



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



FACULTAD DE
CIENCIAS

UDELAR | fcien.edu.uy



Efecto de la desorganización de la matriz extracelular en el área preóptica media sobre el comportamiento maternal de la rata (*Rattus norvegicus*)

Trabajo final de grado de la Licenciatura en Ciencias Biológicas

JULIETA POMI

Orientadora: Dra. Natalia Uriarte

Co-orientador: Dr. Javier Nogueira

Laboratorio de Neurociencias
Laboratorio de Experimentación Animal
Facultad de Ciencias
Universidad de la República

Montevideo, 2019

AGRADECIMIENTOS

A Francesco y Luciana, por aceptar evaluar este trabajo, y por sus aportes.

A Nati y a Javier, por la confianza, el apoyo, por valorarme y alentarme a crecer en este proceso. A Nati por recibirme, y por su enorme dedicación en este año desafiante.

A Annabel, Dani, Vane, Gabi, Magda y Anto, por el apoyo, la disposición, y lo compartido.

A Gabi Bedó, por prestarme su laboratorio, por su disposición, y apoyo burocrático.

A Héctor, Diego y Priscila, por cuidar del bioterio y de los animales con tanta responsabilidad.

Al grupo de Cronobiología, especialmente a Ana y Bettina, por ser referentes en mi proceso de formación y haberme iniciado en actividades de investigación.

A Laura Quintana, por dedicar su tiempo a enseñarme técnicas que fueron muy valiosas y útiles para este trabajo.

Al lab. de Neurofarmacología Experimental del IIBCE, por sus aportes y el apoyo en estas últimas semanas. A Cecilia y Jessica, por entender y haberme brindado la flexibilidad necesaria para finalizar este trabajo.

A mi familia, especialmente a mis padres, por el apoyo incondicional y por creer en mí.

A Alejo, por bancar, por hacerlo todo más fácil, y apoyar en todo proyecto que me proponga.

A mi abuela, por su cariño incondicional y aceptar mis escasas visitas.

A Cami y Vicki, mis hermanas de la vida.

A “las biólogas” Sofi, Jime, Cami, Ani y Lu, de las cosas más lindas que me dejó esta carrera.

A Juli Castillo, mi “dos” en los últimos años, y con quien seremos para siempre “las julis”.

A “los Antárticos”, con quienes compartí una de las experiencias más lindas de esta carrera.

Al “los del clan”, como nos dicen los de arriba, por hacer este proceso mucho más divertido.

ÍNDICE

RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	4
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPÓTESIS	9
OBJETIVO	9
MATERIALES Y MÉTODOS	13
RESULTADOS	15
DISCUSIÓN	20
CONCLUSIONES	25
PERSPECTIVAS	26
BIBLIOGRAFÍA	27

RESUMEN

El comportamiento maternal (CM) en mamíferos es fundamental para la supervivencia de las crías. El área preóptica media (APOm) es clave en la expresión y plasticidad de esta conducta, aunque los mecanismos específicos subyacentes aún se desconocen. Las redes perineuronales (RPNs) de la matriz extracelular han sido involucradas en fenómenos de plasticidad del sistema nervioso, y antecedentes de nuestro grupo, muestran que estas estructuras están presentes en el APOm desde la gestación al postparto tardío. El objetivo de este trabajo fue evaluar el rol de las RPNs del APOm sobre el comportamiento maternal de la rata. En un primer experimento se inyectó la enzima Condroitinasa-ABC (ch-ABC) en el APOm de ratas gestantes (15-18 de gestación) para degradar las RPNs y evaluamos el CM luego del parto. Se utilizaron como grupos control ratas no inyectadas e inyectadas con vehículo. La presencia de RPNs en el APOm se evaluó a través de una reacción a la lectina de *Wisteria Floribunda*. Mientras que las ratas controles expresaron RPNs en el APOm, las ratas tratadas con ch-ABC presentaron una expresión moderada y mostraron una disminución en algunos componentes del CM. Para evaluar si las RPNs presentes en este grupo se debieron a una disolución incompleta, o a una disolución completa y posterior re-ensamblado, realizamos un segundo experimento con la variación de que los cerebros se colectaron y procesaron 24 horas luego de la inyección. En este caso, las RPNs del APOm de las ratas tratadas con ch-ABC se expresaron de forma mínima o nula. Los resultados muestran que esta técnica, hasta ahora no empleada en el APOm, fue puesta a punto exitosamente, y sugieren que las RPNs del APOm se re-ensamblan más rápido que lo reportado para la corteza, probablemente regulado por las hormonas esteroideas de la gestación. Mostramos también que una única inyección de ch-ABC en el APOm en este período es suficiente para afectar algunos componentes importantes de la conducta maternal. Ampliar el número de animales utilizados, cuantificar la expresión de las RPNs, analizar su dinámica temporal, y diseñar un protocolo experimental que permita evitar su presencia durante la gestación, permitirá una comprensión más profunda del rol de las RPNs del APOm sobre el comportamiento maternal.

INTRODUCCIÓN

Comportamiento maternal

El comportamiento maternal puede definirse como el conjunto de actividades entre una madre y sus crías, que se despliega inmediatamente luego del parto y persiste por un período de tiempo prolongado. Esta conducta es altamente conservada a lo largo de la evolución y asegura la supervivencia de las crías (1).

Si bien este comportamiento está presente en vertebrados e invertebrados (2), se encuentra particularmente desarrollado en mamíferos (1,3). En este grupo, la lactancia genera un período de mayor dependencia entre la madre y sus crías. Durante este período, la respuesta maternal va cambiando acorde a las necesidades de las crías, asegurando la independencia al momento del destete. El vínculo entre madre y cría, además de asegurar la alimentación y supervivencia, moldea el desarrollo endócrino, afectivo y social de las crías. Numerosos estudios muestran el rol de esta interacción en la respuesta comportamental y neuroendócrina de las crías en la etapa adulta (4-8).

La rata como modelo maternal

En mamíferos, los sustratos neurobiológicos y comportamentales se encuentran altamente conservados (3). La rata –*Rattus norvegicus*–, presenta características biológicas que facilitan su reproducción y mantenimiento en el laboratorio, constituyendo uno de los modelos clásicos y más utilizados en mamíferos para experimentación animal. Existe una extensa literatura acerca de su biología, y la conducta maternal ha sido bien caracterizada en esta especie (1,9). Con el fin de analizar este comportamiento, el mismo puede dividirse en unidades comportamentales medibles, en frecuencia o duración, y pueden clasificarse en componentes *activos* -acarreo, olfateo, lamidos corporales y anogenitales, construcción del nido-, que reflejan la motivación de la madre por sus crías; y *pasivos* –hover over¹ y amamantamiento- (1,9).

Según el grado de desarrollo al momento de nacer, las crías pueden clasificarse en *precociales* -aquellas que presentan un grado de desarrollo motor-sensorial similar al del estado adulto-, y *altriciales* -dependen en mayor medida de los cuidados maternos para finalizar su desarrollo- (1). Las crías de la rata son altriciales, ya que nacen ciegas, sordas, e incapaces de regular su propia temperatura. Por este motivo, el comportamiento maternal representa el estímulo

¹Postura de la madre por encima de las crías cuya función principal es mantener la temperatura de las mismas, mientras realiza otros comportamientos.

sensorial más importante para que su sistema nervioso se desarrolle por completo, lo que establece una dependencia en el vínculo madre-cría aún más fuerte (6,8).

Esta combinación de factores hace de la rata un modelo muy ventajoso para estudiar las bases neurobiológicas de la conducta maternal (3,10).

Regulación del comportamiento maternal

La conducta maternal es regulada tanto por factores internos como externos -como ser las hormonas y los estímulos sensoriales dados por las propias crías, respectivamente-. La experiencia previa y otros factores contexto específicos también moldean esta respuesta (1,9).

Los esteroides ováricos -el estrógeno y la progesterona-, así como la prolactina y la oxitocina, son responsables de la activación del circuito neural que regula el parto y la respuesta de la madre frente a las crías en sus primeros días de vida (10-12). Durante la gestación, los niveles hormonales se modifican permitiendo un cambio en la respuesta de la madre frente a las crías, que pasan de ser estímulos aversivos a positivos (3). Los niveles de progesterona caen drásticamente los días previos al parto, mientras que los niveles de estradiol permanecen altos. La prolactina y la oxitocina aumentan durante el parto, regulando la producción de leche y las contracciones uterinas, respectivamente (10).

Mientras que el inicio de la conducta maternal es regulado principalmente por el perfil hormonal hacia el final de la gestación y durante el parto, su mantenimiento responde principalmente a los estímulos dados por las propias crías (13). La interacción madre-cría se vuelve necesaria para que la respuesta se modifique acorde a las necesidades de las crías (14,15). La calidad, cantidad y organización de los distintos componentes conductuales van disminuyendo a lo largo de la lactancia (1).

Cerebro maternal: Área preóptica media

El circuito maternal involucra estructuras pertenecientes a distintas redes neuronales que interactúan entre sí para integrar los procesos que contribuyen a una respuesta comportamental exitosa (9,16).

En particular, el *área preóptica media* (APOm) del hipotálamo, cumple un rol esencial en la regulación de esta conducta. Numerosos trabajos han demostrado que al lesionar o inactivar esta área, se interrumpen algunos componentes maternos (17-19), mientras que estimularla

eléctricamente los facilita (20). Esta estructura está conformada por variedad de células que expresan distintos neurotransmisores (GABA, dopamina y glutamato) y neuropéptidos (19,21,22), y presenta una alta densidad de receptores de estrógenos, progestágenos, prolactina y oxitocina (23-26), que regulan el parto y la conducta maternal en las primeras etapas de la lactancia, como se mencionó anteriormente.

