Flores, O., & Camacho-Arroyo, I. (2010). Changes in the content of GFAP in the rat brain during pregnancy and the beginning of lactation. *Neurosci Lett*, *484*(3), 197-200.
- Gonzalez, A., Lovic, V., Ward, G. R., Wainwright, P. E., & Fleming, A. S. (2001). Intergenerational effects of complete maternal deprivation and replacement stimulation on maternal behavior and emotionality in female rats. *Developmental Psychobiology*, *38*, 11-32.
- Grattan, D. R. (2001). The actions of prolactin in the brain during pregnancy and lactation. *Prog. Brain Res.*, *133*, 153-171.
- Grieb, Z. A., Holschbach, M. A., & Lonstein, J. S. (2018). Interaction between postpartum stage and litter age on maternal caregiving and medial preoptic area orexin. *Physiol Behav*, *194*, 430-436.
- Grota, L. J., & Ader, R. (1969). Continuous recording of maternal behaviour in *Rattus Norvegicus*. *Anim Behav*, *17*, 722-729.

- Grota, L. J., & Ader, R. (1974). Behavior of Lactating Rats in a Dual-Chambered Maternity Cage. *Hormones and behavior*, *5*, 275-282.
- Grota, L. J., & Eik-Nes, K. B. (1967). Plasma progesterone concentrations during pregnancy and lactation in the rat. *J. Reprod. Fert.*, *13*, 83-91.
- Haim, A., Julian, D., Albin-Brooks, C., Brothers, H. M., Lenz, K. M., & Leuner, B. (2017). A survey of neuroimmune changes in pregnant and postpartum female rats. *Brain, Behavior, and Immunity*, *59*, 67-78.
- Hansen, S., Bergvall, A., & Nyiredi, S. (1993). Interaction with pups enhances dopamine release in the ventral striatum of maternal rats: a microdialysis study. *Pharmacology Biochemistry Behavior*, *45*(3), 673-676.
- Hansen, S., Sodersten, P., & Eneroth, P. (1983). Mechanisms regulating hormone release and the duration of dioestrus in the lactating rat. *Journal of Endocrinology*, *99*, 173-180.
- Härtig, W., Brauer, K., & Brückner, G. (1992). Wisteria floribunda agglutinin-labelled nets surround parvalbumin-containing neurons. *Neuroreport.*, *3*(10), 869-872.
- Hatton, G., & Tweedle, C. (1981). Magnocellular Neuropeptidergic Neurons in Hypothalamus: Increases in Membrane Apposition and Number of Specialized Synapses from Pregnancy to Lactation. *Brain Research Bulletin*, *8*, 197-204.
- Hille, B. (1966). Common mode of action of three agents that decrease the transient change in sodium permeability in nerves. *Nature*, *210*(5042), 1220-1222.
- Hille, B. (1977). Local anesthetics: hydrophilic and hydrophobic pathways for the drug-receptor reaction. *J Gen Physiol.*, *69*(4), 497-515.
- Hillner, K. M., Jacobs, V. R., Fischer, T., & Aigner, L. (2014). The Maternal Brain: An Organ with Peripartur Plasticity. *Neural Plasticity*, *2014*, 574159.
- Hofer, M. A., Brunelli, S. A., Masmela, J., & Shair, H. N. (1996). Maternal interactions prior to separation potentiate isolation-induced calling in rat pups. *Behavioral Neuroscience*, *110*(5), 1158-1167.
- Hofer, M. A., Brunelli, S. A., & Shair, H. N. (1994). Potentiation of isolation-induced vocalization by brief exposure of rat pups to maternal cues. *Developmental psychobiology*, *27*(8), 503-517.
- Holinka, C. F., & Carlson, A. D. (1976). Pup Attraction to Lactating Sprague-Dawley Rats. *Behavioral biology*, *16*, 489-505.
- Horii-Hayashi, N., Sasagawa, T., Matsunaga, W., & Nishi, M. (2015). Development and Structural Variety of the Chondroitin Sulfate Proteoglycans-Contained Extracellular Matrix in the Mouse Brain. *Neural Plasticity*.
- Horii-Hayashi, N., Sasagawa, T., & Nishi, M. (2016). Insights from extracellular matrix studies in the hypothalamus: structural variations of perineuronal nets and discovering a new perifornical area of the anterior hypothalamus. *Anatomical Science International.*, *92*(1), 18-24.

- Hylin, M. J., Orsi, S. A., Moore, A. N., & Dash, P. K. (2013). Disruption of the perineuronal net in the hippocampus or medial prefrontal cortex impairs fear conditioning. *Learn Mem*, *20*, 267-273.
- Jacobson, C., Terkel, J., Gorski, R., & Sawyer, C. (1980). Effects of small medial preoptic area lesions on maternal behavior: retrieving and nest building in the rat. *Brain Research*, *194*(2), 471-478.
