



Universidad de la República
Licenciatura en Biología Humana



Proyecto de Pasantía de Grado

**AGENTES DOPAMINÉRGICOS DURANTE LA LACTANCIA: EFECTOS SOBRE EL SUEÑO Y EL
AMAMANTAMIENTO**

Estudiante: Luciana Benedetto

Tutor: Annabel Ferreira

Orientador de Pasantía: Pablo Torterolo

Lugar de realización: Laboratorio de sueño, Depto. Fisiología, Facultad de Medicina, UdelaR.

Resumen

La existencia de trastornos psiquiátricos como la psicosis durante el período postparto hace vulnerable a la mujer, afectando su estado emocional, su vínculo con el recién nacido, y, en última instancia el desarrollo del hijo. El uso de agentes dopaminérgicos como fármacos antipsicóticos se continúa durante el período de lactancia. El principal efecto de estos fármacos es la inhibición de los receptores dopaminérgicos de tipo 2 (D2). Uno de los efectos secundarios de su uso clínico es la sedación y en forma paralela, alteraciones en el amamantamiento. Sin embargo, aún se desconocen las áreas del cerebro donde actúan estos fármacos para generar dichos efectos. De particular interés es el área preóptica media (mPOA), una región del cerebro que regula tanto el comportamiento maternal como el sueño. Dado que las áreas implicadas en el control del comportamiento maternal y del sueño, en particular el mPOA, se han conservado evolutivamente y están también presentes en la rata, en este trabajo utilizaremos dicho animal para explorar el efecto de fármacos dopaminérgicos en el área mencionada.

Desde el punto de vista del sueño, el mPOA ha sido clásicamente relacionado con el sueño NREM, mientras que en relación al comportamiento maternal, si bien todos los trabajos concuerdan con que regula los comportamientos maternales activos, como el acarreo de las crías, surgen ciertas discrepancias con su rol en el amamantamiento. En particular, hay un trabajo que muestra que el tratamiento local con Raclopride, un antagonista D2, en el mPOA promueve las posturas de amamantamiento sin modificar los componentes activos. Nuestra hipótesis inicial de trabajo es que estos efectos del Raclopride en el mPOA sobre el amamantamiento se deben a sus probables efectos sobre el sueño NREM. Sin embargo, al día de hoy no hay trabajos que muestren el efectos de agentes dopaminérgicos sobre el mPOA en el sueño. Con base en esta hipótesis nos propusimos como objetivo determinar los efectos de antagonistas dopaminérgicos D2 intra-mPOA sobre el sueño y el amamantamiento. Para cumplir dicho objetivo, realizamos en ratas madres, previamente implantadas para el registro crónico del ciclo sueño-vigilia, el registro simultáneo de sueño y del comportamiento maternal luego de la microinyección de Raclopride (un antagonista D2) o su vehículo en el mPOA.

Contrariamente a nuestras expectativas, los resultados muestran que mientras que el sueño NREM no se vio afectado, el sueño REM y su etapa transicional desde el sueño NREM se vieron significativamente disminuidos luego del tratamiento con Raclopride. Asimismo, encontramos que a las madres tratadas con Raclopride les llevó más tiempo reunir a toda la camada e iniciaron antes las posturas de amamantamiento en comparación con el grupo control. Si bien los presentes resultados tienden a rechazar nuestra hipótesis inicial, ya que el inicio temprano en el amamantamiento no se acompañó por un inicio temprano al sueño NREM, deberíamos realizar más experimentos donde los cambios en el amamantamiento sean mayores. A su vez, nuestro datos son la primera evidencia de cómo el sistema dopaminérgico modula el sueño actuando sobre el mPOA. Dado que la mayoría de los tratamientos con distintos fármacos en el mPOA modulan el sueño NREM, los presentes resultados podrían sugerir que las proyecciones dopaminérgicas en esta área serían claves en la transición del sueño NREM al sueño REM.

1. Antecedentes y fundamentación

1.1. El sueño y la vigilia

La vida entera de un individuo se desarrolla entre los estados de sueño y vigilia, siendo el ciclo sueño-vigilia el ritmo biológico circadiano más evidente en aves y mamíferos. El sueño se puede definir como un estado rápidamente reversible durante el cual la interacción con el medio se encuentra disminuida. Se pueden distinguir dos estados comportamentales de sueño: el no-REM (NREM) y el REM (Carskadon, 2005). Una de las principales funciones del sueño, y en particular del sueño NREM, es la conservación y restauración de la energía (Benington and Heller, 1995).

1.2. Lactancia

A pesar de las diferencias que existen en el comportamiento maternal entre distintas especies de mamíferos, el amamantamiento o *nursing* es el comportamiento que, no solo nos define como mamíferos, sino que también es el comportamiento maternal más conservado evolutivamente (Stern, 1989). Además de proveer nutrición y asegurar el crecimiento de las crías, este comportamiento también les brinda soporte afectivo (Bell et al., 1974; Bowlby, 1958; Harlow, 1967) La ausencia del contacto con la madre genera alteraciones fisiológicas y psicológicas en el desarrollo de las crías, a pesar de tener todas las necesidades nutricionales cubiertas (Chatterjee et al., 2007; Faturi et al., 2010).

1.3. Sueño durante el período postparto

Desde el punto de vista metabólico, el período postparto es una etapa de alta demanda energética, debido tanto al amamantamiento como a la atención y cuidados que requieren las crías (Thornburg et al., 2006; Zhao et al., 2010).

En algunas especies, la privación y la fragmentación de sueño son algunas de las consecuencias de las primeras etapas de la maternidad (Hunter et al., 2009; Lyamin et al., 2007). En el caso de la madre humana existe una privación parcial de sueño y, principalmente, también una fragmentación del sueño que se acompaña de un sueño más profundo que compensaría, al menos parcialmente, dicha privación (Montgomery-Downs et al., 2010; Nishihara et al., 2004). En madres humanas se ha observado que la privación y fragmentación de sueño aumentan la irritabilidad de la madre que puede distorsionar el cuidado del bebé y conducir a posibles trastornos psiquiátricos (Lee, 1998; Sharma and Mazmanian, 2003).

En el caso de la rata, existe un trabajo que muestra que la madre no estaría privada de sueño durante el postparto tardío (Voloschin 1979) mientras que otro estudio evidencia que si estaría privada de sueño durante el día a lo largo del postparto (Sivadas et al., 2016). Particularmente, en nuestro laboratorio logramos determinar que la rata madre es capaz de amamantar y dormir a la vez, principalmente en sueño NREM durante las posturas más típicas de amamantamiento (Benedetto et al., en prep.). A pesar que esto, este sueño NREM que presenta la rata madre mientras amamanta es muy fragmentado en comparación a cuando no está en contacto con las crías (Benedetto et al., en prep.). En este sentido, Sivadas y col. (2016) describieron

que, al igual que en la madre humana, la rata madre tiene el sueño fragmentado en comparación con ratas no madres.

1.4. Área preóptica media como centro regulador del sueño y la lactancia

El área preóptica (POA), es un área heterogénea considerada integradora de diversos comportamientos y variables fisiológicas cruciales para la supervivencia del individuo, como el balance hidroelectrolítico (Gvilia et al., 2005), el control de la temperatura (Parmeggiani, 2003; Parmeggiani et al., 1986; Parmeggiani et al., 1987), el comportamiento sexual (Graham and Pfaus, 2012; Paredes and Agmo, 1992), y, de particular interés para el presente proyecto, también está implicada en el control del comportamiento maternal (Numan, 1974; Numan, 1990; Numan, 1994; Numan and Insel, 2003) y del sueño (Benedetto et al., 2012; Benedetto et al., 2013; Szymusiak et al., 1998; Torterolo et al., 2009). En particular, el área preóptica media (mPOA), ubicada en la parte anterior del hipotálamo, tiene un papel fundamental en el control de estos dos comportamientos (Kumar et al., 2011; Pereira and Morrell, 2009; Srividya et al., 2007). De manera interesante, varios de estos comportamientos pueden coexistir simultáneamente, como el comportamiento maternal y el sexual en el estro postparto (Agrati et al., 2011) o pueden estar asociados, como el sueño NREM y la eyección de leche en la rata (Voloschin and Tramezzani, 1979). Si bien hemos logrado determinar que el sueño y el amamantamiento están asociados desde el punto de vista comportamental (Benedetto et al., en prep.), aún no se ha descrito si existe una regulación simultánea por parte del mPOA.