Plasticidad de la conducta maternal

La respuesta maternal es sumamente plástica. La misma varía a nivel temporal, entre individuos, y en diferentes contextos (14,27-30). Al intentar comprender el sustrato neural que subyace esta plasticidad conductual, numerosos estudios se han focalizado en el rol del APOm. Se ha reportado que en esta área, aumenta el número de receptores de estrógeno y oxitocina (31), así como el volumen neuronal (32) y la densidad de espinas dendríticas (33) durante la gestación. Por otro lado, la expresión de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), principal proteína de los filamentos intermedios de los astrocitos, que le confieren forma y estabilidad, también aumenta durante este período en el APOm (34).

En cuanto a la lactancia, el APOm cumple un rol dinámico que se invierte a lo largo de este período. Pereira y Morrell (15), demostraron que mientras la inactivación del APOm en postparto temprano disminuye la respuesta maternal, en postparto tardío la facilita. Esta estructura entonces actúa como promotora o inhibitoria del comportamiento según el contexto y las necesidades de las crías. Hacia el final de la lactancia, disminuye el tiempo de amamantamiento e interacción entre madre y crías, facilitando la independencia de las mismas. No obstante, hasta el momento se desconocen los mecanismos específicos que sostienen el rol diferencial de APOm y el cambio conductual asociado.

Matriz extracelular y plasticidad

La matriz extracelular (MEC) representa entre el 10-20% del volumen cerebral. En esta matriz, los glicosaminoglicanos juegan un papel crucial (35). Una de las formas en las que se organiza la MEC es en *redes perineuronales* (RPNs) que rodean ciertos cuerpos y prolongaciones neuronales, dejando espacios donde se dan los contactos sinápticos (36,37). Estas redes están compuestas por largas cadenas de glicosaminoglicanos de ácido hialurónico, unidos a proteoglicanos a través de proteínas de unión Tenascinas-R (38).

A pesar de que estas interacciones forman redes condensadas, las RPNs se mantienen dinámicas, reguladas principalmente por metaloproteasas, pero también por astrocitos y

oligodendrocitos que degradan los proteoglicanos (38). De forma experimental, el Condroitín Sulfato (CS), principal proteoglicano de las RPNs, puede ser degradado empleando la enzima Condroitinasa ABC (ch-ABC). Esta enzima, sintetizada por la bacteria *Proteus vulgaris*, corta las cadenas laterales de glicosaminoglicanos del CS, produciendo como resultado una desorganización de las RPNs (39). Esta técnica ha sido utilizada para explorar los diversos roles de estas redes en el sistema nervioso.

El rol de las RPNs en el SNC es múltiple: contribuyen a las propiedades intrínsecas de las neuronas, como el potencial de membrana en reposo (40), previenen el estrés oxidativo (41), contribuyen a la homeostasis iónica (42), están involucradas en procesos que subyacen a algunas lesiones y enfermedades (43), y de forma interesante, numerosos autores han reportado su rol en procesos de plasticidad (38).

En períodos críticos, estas redes juegan un rol particularmente importante. El desarrollo postnatal se caracteriza por presentar una alta plasticidad cerebral que permite cambios en el circuito neural en respuesta a las entradas sensoriales, permitiendo adaptar funciones cerebrales de orden superior -memoria, cognición, comportamiento- al contexto ambiental (38). Las RPNs participan al final de este período crítico amortiguando la plasticidad para consolidar los circuitos (38). Esto se ha puesto en evidencia cuando al disgregar o impedir experimentalmente la formación de las RPNs, se observó que la plasticidad de la dominancia ocular en la corteza visual se restauró más allá del período crítico (44,45).

En la etapa adulta, aunque las RPNs se consideran principalmente estables si no son perturbadas por enfermedades o lesiones (46), están implicadas en procesos plásticos del sistema nervioso. En esta etapa, las RPNs están involucradas en el establecimiento de contactos sinápticos, limitando la plasticidad del circuito (47). En este sentido, se ha reportado que la eliminación de las redes, habilita el borrado de memoria de miedo previamente consolidada (48), e impide la conversión de memoria de corto a largo plazo (49). Por otra parte, la disolución de estas redes incrementa la plasticidad en la corteza auditiva (50), y mejora la capacidad de reconocimiento de objetos novedosos (51). Cabe destacar que la mayoría de los estudios acerca de las RPNs han sido realizados en corteza, y en algunas pocas regiones subcorticales (48,50-55).

De forma interesante, la gestación y lactancia se consideran uno de los períodos más relevantes en la plasticidad adulta (56), donde el APOm, como se mencionó anteriormente, juega un rol importante. Ferreño (57) y Uriarte et al., (58), han estudiado la dinámica temporal de las RPNs durante la gestación y la lactancia en APOm. Hasta entonces, se desconocía la organización de las RPNs en esta área. Los autores encontraron que éstas comienzan a

ensamblarse durante la gestación, alcanzan su mayor grado de organización los días previos al parto, y comienzan a desorganizarse en postparto tardío (Figuras 1 y 2).

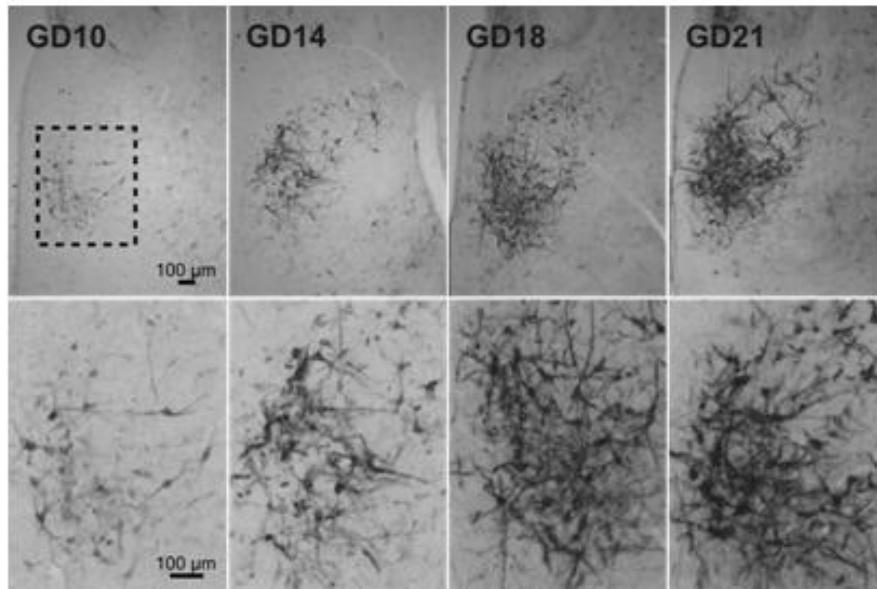


Figura 1: Ensamblado de las RPNs en el APOm en días de gestación (GD) 10 a 21, obtenido a partir de la reacción histoquímica a la lectina de *Wisteria Floribunda*. Se muestra a menor aumento (arriba), y a mayor aumento de la región encerrada en el cuadrado (abajo). Bregma -1,08mm. Extraído de Uriarte et al., (58).

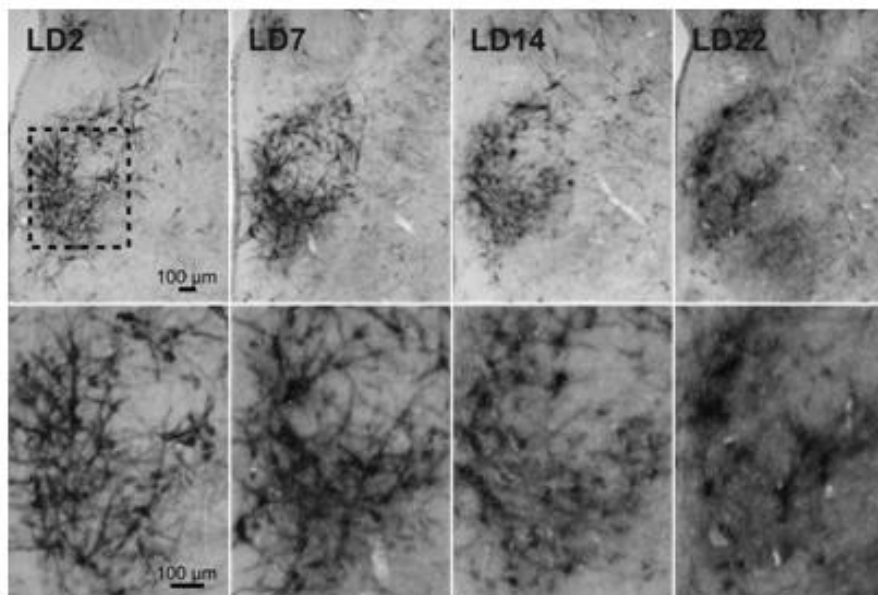


Figura 2: Desensamblado de las RPNs en el APOm durante los días de lactancia (LD) 2 a 22, obtenidas a partir de la reacción histoquímica a la lectina de *Wisteria Floribunda*. Se muestra a menor aumento (arriba), y a mayor aumento de la región encerrada en el cuadrado (abajo). Bregma -1,08mm. Extraído de Uriarte et al., (58).

Dados estos antecedentes, la técnica de disgregación de las RPNs a través de la enzima Condroitinasa ABC puede ser valiosa para determinar el rol que cumplen las RPNs del APOm descritas por Ferreño (57) y Uriarte et al. (58) durante la gestación, en el comportamiento maternal.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPÓTESIS

Las evidencias recién mencionadas indican que:

- El APOm es un área clave en la regulación de la conducta maternal.
- En el APOm, las RPNs se ensamblan y alcanzan su máxima expresión durante la gestación y se desensamblan durante la lactancia.
- Las RPNs han sido involucradas en procesos de plasticidad facilitando la consolidación de los circuitos neurales.

Según estos antecedentes, nos planteamos la siguiente hipótesis: *la organización de las RPNs en el APOm durante la gestación contribuye a la expresión del comportamiento maternal luego del parto.*

OBJETIVO

Explorar el rol de las redes perineuronales en el área preóptica media sobre el comportamiento maternal de la rata.