- Keyser-Marcus, L., Stafisso-Sandoz, G., Gerecke, K., Jasnow, A., Nightingale, L., & Lambert, K. (2001). Alterations of medial preoptic area neurons following pregnancy and pregnancy-like steroidal treatment in the rat. *Brain Research Bulletin*, *55*, 737-745.
- Kinsley, C., Trainera, R., Stafisso-Sandoza, G., Quadrosa, P., Marcusa, L., & Hearona, C. (2006). Motherhood and the hormones of pregnancy modify concentrations of hippocampal neuronal dendritic spines. *Hormones and Behavior*, *49*, 131-142.
- Kinsley, C. H., & Amory-Meyer, E. (2011). Why the maternal brain? *Journal of Neuroendocrinology*, *23*(11), 974-983.
- Kinsley, C. H., & Bridges, R. S. (1988). Parity-associated reductions in behavioral sensitivity to opiates. *Biology of reproduction*, *39*, 270-278.
- Kinsley, C. H., & Bridges, R. S. (1990). Morphine treatment and reproductive condition alter olfactory preferences for pup and adult male odors in female rats. *Developmental psychobiology*, *23*(4), 331-347.
- Kinsley, C. H., & Lambert, K. G. (2008). Reproduction-induced neuroplasticity: natural behavioural and neuronal alterations associated with the production and care of offspring. *J. Neuroendocrinol*, *20*, 515-525.
- Kinsley, C. H., Madonia, L., Gifford, G. W., Tureski, K., Griffin, G. R., Lowry, C., . . . Lambert, K. G. (1999). Motherhood improves learning and memory. *Nature* *402*, 137-138.
- Kochlamazashvili, G., Henneberger, C., Bukalo, O., Dvoretzkova, E., Senkov, O., Lievens, P. M., . . . Dityatev, A. (2010). The extracellular matrix molecule hyaluronic acid regulates hippocampal synaptic plasticity by modulating postsynaptic L-type Ca(2+) channels. *Neuron*, *67*(1), 116-128.
- Kristal, M. B., DiPirro, J. M., & Thompson, A. C. (2012). Placentophagia in humans and nonhuman mammals: causes and consequences. *Ecol Food Nutr*, *51*(3), 177-197.
- Lau, L. W., Cua, R., Keough, M. B., Haylock-Jacobs, S., & Yong, V. W. (2013). Pathophysiology of the brain extracellular matrix: a new target for remyelination. *Nature Reviews Neuroscience*, *14*(10), 722-729.
- Lee, A., Clancy, S., & Fleming, A. (1999). Mother rats bar-press for pups: effects of lesions of the mpoa and limbic sites on maternal behavior and operant responding for pup-reinforcement. *Behavioural brain research*, *108*(2), 215-231.
- Lee, A., Clancy, S., & Fleming, A. (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. *Behavioural Brain Research*, *108*(2), 215-231.

- Leon, M., & Moltz, H. (1971). Maternal Pheromone: Discrimination by Pre-Weanling Albino Rats. *Physiol Behav*, 7, 265-267.
- Leuner, B., Fredericks, P. J., Nealer, C., & Albin-Brooks, C. (2014). Chronic gestational stress leads to depressive-like behavior and compromises medial prefrontal cortex structure and function during the postpartum period. *PLoS One*, 9(3), e89912.
- Leuner, B., & Gould, E. (2010). Dendritic growth in medial prefrontal cortex and cognitive flexibility are enhanced during the postpartum period. *J Neurosci*, 30(40), 13499-13503.
- Leuner, B., Miresco, C., Noiman, L., & Gould, E. (2007). Maternal experience inhibits the production of immature neurons in the hippocampus during the postpartum period through elevations in adrenal steroids. *Hippocampus*, 17, 434-442.
- Levy, A. D., Omar, M. H., & Koleske, A. J. (2014). Extracellular matrix control of dendritic spine and synapse structure and plasticity in adulthood. *Front Neuroanat*, 8(116), 2014.
- Li, M., & Fleming, A. (2003). The nucleus accumbens shell is critical for normal expression of pup-retrieval in postpartum female rats. *Behavioural Brain Research*, 145(1-2), 99-111. doi: 10.1016/s0166-4328(03)00135-9
- Lin, F. G., Galindo-Leon, E. E., Ivanova, T. N., Mappus, R. C., & Liu, R. C. (2013). A role for maternal physiological state in preserving auditory cortical plasticity for salient infant calls. *Neuroscience*, 247, 102-116.