Área preóptica media y sueño

El POA es de las pocas áreas del cerebro donde la actividad de algunos grupos neuronales se incrementa durante el sueño NREM, hecho constatado en diversas especies como conejos, gatos y ratas (Alam et al., 1997; Alam et al., 1995; Eguchi and Satoh, 1980; Findlay and Hayward, 1969; Gvilia et al., 2005; Kaitin, 1984; Koyama and Hayaishi, 1994a; Koyama and Hayaishi, 1994b; Krilowicz et al., 1994; Sherin et al., 1996; Suntsova et al., 2002; Torterolo et al., 2009). Además, lesiones eléctricas específicas del mPOA producen un disturbio severo y persistente del sueño (McGinty and Serman, 1968). La importancia de las neuronas del mPOA en el sueño, y no la de las fibras de pasaje, ha sido confirmada mediante lesiones con ácido iboténico (que destruye los cuerpos neuronales, conservando indemnes los axones). Dichas lesiones causan severo insomnio (Sallanon et al., 1989; Sallanon et al., 1986; Szymusiak et al., 1991). A su vez, la microinyección local en el mPOA de diversas sustancias y neuropéptidos como el glutamato (Kaushik et al., 2011), triazolam (Mendelson and Martin, 1992; Mendelson et al., 1989), pentobarbital (Mendelson, 1996) y adenosine (Mendelson, 2000) promueven el sueño NREM. Asimismo, la actividad neuronal de esta área se incrementa durante el sueño NREM, observado tanto con la proteína Fos (Gong et al., 2004; Lu et al., 2000; Sherin et al., 1996; Torterolo et al., 2009), como con registros de unidades (Koyama and Hayaishi, 1994a).

Área preóptica media y amamantamiento

Si bien hay consenso sobre que el mPOA cumple un rol fundamental en la regulación del comportamiento maternal activo (como los lamidos y acarreos), existen discrepancias respecto a su función en la regulación del

amamantamiento. Diversos trabajos muestran que lesiones del mPOA afectan tanto los componentes activos así como también el amamantamiento (Numan and Stolzenberg, 2008), mientras que otros evidencian que solo se ve afectado el comportamiento maternal activo (Numan and Callahan, 1980; Numan and Stolzenberg, 2008; Stern and Lonstein, 2001; Terkel et al., 1979). En este sentido, Stern y Lonstein (2001) postulan que muchos de los trabajos que reportan alteraciones en el amamantamiento luego de lesiones en el mPOA se deben a fallas metodológicas, de forma tal que si el comportamiento activo se ve alterado y la hembra no reúne a las crías, inevitablemente se verá afectado el amamantamiento por falta de contacto con las crías. Asimismo, Miller y Lonstein (2005) plantean, por ejemplo, que la acción facilitadora de las posturas de amamantamiento de algunos agentes dopaminérgicos (DAérgicos) sobre el mPOA podría deberse a la modulación de otros procesos fisiológicos controlados por el mPOA. De hecho, existen trabajos que muestran que la ablación de los pezones (telectomía) no modifica la actividad de las neuronas del mPOA, utilizando la proteína Fos como índice de actividad neuronal (Numan and Numan, 1995; Walsh et al., 1996).

1.5. Regulación dopaminérgica durante el período de lactancia y sus efectos en el sueño

Conceptos generales de la dopamina

La dopamina es un neurotransmisor involucrado en diversos comportamientos y procesos fisiológicos incluidos el comportamiento maternal y del ciclo sueño-vigilia (Le Moal, 1995; Monti et al., 1988; Stolzenberg and Numan, 2011).

Los grupos neuronales DAérgicos están localizados en el área tegmental ventral (VTA), la sustancia *nigra pars compacta* (SNc) y otras áreas como el área periventricular y el núcleo arcuato del hipotálamo (Freeman et al., 2000; Monti and Monti, 2007). En particular, el mPOA recibe aferencias dopaminérgicas provenientes principalmente del área periventricular del hipotálamo y también del VTA (Bjorklund et al., 1975; Day et al., 1980; Miller and Lonstein, 2005; Simerly and Swanson, 1986).

La dopamina ejerce sus efectos actuando sobre cinco subtipos de receptores, agrupados en dos grandes familias: de tipo 1 (excitatorios, incluye receptores D1 y D5) y los de tipo 2 (inhibitorios, incluye receptores D2-D4). El mPOA expresa ambas subfamilias de receptores, permitiendo responder a las entradas dopaminérgicas (Bakowska and Morrell, 1995).

Agentes dopaminérgicos

La proclividad al desarrollo de trastornos psiquiátricos, así como de recaídas, aumenta durante el período postparto. Para el tratamiento agudo y crónico de las psicosis postparto se requiere el uso de agentes DAérgicos como fármacos antipsicóticos (Babu et al., 2015; Gardner et al., 2005). Estos fármacos pueden afectar aspectos relacionados a la maternidad y al sueño, interfiriendo con el vínculo con el recién nacido y su desarrollo saludable (Klinger et al., 2013).

Los principales efectos de los fármacos antipsicóticos parecen deberse al bloqueo de los receptores D2 (Gardner et al., 2005; Girgenti et al., 2010). Aunque los efectos de agentes DAérgicos sobre el sueño han sido estudiados en distintas áreas del cerebro (Monti et al., 2016), curiosamente, no existen trabajos *in vivo* que muestren cual es el efecto de la dopamina sobre el POA.

El único antecedente es un estudio *in vitro* que mostró que el Modafinil, un fármaco que potencia la actividad DAérgica, incrementa la inhibición de las neuronas del POA inducida por la noradrenalina (Gallopín et al., 2004).

En forma paralela, la DA es crítica tanto para la motivación maternal por sus vías DAérgicas provenientes del VTA y sus conexiones con otras áreas cerebrales como el mPOA (Numan and Stolzenberg, 2008; Stolzenberg and Numan, 2011), como para el amamantamiento por la regulación de prolactina (Christian, 2007). En particular, los antagonistas selectivos D2, como el Raclopride, microinyectados en el mPOA inhiben únicamente el amamantamiento, sin afectar el comportamiento maternal activo (Miller and Lonstein, 2005). Sin embargo, los propios autores discuten si estos resultados se deben directamente a un aumento en el amamantamiento o si podrían ser consecuencia de la modulación de algún otro parámetro fisiológico regulado por el mPOA, como el sueño (Miller and Lonstein, 2005). Por tanto, es de particular interés poder determinar la acción de agentes DAérgicos a nivel del mPOA y sus efectos simultáneos en el sueño y en el comportamiento maternal.

2. Descripción del problema de investigación

A pesar de que el mPOA es un área clave en el control del sueño y el comportamiento maternal, su rol en el control del amamantamiento aún no es claro, existiendo resultados contradictorios. Al día de hoy no hay trabajos que investiguen ambos comportamientos en forma simultánea frente a alteraciones del mPOA. Igualmente, se desconoce si los agentes DAérgicos modulan el sueño actuando en el mPOA. Es nuestra hipótesis de trabajo que la microinyección de antagonistas D2 intra-mPOA promueve tanto el sueño NREM como las posturas de amamantamiento.