Objetivos específicos

- Poner a punto el uso de un método farmacológico para disgregar las redes perineuronales en el área preóptica media de la rata gestante.
- Determinar el efecto de la disgregación de las redes perineuronales en el área preóptica media sobre el comportamiento maternal de la rata.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Experimento I: disgregación de las RPNs y comportamiento maternal

Para abordar el objetivo planteado, diseñamos un experimento que consistió en disgregar las RPNs del APOm en gestación, a través de una inyección intracerebral de la enzima Condroitinasa ABC (Ch-ABC), y evaluar la conducta maternal en día 1-2 postparto a través de una prueba comportamental. La inyección se realizó en día 15-18 de gestación dado el patrón temporal de expresión de las RPNs en esta área ya mencionado. Para evidenciar la disolución de estos componentes en el área de estudio, inmediatamente concluido el registro comportamental se obtuvieron los cerebros para realizar la detección citoquímica de las RPNs (Figura 3).

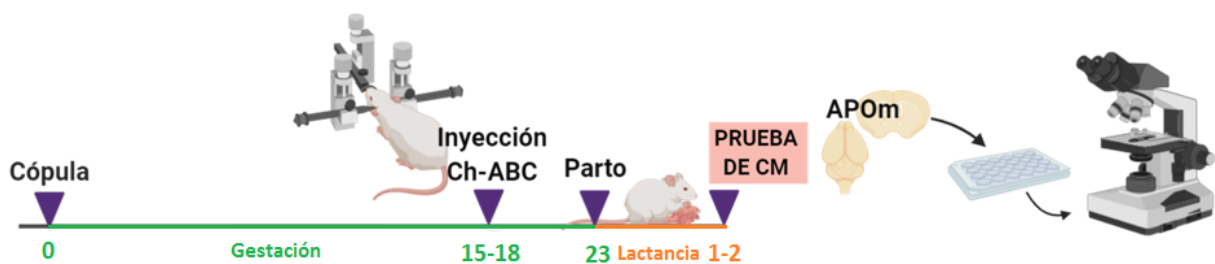


Figura 3. Esquema del protocolo experimental utilizado en el Experimento I. En este experimento se realizó una inyección intracerebral de la enzima condroitinasa ABC (ch-ABC) en día 15-18 de gestación de la rata, y en día 1-2 de lactancia se realizó una prueba de comportamiento maternal (CM), e inmediatamente después se colectó el cerebro, se procesó en vibrátomo para obtener cortes del APOm y se realizó una técnica citoquímica para detectar las RPNs.

Grupos experimentales

- a) Ratas gestantes no inyectadas (n=5)
- b) Ratas inyectadas con solución salina estéril en APOm, en día 15-18 de gestación (n=7)
- c) Ratas inyectadas con Condroitinasa-ABC en APOm, en día 15-18 de gestación (n=5)

Experimento control de la Ch-ABC en corteza cerebral

Dado que no existen antecedentes del efecto de la Ch-ABC en el APOm, previo al Experimento I realizamos un experimento control que consistió en inyectar la enzima en la corteza cerebral, donde la mayoría de los trabajos reportan su uso, y así asegurar su correcto funcionamiento. Estos experimentos se realizaron con ratas no gestantes.

Grupos experimentales

- a) Ratas no inyectadas (n=2)
- b) Ratas inyectadas con Ch-ABC en corteza (n=2)

Experimento II: expresión de las RPNs a 24 horas de ser tratadas con Ch-ABC

Concluido el Experimento I y dados los resultados obtenidos, nos preguntamos si es posible que las RPNs se re-ensamblen en el tiempo transcurrido entre la inyección y la colecta del cerebro del animal. Para evaluarlo, nos planteamos un segundo experimento en el cual inyectamos Ch-ABC en el APOm durante la gestación, al igual que en el Experimento I. Sin embargo, en este segundo experimento, los cerebros fueron colectados el día siguiente a la inyección, de modo de evaluar la expresión de las RPNs del APOm a las 24 horas de ser disgregadas con la enzima (Figura 4).

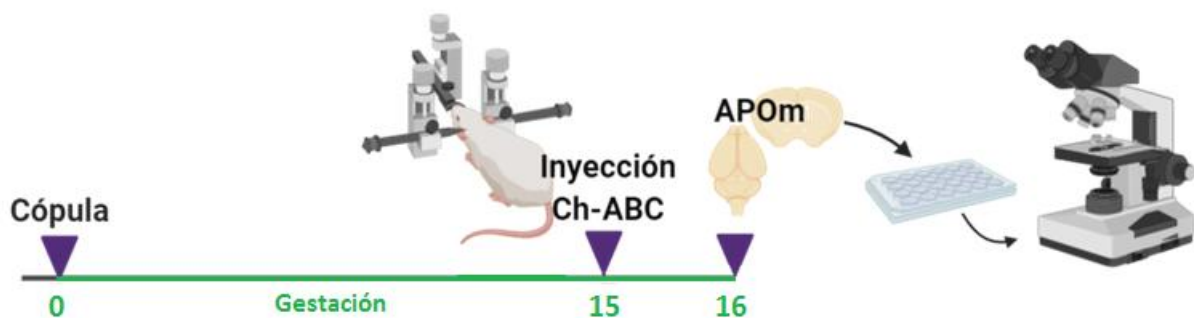


Figura 4. Esquema del protocolo experimental correspondiente al Experimento II. En este experimento se realizó una inyección intracerebral de la enzima condoritinasa ABC (ch-ABC) en día 15 de gestación y 24 horas más tarde se colectó el cerebro, se procesó en vibratómetro para obtener cortes del APOm y se realizó una técnica citoquímica para detectar las RPNs.

Grupos experimentales

- a) Ratas gestantes no inyectadas (n=4)
- b) Ratas inyectadas con solución salina estéril en APOm, en día 15 de gestación (n=3)
- c) Ratas inyectadas con Condroitinasa-ABC en APOm, en día 15 de gestación (n=4)

Para estos tres experimentos, se aplicó el mismo protocolo de cirugía estereotáxica, de perfusión y colecta de los cerebros, y de detección de las RPNs. Estos pasos se detallan a continuación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ratas (*Rattus norvegicus*, cepa Wistar) hembras criadas en el Laboratorio de Experimentación Animal (LEA) de Facultad de Ciencias. Las mismas estuvieron bajo temperatura (22°C) y humedad (65%) constante, con un ciclo de luz-oscuridad 12:12, y tuvieron acceso libre a agua y ración. El protocolo experimental en el cual se enmarca este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de Experimentación Animal (Nº exp.240011-001 541-17).

Para obtener hembras gestantes (90 días de edad), las mismas fueron sincronizadas por monitoreo del ciclo estral y en proestro se las colocó junto a un macho con experiencia sexual durante una noche. Se confirmó la cópula a la mañana siguiente por la presencia de espermatozoides en un frotis vaginal, estableciendo ese día como día 1 de gestación.

Administración del fármaco

Previo a la inyección, los animales fueron anestesiados vía inyección intraperitoneal (75 mg/kg de Ketamina, 7,5 mg/kg de Xilacina y 1,5 mg/kg de Acedan) y fijados en el aparato de estereotaxia (Kopf Instruments). El volumen de las inyecciones de ch-ABC (Sigma) o vehículo (solución salina estéril) fue de 0,5-1µl por hemisferio, a una dosis de 2U/µl y una velocidad de 0,25µl/min, con una jeringa Hamilton NeuroSyringe de 2µl. Luego de la inyección, la jeringa se mantuvo en el sitio por 3 minutos para permitir la difusión de la enzima. Luego de la cirugía, se

administró a los animales analgésico (1 ml/kg a 1 mg/ml de Metacam) vía inyección subcutánea y se aplicó antibiótico y antiinflamatorio local (Crema 6A).

Para el experimento control de la enzima en la corteza cerebral, las coordenadas de inyección fueron las siguientes: AP: -0,8 mm de bregma; ML: +1,5 mm de la línea media; y DV: -1,5 mm de la superficie craneal (Figura 5). Para los Experimento I y II, las inyecciones se realizaron en el día 15-18 de gestación, momento en que las RPNs comienzan a ensamblarse en el APOm (57,58). Las coordenadas, fijadas de acuerdo a la literatura (15) y a datos previos de nuestro laboratorio, fueron: AP: -0,8 mm de bregma; ML: $\pm 0,5$ mm de la línea media; y DV: -8,5 mm de la superficie craneal (Figura 5).

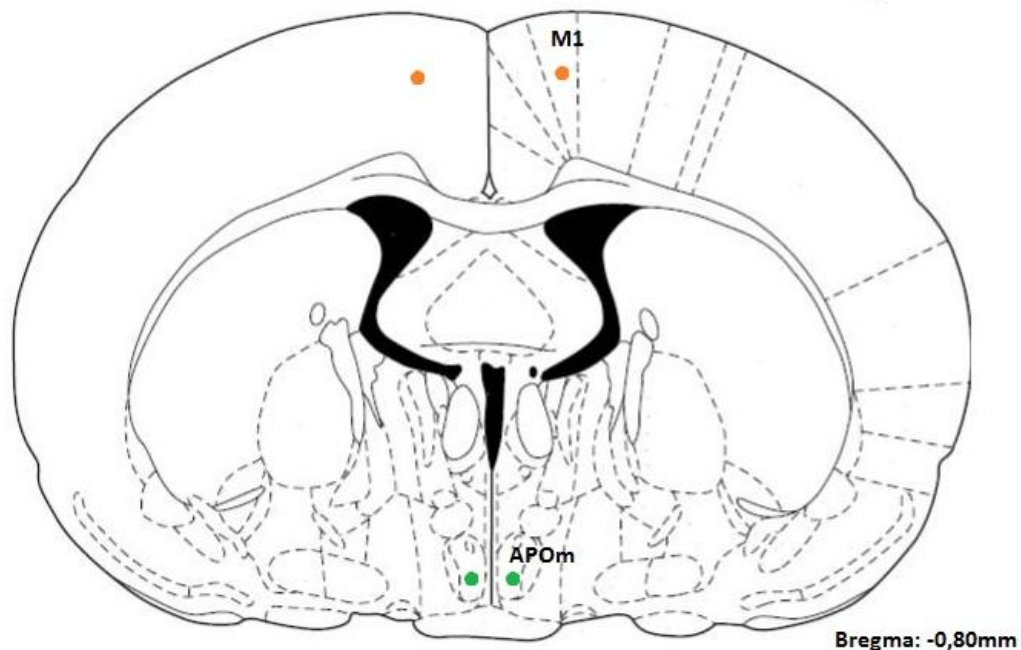


Figura 5: Sitios de inyección del Experimento control en corteza (naranja) y de Experimentos I y II (verde). (M1: corteza motora primaria; APOm: área preóptica media). Modificado de Paxinos y Watson (69).