- Lonstein, J. (2007). Regulation of anxiety during the postpartum period. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 28(2-3), 115-141. doi: 10.1016/j.yfrne.2007.05.002
- Lonstein, J., Greco, B., De Vries, G., Stern, J., & Blaustein, J. (2000). Maternal behavior stimulates c-fos activity within estrogen receptor alpha-containing neurons in lactating rats. *Neuroendocrinology*, 72, 91-101.
- Lonstein, J., Pereira, M., Morrell, J., & Marler, C. (2014). Parenting Behavior. *In book: Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, Edition: 4*, 2371-2437.
- Lonstein, J., Wagner, C., & De Vries, G. (1999). Comparison of the "Nursing" and Other Parental Behaviors of Nulliparous and Lactating Female Rats. *Horm Behav*, 36, 242-251.
- Lonstein, J. S. (2005). Reduced anxiety in postpartum rats requires recent physical interactions with pups, but is independent of suckling and peripheral sources of hormones. *Horm. Behav*, 47(3), 241-255.
- Love, G., Torrey, N., McNamara, I., Morgan, M., Banks, M., Hester, N. W., . . . Lambert, K. G. (2005). Maternal experience produces long-lasting behavioral modifications in the rat. *Behav Neurosci*, 119(1084-96).
- Lovic, V., & Fleming, A. (2004). Artificially-reared female rats show reduced prepulse inhibition and deficits in the attentional set shifting task--reversal of effects with maternal-like licking stimulation. *Behav Brain Res*, 148(1-2), 209-219.
- Lovic, V., Gonzalez, A., & Fleming, A. S. (2001). Maternally separated rats show deficits in maternal care in adulthood. *Dev Psychobiol*, 39, 19-33.

- Macbeth, A. H., Scharfman, H. E., Maclusky, N. J., Gautreaux, C., & Luine, V. N. (2008). Effects of multiparity on recognition memory, monoaminergic neurotransmitters, and brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *Horm Behav*, *54*, 7-17.
- Magnusson, J. E., & Fleming, A. S. (1995). Rat pups are reinforcing to the maternal rat: role of sensory cues. *Psychobiology* *23*, 69-75.
- Maheu, M. E., Akbari, E. M., & Fleming, A. S. (2009). Callosal oligodendrocyte number in postpartum Sprague-Dawley rats. *Brain Res*, *1267*, 18-24.
- Matthews-Felton, T., Corodimas, K. P., Rosenblatt, J., & Morrell, J. (1995). Lateral habenula neurons are necessary for the hormonal onset of maternal behavior and for the display of postpartum estrus in naturally parturient female rats. *Behav Neurosci*, *109*(6), 1172-1188.
- Mattson, B., & Morrell, J. (2005). Preference for cocaine- versus pup-associated cues differentially activates neurons expressing either Fos or cocaine- and amphetamine-regulated transcript in lactating, maternal rodents. *Neuroscience*, *135*(2), 315-328.
- Mattson, B. J., Williams, S. E., Rosenblatt, J. S., & Morrell, J. (2003). Preferences for cocaine- or pup-associated chambers differentiates otherwise behaviorally identical postpartum maternal rats. *Psychopharmacology*, *167*(1), 1-8.
- Mattson, B. J., Williams, S. K., Rosenblatt, J., & Morrell, J. (2001). Comparison of two positive reinforcing stimuli: pups and cocaine throughout the postpartum period. *Behavioral Neuroscience*, *115*, 683-694.
- Mayer, A., Ahdieh, H., & Rosenblatt, J. (1990). Effects of prolonged estrogen-progesterone treatment and hypophysectomy on the stimulation of short-latency maternal behavior and aggression in female rats. *Hormones and Behavior*.
- McGee, A. W., Yang, Y., Fischer, Q. S., Daw, N. W., & Strittmatter, S. M. (2005). Experience-driven plasticity of visual cortex limited by myelin and Nogo receptor. *Science*, *309*(5744), 2222-2226.
- Meurisse, A., Gonzalez, A., Delsol, G., Caba, M., Levy, F., & Poindron, P. (2005). Estradiol receptor-expression in hypothalamic and limbic regions of ewes is influenced by physiological state and maternal experience. *Hormones and behavior*, *48*, 34-43.
- Miller, S., & Lonstein, J. (2005). Dopamine D1 and D2 Receptor Antagonism in the Preoptic Area Produces Different Effects on Maternal Behavior in Lactating Rats. *Behavioral Neuroscience*, *119*(4), 1072-1083.
- Mitra, S. W., Hoskin, E., Yudkovitz, J., Pear, L., Wilkinson, H. A., Hayashi, S., . . . Schaeffer, J. M. (2003). Immunolocalization of estrogen receptor beta in the mouse brain: comparison with estrogen receptor alpha. *Endocrinology*, *144*, 2055-2067.
- Miyata, S., & Kitagawa, H. (2017). Formation and remodeling of the brain extracellular matrix in neural plasticity: roles of chondroitin sulfate and hyaluronan. *BBA - General Subjects*, *861*(10), 2420-2434.