3. Objetivo

3.1. General

Determinar los efectos la administración intra-mPOA de un antagonista dopaminérgico D2 sobre sueño y el comportamiento maternal durante la lactancia de la rata madre.

3.2. Específicos

- Determinar los efectos de la microinyección intra-mPOA de un antagonista selectivo D2 en el sueño.
- Determinar los efectos de la microinyección intra-mPOA de un antagonista selectivo D2 en el comportamiento maternal.

4. Metodología

4.1. Instalaciones

Los experimentos se realizaron en el Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de la República (UdelaR).

4.2. Animales y alojamiento

Los protocolos experimentales fueron aprobados por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal de la UdelaR (n° de protocolo: 293) y realizados de acuerdo a la "Guía para el uso y cuidado de animales de laboratorio" (8va edición, National Academy Press, Washington D. C., 2011). Se realizó el mayor esfuerzo para minimizar el número de animales en cada estudio y se tomaron las medidas adecuadas para minimizar el dolor y/o el estrés de los animales durante la realización de los experimentos.

Para el presente estudio se utilizaron nueve ratas hembras primíparas de la cepa Wistar (250-280 g). Dos días previos al parto las hembras gestantes se alojaron en cajas individuales (40 x 30 x 20 cm), con papel toalla como material de construcción del nido. En el día 1 postparto (PPD1; día del parto = día 0) se unificó el número de crías a 8 por madre (cuatro machos y cuatro hembras).

4.3. Cirugía estereotáxica

En el PPD1 las hembras lactantes se anestesiaron con Ketamina/Xilacina/Acepromacina (80 mg/Kg, 2.8 mg/Kg, 2.0 mg/Kg respectivamente; i.p.). El procedimiento quirúrgico consistió en realizar una incisión antero-posterior por la línea media en la piel y el tejido subcutáneo que recubre el cráneo, dejando expuesta la calota. Con el fin de obtener una posición horizontal de la superficie del cráneo en el aparato estereotáxico, la barra de incisivos fue ajustada en cada animal para obtener la misma medida dorso-ventral de lambda y bregma (Paxinos and Watson, 2005). Una vez tomadas las medidas de bregma, se calcularon las coordenadas correspondientes para los sitios blancos. Posteriormente, se realizaron pequeñas perforaciones donde se implantaron electrodos previamente soldados en un extremo a tornillos y en el otro a un conector para el registro del electroencefalograma (EEG). Se implantaron 3 electrodos en áreas corticales: corteza prefrontal (AP = + 5.8; L = 1.5); corteza parietal posterior (AP = -4.0, L = 2.2); corteza visual primaria (AP = -7.0, L = 3.0) y a su vez un electrodo en el cerebelo como electrodo indiferente (AP = -11.0, L = 0.0) (Paxinos and Watson, 2005). Además, se colocaron dos electrodos en los músculos de la nuca para el registro de la actividad eléctrica muscular (EMG). Se implantaron adicionalmente cánulas guías bilaterales 2 mm sobre el mPOA (AP= -0.5 mm; DV= 6.5 mm; L= 0.5 mm) de acuerdo a (Paxinos and Watson, 2005). Finalmente, todos los electrodos y el conector (y si corresponde las cánulas guías) se fijaron al cráneo con cemento acrílico.

Durante los 40-60 minutos de duración de la cirugía, las crías permanecieron en la caja materna bajo una lámpara para mantener una temperatura adecuada. Inmediatamente luego de la cirugía, las madres regresaron a la caja materna junto a sus crías (Benedetto et al., 2014; Rivas et al., 2016).

Luego de la cirugía, las ratas madres y sus crías se alojaron en sus cajas dentro de una cámara a prueba de sonido, con el ciclo luz-oscuridad de 12/12 h (luces encendidas a las 6:00 AM), la temperatura (22 ± 1 °C) controlada, y con libre acceso a alimento y agua durante toda la serie experimental.

4.4. Diseño experimental

Los experimentos fueron realizados entre PPD4-8 durante la fase de luz. Previo al inicio de los experimentos, se realizó un registro control para corroborar que los parámetros de sueño y el comportamiento maternal fueran adecuados. Cada animal recibió 3 microinyecciones: vehículo, 5 µg de Raclopride ($RAC_{5\mu g}$) y 10 µg de Raclopride ($RAC_{10\mu g}$) en forma contrabalaceada. Luego de cada día de microinyección, se realizaron registros controles.

Al inicio de cada sesión experimental, las crías fueron separadas de sus madres por tres horas y colocadas bajo una lámpara para mantener su temperatura. Luego de dos horas y 45 minutos de la separación de las crías, las madres fueron microinyectadas (e inmediatamente después conectadas al sistema de registro en la propia caja materna). Transcurrido 15 minutos luego de la microinyección, se inició el registro polisomnográfico y de video durante cuatro horas y en forma paralela se colocaron las crías en la caja materna, en el área opuesta al nido. Si a los 300 segundos la hembra no acarrió todas las crías al nido, el experimentador colocó las crías en el nido (Stern and Taylor, 1991). El protocolo experimental fue similar al utilizado por Miller y col. (2005), complementándole el registro polisomnográfico.

Previo a la colocación de las crías en la caja materna y al finalizar cada sesión experimental, se pesó cada cría y el total de la camada como medida indirecta de la eyección láctea (Stern and Taylor, 1991).

Al finalizar cada sesión experimental el animal se desconectó del sistema de registro.

4.5. Infusión de drogas

Luego de retirado el mandril de las cánulas guía, se realizó una microinyección bilateral intra-mPOA de 200 nl del antagonista selectivo D2 Raclopride (0, 5 o 10 µg en cada lado; Sigma Chemical, St. Louis, MO) diluido en solución salina isotónica. Las microinyecciones fueron realizadas en un período de dos minutos con inyector conectados a microjeringas Hamilton (Hamilton Company, Reno, NV), con una tasa de infusión de 0.1 µl/min, utilizando una bomba de infusión (Harvard Apparatus Inc., Holliston, MA). Finalizada la microinyección, los inyector permanecieron un minuto adicional en el sitio de inyección y luego se colocó nuevamente el mandril.

Las dosis elegidas se basan en trabajos previos, ya que modifican el amamantamiento, sin alterar la locomoción (Miller and Lonstein, 2005; Moses et al., 1995).

4.6. Registro y análisis del ciclo sueño-vigilia

Los registros del EEG fueron monopolares (contra el electrodo indiferente) y el EMG bipolar. Las señales bioeléctricas obtenidas se amplificaron 1000 veces y filtraron (pasa bajos: 500 Hz; pasa altos: 10 Hz para el EMG y 1 Hz para el EEG). Estas señales se monitorizaron y almacenaron para

su posterior análisis en una PC utilizando el software Spike2, con una frecuencia de muestreo de 1024 Hz.

Los estados de vigilia, sueño NREM (LS y SWS), etapa transicional (IS) y sueño REM fueron diagnosticados en épocas de 5 segundos de duración, en las cuales se analizó cual era el estado predominante. Cada estado se estadificó en forma estándar (Benedetto et al., 2013), tomando en cuenta los siguientes parámetros bioeléctricos:

- Vigilia (W): Ondas de bajo voltaje y alta frecuencia en la corteza frontal, presencia o no de ritmo theta (5-8 Hz) en la corteza parietal y occipital, y alta actividad en el EMG.

- Sueño ligero (LS): ondas de alto voltaje interrumpidas por actividad electroencefalográfica de bajo voltaje y alta frecuencia con la amplitud reducida en el EMG.

- Sueño de ondas lentas o profundo (SWS): ondas de alto voltaje y baja frecuencia (0-4 Hz) constantes tanto en la corteza frontal como parietal, combinadas con husos de sueño (9-15 Hz) y EMG reducido en amplitud.

- Sueño NREM: LS + SWS.