Monitoreo postcirugía

Luego de la cirugía, los animales fueron monitoreados continuamente, y en los animales del Experimento I se monitoreó el parto, se cuantificó el número de crías, la proporción de hembras/machos, el peso y el estado fisiológico.

Prueba de comportamiento maternal

En el Experimento I, se realizó una prueba de comportamiento maternal en día 2 de lactancia. Previo a la misma, se retiró a la camada y se re-introdujo luego de transcurridos diez minutos. Durante 30 minutos se registró mediante observación continua el número de los siguientes componentes activos de la conducta maternal: acarreo de las crías al nido, rearreglos de las crías en el nido, lamido corporal y anogenital, olfateos, y construcción de nido. También se registró la duración de dos componentes pasivos: hover over (tiempo en que la madre está sobre sus crías) y amamantamiento. Las latencias del primer acarreo y de la reunión de toda la camada en el nido también fueron registradas.

Colecta y procesamiento de encéfalos

Para este paso, los animales fueron anestesiados con tiopental sódico (100 mg/kg, i.p.) y se perfundieron de forma transcardíaca con buffer fosfato salino (PBS) heparinizado, seguido de solución de paraformaldehído al 4%. Los cerebros extraídos fueron posfijados por 24hs en la misma solución. Posteriormente fueron procesados en vibrátomo para obtener cortes de 40µm, y conservados en PBS + Azida al 0,02% hasta el siguiente paso.

Verificación de la degradación de las RPNs

Para confirmar la localización del sitio de inyección y el éxito de la degradación de las RPNs, los cortes obtenidos de las secciones cercanas a APOm se procesaron para detectar la reactividad a la lectina de *Wisteria floribunda aglutinina* (WFA) biotinilada (SIGMA L1516, USA). Ésta reconoce la N-acetilgalactosamina de las cadenas de azúcar presentes en la mayoría de las RPNs (38).

La técnica histoquímica mencionada consiste en los siguientes pasos: lavar las secciones en PBS para remover el medio en el que estaban embebidas y bloquear las peroxidasas endógenas por 20 minutos en etanol (100%) y 0,3% H₂O₂. Posteriormente, volver a lavar en PBS y bloquear los sitios de unión inespecíficos en solución de PB, 0,2% tritón x100 y 3% BSA. Volver a lavar en PBS, e incubar en solución avidina-biotina peroxidasa, ABC kit (*Vector Lab*). Por último, lavar y revelar con el sistema 3,3'-diaminobenzidina, DAB kit (*SIGMAFAST With Metal Enhancer*).

Los cortes se analizaron utilizando un microscopio Nikon Eclipse E400 junto a una cámara digital Micrometrics 319CU CMOS 3.2 Megapixel, con la cual se obtuvieron las imágenes de

APOm y corteza cerebral. El grado de expresión de las RPNs se analizó de forma cualitativa y se clasificó en tres categorías (0=expresión nula o mínima; 1=expresión moderada; 2=expresión máxima).

Este paso se realizó en el Dpto. de Histología y Embriología de la Facultad de Medicina.

Análisis estadístico de los datos comportamentales

Puesto que los datos comportamentales no suelen seguir una distribución normal, se utilizaron métodos estadísticos no paramétricos para su análisis. Las comparaciones entre los tres grupos independientes se realizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis y las comparaciones a posteriori entre dos grupos se realizaron con la prueba de U de Mann Whitney. Los datos se expresaron como medianas (rango semi-intercuartil: RSIQ).

RESULTADOS

Control de la acción de la enzima Condroitinasa ABC en corteza

El tratamiento con Ch-ABC produjo una marcada degradación de las RPNs que se extiende desde el sitio de inyección a toda el área cortical presente en las rodajas de cerebro analizadas (Tabla 1, Figura 7).

Tabla 1. Proporción de ratas con expresión mínima-nula (-), moderada ($\pm$), o máxima (+) de RPNs en la corteza cerebral, para ratas no inyectadas, e inyectadas con Ch-ABC.

Expresión de las RPNs en APOm	-	$\pm$	+
No inyectada	0/2	0/2	2/2
Ch-ABC	2/2	0/2	0/2

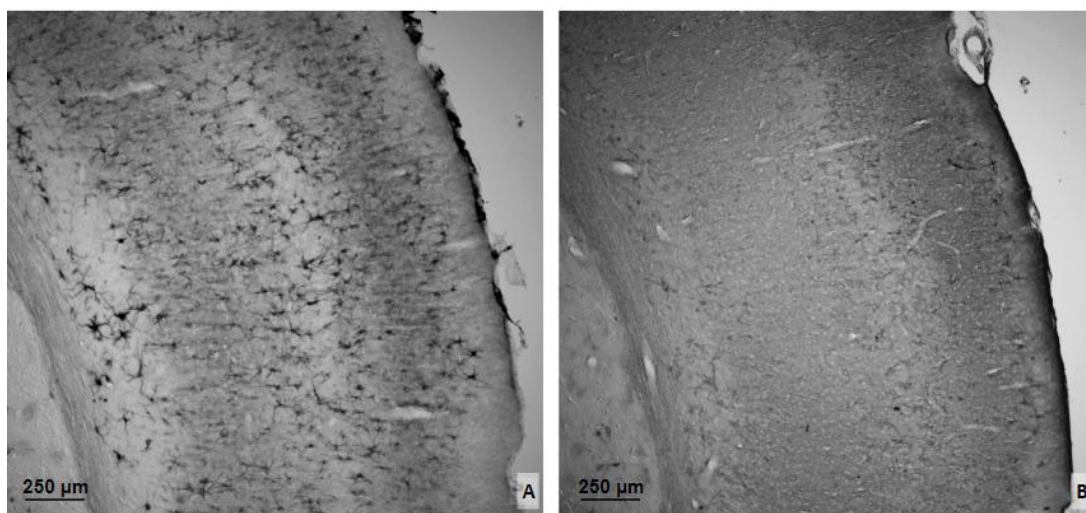


Figura 7. Imágenes representativas de la expresión de las RPNs en la corteza cerebral de ratas no inyectadas (A) e inyectadas con Ch-ABC (B). Para detectar las RPNs se realizó la reacción histoquímica a la lectina de *Wisteria Floribunda*.

Experimento I

Expresión de las RPNs en el APOm en día 2 postparto

Las RPNs se expresaron en el toda el APOm en las ratas no inyectadas, en las ratas inyectadas con vehículo, y en una de las ratas inyectadas con Ch-ABC (Tabla 2, Figura 8). Sin embargo, 4 de 5 ratas inyectadas con esta enzima, presentaron un nivel moderado de expresión con respecto a las ratas controles (Tabla 2, Figura 8).

Tabla 2. Proporción de ratas con expresión mínima-nula (-), moderada ($\pm$), o máxima (+) de RPNs en el APOm, para ratas no inyectadas, inyectadas con vehículo y con Ch-ABC en día 15-18 de gestación, y perfundidas en día 2 de lactancia.

Expresión de las RPNs en APOm	-	$\pm$	+
No inyectada	0/5	0/5	5/5
Vehículo	0/7	0/7	7/7
Ch-ABC	0/5	4/5	1/5

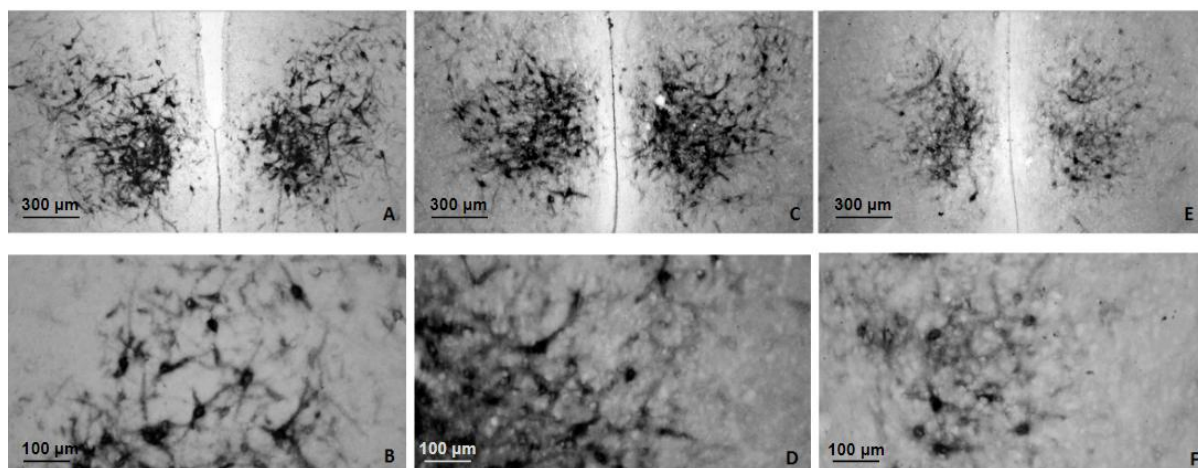


Figura 8. Imágenes representativas de la expresión de las RPNs en el APOM de ratas en día 2 postparto no inyectadas (A,B), inyectadas con vehículo (C,D) y con Ch-ABC (E,F) en día 15-18 de gestación. Para detectar las RPNs se realizó la reacción histoquímica a la lectina de *Wisteria Floribunda*

Comportamiento maternal y características de la camada

Para evaluar el comportamiento maternal asociado a la disminución de las RPNs en el APOM de las ratas inyectadas con Ch-ABC, excluimos del análisis la rata en la que los niveles no variaron con respecto a las ratas controles.