- Moltz, H., Levin, R., & Leon, M. (1969). Differential effects of progesterone on the maternal behavior of primiparous and multiparous rats. *Physiological Psychology*, *67*(1), 36-40.

- Moltz, H., & Wiener, E. (1966). Effects of ovariectomy on maternal behavior of primiparous and multiparous rats *J. of Comparative and Physiological Psychology*, *62*(3), 382-387.
- Montes, G., & Luque, E. (1988). Effects of Ovarian Steroids on Vaginal Smears in the Rat.
- Murphy, D. D., & Segal, M. (1996). Regulation of dendritic spine density in cultured rat hippocampal neurons by steroid hormones. *J Neurosci*, *16*, 4059-4068.
- Murphy, D. D., & Segal, M. (2000). Progesterone Prevents Estradiol-Induced Dendritic Spine Formation in Cultured Hippocampal Neurons. *Neuroendocrinology*, *72*, 133-143.
- Nakamura, M., Nakano, K., Morita, S., Nakashima, T., Oohira, A., & Miyata, S. (2009). Expression of chondroitin sulfate proteoglycans in barrel field of mouse and rat somatosensory cortex. *Brain Res*, *3*(1252), 117-129.
- Numan, M. (1974). Medial preoptic area and maternal behavior in the female rat. *Journal of Comparative Psysiological Psychology*, *87*(4), 746-759.
- Numan, M. (1994). A neural circuitry analysis of maternal behavior in the rat. *Acta Paediatr Suppl*, *397*, 19-28.
- Numan, M. (2006). Hypothalamic neural circuits regulating maternal responsiveness toward infants. *Behavioral and Cognitive Neuroscience Reviews*, *5*(4), 163-190. doi: 10.1177/1534582306288790
- Numan, M. (2012). Maternal behavior: neural circuits, stimulus valence, and motivational processes. *Parent., Sci. Pract.*, *12*, 105–114.
- Numan, M., & Callahan, E. C. (1980). The connections of the medial preoptic region and maternal behavior in the rat. *Physiol. Behav*, *25*, 653–665.
- Numan, M., Corodimas, K. P., & Numan, M. J. (1988). Axon-sparing lesions of the preoptic region and substantia innominata disrupt maternal behavior in rats. *Behav Neurosci*, *102*, 381-396.
- Numan, M., Corodimas, K. P., Numan, M. J., Factor, E. M., & Piers, W. D. (1988). Axon-sparing lesions of the preoptic region and substantia innominata disrupt maternal behavior in rats. *Behav. Neurosci*, *102*, 381–396.
- Numan, M., & Insel, T. (2003). The neurobiology of parental behavior. *The neurobiology of parental behavior*. Springer-Verlag, New York, 69-106.
- Numan, M., Marzella, S., & Palumbo, A. (1998). Expression of c-fos, fos B, and egr-1 in the medial preoptic area and bed nucleus of the stria terminalis during maternal behavior in rats. *Brain Research*, *792*, 348-352.
- Numan, M., Numan, M., Pliakou, N., Stolzenberg, D., Mullins, O., Murphy, J., & Smith, C. (2005b). The effects of D1 or D2 dopamine receptor antagonism in the medial preoptic area, ventral pallidum, or nucleus accumbens on the maternal retrieval response and other aspects of maternal behavior in rats. *Behavioral Neuroscience*, *119*(6), 1588-1604.

- Numan, M., Numan, M., Schwarz, J., Neuner, C., Flood, T., & Smith, C. (2005). Medial preoptic area interactions with the nucleus accumbens-ventral pallidum circuit and maternal behavior in rats. *Behavioural Brain Research*, *158*(1), 53-68. doi: 10.1016/j.bbr.2004.08.008
- Numan, M., Numan, M., Schwarz, J., Neuner, C., Flood, T., & Smith, C. (2005a). Medial preoptic area interactions with the nucleus accumbens-ventral pallidum circuit and maternal behavior in rats. *Behavioural brain research*, *158*(1), 53-68. doi: 10.1016/j.bbr.2004.08.008
- Numan, M., & Numan, M. J. (1995). Importance of pup-related sensory inputs and maternal performance for the expression of Fos-like immunoreactivity in the preoptic area and ventral bed nucleus of the stria terminalis of postpartum rats. *Behavioral Neuroscience*, *109*(1), 135-149.
- Numan, M., & Numan, M. J. (1997). Projection sites of medial preoptic area and ventral bed nucleus of the stria terminalis neurons that express Fos during maternal behavior in female rats. *Journal of neuroendocrinology*, *9*(5), 369-384.