- Etapa transicional (IS): ondas theta en la corteza occipital y husos de sueño en la corteza frontal (Gottesmann, 1992; Gottesmann, 1996).

- Sueño REM: ondas de bajo voltaje y alta frecuencia electroencefalográfica, presencia de ritmo theta en la corteza parietal y occipital sin actividad en el EMG.

El análisis de sueño y vigilia se realizará durante cuatro horas a partir de la colocación de las crías en la caja materna.

4.7. Registro y análisis del comportamiento maternal

La actividad de la madre se registró utilizando la cámara web acoplada al software de adquisición para el registro polisomnográfico.

Los comportamientos maternos que se analizaron fueron la latencia a la reunión a toda la camada (RTC), la latencia a la primera postura de amamantamiento (> 2 minutos) y el tiempo en posturas de amamantamiento. Los cambios en el amamantamiento fueron medidos en forma indirecta, estimando la transferencia de leche a las crías, calculando el porcentaje de aumento del peso total de la camada antes de colocarlas con la madre y al final de la sesión experimental (Miller and Lonstein, 2005; Stern and Lonstein, 2001; Stern and Taylor, 1991); esto evita mediciones invasivas en la madre que puedan generar estrés y alterar el sueño.

Los videos obtenidos se almacenaron y posteriormente se estadificaron en épocas de 5 segundos en función del comportamiento maternal predominante en cada época.

Se analizaron cuatro horas a partir de la colocación de las crías en la caja materna.

4.8. Análisis estadístico

Como los datos siguieron una distribución normal (test de Kolmogorov-Smirnov), estos se presentaron medias \pm error estándar (SEM) y las comparaciones entre los grupos se realizaron utilizando ANOVA de medidas repetidas seguido del test de Tukey como post hoc. El criterio para descartar la hipótesis nula fue $p < 0.05$ (Siegel, 1956).

4.9. Análisis histológico

Una vez sacrificados los animales con una sobredosis de anestesia, estos fueron perfundidos con 300 ml de solución salina heparinizada seguido por 300 ml de una solución de 4% paraformaldehído. Posteriormente, se extrajo el encéfalo y colocó en paraformaldehído al 4% por inmersión durante 24 horas a 4°C. A continuación el tejido se mantuvo por 48 horas en una solución de sacarosa al 30% a 4°C. A continuación, el encéfalo se congeló para luego realizar cortes coronales a 30 µm utilizando un vibrátomo. La detección del rastro de cánula de inyección, identificación del sitio de inyección y la toma de fotografías de las secciones coronales fueron realizadas bajo lupa (Benedetto et al., 2014; Benedetto et al., 2013; Devera et al., 2015; Rivas et al., 2016).

5. Resultados

5.1. Localización de la cánula

De los nueve animales utilizados, siete de ellos fueron incluidos en el presente trabajo (ver Figura 1) mientras que los restantes fueron descartados debido a que la localización de la cánula se encontró fuera del mPOA.

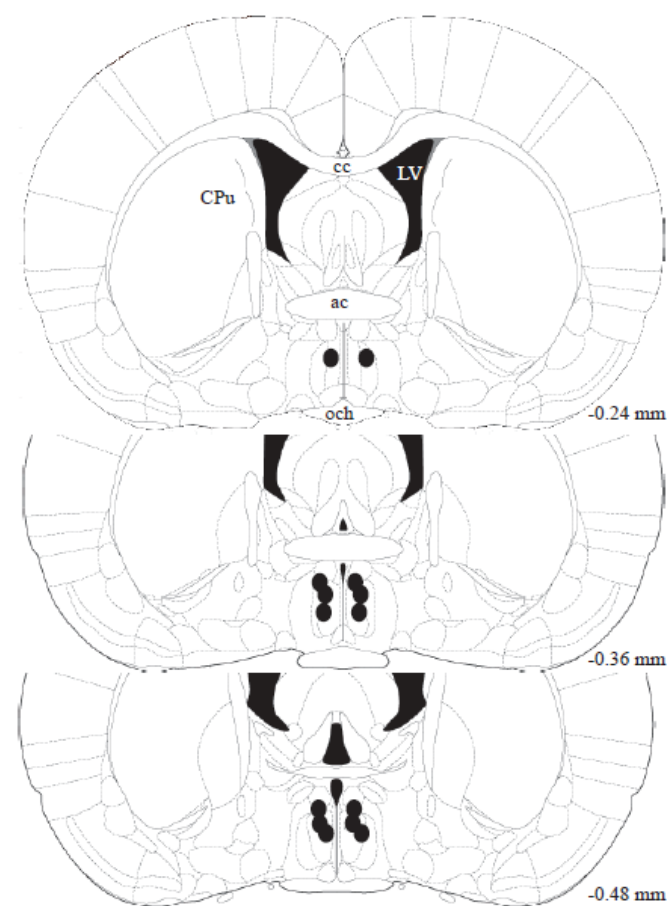


Figura 1. Sitios de microinyección. Representación esquemática de las secciones coronales a nivel del mPOA. Los círculos negros indican los sitios de microinyección con Raclopride (n=7); los números inferiores indican la distancia desde Bregma. Los esquemas fueron tomados del atlas Paxinos y Watson (2005). ac, comisura anterior; cc, cuerpo calloso; CPu, caudado putamen; LV, ventrículo lateral; och, quiasma óptico.

5.2. Comportamiento maternal

Como se observa en la Tabla 1, la latencia a la RTC no se vio afectada luego del tratamiento con RAC₅ μ g y aumentó significativamente luego de RAC₁₀ μ g con respecto al vehículo.

Con respecto a las posturas de amamantamiento, las ratas madres tratadas con RAC₅ μ g iniciaron antes las posturas de amamantamiento en comparación con el control, mientras que la duración de las posturas de amamantamiento no se vieron modificadas, evaluadas tanto hora por hora como en las cuatro horas totales (ver Tabla 1).

La ganancia de peso de las crías no se vio afectada luego del tratamiento con Raclopride.

Tabla 1. Efectos de la microinyección de Raclopride en el mPOA sobre distintos parámetros maternos (n=7).

Parámetros maternos (mins)	Salina	RAC ₅ μ g	RAC ₁₀ μ g	ANOVA		Tukey (p)
				F (2,12)	p	
Ganancia de peso de las crías (%)	6.3 \pm 0.2	6.5 \pm 0.8	4.47 \pm 0.6	2.25	0.14	
Reunión toda la camada	1.9 \pm 0.4	2.6 \pm 0.8	4.56 \pm 0.4*	6.27	0.014	*0.013
Nursing:						
Latencia	9.2 \pm 1.2	5.3 \pm 1.2*	6.58 \pm 0.6	5.09	0.024	*0.022
Duración (mins):						
<i>Tiempo total</i>	189.2 \pm 5.7	180.1 \pm 3.1	189.0 \pm 24.0	0.56	0.58	-
<i>Primera media hora</i>	17.9 \pm 0.71	14.5 \pm 1.7	16.2 \pm 1.8	1.21	0.33	-
<i>Primera hora</i>	39.5 \pm 2.6	39.6 \pm 2.5	42.7 \pm 2.2	0.57	0.57	-
<i>Segunda hora</i>	51.3 \pm 2.3	50.0 \pm 2.2	48.8 \pm 4.9	0.57	0.90	-
<i>Tercera hora</i>	51.0 \pm 3.4	45.0 \pm 3.1	49.7 \pm 3.2	0.10	0.90	-
<i>Cuarta hora</i>	47.3 \pm 3.7	45.5 \pm 1.6	47.8 \pm 2.7	0.12	0.87	-
n° episodios	21.1 \pm 3.2	22.0 \pm 2.3	21.0 \pm 3.6	0.05	0.94	-
Duración de episodios	10.4 \pm 1.4	8.9 \pm 1.0	14.4 \pm 5.2	0.82	0.46	-

Los asteriscos indican diferencias significativas respecto al control.