En cuanto a los componentes activos del comportamiento maternal analizados, se encontró una diferencia significativa para lamidos anogenitales entre madres inyectadas con vehículo y con ch-ABC (Figura 9, $p=0,03$, prueba U de Mann-Whitney).

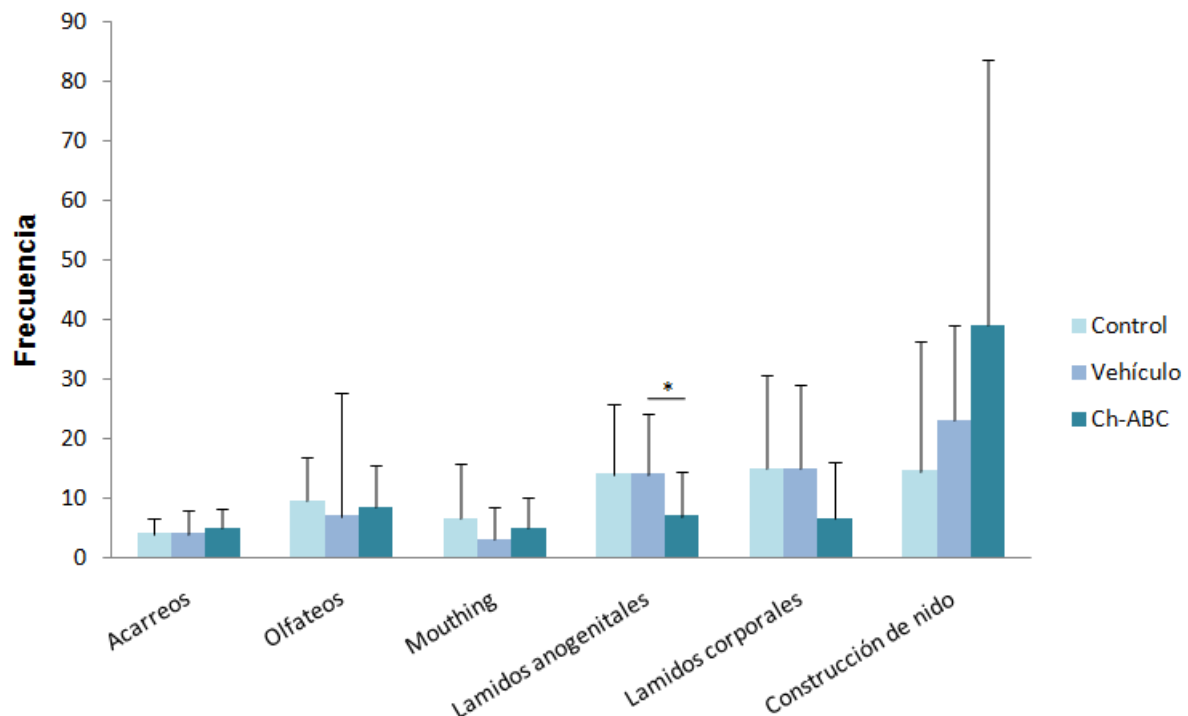


Figura 9. Número de componentes activos del comportamiento materno en día 2 postparto (acarreo, olfateo, mouthing, lamidos corporales y anogenitales, construcción del nido) durante 30 minutos, de las madres control, inyectadas con vehículo, y con ch-ABC. Los datos se expresan como medianas (RSIQs), * $p=0,03$ Ch-ABC vs. Vehículo, prueba U de Mann-Whitney.

En cuanto a los componentes pasivos, se halló una diferencia significativa para hover over entre madres inyectadas con vehículo y con ch-ABC (Tabla 3, $p=0,03$, prueba U de Mann-Whitney). No se encontraron diferencias significativas para amamantamiento entre los grupos experimentales (Tabla 3).

Tabla 3. Tiempo (s) invertido en hover over y amamantamiento en día 2 postparto por las madres controles, inyectadas con vehículo, y con ch-ABC.

Tiempo (s)	No inyectada	Vehículo	Ch-ABC
Hover Over	548 (496)	696 (666)	0 (60) *
Amamantamiento	168 (237)	119 (452)	0 (0)

Los datos se expresan como medianas (RSIQs), * $p=0,03$, Ch-ABC vs. Vehículo, prueba U de Mann-Whitney.

Por otro lado, la latencia al primer acarreo así como la frecuencia de otros comportamientos no variaron significativamente entre los tres grupos experimentales (Tabla 4 y 5).

De forma interesante, la latencia de la reunión de toda la camada en el nido (RTCN) de madres inyectadas con Ch-ABC aumentó significativamente con respecto a madres no inyectadas

(Tabla 4, $p=0,03$, prueba U de Mann-Whitney) e inyectadas con vehículo (Tabla 4, $p=0,01$, prueba U de Mann-Whitney).

Tabla 4. Latencia (s) al primer acarreo y a la reunión de toda la camada en el nido (RTCN), de madres controles, inyectadas con vehículo, y con ch-ABC.

Tiempo (s)	No inyectada	Vehículo	Ch-ABC
Latencia acarreo	10 (9,8)	9 (21)	11 (9)
Latencia RTCN	225 (179)	280 (366)	1157 (780) * #

Los datos se expresan en medianas (RSIQs). * $p=0,03$ Ch-ABC vs. No inyectadas, # $p=0,01$ Ch-ABC vs. Vehículo, prueba U de Mann-Whitney.

Tabla 5. Frecuencia de otros comportamientos (alimentación y acicalamiento) de madres controles, inyectadas con vehículo, y con ch-ABC.

Frecuencia	No inyectada	Vehículo	Ch-ABC
Alimentación	4 (6)	3 (4)	3 (6)
Acicalamiento	21 (24)	22 (20)	16 (12)

Los datos se expresan en medianas (RSIQs).

Con respecto al parto, todas las ratas parieron en el día 23 de gestación, y las características de la camada (número de crías, peso por cría, y proporción hembra/macho), tampoco variaron entre los grupos (Tabla 6). Estas variables fueron medidas en el día 2 postparto.

Tabla 6. Características de la camada en día 2 postparto (número de crías, peso por cría, y proporción de hembras/machos), de madres controles, inyectadas con vehículo, y con ch-ABC.

	No inyectada	Vehículo	Ch-ABC
N° de crías	14 (7,5)	16 (10)	12 (7,9)
Peso por cría (g)	7,9 (5,3)	7,7 (4,4)	6,9 (4,0)
Hembras/Machos	1,25 (1,25)	1,4 (1,1)	1,1 (0,7)

Los datos se expresan en medianas (RSIQs).

Experimento II

Con respecto a la expresión de las RPNs en el APOm a las 24 horas de la inyección, se observó que tanto las ratas inyectadas con vehículo como no inyectadas, presentaron RPNs en todo el APOm, y no parece haber diferencias en su nivel de expresión (Tabla 7, Figura 10). En cambio, se observó que las mismas fueron disueltas en gran medida o completamente al ser tratadas con ch-ABC (Tabla 7, Figura 10).

Tabla 7. Proporción de ratas con expresión mínima-nula (-), moderada ($\pm$), o máxima (+) de RPNs en el APOm, para ratas no inyectadas, inyectadas con vehículo y con Ch-ABC en día 15 de gestación, y perfundidas 24 horas luego.

Expresión de las RPNs en APOm	-	$\pm$	+
No inyectada	0/4	0/4	4/4
Vehículo	0/3	0/3	3/3
Ch-ABC	4/4	0/4	0/4

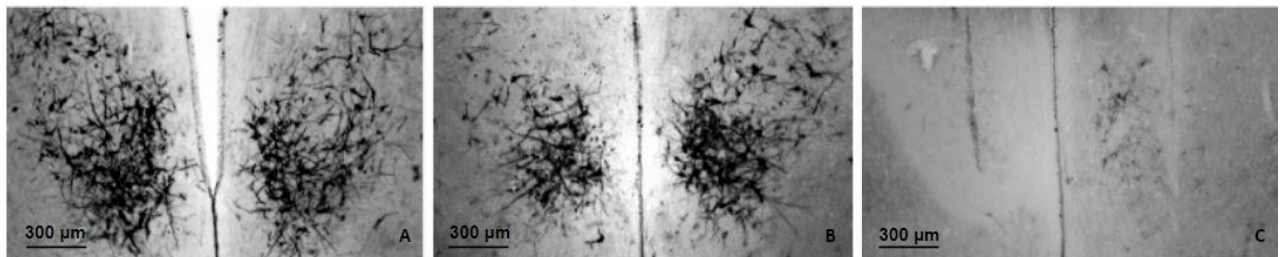


Figura 10. Imágenes representativas de la expresión de las RPNs en día 16 de gestación en el APOm de ratas no inyectadas (A), inyectadas 24 horas antes con vehículo (B) y con Ch-ABC (C). Para detectar las RPNs se realizó la reacción histoquímica a la lectina de *Wisteria Floribunda*

DISCUSIÓN

Dada la dinámica temporal de la expresión de las redes perineuronales en el área preóptica media durante la gestación y el postparto temprano (57,58), y teniendo en cuenta el rol que juega esta área en la plasticidad de la conducta maternal (15,32-34), en este trabajo nos planteamos el objetivo de explorar el rol de estas estructuras en el comportamiento maternal de la rata. Para abordar este objetivo, se empleó una técnica de disgregación de las RPNs en el

APOm mediante la inyección intracerebral de la enzima condroitinasa-ABC, que fue puesta a punto por primera vez en este trabajo.