- Numan, M., Rosenblatt, J., & Komisaruk, B. (1977). Medial preoptic area and onset of maternal behavior in the rat. *J Comp Physiol Psychol*, *91*(1), 146-164.
- Numan, M., & Smith, H. G. (1984). Maternal behavior in rats: evidence for the involvement of preoptic projections to the ventral tegmental area. *Behavioral Neuroscience*, *98*, 712-727.
- Numan, M., & Stolzenberg, D. (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*(1), 46-64. doi: 10.1016/j.yfrne.2008.10.002
- Numan, M., Stolzenberg, D., Dellevegne, A. A., Correnti, C. M., & Numan, M. J. (2009). Temporary inactivation of ventral tegmental area neurons with either muscimol or baclofen reversibly disrupts maternal behavior in rats through different underlying mechanisms. *Behavioral Neuroscience*, *123*(4), 740-751.
- Olazábal, D., Pereira, M., Agrati, D., Ferreira, A., Fleming, A., González-Mariscal, G., . . . Uriarte, N. (2013a). New theoretical and experimental approaches on maternal motivation in mammals. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *37*(8), 1860-1874. doi: 10.1016/j.neubiorev.2013.04.003
- Olazábal, D., Pereira, M., Agrati, D., Ferreira, A., Fleming, A., González-Mariscal, G., . . . Uriarte, N. (2013b). Flexibility and adaptation of the neural substrate that supports maternal behavior in mammals. *Neuroscience Biobehavioral Reviews*, *37*, 1875-1892.
- Orlando, C., Ster, J., Gerber, U., Fawcett, J. W., & Raineteau, O. (2012). Perisynaptic chondroitin sulfate proteoglycans restrict structural plasticity in an integrin-dependent manner. *Journal of Neuroscience*, *32*, 18009-18017.
- Orpen, B., Furman, N., Wong, P., & Fleming, A. (1987). Hormonal influences on the duration of postpartum maternal responsiveness in the rat. *Physiology & Behavior*, *40*(3), 307-315.

- Parent, C., Wen, X., Dhir, S. K., Ryan, R., Diorio, J., & Zhang, T. Y. (2017). Maternal care associates with differences in morphological complexity in the medial preoptic area. *Behavioral Brain Research*, *326*, 22-32.
- Paris, J. J., & Frye, C. A. (2008). Estrous cycle, pregnancy, and parity enhance performance of rats in object recognition or object placement tasks. *Reproduction*, *136*, 105-115.
- Pascual-Leone, A., Amedi, A., Fregni, F., & Merabet, L. B. (2005). The plastic human brain cortex. *Ann Rev Neurosci*, *28*, 377-401.
- Pawluski, J., Lambert, K., & Kinsley, C. (2016). Neuroplasticity in the maternal hippocampus: Relation to cognition and effects of repeated stress. *Hormones and Behavior*, *77*, 86-97.
- Pawluski, J. L., Walker, S. K., & Galea, L. A. (2006). Reproductive experience differentially affects spatial reference and working memory performance in the mother. *Horm Behav*, *49*, 143-149.
- Paxinos, G., & Watson, C. (1997). The rat brain in stereotaxic coordinates. *3rd ed.* New York: Academic Press.
- Pedersen, C. A., Caldwell, J. D., Walker, C., Ayers, G., & Mason, G. A. (1994). Oxytocin activates the postpartum onset of rat maternal behavior in the ventral tegmental and medial preoptic areas. *Behav Neurosci*, *108*(6), 1163-1171.
- Pepe, G. J., & Rothchild, I. (1974). A Comparative Study of Serum Progesterone Levels in Pregnancy and in Various Types of Pseudopregnancy in the Rat. *Endocrine Society*, *95*(1), 275-279.
- Pereira de Vasconcelos, A., Klur, S., Muller, C., Cosquer, B., Lopez, J., Certa, U., & Cassel, J. C. (2006). Reversible inactivation of the dorsal hippocampus by tetrodotoxin or lidocaine: a comparative study on cerebral functional activity and motor coordination in the rat. *Neuroscience*, *141*, 1649-1663.
- Pereira, M. (2016). Structural and functional plasticity in the maternal brain circuitry. In H. J. V. Rutherford & L. C. Mayes (Eds.), *Maternal brain plasticity: Preclinical and human research and implications for intervention*. *New Directions for Child and Adolescent Development*, *153*, 23-46.
- Pereira, M., & Ferreira, A. (2006). Demanding pups improve maternal behavioral impairments in sensitized and haloperidol-treated lactating female rats. *Behavioural Brain Research*, *175*(1), 139-148. doi: 10.1016/j.bbr.2006.08.013
- Pereira, M., & Ferreira, A. (2015). Neuroanatomical and neurochemical basis of parenting: Dynamic coordination of motivational, affective and cognitive processes. *Hormones and Behavior*, *77*, 72-85.