5.3. Sueño

Como se muestra en la Tabla 2, tanto la duración como el número de episodios de IS y del sueño REM se vieron significativamente disminuidos luego de la microinyección de RAC_{10μg} respecto al control en las cuatro horas de registro. Tanto la vigilia como ambas etapas del sueño NREM no se vieron modificadas luego del tratamiento con Raclopride.

Como se muestra en el análisis hora por hora en la Figura 2, el IS disminuyó significativa mente en la cuarta hora luego de RAC_{10μg}, comparado con el vehículo. A su vez, el sueño REM disminuyó significativamente en la segunda hora con ambas dosis de Raclopride mientras que tuvo una tendencia a disminuir también con ambas dosis en la tercera hora. Por el contrario, la vigilia y ambas etapas del sueño NREM no se vieron afectadas en el análisis hora por hora luego del tratamiento con Raclopride respecto al control o entre las distintas dosis.

Las latencias al sueño LS, SWS y REM no se vieron afectadas luego del tratamiento con Raclopride en comparación con el vehículo (ver Tabla 2).

Tabla 2. Efectos de la microinyección de Raclopride en el mPOA sobre distintos parámetros de sueño.

Parámetros de sueño	Salina	RAC ₅ µg	RAC ₁₀ µg	ANOVA		Tukey (p)
				F (2,12)	p	
Vigilia						
Duración (min)	80.0 ± 6.3	89.8 ± 6.2	101.1 ± 10.4	1.89	0.19	-
Número de episodios	126 ± 9.4	126.2 ± 21.4	125.1 ± 21.7	1.87	0.19	-
Duración episodios (min)	0.7 ± 0.0	5.0 ± 4.0	7.1 ± 5.9	0.24	0.79	-
Sueño ligero (LS)						
Duración (min)	40.4 ± 4.9	33.9 ± 2.4	36.8 ± 2.1	1.10	0.36	-
Número de episodios	201.9 ± 12.1	91.0 ± 15.8	211.3 ± 13.9	0.17	0.85	-
Duración episodios (minutos)	0.2 ± 0.0	0.16 ± 0.0	0.2 ± 0.0	1.69	0.22	-
Latencia	11.2 ± 0.5	8.2 ± 1.5	9.9 ± 2.8	0.90	0.43	-
Sueño de ondas lentas (SWS)						
Duración (minutos)	93.8 ± 6.41	102.6 ± 6.0	89.9 ± 9.5	1.29	0.31	-
Número de episodios	182.0 ± 16.4	169.4 ± 13.2	167.7 ± 11.7	0.33	0.73	-
Duración episodios (minutos)	0.56 ± 0.1	0.63 ± 0.1	0.2 ± 0.0	0.97	0.41	-
Latencia	18.5 ± 4.0	13.9 ± 3.5	15.2 ± 3.5	1.89	0.19	-
Etapa transicional (IS)						
Duración (minutos)	4.4 ± 0.81	2.7 ± 0.39	1.6 ± 0.3*	5.79	0.017	0.013
Número de episodios	18.8 ± 3.8	15.3 ± 1.9	8.7 ± 1.7*	4.02	0.46	0.04
Duración episodios (minutos)	0.19 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.56	0.59	-
Sueño REM						
Duración (minutos)	21.5 ± 0.95	10.9 ± 2.4#	10.8 ± 2.27*	13.98	0.0007	#0.0019 *0.0017
Número de episodios	21.9 ± 4.1	14.1 ± 2.1	8.5 ± 1.7*	4.17	0.04	0.03
Duración episodios (minutos)	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1	1.2 ± 0.2	1.94	0.19	-
Latencia	48.9 ± 3.4	68.7 ± 14.8	84.4 ± 25.4	1.14	0.35	-

Los asteriscos y numerales indican diferencias significativas respecto al control.

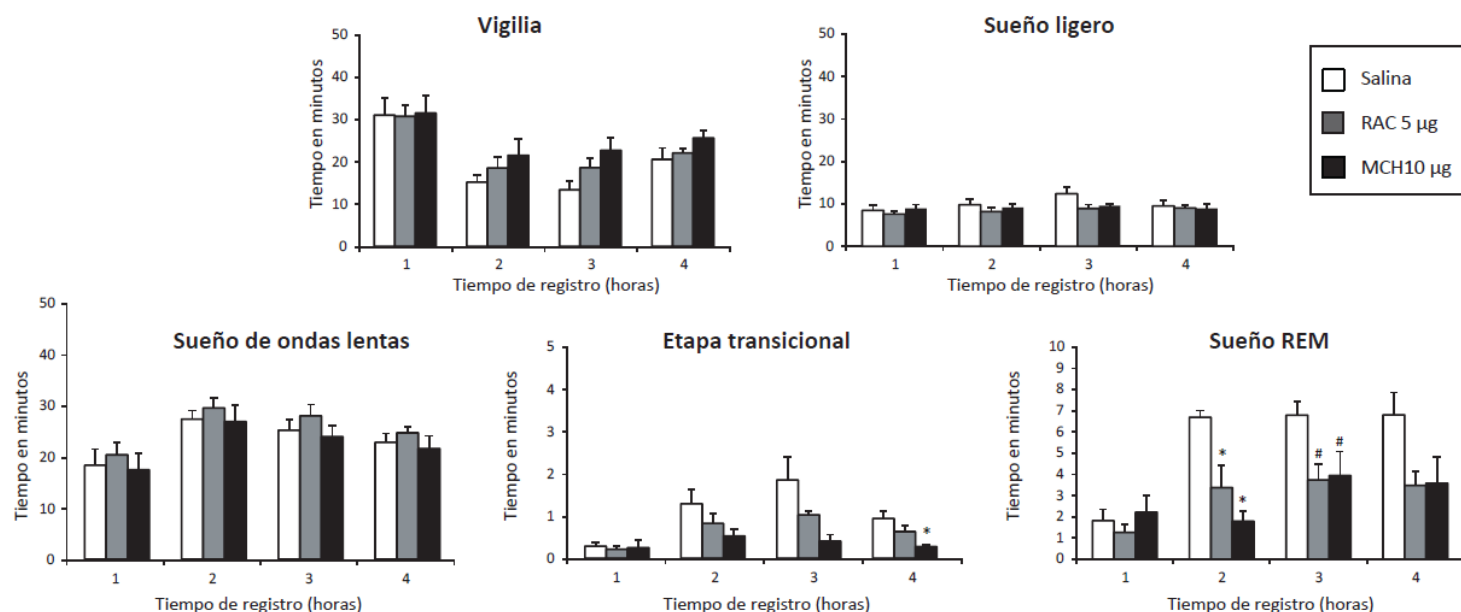


Figura 2. Efecto de la microinyección de Raclopride intra-mPOA sobre el sueño. Las gráficas muestran el tiempo promedio que las ratas madres permanecieron en vigilia (W), sueño ligero (LS), sueño de ondas lentas (SWS), etapa transicional (IS) y sueño REM en cada hora de registro. Las diferencias entre grupos fueron analizadas con un ANOVA de medidas repetidas seguido del test de Tukey como post hoc. Los asteriscos muestran las diferencias significativas encontradas, mientras que el numeral indica una tendencia ($p \leq 0.06$) comparado con los valores controles.

6. Discusión

Contrariamente a nuestras expectativas, evidenciamos que la microinyección de un antagonista D2, Raclopride, no afectó el sueño NREM mientras que disminuyó significativamente tanto el sueño REM como su etapa de transición desde el sueño NREM y tuvo cambios pequeños pero significativos sobre el comportamiento maternal.