Efecto de la administración de la Ch-ABC en la corteza cerebral

La enzima Condroitinasa ABC degrada las redes perineuronales cortando la unión entre las cadenas de glicosaminoglicanos y el condroitín sulfato (39). Esta técnica, ha sido utilizada para explorar el rol de las RPNs en distintos procesos neurales. Estos estudios se han centrado principalmente en la corteza cerebral, y en algunas otras áreas subcorticales (40,43,44,48-52,55). Por esta razón, decidimos comprobar el correcto funcionamiento de esta enzima en la corteza, previo a emplearla en el APOm, donde hasta el momento su acción era desconocida.

Las RPNs se disolvieron completamente en las ratas inyectadas con Ch-ABC, y de forma interesante, la disolución alcanzó zonas corticales distales al sitio de inyección. Un resultado similar se observó en Romberg et al., (51), sugiriendo un alto poder de difusión de esta enzima. Sin embargo, sabiendo que el poder de difusión de una molécula en el espacio extracelular depende de su cercanía a las células (59), y que probablemente la densidad neuronal sea diferente en el APOm, la difusión de esta enzima podría variar entre estas áreas.

Disgregación de las RPNs en el APOm y comportamiento maternal

Dado que las RPNs parecen jugar un rol en la consolidación de los circuitos neurales (38), nos preguntamos si degradarlas durante su ensamblaje en una de las áreas implicadas en el circuito maternal, podría afectar esta conducta. Considerando que las redes comienzan a ensamblarse en día 10 y alcanzan su máxima expresión en día 21 de gestación (57,58), elegimos administrar la enzima dentro de este período. No obstante, entre los días 15 y 18 de gestación, el grado de expresión de las RPNs en el APOm aumenta (57,58), y por ende, el volumen requerido para disolverlas podría ser diferente. Por este motivo, inyectamos dos volúmenes -0,5 y 1µl por hemisferio-, determinados en base a trabajos donde emplean esta enzima en núcleos subcorticales de tamaños similares al del APOm (52,55), pero dado que los resultados obtenidos fueron similares, agrupamos los datos en un solo grupo.

Los resultados mostraron que las ratas inyectadas con ch-ABC, excepto una, presentaron un menor nivel de RPNs que las ratas controles en toda el APOm. El hecho de que una de ellas no presente tal disminución es probable que sea debido a un error experimental en el momento de inyección. Al perfundir y extraer el cerebro del animal, se halló un coágulo de sangre entre el cráneo y el mismo, lo que sugiere una obstaculización por hemorragia al momento de introducir la jeringa, impidiendo administrar eficazmente la enzima en el tejido.

Por otro lado, para que el volumen de inyección *per se* no dañara el tejido, se eligió una menor velocidad de inyección y la jeringa se dejó en el sitio más tiempo que lo reportado en otros trabajos en áreas de tamaño similar (52). Como muestran los resultados, no parece haber diferencias de expresión de las RPNs entre ratas no inyectadas e inyectadas con vehículo, y el tejido parece haberse conservado en buen estado en los tres grupos experimentales. Esto asegura que la manipulación *per se* no alteró la expresión de las RPNs.

Con respecto a los resultados comportamentales, se observó que las ratas tratadas con Ch-ABC realizaron menos lamidos anogenitales y pasaron menos tiempo en hover over que las madres inyectadas con vehículo. Estas dos medidas, constituyen componentes importantes para el desarrollo de las crías. Los lamidos anogenitales, limpian y promueven la eliminación de residuos (1), pero también permiten a la madre recuperar agua y electrolitos gastados mientras cuida de sus crías (60). Asimismo, la estimulación táctil que reciben las crías mientras su madre las lame tiene importantes efectos en el desarrollo emocional, sexual y endócrino de las crías. Se ha reportado que un aumento en la cantidad de lamidos recibidos por las crías reduce conductas de miedo y altera la función reproductiva de las crías en la adultez (4,6,61). En cuanto al hover over, que refiere a la posición de la madre sobre las crías, es una medida indirecta del grado de interacción entre madre-cría, dado que en esta postura la madre también realiza otras actividades, como lamer a sus crías (1). Parece coherente entonces, que los lamidos anogenitales hayan sido menores en madres con Ch-ABC si también lo fue la duración de esta postura. Este componente maternal cumple además la importante función de mantener la temperatura de las crías y dar acceso al amamantamiento (62). Por este motivo, una disminución en esta postura podría tener como consecuencia un menor desarrollo de las crías. En este sentido, si bien no varió de forma significativa entre grupos, resulta interesante que las ratas inyectadas con Ch-ABC no hayan amamantado a sus crías en el tiempo que duró la prueba comportamental. Realizar más experimentos nos permitirá evaluarlo.

De forma inesperada, los lamidos anogenitales y el hover over, no variaron entre madres inyectadas con ch-ABC y madres no inyectadas, probablemente debido al reducido número de animales utilizados.

Por otra parte, el tiempo que tarda la madre en acarrear todas las crías en el nido -latencia RTCN-, es considerada clave en la respuesta maternal en ratas (9) y es un comportamiento complejo que involucra procesamiento cognitivo, ya que la madre debe reconocer a su cría, moverse hacia ella, recogerla, y recordar el lugar del nido para depositarla (1). Dado que las RPNs de las ratas inyectadas con Ch-ABC en el APOm no se vieron alteradas en corteza (datos no mostrados), es posible que el aumento de esta variable en este grupo se deba principalmente a aspectos motivacionales de la madre hacia las crías (1). Si bien la

introducción de la jeringa en el cerebro para inyectar en el APOm lesiona inevitablemente la corteza, esta manipulación no afectó el comportamiento de los animales, dado que la latencia de la RTCN, así como otros comportamientos no maternos, no variaron entre ratas inyectadas con vehículo y no inyectadas.

Tampoco se encontraron diferencias significativas en el parto y características de la camada, como el número de crías, el peso, y la proporción de hembras/machos en la camada entre los grupos experimentales.

Estos resultados sugieren que la manipulación farmacológica empleada es específica de la conducta materna, ya que otros comportamientos como la alimentación y acicalamiento no se vieron afectados. Asimismo, indican que las diferencias encontradas en algunos componentes maternos no se deben a daños motores o cognitivos.

Cabe destacar que en el laboratorio, es la primera vez que se realiza una cirugía intracerebral en gestación, y tan cercana al parto. Teniendo esta consideración, los resultados obtenidos presentan gran valor al demostrar que dicha manipulación es viable, no afecta el desarrollo de las crías en el útero o el parto en sí mismo, y puede ser incorporada a las técnicas experimentales utilizadas en el laboratorio.

Basándonos en estos resultados, en la expresión de las RPNs del APOm durante la gestación (57,58), y su rol en la consolidación de los circuitos neurales (38), podemos proponer que la degradación de estas estructuras estaría impidiendo que el circuito materno se consolide correctamente. En este sentido, sería interesante conocer el fenotipo de las neuronas rodeadas por las RPNs en el APOm para entender mejor los mecanismos que regulan esta conducta. En la corteza cerebral, la mayoría de las neuronas envueltas por RPNs son GABAérgicas (44). En el APOm, se sabe que las RPNs no rodean a todas las neuronas sino a una subpoblación de esta área (58). Aunque el APOm es un área compleja y heterogénea que contiene diferentes tipos celulares (21,65), Tsuneoka et al., (65) observaron que en el comportamiento materno del ratón, las neuronas que expresan c-FOS en APOm son principalmente inhibitorias GABAérgicas. Fang et al., (66) por otro lado, reportaron que las neuronas GABAérgicas responsables de algunas conductas maternas, expresan receptores de estrógeno. Se sabe a su vez que el estrógeno, puede incrementar la liberación y síntesis de GABA (67,68). Teniendo en cuenta el rol de las hormonas esteroideas de la gestación en la expresión de las RPNs del APOm (58), junto a estos antecedentes, es posible plantear que las neuronas de APOm envueltas por las RPNs son neuronas inhibitorias GABAérgicas. Esto puede determinarse realizando una inmunodetección para marcar la enzima que cataliza la descarboxilación de glutamato en GABA (GAD67: glutamato descarboxilasa) junto a la detección de RPNs con WFA.

Teniendo en cuenta la varianza interindividual que existe en el comportamiento maternal (5), es importante destacar que el número de ratas en cada grupo experimental es mínimo, y será ampliado más adelante. Es posible que con una muestra mayor, surjan otras diferencias entre las ratas inyectadas con la enzima y las controles. De este experimento podemos concluir, hasta ahora, que una disminución en la expresión de las RPNs del APOm durante la gestación afecta algunos componentes maternos en postparto temprano.

Análisis temporal de las RPNs en APOm

El hecho de que las RPNs, aunque de forma moderada, estuviesen presentes en las ratas inyectadas con ch-ABC, puede deberse a que la Ch-ABC no logró disolverlas completamente, o a que las mismas se disolvieron y volvieron a formarse en el período de tiempo entre la inyección y la perfusión del animal. A partir de los resultados en el Experimento II, en el cual los animales fueron perfundidos 24 horas luego de ser inyectados, podemos interpretar que las RPNs expresadas en el APOm de ratas inyectadas con ch-ABC y perfundidas en día 1-2 postparto, corresponden a un re-ensamblado.