- Pereira, M., & Morrell, J. (2009). The changing role of the medial preoptic area in the regulation of maternal behavior across the postpartum period: facilitation followed by inhibition. *Behavioural Brain Research*, *205*(1), 238-248. doi: 10.1016/j.bbr.2009.06.026

- Pereira, M., & Morrell, J. (2010). The medial preoptic area is necessary for motivated choice of pup- over cocaine-associated environments by early postpartum rats. *Neuroscience*, *167*(2), 216-231. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.02.015
- Pereira, M., & Morrell, J. (2011). Functional mapping of the neural circuitry of rat maternal motivation: effects of site-specific transient neural inactivation. *Journal of Neuroendocrinology*, *23*(11), 1020-1035. doi: 10.1111/j.1365-2826.2011.02200.x
- Pereira, M., & Morrell, J. (2011). Functional mapping of the neural circuitry of rat maternal motivation: effects of site-specific transient neural inactivation. *J Neuroendocrinol*, *23*(11), 1020-1035.
- Pereira, M., Seip, K., & Morrell, J. (2008). Maternal motivation and its neural substrate across the postpartum period. *Neurobiology of the Parental Brain*, 39-59.
- Perrin, G., Meurisse, M., & Lévy, F. (2007). Inactivation of the medial preoptic area or the bed nucleus of the stria terminalis differentially disrupts maternal behavior in sheep. *Hormones and Behavior* *52*, 461-473.
- Petrovich, G. D., Canteras, N. S., & Swanson, L. W. (2001). Combinatorial amygdalar inputs to hippocampal domains and hypothalamic behavior systems. *Brain Research Reviews*, *38*, 247-289.
- Ragozzino, M. E., Detrick, S., & Kesner, R. P. (1999). Involvement of the prelimbic-infralimbic areas of the rodent prefrontal cortex in behavioral flexibility for place and response learning. *Journal of Neuroscience*, *19*(11), 4585-4594.
- Rainbow, T. C., Parsons, B., MacLusky, N. J., & McEwen, B. S. (1982). Estradiol receptor levels in rat hypothalamic and limbic nuclei. *J. Neurosci.*, *2*, 1439-1445.
- Reisbick, S., Rosenblatt, J., & Mayer, A. (1975). Decline of maternal behavior in the virgin and lactating rat. *J Comp Physiol Psychol*, *89*, 722-732.
- Rich, E. L., & Shapiro, M. (2009). Rat prefrontal cortical neurons selectively code strategy switches. *Journal of Neuroscience* *29*(22), 7208-7219.
- Robinson, D. L., Zitzman, D. L., & Williams, S. K. (2011). Mesolimbic dopamine transients in motivated behaviors: focus on maternal behavior. *Front. Psychiatry*, *2*, 23.
- Romanides, A. J., Duffy, P., & Kalivas, P. W. (1999). Glutamatergic and dopaminergic afferents to the prefrontal cortex regulate spatial working memory in rats. *Neuroscience*, *92*(1), 97-106.
- Romberg, C., Yang, S., Melani, R., Andrew, M. R., Horner, A. E., & Spillantini, M. G. (2013). Depletion of perineuronal nets enhances recognition memory and long-term depression in the perirhinal cortex. *Neuroscience*, *33*(7057-7065).
- Rosenblatt, J. (1969). The development of maternal responsiveness in the rat. *The American Journal of Orthopsychiatry*, *39*(1), 36-56.
- Rosenblatt, J. (1975). Prepartum and postpartum regulation of maternal behaviour in the rat. *Ciba Foundation Symposium*, *33*, 17-37.

- Rosenblatt, J. S. (1967). Nonhormonal basis of maternal behavior in the rat. *Science*, *156*, 1512-1514.
- Rosenblatt, J. S., Mayer, A. D., & Giordano, A. L. (1988). Hormonal basis during pregnancy for the onset of maternal behavior in the rat. *Psychoneuroendocrinology*, *13*, 29-46.
- Sakamoto, H., Ukenaa, K., & Tsutsui, K. (2002). Dendritic spine formation in response to progesterone synthesized de novo in the developing Purkinje cell in rats. *Neuroscience Letters*, *322*, 111-115.
- Salamone, J., & Correa, M. (2002). Motivational views of reinforcement: implications for understanding the behavioral functions of nucleus accumbens dopamine. *Behavioural Brain Research*.
- Salamone, J., & Correa, M. (2012). The mysterious motivational functions of mesolimbic dopamine. *Neuron*, *76*(3), 470-485. doi: 10.1016/j.neuron.2012.10.021
- Sandkühler, J., Maisch, B., & Zimmermann, M. (1987). The use of local anaesthetic microinjections to identify central pathways: a quantitative evaluation of the time course and extent of the neuronal block. *Experimental Brain Research*, *68*, 168-178.