Luego del tratamiento con la dosis más baja de Raclopride ($RAC_{5\mu g}$) las madres comenzaron a amamantar antes en comparación con el tratamiento con vehículo. Este resultado es coherente con los datos experimentales de Miller y col. (2005) y sugiere que nuestra hipótesis inicial podría no ser correcta, debido a que esta disminución en la latencia al inicio del amamantamiento no fue acompañada de un inicio más temprano del sueño NREM. Sin embargo, a diferencia del trabajo de Miller y col. (2005) nuestros resultados mostraron que la duración del tiempo que las hembras permanecieron en posturas de amamantamiento no se vio afectada luego de ninguna de las dosis de Raclopride en comparación con los controles. Por lo tanto, son necesarios más

experimentos para comprobar dicha hipótesis. Las diferencias encontradas respecto a los antecedentes pueden deberse a diferencias en los protocolos experimentales, como el hecho de que en nuestro protocolo las crías no fueron limpiadas de heces y orina previo al pesado de las mismas. Estas diferencias podrían generar cambios en las respuestas maternas.

A su vez, luego del tratamiento con Raclopride ($RAC_{10\mu g}$) a las madres les llevó más tiempo reunir a toda la camada, mientras que con la dosis más baja de Raclopride ($RAC_{5\mu g}$) no hallamos diferencias comparado con los controles. Nuestros datos sugerirían que el sistema DAérgico posee un rol en la motivación maternal, lo que es coherente con antecedentes previos que muestran que tanto la administración periférica como intra-mPOA con agentes DAérgicos modula el comportamiento maternal (Stern and Keer, 1999; Stolzenberg et al., 2007). A pesar de que Miller y col. (2005) mostraron que el comportamiento maternal activo no se vio afectado con Raclopride a la dosis más baja que nosotros utilizamos ($RAC_{5\mu g}$), no utilizaron la dosis a la cual observamos los cambios en el comportamiento maternal activo. Por lo tanto, se podría especular que la activación del sistema DAérgico en el mPOA debe ser mayor para activar el componente maternal activo en comparación con el pasivo. Sin embargo, nosotros no medimos ningún otro parámetro maternal activo como para comprobar dicha hipótesis.

Si bien la mayoría de los estudios relacionan el mPOA y en general el POA al sueño NREM, nuestros resultados muestran que el mPOA altera marcadamente el sueño REM y su etapa transicional desde el sueño NREM. Estos datos son respaldados por determinados datos experimentales que resaltan la importancia de esta área también en el control del sueño REM (Asala et al., 1990; Suntsova and Dergacheva, 2004). Particularmente, Suntsova & Dergacheva evidenciaron que la mayoría de las neuronas registradas del mPOA incrementan su frecuencia de descarga durante el sueño REM en comparación con la vigilia y el sueño NREM, incrementando su descarga entre 20 y 70 segundos previo al inicio del sueño REM en la mitad de dichas neuronas. Asimismo, la estimulación eléctrica del mPOA a frecuencias bajas durante el sueño NREM promueve la entrada del sueño REM (Suntsova and Dergacheva, 2004). Además, Asala y col. (1990) mostraron que luego de la lesión del mPOA el sueño REM se vio incrementado.

Nuestro estudio es el primero en evaluar directamente el rol del sistema DAérgico en el mPOA sobre el sueño, mostrando una clara disminución del sueño REM y su etapa transicional tanto en su duración como en el número de episodios. A pesar que las neuronas del DAérgicas del área tegmental ventral (VTA) como de la SNc no cambian su frecuencia de descarga a lo largo del ciclo sueño-vigilia (Miller et al., 1983; Trulson, 1985; Trulson and Preussler, 1984; Trulson et al., 1981), su patrón temporal de descarga es modulado a lo largo de dicho ciclo. En este sentido, (Dahan et al., 2007) evidenciaron que hay un incremento prominente en la descarga de las neuronas DAérgicas del VTA

durante el sueño REM. Además, la liberación de DA durante el sueño REM, tanto en el núcleo accumbens y en la corteza prefrontal, está incrementada durante el sueño REM en comparación con el sueño NREM (Lena et al., 2005). El hecho de que un antagonista D2 en el mPOA disminuya el tiempo en sueño REM y su etapa de transición (los presentes resultados), nos lleva a hipotetizar que las proyecciones DAérgicas hacia el mPOA facilitarían la transición del sueño NREM al REM. Respaldando esta hipótesis, Jouvet y col. en 1988 ya habían discutido el potencial rol del POA en el control de las áreas del tronco encefálico críticas en la generación del sueño REM (Jouvet, 1988). Sin embargo, son necesarios más experimentos para confirmar esta hipótesis. Asimismo, con el fin de tener un conocimiento más exhaustivo en el rol DAérgico en el mPOA en relación al sueño, dos principales líneas de trabajo deberían seguirse. En primer lugar, estudiar otros agentes DAérgicos, tanto agonistas como antagonistas de otros receptores y del propio D2. Por otro lado, también es necesario replicar los hallazgos encontrados en animales no maternos, ya que es sabido que el componente hormonal condiciona fuertemente la fisiología de esta área (Schrader et al., 2012) y que su rol cambia, por ejemplo, según la etapa del postparto (Pereira and Morrell, 2009).

Los hallazgos en el comportamiento materno y el sueño en su conjunto, donde la motivación materno y el sueño REM (un estado con un componente emocional alto) se encuentran disminuidos luego del tratamiento con antagonistas D2, podrían vincularse desde el punto de vista que para ambos comportamientos u estados el sistema DAérgico es fundamental.

Los estudios a futuros estarán centrados en determinar los efectos de otros agentes DAérgicos y la evaluación del sistema DAérgico en el mPOA en animales no-maternos. A su vez, también intentaremos llevar a cabo más experimentos para comprobar o rechazar nuestra hipótesis inicial.

7. Bibliografía

- Agrati, D., et al., 2011. Coexpression of sexual behavior and maternal aggression: the ambivalence of sexually active mother rats toward male intruders. *Behav Neurosci.* 125, 446-51.
- Alam, M., et al., 1997. Thermosensitive neurons of the diagonal band in rats: relation to wakefulness and non-rapid eye movement sleep. *Brain Res.* 752, 81-9.
- Alam, M. N., et al., 1995. Neuronal discharge of preoptic/anterior hypothalamic thermosensitive neurons: relation to NREM sleep. *Am J Physiol.* 269, R1240-9.
- Asala, S. A., et al., 1990. Effects of medial preoptic area lesions on sleep and wakefulness in unrestrained rats. *Neurosci Lett.* 114, 300-4.
- Babu, G. N., et al., 2015. Antipsychotics in pregnancy and lactation. *Indian J Psychiatry.* 57, S303-7.
- Bakowska, J. C., Morrell, J. I., 1995. Quantitative autoradiographic analysis of D1 and D2 dopamine receptors in rat brain in early and late pregnancy. *Brain Res.* 703, 191-200.
- Bell, R. W., et al., 1974. Early experience, ultrasonic vocalizations, and maternal responsiveness in rats. *Dev Psychobiol.* 7, 235-42.
- Benedetto, L., et al., 2012. GABAergic processes within the median preoptic nucleus promote NREM sleep. *Behav Brain Res.* 232, 60-5.
- Benedetto, L., et al., 2014. Melanin-concentrating hormone in the medial preoptic area reduces active components of maternal behavior in rats. *Peptides.* 58C, 20-25.
- Benedetto, L., et al., en prep. A descriptive analysis of sleep and wakefulness states in different maternal behaviors in lactating rats.
- Benedetto, L., et al., 2013. Microinjection of melanin concentrating hormone into the lateral preoptic area promotes non-REM sleep in the rat. *Peptides.* 39, 11-5.
- Benington, J. H., Heller, H. C., 1995. Restoration of brain energy metabolism as the function of sleep. *Prog Neurobiol.* 45, 347-60.
- Bjorklund, A., et al., 1975. Evidence of an incerto-hypothalamic dopamine neurone system in the rat. *Brain Res.* 89, 29-42.
- Bowlby, J., 1958. The nature of the child's tie to his mother. *Int J Psychoanal.* 39, 350-73.
- Carskadon, M. A. a. D., W., Normal Human Sleep: An Overview. In: T. R. Meir H. Kryger, William C. Dement, Ed., Principles and practices of sleep medicine. vol. Elsevier-Saunders, Philadelphia, 2005, pp. 13-23.
- Chatterjee, D., et al., 2007. Maternal isolation alters the expression of neural proteins during development: 'Stroking' stimulation reverses these effects. *Brain Res.* 1158, 11-27.
- Christian, H. C, et al., 2007. Thyrotrophin-releasing hormone, vasoactive intestinal peptide, prolactin-releasing peptide and dopamine regulation of prolactin secretion by different lactotroph morphological subtypes in the rat. *J Neuroendocrinol.* 19, 605-13.
- Dahan, L., et al., 2007. Prominent burst firing of dopaminergic neurons in the ventral tegmental area during paradoxical sleep. *Neuropsychopharmacology.* 32, 1232-41.