Este resultado es interesante si se tiene en cuenta el trabajo de Romberg et al. (51) en corteza, en el cual se administra un total de 0,6 μ l de Ch-ABC a una concentración de 0,05U/ μ l -cuatro veces menor a la utilizada en este trabajo-, y observa que las RPNs siguen ausentes a las dos semanas, tienen un nivel bajo de expresión a las seis semanas, y se expresan en su totalidad a las ocho semanas. En este trabajo, la dosis utilizada fue de 2U/ μ l, y se inyectó 0,5 o 1 μ l por hemisferio, y a los 7-10 días de inyección las RPNs estaban presentes. Siguiendo la hipótesis planteada, las RPNs se expresarían en gestación para jugar un rol en la consolidación del circuito maternal y de esta manera, contribuir a la correcta expresión de la conducta maternal. Entonces, el resultado recién discutido apoya esta hipótesis. Es lógico pensar que si las RPNs del APOm son importantes en este período, exista una fuerte regulación que las genere y mantenga, y una dosis aguda de Ch-ABC no sea suficiente para mantenerlas disgregadas en ese período de tiempo. En este sentido, Ferreño (57) y Uriarte et al. (58), realizaron un experimento en el cual simulan el perfil hormonal de la gestación en un tratamiento de estrógeno y progesterona en ratas ovariectomizadas, y las mismas expresan RPNs en APOm. Esta evidencia indica que los altos niveles de hormonas esteroideas de la gestación regulan el ensamblaje y mantenimiento de las RPNs en esta área, explicando por qué en nuestro trabajo, las RPNs reaparecen en un menor tiempo que el reportado por Romberg et al., (51) para corteza.

Aunque aún se desconoce en profundidad cómo se sintetizan las RPNs, Carulli et al., (45) identificaron que la síntesis neuronal de Crtl1, proteína de unión de Hialuronos y Proteoglicanos, parece ser clave en su formación. A su vez, los animales que carecen de esta proteína, generan proteoglicanos de condroitín sulfato esparcidos difusamente más que concentrados en RPNs, rodeando únicamente los somas pero no las dendritas (45). Esta evidencia parece corresponder a la forma en que toman las RPNs en las ratas tratadas con Ch-ABC en el Experimento I. Podríamos hipotetizar que en el APOm durante la gestación, esta proteína no se sintetiza de forma suficiente en el período de tiempo estudiado. Esto explicaría por qué la morfología de las RPNs re-ensambladas difieren en forma con respecto a las controles. Podríamos comprobar esta hipótesis realizando una inmunohistoquímica que detecte la expresión de esta proteína.

CONCLUSIONES

En este trabajo se logró poner a punto una técnica nueva y compleja, que disuelve las RPNs del APOm de la rata mediante una inyección intracerebral de la enzima ch-ABC -hasta ahora no empleada en esta área-, en un período crítico y delicado como es la gestación. En este trabajo se incluyeron los datos de madres inyectadas entre los días 15 y 18 de gestación, pero es interesante mencionar que también se inyectaron animales 48 horas previas al parto, y tanto la recuperación como el parto fueron exitosos. A partir de este trabajo, esta técnica es una herramienta más del laboratorio, que permite explorar las bases neurobiológicas de la gestación.

Los resultados indican que tras una inyección aguda de Ch-ABC en gestación, las RPNs del APOm son degradadas y vuelven a ensamblarse de forma más rápida que lo reportado por otros autores en corteza, probablemente mediado por el perfil hormonal característico de este período. Este fenómeno es suficiente para afectar algunos componentes importantes de la conducta maternal en los primeros días postparto, sugiriendo fuertemente que las RPNs del APOm en la gestación, juegan un rol facilitador de la conducta maternal.

PERSPECTIVAS

En primer lugar, es importante mencionar que este trabajo muestra datos preliminares dado el bajo número de animales. Posteriormente, incorporaremos más animales, y se realizará una cuantificación del grado de expresión de las RPNs en APOm, que podrá correlacionarse con el comportamiento maternal. En este trabajo, el grado de expresión de las RPNs se clasificó cualitativamente en base a la observación. Para realizar la cuantificación, las imágenes serán analizadas mediante el software *ImageJ*, se transformarán a 8 bits en escala de grises y de píxeles a micrómetros. Se fijará la región de interés tomando el contorno que incluye la extensión de la señal detectada, y luego se realizarán comparaciones estadísticas mediante ANOVA, seguido del test post hoc Tukey, tal como lo hicieron Ferreño (57) y Uriarte et al., (58).

En segundo lugar, sería valioso caracterizar la dinámica temporal del re-ensamblado de las RPNs del APOm, como lo hizo Romberg et al., (51) para la corteza cerebral. Conociendo cuánto tiempo demoran en reaparecen las RPNs luego de ser degradadas con la enzima, podríamos realizar un mejor análisis de los resultados del Experimento I. Si las RPNs, tardasen una semana en re-armarse, entonces las redes observadas en el APOm se habrían re-ensamblado en postparto, y habrían estado ausente durante la gestación. Si en cambio, estas estructuras se rearmen a las 48 horas de la inyección con Ch-ABC, indica que la ausencia de las mismas durante este tiempo es suficiente para alterar el comportamiento maternal, sugiriendo un rol aún más importante en su regulación.

Por otro lado, conocer este dato, permitirá diseñar un protocolo experimental que permita mantener ausente a las RPNs durante toda la gestación, y de esta manera, observar su efecto en el comportamiento maternal. Una posibilidad, es implantar cánulas guías en el APOm (15,57) e inyectar periódicamente Ch-ABC, de manera de evitar su re-ensamblado y evaluar el comportamiento maternal en estas condiciones. Este protocolo deberá ser puesto a punto, y presenta algunos desafíos experimentales. Por un lado, el volumen deberá ser ajustado, puesto que la inyección crónica podría tener diferentes consecuencias para el tejido que una inyección aguda. Por otro lado, se requieren más eventos de manipulación del animal en un período crítico, donde las ratas suelen presentar un mayor grado de agresividad (63,64).

Por último, dadas las evidencias anteriores que indican el rol de las neuronas GABAérgicas en el comportamiento maternal y su regulación por los esteroides gonadales, sería interesante determinar si las neuronas envueltas por las RPNs en esta área son GABAérgicas, y si las mismas expresan receptores de hormas esteroideas.

Este trabajo fue realizado en el marco del proyecto I/FVF2017/084: “Caracterización funcional de los cambios en la matriz extracelular del área preóptica media durante la lactancia en la rata.” Fondo Vaz Ferreira de Apoyo a Proyectos de Investigación, D2C2, MEC; 2017. Responsable: Natalia Uriarte.

Con los datos de este trabajo, se presentó el póster: “Organización de la matriz extracelular en el área preóptica media y comportamiento maternal de la rata (*Rattus norvegicus*)”. Pomi J., Nogueira J., Uriarte N. (2019). II Reunión de Biología del Comportamiento del Cono Sur, Montevideo, Uruguay.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ferreira, A., Agrati, D., Uriarte, N., Pereira, M., & Zuluaga, M. J. (2012). The rat as a model for studying maternal behavior. *Behavioral Animal Models. Research Signpost, Kerala*, 73-88.
2. Trumbo, S. T. (2012). Patterns of parental care in invertebrates. *The evolution of parental care*, 81-100.
3. Lonstein, J. S., Lévy, F., & Fleming, A. S. (2015). Common and divergent psychobiological mechanisms underlying maternal behaviors in non-human and human mammals. *Hormones and Behavior*, 73, 156-185.
4. Caldji, C., Tannenbaum, B., Sharma, S., Francis, D., Plotsky, P. M., & Meaney, M. J. (1998). Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(9), 5335-5340.
5. Champagne, F. A., Francis, D. D., Mar, A., & Meaney, M. J. (2003). Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. *Physiology & behavior*, 79(3), 359-371.
6. Uriarte, N., Breigeiron, M. K., Benetti, F., Rosa, X. F., & Lucion, A. B. (2007). Effects of maternal care on the development, emotionality, and reproductive functions in male and female rats. *Developmental Psychobiology: The Journal of the International Society for Developmental Psychobiology*, 49(5), 451-462.
7. Franks, B., Curley, J. P., & Champagne, F. A. (2011). Measuring variations in maternal behavior: Relevance for studies of mood and anxiety. In *Mood and Anxiety Related Phenotypes in Mice* (pp. 209-224). Humana Press.
8. 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.
9. Lonstein, J. S., & Fleming, A. S. (2002). Parental behaviors in rats and mice. *Current protocols in neuroscience*, Unit-8.
10. 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(1-2), 29-46.
11. Fahrenbach, S. E., Morrell, J. I., & Pfaff, D. W. (1984). Oxytocin induction of short-latency maternal behavior in nulliparous, estrogen-primed female rats. *Hormones and behavior*, 18(3), 267-286.
12. Numan, M., & Insel, T. R. (2003). Paternal Behavior. *The Neurobiology of Parental Behavior*, 246-267.
13. Rosenblatt, J. S. (1967). Nonhormonal basis of maternal behavior in the rat. *Science*, 156(3781), 1512-1513.
14. Wansaw, M. P., Pereira, M., & Morrell, J. I. (2008). Characterization of maternal motivation in the lactating rat: contrasts between early and late postpartum responses. *Hormones and behavior*, 54(2), 294-301.
15. 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. *Behavioural brain research*, 205(1), 238-248.
16. Pereira, M., & Morrell, J. I. (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.