- Savoy-Moore, R., Schwartz, N. A., Duncan, J. A., & Marshall, J. C. (1980). Pituitary gonadotropin-releasing hormone receptors during the rat estrous cycle. *Science*, *209*, 294-944.
- Schwartz, E., & Rowe, F. A. (1976). Olfactory bulbectomy: influences on maternal behavior in primiparous and multiparous rats. *Physiol. Behav.*, *17*(6), 879-883.
- Seeger, G., Lüth, H. J., Winkelmann, E., & Brauer, K. (1996). Distribution patterns of Wisteria floribunda agglutinin binding sites and parvalbumin-immunoreactive neurons in the human visual cortex: a double-labelling study. *J Hirnforsch*, *37*(3), 351-366.
- Seip, K., & Morrell, J. (2007). Increasing the incentive salience of cocaine challenges preference for pup- over cocaine-associated stimuli during early postpartum: place preference and locomotor analyses in the lactating female rat. *Psychopharmacology*, *194*, 309-319.
- Seip, K., & Morrell, J. (2009). Transient inactivation of the ventral tegmental area selectively disrupts the expression of conditioned place preference for pup- but not cocaine-paired contexts. *Behavioral neuroscience*, *123*(6), 1325-1338. doi: 10.1037/a0017666
- Seip, K., Pereira, M., Wansaw, M. P., Reiss, J. I., Dziopa, E., & Morrell, J. (2008). Incentive salience of cocaine across the postpartum period of the female rat. *Psychopharmacology*, *199*(1), 119-130.
- Shnitko, T. A., Mace, K. D., Sullivan, K. M., Martin, W. K., Andersen, E. H., Williams Avram, S. K., . . . Robinson, D. L. (2017). Use of fast-scan cyclic voltammetry to assess phasic dopamine release in rat models of early postpartum maternal behavior and neglect. *Behav. Pharmacol*, *28*, 648-660.
- Shughrue, P. J., Lane, M. V., & Merchenthaler, I. (1997). Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.*, *388*, 507-525.

- Siegel, H. I., & Rosenblatt, J. (1975). Hormonal Basis of Hysterectomy-Induced Maternal Behavior during Pregnancy in the Rat. *Hormones and behavior*, 6, 211-222.
- Simerly, R., & Swanson, L. (1988). Projections of the medial preoptic nucleus: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin anterograde tract-tracing study in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 270(2), 209-242.
- Simerly, R. B., Gorski, R. A., & Swanson, L. W. (1986). Neurotransmitter specificity of cells and fibers in the medial preoptic nucleus: an immunohistochemical study in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 246, 343-363.
- Slaker, M., Churchill, L., Todd, R. P., Blacktop, J. M., Zuloaga, D. G., & Raber, J. (2015). Removal of perineuronal nets in the medial prefrontal cortex impairs the acquisition and reconsolidation of a cocaine-induced conditioned place preference memory. *J Neurosci*, 35, 4190-4202.
- Smith, M. S., & Neill, J. D. (1977). Inhibition of gonadotropin secretion during lactation in the rat: relative contribution of suckling and ovarian steroids. *Biological Reproduction*, 17(2), 255-261.
- Smotherman, W. (2004). Mother-infant interaction and the modulation of pituitary-adrenal activity in rat pups after early stimulation. *Developmental Psychobiology*, 16(3), 169-176.
- Stack, E., Balakrishnan, R., Numan, M. J., & Numan, M. (2002). A functional neuroanatomical investigation of the role of the medial preoptic area in neural circuits regulating maternal behavior. *Behavioural Brain Research*, 131(1-2), 17-36.
- Stern, J., & Keer, S. (1999). Maternal motivation of lactating rats is disrupted by low dosages of haloperidol. *Behavioural Brain Research*, 99(2), 231-239.
- Stern, J. M., & McDonald, C. (1989). Ovarian hormone-induced short-latency maternal behavior in ovariectomized virgin Long Evans rats. *Horm. Behav*, 23, 157-172.
- Stolzenberg, D., & Champagne, F. (2016). Hormonal and non-hormonal bases of maternal behavior: the role of experience and epigenetic mechanisms. *Hormones and behavior*, 77, 204-210.
- Stolzenberg, D., & Numan, M. (2011). Hypothalamic interaction with the mesolimbic DA system in the control of the maternal and sexual behaviors in rats. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 35, 826-847.
- Stolzenberg, D., Stevens, J. S., & Rissmans, E. F. (2014). Histone deacetylase inhibition induces long-lasting changes in maternal behavior and gene expression in female mice. *Endocrinology*, 155(9), 3674-3683.