- Day, T. A., et al., 1980. Noradrenergic and dopaminergic projections to the medial preoptic area of the rat. A combined horseradish peroxidase/catecholamine fluorescence study. *Brain Res.* 193, 543-8.
- Devera, A., et al., 2015. Melanin-concentrating hormone (MCH) modulates the activity of dorsal raphe neurons. *Brain Res.* 1598, 114-28.
- Eguchi, K., Satoh, T., 1980. Characterization of the neurons in the region of solitary tract nucleus during sleep. *Physiol Behav.* 24, 99-102.
- Faturi, C. B., et al., 2010. Disruptions of the mother-infant relationship and stress-related behaviours: altered corticosterone secretion does not explain everything. *Neurosci Biobehav Rev.* 34, 821-34.
- Findlay, A. L., Hayward, J. N., 1969. Spontaneous activity of single neurones in the hypothalamus of rabbits during sleep and waking. *J Physiol.* 201, 237-58.
- Freeman, M. E., et al., 2000. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev.* 80, 1523-631.
- Gallopín, T., et al., 2004. Effect of the wake-promoting agent modafinil on sleep-promoting neurons from the ventrolateral preoptic nucleus: an in vitro pharmacologic study. *Sleep.* 27, 19-25.
- Gardner, D. M., et al., 2005. Modern antipsychotic drugs: a critical overview. *Cmaj.* 172, 1703-11.
- Girgenti, M. J., et al., 2010. Antipsychotic-induced gene regulation in multiple brain regions. *J Neurochem.* 113, 175-87.
- Gong, H., et al., 2004. Activation of c-fos in GABAergic neurones in the preoptic area during sleep and in response to sleep deprivation. *J Physiol.* 556, 935-46.
- Gottesmann, C., 1992. Detection of seven sleep-waking stages in the rat. *Neurosci Biobehav Rev.* 16, 31-8.
- Gottesmann, C., 1996. The transition from slow-wave sleep to paradoxical sleep: evolving facts and concepts of the neurophysiological processes underlying the intermediate stage of sleep. *Neurosci Biobehav Rev.* 20, 367-87.
- Graham, M. D., Pfaus, J. G., 2012. Differential effects of dopamine antagonists infused to the medial preoptic area on the sexual behavior of female rats primed with estrogen and progesterone. *Pharmacol Biochem Behav.* 102, 532-9.
- Gvilia, I., et al., 2005. Different neuronal populations of the rat median preoptic nucleus express c-fos during sleep and in response to hypertonic saline or angiotensin-II. *J Physiol.* 569, 587-99.
- Harlow, M. K., 1967. Motherhood in primates. *NLN Conv Pap.* 1, 39-51.
- Hunter, L. P., et al., 2009. A selective review of maternal sleep characteristics in the postpartum period. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs.* 38, 60-8.
- Jouvet, M., 1988. The regulation of paradoxical sleep by the hypothalamo-hypophysis. *Arch Ital Biol.* 126, 259-74.
- Kaitin, K. I., 1984. Preoptic area unit activity during sleep and wakefulness in the cat. *Exp Neurol.* 83, 347-57.
- Kaushik, M. K., et al., 2011. Glutamate microinjection at the medial preoptic area enhances slow wave sleep in rats. *Behav Brain Res.* 217, 240-3.
- Klinger, G., et al., 2013. Antipsychotic drugs and breastfeeding. *Pediatr Endocrinol Rev.* 10, 308-17.

- Koyama, Y., Hayaishi, O., 1994a. Firing of neurons in the preoptic/anterior hypothalamic areas in rat: its possible involvement in slow wave sleep and paradoxical sleep. *Neurosci Res.* 19, 31-8.
- Koyama, Y., Hayaishi, O., 1994b. Modulation by prostaglandins of activity of sleep-related neurons in the preoptic/anterior hypothalamic areas in rats. *Brain Res Bull.* 33, 367-72.
- Krilowicz, B. L., et al., 1994. Regulation of posterior lateral hypothalamic arousal related neuronal discharge by preoptic anterior hypothalamic warming. *Brain Res.* 668, 30-8.
- Kumar, D., et al., 2011. Warm sensitive neurons of the preoptic area regulate ambient temperature related changes in sleep in the rat. *Indian J Physiol Pharmacol.* 55, 262-71.
- Le Moal, M., Mesocorticolimbic dopaminergic neurons: functional and regulatory roles. In: F. Bloom, D. Kupfer, Eds., *Psychopharmacology: the fourth generation of progress.* vol. Raven Press, New York, 1995, pp. 283–94.
- Lee, K. A., 1998. Alterations in sleep during pregnancy and postpartum: a review of 30 years of research. *Sleep Med Rev.* 2, 231-42.
- Lena, I., et al., 2005. Variations in extracellular levels of dopamine, noradrenaline, glutamate, and aspartate across the sleep--wake cycle in the medial prefrontal cortex and nucleus accumbens of freely moving rats. *J Neurosci Res.* 81, 891-9.
- Lu, J., et al., 2000. Effect of lesions of the ventrolateral preoptic nucleus on NREM and REM sleep. *J Neurosci.* 20, 3830-42.
- Lyamin, O., et al., 2007. Behavioral aspects of sleep in bottlenose dolphin mothers and their calves. *Physiol Behav.* 92, 725-33.
- McGinty, D. J., Serman, M. B., 1968. Sleep suppression after basal forebrain lesions in the cat. *Science.* 160, 1253-5.
- Mendelson, W. B., 1996. Sleep induction by microinjection of pentobarbital into the medial preoptic area in rats. *Life Sci.* 59, 1821-8.
- Mendelson, W. B., 2000. Sleep-inducing effects of adenosine microinjections into the medial preoptic area are blocked by flumazenil. *Brain Res.* 852, 479-81.
- Mendelson, W. B., Martin, J. V., 1992. Characterization of the hypnotic effects of triazolam microinjections into the medial preoptic area. *Life Sci.* 50, 1117-28.
- Mendelson, W. B., et al., 1989. Enhancement of sleep by microinjection of triazolam into the medial preoptic area. *Neuropsychopharmacology.* 2, 61-6.
- Miller, J. D., et al., 1983. Activity of mesencephalic dopamine and non-dopamine neurons across stages of sleep and walking in the rat. *Brain Res.* 273, 133-41.
- Miller, S. M., Lonstein, J. S., 2005. Dopamine d1 and d2 receptor antagonism in the preoptic area produces different effects on maternal behavior in lactating rats. *Behav Neurosci.* 119, 1072-83.
- Montgomery-Downs, H. E., et al., 2010. Normative longitudinal maternal sleep: the first 4 postpartum months. *Am J Obstet Gynecol.* 203, 465 e1-7.
- Monti, J. M., et al., 1988. Biphasic effects of dopamine D-2 receptor agonists on sleep and wakefulness in the rat. *Psychopharmacology (Berl).* 95, 395-400.