17. Numan, M., & Callahan, E. C. (1980). The connections of the medial preoptic region and maternal behavior in the rat. *Physiology & behavior*, 25(5), 653-665.
18. Numan, M., McSparren, J., & Numan, M. J. (1990). Dorsolateral connections of the medial preoptic area and maternal behavior in rats. *Behavioral neuroscience*, 104(6), 964.
19. Arrati, P. G., Carmona, C., Dominguez, G., Beyer, C., & Rosenblatt, J. S. (2006). GABA receptor agonists in the medial preoptic area and maternal behavior in lactating rats. *Physiology & behavior*, 87(1), 51-65.
20. Morgan, H. D., Watchus, J. A., Milgram, N. W., & Fleming, A. S. (1999). The long lasting effects of electrical stimulation of the medial preoptic area and medial amygdala on maternal behavior in female rats. *Behavioural Brain Research*, 99(1), 61-73.
21. 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. *Journal of Comparative Neurology*, 246(3), 343-363.
22. 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 research*, 703(1-2), 191-200.
23. Shughrue, P. J., Lane, M. V., & Merchenthaler, I. (1997). Comparative distribution of estrogen receptor- α and- β mRNA in the rat central nervous system. *Journal of Comparative Neurology*, 388(4), 507-525.
24. Bakowska, J. C., & Morrell, J. I. (1997). Atlas of the neurons that express mRNA for the long form of the prolactin receptor in the forebrain of the female rat. *Journal of Comparative Neurology*, 386(2), 161-177.
25. Numan, M., Roach, J. K., del Cerro, M. C. R., Guillamón, A., Segovia, S., Sheehan, T. P., & Numan, M. J. (1999). Expression of intracellular progesterone receptors in rat brain during different reproductive states, and involvement in maternal behavior. *Brain Research*, 830(2), 358-371.
26. Champagne, F., Diorio, J., Sharma, S., & Meaney, M. J. (2001). Naturally occurring variations in maternal behavior in the rat are associated with differences in estrogen-inducible central oxytocin receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(22), 12736-12741.
27. Francis, D. D., Champagne, F. C., & Meaney, M. J. (2000). Variations in maternal behaviour are associated with differences in oxytocin receptor levels in the rat. *Journal of neuroendocrinology*, 12(12), 1145-1148.
28. Uriarte, N., Ferreira, A., Rosa, X. F., Sebben, V., & Lucion, A. B. (2008). Overlapping litters in rats: effects on maternal behavior and offspring emotionality. *Physiology & behavior*, 93(4-5), 1061-1070.
29. Dwyer, C. M. (2008). Individual variation in the expression of maternal behaviour: a review of the neuroendocrine mechanisms in the sheep. *Journal of Neuroendocrinology*, 20(4), 526-534.
30. 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. *Physiology & behavior*, 194, 430-436.
31. Meurisse, M., Gonzalez, A., Delsol, G., Caba, M., Levy, F., & Poindron, P. (2005). Estradiol receptor- α expression in hypothalamic and limbic regions of ewes is influenced by physiological state and maternal experience. *Hormones and Behavior*, 48(1), 34-43.
32. Keyser-Marcus, L., Stafisso-Sandoz, G., Gerecke, K., Jasnow, A., Nightingale, L., Lambert, K. G., ... & Kinsley, C. H. (2001). Alterations of medial preoptic area neurons following pregnancy and pregnancy-like steroidal treatment in the rat. *Brain Research Bulletin*, 55(6), 737-745.

33. 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(9), 955-961.
34. 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. *Neuroscience letters*, 484(3), 197-200.
35. Cragg, B. (1979). Brain extracellular space fixed for electron microscopy. *Neuroscience letters*, 15(2-3), 301-306.
36. Celio, M. R., & Blumcke, I. (1994). Perineuronal nets—a specialized form of extracellular matrix in the adult nervous system. *Brain Research Reviews*, 19(1), 128-145.
37. Dityatev, A., & Schachner, M. (2003). Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity. *NatureReviewsNeuroscience*, 4(6), 456.
38. Testa, D., Prochiantz, A., & Di Nardo, A. A. (2019, May). Perineuronal nets in brain physiology and disease. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 89, pp. 125-135). Academic Press.
39. Sato, N., Shimada, M., & Oda, H. (2006). *U.S. Patent No. 7,008,783*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
40. Chu, P., Abraham, R., Budhu, K., Khan, U., Garcia, N. D. M., & Brumberg, J. C. (2018). The impact of perineuronal net digestion using chondroitinase ABC on the intrinsic physiology of cortical neurons. *Neuroscience*, 388, 23-35.
41. Suttikus, A., Rohn, S., Weigel, S., Glöckner, P., Arendt, T., & Morawski, M. (2014). AggreCAN, link protein and tenascin-R are essential components of the perineuronal net to protect neurons against iron-induced oxidative stress. *Celldeath & disease*, 5(3), e11119.
42. Costa, C., Tortosa, R., Domènech, A., Vidal, E., Pumarola, M., & Bassols, A. (2007). Mapping of aggreCAN, hyaluronic acid, heparansulphate proteoglycans and aquaporin 4 in the central nervous system of the mouse. *Journal of chemical neuroanatomy*, 33(3), 111-123.
43. Liu, X., Wang, J., Li, G., & Lv, H. (2018). Effect of combined chondroitinase ABC and hyperbaric oxygen therapy in a rat model of spinal cord injury. *Molecular medicine reports*, 18(1), 25-30.
44. Pizzorusso, T., Medini, P., Berardi, N., Chierzi, S., Fawcett, J. W., & Maffei, L. (2002). Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. *Science*, 298(5596), 1248-1251.
45. Carulli, D., Pizzorusso, T., Kwok, J. C., Putignano, E., Poli, A., Forostyak, S., ... & Fawcett, J. W. (2010). Animals lacking link protein have attenuated perineuronal nets and persistent plasticity. *Brain*, 133(8), 2331-2347.
46. Fawcett, J. W. (2015). The extracellular matrix in plasticity and regeneration after CNS injury and neurodegenerative disease. In *Progress in brain research* (Vol. 218, pp. 213-226). Elsevier.
47. Bavelier, D., Levi, D. M., Li, R. W., Dan, Y., & Hensch, T. K. (2010). Removing brakes on adult brain plasticity: from molecular to behavioral interventions. *Journal of Neuroscience*, 30(45), 14964-14971.
48. Gogolla, N., Caroni, P., Lüthi, A., & Herry, C. (2009). Perineuronal nets protect fear memories from erasure. *Science*, 325(5945), 1258-1261.
49. 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. *Learning & memory*, 20(5), 267-273.

50. Banerjee, S. B., Gutzeit, V. A., Baman, J., Aoued, H. S., Doshi, N. K., Liu, R. C., & Ressler, K. J. (2017). Perineuronal nets in the adult sensory cortex are necessary for fear learning. *Neuron*, 95(1), 169-179.
51. Romberg, C., Yang, S., Melani, R., Andrews, M. R., Horner, A. E., Spillantini, M. G., ... & Saksida, L. M. (2013). Depletion of perineuronal nets enhances recognition memory and long-term depression in the perirhinal cortex. *Journal of Neuroscience*, 33(16), 7057-7065.
52. Xue, Y. X., Xue, L. F., Liu, J. F., He, J., Deng, J. H., Sun, S. C., ... & Lu, L. (2014). Depletion of perineuronal nets in the amygdala to enhance the erasure of drug memories. *Journal of Neuroscience*, 34(19), 6647-6658.
53. Horii-Hayashi, N., Sasagawa, T., & Nishi, M. (2017). 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.
54. Yang, S., Hilton, S., Alves, J. N., Saksida, L. M., Bussey, T., Matthews, R. T., ... & Fawcett, J. W. (2017). Antibody recognizing 4-sulfated chondroitin sulfate proteoglycans restores memory in tauopathy-induced neurodegeneration. *Neurobiology of aging*, 59, 197-209.
55. Pignataro, A., Pagano, R., Guarneri, G., Middei, S., & Ammassari-Teule, M. (2017). Extracellular matrix controls neuronal features that mediate the persistence of fear. *Brain Structure and Function*, 222(9), 3889-3898.
56. Hiller, K. M., Jacobs, V. R., Fischer, T., & Aigner, L. (2014). The maternal brain: an organ with peripartur plasticity. *Neural plasticity*, 2014.
57. Ferreño, M. (2018). Bases neurales y endócrinas de la flexibilidad comportamental de ratas madres. Tesis de Doctorado. Pedeciba, Biología. <http://www.bib.fcien.edu.uy/files/etd/biol/uy24-19346.pdf>
58. Uriarte, N., Ferreño, M., Méndez, & D., Nogueira, J. (en revisión). Reorganization of perineuronal nets in the medial Preoptic Area during the reproductive cycle in female rats.
59. Kihara, T., Ito, J., & Miyake, J. (2013). Measurement of biomolecular diffusion in extracellular matrix condensed by fibroblasts using fluorescence correlation spectroscopy. *PLoS One*, 8(11), e82382.
60. Gubernick, D. J., & Alberts, J. R. (1987). "Resource" exchange in the biparental California mouse (*Peromyscus californicus*): Water transfer from pups to parents. *Journal of Comparative Psychology*, 101(4), 328.
61. Moore, C. L. (1992). The Role of Maternal Stimulation in the Development of Sexual Behavior and Its Neural Basis a. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 662(1), 160-177.
62. Stern, J. M., & Johnson, S. K. (1990). Ventral somatosensory determinants of nursing behavior in Norway rats. I. Effects of variations in the quality and quantity of pup stimuli. *Physiology & behavior*, 47(5), 993-1011.
63. Mayer, A. D., & Rosenblatt, J. S. (1993). Persistent effects on maternal aggression of pregnancy but not of estrogen/progesterone treatment of non pregnant ovariectomized rats revealed when initiation of maternal behavior is delayed. *Hormones and behavior*, 27(1), 132-155.
64. Rosenblatt, J. S., Factor, E. M., & Mayer, A. D. (1994). Relationship between maternal aggression and maternal care in the rat. *Aggressive Behavior*, 20(3), 243-255.
65. 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. *Journal of Comparative Neurology*, 521(7), 1633-1663.

66. 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.
67. Herbison, A. E. (1997). Estrogen regulation of GABA transmission in rat preoptic area. *Brain research bulletin*, 44(4), 321-326.
68. Curran-Rauhut, M. A., & Petersen, S. L. (2002). Regulation of glutamic acid decarboxylase 65 and 67 gene expression by ovarian steroids: identification of two functionally distinct populations of GABA neurons in the preoptic area. *Journal of neuroendocrinology*, 14(4), 310-317.
69. Paxinos, G., & Watson, C. (1997). Atlas of anatomy of rat brain. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 3rd San Diego, Calif. Academic Press Inc.