- Stolzenberg, D. S., McKenna, J. B., Keough, S., Hancock, R., Numan, M. J., & Numan, M. (2007). Dopamine D1 receptor stimulation of the nucleus accumbens or the medial preoptic area promotes the onset of maternal behavior in pregnancy-terminated rats. *Behav Neurosci.*, 121(5), 907-919.
- Taya, K., & Greenwald, G. S. (1982). Peripheral blood and ovarian levels of sex steroids in the lactating rat. *Endocrinologia Japonica*, 29(4), 453-459.

- Taya, K., & Greenwald, G. S. (1983). Peripheral blood and ovarian levels of sex steroids in the lactating rat. *Endocrinol Jpn.*, 29(4), 453-459.
- Terkel, J., Bridges, R., & Sawyer, C. (1979). Effects of transecting lateral neural connections of the medial preoptic area on maternal behavior in the rat: nest building, pup retrieval and prolactin secretion. *Brain Research*, 169(2), 369-380.
- Terkel, J., & Rosenblatt, J. (1971). Aspects of nonhormonal maternal behavior in the rat. *Hormones and behavior*, 2(2), 161-171.
- Testa, D., Prochiantz, A., & Di Nardo, A. A. (2018). Perineuronal nets in brain physiology and disease. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2018.09.011>.
- Tomogane, H., Ota, K., & Yokoyama, A. (1969). Progesterone and 20-alpha-hydroxypregn-4-en-3-one levels in ovarian vein blood of the rat throughout lactation. *Journal of Endocrinology*, 44(1), 101-106.
- Tsuneoka, Y., Maruyama, T., Yoshida, S., Nishimori, K., Kato, T., Numan, M., & Kuroda, K. O. (2013). Functional, anatomical, and neurochemical differentiation of medial preoptic area subregions in relation to maternal behavior in the mouse. *J. Comp. Neurol.*, 521, 1633-1663.
- Tsuneoka, Y., Yoshida, S., Takase, K., Oda, S., Kuroda, M., & Funato, H. (2017). Neurotransmitters and neuropeptides in gonadal steroid receptor-expressing cells in medial preoptic area subregions of the male mouse. *Sci Rep*, 7, 9809.
- Uriarte, N., Fernández, M. V., Agrati, D., Zuluaga, M. J., Ferreño, M., & Ferreira, A. (2014). Maternal and affective behaviors of lactating rats reared in overlapping litters. *Journal of Physiology Paris*, 108(2-3), 221-230.
- Uriarte, N., Ferreira, A., Rosa, X., & Lucion, A. (2009). Effects of litter-overlapping on emotionality, stress response, and reproductive functions in male and female rats. *Developmental Psychobiology*, 51(3), 259-267. doi: 10.1002/dev.20360
- Uriarte, N., Ferreira, A., Rosa, X., Sebben, V., & Lucion, A. (2008). Overlapping litters in rats: effects on maternal behavior and offspring emotionality. *Physiology & Behavior*, 93(4-5), 1061-1070. doi: 10.1016/j.physbeh.2008.02.004
- Wang, D., & Fawcett, J. (2012). The perineuronal net and the control of CNS plasticity. *Cell Tissue Res*, 349, 147-160.
- Wansaw, M. P., Pereira, M., & Morrell, J. (2008). Characterization of maternal motivation in the lactating rat: Contrasts between early and late postpartum responses. *Hormones and Behavior*, 54, 294-301.
- Wilsoncroft, W. (1969). Babies by bar-press: Maternal behavior in the rat. *Behav Res Meth & Intru*, 1(6), 229-230.
- Wise, R. (2004). Dopamine, learning and motivation. *Nature reviews. Neuroscience*, 5(6), 483-494. doi: 10.1038/nrn1406

- Woolley, C., & McEwen, B. S. (1993). Roles of Estradiol and Progesterone in Regulation of Hippocampal Dendritic Spine Density During the Estrous Cycle in the Rat *The Journal of Comparative Neurology*, 336, 293-306.
- Wu, Z., Autry, A. E., Bergan, J. F., Watabe-Uchida, M., & Dulac, C. G. (2014). Galanin neurons in the medial preoptic area govern parental behavior. *Nature*, 509(7500), 325-330.
- Xue, Y. X., Xue, L. F., Liu, J. F., He, J., Deng, J. H., & Sun, S. C. (2014). Depletion of perineuronal nets in the amygdala to enhance the erasure of drug memories. *J Neurosci*, 34(19), 6647-6658.
- Yoshinga, K., Hawkins, R., & Stocker, J. (1969). Estrogen secretion by the rat ovary in vivo during the estrous cycle and pregnancy. *Endocrinology*, 85, 103-112.
- Zhao, C., Saul, M. C., Driessen, T., & Gammie, S. (2012). Gene expression changes in the septum: Possible implications for microRNAs in sculpting the maternal brain. *. PloS one*, 7(6).