- Monti, J. M., Monti, D., 2007. The involvement of dopamine in the modulation of sleep and waking. *Sleep Med Rev.* 11, 113-33.
- Monti, J. M., et al., 2016. *Dopamine and Sleep: Molecular, Functional, and Clinical Aspects*, vol. Springer, Switzerland.
- Moses, J., et al., 1995. Dopaminergic drugs in the medial preoptic area and nucleus accumbens: effects on motor activity, sexual motivation, and sexual performance. *Pharmacol Biochem Behav.* 51, 681-6.
- Nishihara, K., et al., 2004. Delta and theta power spectra of night sleep EEG are higher in breast-feeding mothers than in non-pregnant women. *Neurosci Lett.* 368, 216-20.
- Numan, M., 1974. Medial preoptic area and maternal behavior in the female rat. *J Comp Physiol Psychol.* 87, 746-59.
- Numan, M., 1990. Long-term effects of preoptic area knife cuts on the maternal behavior of postpartum rats. *Behav Neural Biol.* 53, 284-90.
- Numan, M., Maternal Behavior. In: E. K. a. J. Neill, Ed., *The Physiology of Reproduction.* vol. 2. Raven Press, Ltd, New York, 1994, pp. 221-302.
- Numan, M., Callahan, E. C., 1980. The connections of the medial preoptic region and maternal behavior in the rat. *Physiol Behav.* 25, 653-65.
- Numan, M., Insel, T. R., 2003. *The neurobiology of parental behavior*, vol. Springer-Verlag, New York.
- 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. *Behav Neurosci.* 109, 135-49.
- Numan, M., Stolzenberg, D. S., Hypothalamic interaction with the mesolimbic dopamine system and the regulation of maternal responsiveness. In: R. S. Bridges, Ed., *Neurobiology of the Parental Brain.* vol. Elsevier Academic Press, San Diego (CA), 2008, pp. 3-22.
- Paredes, R. G., Agmo, A., 1992. Facilitation of sexual behavior shortly after electrolytic lesion of the medial preoptic area: what does it mean? *Brain Res Bull.* 29, 125-8.
- Parmeggiani, P. L., 2003. Thermoregulation and sleep. *Front Biosci.* 8, s557-67.
- Parmeggiani, P. L., et al., 1986. Polygraphic study of anterior hypothalamic-preoptic neuron thermosensitivity during sleep. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 63, 289-95.
- Parmeggiani, P. L., et al., 1987. Thermosensitivity of anterior hypothalamic-preoptic neurons during the waking-sleeping cycle: a study in brain functional states. *Brain Res.* 415, 79-89.
- Paxinos, G., Watson, C., 2005. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, vol. Elsevier Academic Press, San Diego, California.
- 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, 238-48.
- Rivas, M., et al., 2016. Hypocretinergic system in the medial preoptic area promotes maternal behavior in lactating rats. *Peptides.*
- Sallanon, M., et al., 1989. Long-lasting insomnia induced by preoptic neuron lesions and its transient reversal by muscimol injection into the posterior hypothalamus in the cat. *Neuroscience.* 32, 669-83.

- Sallanon, M., et al., 1986. [Long-duration insomnia after lesions of the perikaryons of the paramedian preoptic area in cats]. *C R Acad Sci III*. 303, 403-9.
- Schrader, J. A., et al., 2012. Pregnancy affects FOS rhythms in brain regions regulating sleep/wake state and body temperature in rats. *Brain Res*. 1480, 53-60.
- Sharma, V., Mazmanian, D., 2003. Sleep loss and postpartum psychosis. *Bipolar Disord*. 5, 98-105.
- Sherin, J. E., et al., 1996. Activation of ventrolateral preoptic neurons during sleep. *Science*. 271, 216-9.
- Siegel, S., 1956. *Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences*. , vol. McGraw-Hill, New York.
- Simerly, R. B., Swanson, L. W., 1986. The organization of neural inputs to the medial preoptic nucleus of the rat. *J Comp Neurol*. 246, 312-42.
- Sivadas, N., et al., 2016. Dynamic changes in sleep pattern during post-partum in normal pregnancy in rat model. *Behav Brain Res*. 320, 264-274.
- Srividya, R., et al., 2007. The medial septum acts through the medial preoptic area for thermoregulation and works with it for sleep regulation. *Indian J Physiol Pharmacol*. 51, 261-73.
- Stern, J. M., *Maternal Behavior: Sensory, Hormonal and Neural Determinants*. In: F. R. Brush, S. Levine, Eds., *Psychoendocrinology*. vol. Academic Press, New York, 1989, pp. 103-226.
- Stern, J. M., Keer, S. E., 1999. Maternal motivation of lactating rats is disrupted by low dosages of haloperidol. *Behav Brain Res*. 99, 231-9.
- Stern, J. M., Lonstein, J. S., 2001. Neural mediation of nursing and related maternal behaviors. *Prog Brain Res*. 133, 263-78.
- Stern, J. M., Taylor, L. A., 1991. Haloperidol inhibits maternal retrieval and licking, but enhances nursing behavior and litter weight gains in lactating rats. *J Neuroendocrinol*. 3, 591-6.
- Stolzenberg, D. S., et al., 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, 907-19.
- Stolzenberg, D. S., Numan, M., 2011. Hypothalamic interaction with the mesolimbic DA system in the control of the maternal and sexual behaviors in rats. *Neurosci Biobehav Rev*. 35, 826-47.
- Suntsova, N., et al., 2002. Sleep-waking discharge patterns of median preoptic nucleus neurons in rats. *J Physiol*. 543, 665-77.
- Suntsova, N. V., Dergacheva, O. Y., 2004. The role of the medial preoptic area of the hypothalamus in organizing the paradoxical phase of sleep. *Neurosci Behav Physiol*. 34, 29-35.
- Szymusiak, R., et al., 1998. Sleep-waking discharge patterns of ventrolateral preoptic/anterior hypothalamic neurons in rats. *Brain Res*. 803, 178-88.
- Szymusiak, R., et al., 1991. Exposure to heat restores sleep in cats with preoptic/anterior hypothalamic cell loss. *Brain Res*. 541, 134-8.
- Terkel, J., et al., 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 Res*. 169, 369-80.
- Thornburg, K. L., et al., *Maternal Adaptation to Pregnancy*. In: N. J. D. Knobil E., Ed., *The of Reproduction*. vol. Raven Press, Ltd, New York, 2006.

- Tortero, P., et al., 2009. State-dependent pattern of Fos protein expression in regionally-specific sites within the preoptic area of the cat. *Brain Res.* 1267, 44-56.
- Trulson, M. E., 1985. Simultaneous recording of substantia nigra neurons and voltammetric release of dopamine in the caudate of behaving cats. *Brain Res Bull.* 15, 221-3.
- Trulson, M. E., Preussler, D. W., 1984. Dopamine-containing ventral tegmental area neurons in freely moving cats: activity during the sleep-waking cycle and effects of stress. *Exp Neurol.* 83, 367-77.
- Trulson, M. E., et al., 1981. Activity of substantia nigra units across the sleep-waking cycle in freely moving cats. *Neurosci Lett.* 26, 183-8.
- Voloschin, L. M., Tramezzani, J. H., 1979. Milk ejection reflex linked to slow wave sleep in nursing rats. *Endocrinology.* 105, 1202-7.
- Walsh, C. J., et al., 1996. The effects of olfactory and somatosensory desensitization on Fos-like immunoreactivity in the brains of pup-exposed postpartum rats. *Behav Neurosci.* 110, 134-53.
- Zhao, Z. J., et al., 2010. Milk energy output during peak lactation in shaved Swiss mice. *Physiol Behav.* 101, 59-66.