



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



PEDECIBA Biología, Subárea Neurociencias

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas

Expresión de las redes perineuronales del área preóptica media y su rol en el comportamiento maternal de la rata.

Lic. Julieta Pomi

Orientadores: Dres. Natalia Uriarte y Javier Nogueira

**Laboratorio de Neurociencias, Facultad de Ciencias, Udelar
Departamento de Histología y Embriología, Facultad de Medicina, Udelar**

Montevideo, 2024

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	3
RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	5
Comportamiento maternal	5
La rata como modelo para el estudio del comportamiento maternal	5
Regulación neuroendócrina de la conducta maternal	6
El papel del área preóptica media	8
Redes perineuronales de la matriz extracelular	8
Rol de las redes perineuronales en procesos de neuroplasticidad	11
Redes perineuronales durante el ciclo reproductivo	12
Redes perineuronales y comportamiento maternal	13
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA e HIPÓTESIS	14
Hipótesis general:	14
Objetivos generales:	14
Objetivos específicos:	15
CAPÍTULO I: Dinámica temporal de re-ensamblado de las PNN en el APOm luego de la administración de ChABC.	16
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	16
MATERIALES Y MÉTODOS	17
Grupos experimentales	17
Animales	17
Implante de cánulas guía	17
Administración del fármaco	18
Obtención y procesamiento de los encéfalos	19
Análisis de la expresión de las PNN	19
RESULTADOS	20
CAPÍTULO II: Rol de las PNN del APOm durante la gestación sobre el comportamiento maternal.	21
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	21
MATERIALES Y MÉTODOS	22
Grupos experimentales	22
Implante de cánulas y administración del fármaco	22
Parto y prueba comportamental	22
Análisis estadísticos	23
Obtención y procesamiento del encéfalo	23
RESULTADOS	23
Gestación y parto	24
Desarrollo de las crías en las primeras horas de vida	25
Conducta maternal	26
Otras conductas	28
CAPÍTULO III: Composición molecular de las PNN del APOm.	29
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	29

MATERIALES Y MÉTODOS	29
Grupos experimentales	29
Animales y obtención de los grupos experimentales	29
Obtención y procesamiento de las imágenes	29
RESULTADOS	30
DISCUSIÓN GENERAL	35
Dinámica temporal del re-ensamblado de las PNN en el APOm	35
Rol de las PNN en la gestación y el parto.	36
Rol de las PNN en el desarrollo de las crías y en los componentes pasivos de la conducta maternal	36
Rol de las PNN sobre los componentes activos de la conducta maternal	37
Composición de las PNN en el APOm	39
Puesta a punto de la técnica de inyección seriada en hembras gestantes	42
CONCLUSIONES	43
PERSPECTIVAS DE TRABAJO	44
ANEXO	45
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

AGRADECIMIENTOS

A mis tutores Natalia y Javier, por todo el aprendizaje, por la dedicación, el apoyo, y por el camino compartido durante todos estos años.

A mis compañeras de laboratorio, por el apoyo, el cariño y disposición.

A Héctor, por su dedicación y responsabilidad con los animales del bioterio.

A Gabriela Bedó, por prestarme las instalaciones de su laboratorio.

A los miembros del tribunal, Laura Quintana, Marcela Alsina y Mayda Rivas, por aceptar evaluar este trabajo y por sus valiosos aportes.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) y a la Comisión Académica de Posgrado (CAP), por el apoyo financiero.

A PEDECIBA y a la Universidad de la República, por brindarme una formación de calidad.

Y en especial a mi familia y amigos, por el amor incondicional, el acompañamiento y el sostén, que fueron tan importantes en este proceso.

RESUMEN

El comportamiento maternal en mamíferos es fundamental para la supervivencia de las crías. El área preóptica media (APOm) es un área clave del circuito cerebral maternal en la expresión y plasticidad de esta conducta. Sin embargo, poco se sabe aún de los mecanismos específicos subyacentes a su plasticidad durante el período posparto. Las redes perineuronales (PNN) de la matriz extracelular están involucradas en diversos fenómenos de plasticidad del sistema nervioso. Antecedentes de nuestro laboratorio muestran que las PNN se expresan en el APOm de la rata hembra desde mediados de la gestación hasta el período postparto tardío. En mi tesina de grado comencé a estudiar el rol de estas estructuras en el comportamiento maternal de la rata y puse a punto una técnica para disgregarlas farmacológicamente, a través de la administración intracerebral de la enzima Condroitinasa ABC (ChABC). Una inyección local de esta enzima a mediados del período gestacional disuelve las PNN del APOm, que posteriormente se rearmen, provocando la alteración de algunos componentes de la conducta maternal luego del parto. En este trabajo nos propusimos profundizar en el rol de las PNN del APOm sobre el comportamiento maternal, y comenzar a caracterizar su composición, a través de tres grandes objetivos asociados a tres capítulos experimentales: 1) Analizar la dinámica temporal del reensamblado de las PNN en el APOm luego de su disgregación farmacológica con ChABC en la gestación; 2) Evaluar el rol de las PNN del APOm durante la gestación sobre el comportamiento maternal, a través de su disolución con ChABC durante toda la gestación; 3) Comenzar a caracterizar la composición molecular de las PNN del APOm, a través de la técnica de inmunofluorescencia. Encontramos que las PNN del APOm comienzan a re-ensamblarse a las 72 horas de ser disueltas con una inyección de ChABC en la gestación. Este tiempo es significativamente menor al reportado para otras áreas del cerebro, probablemente debido al rol de las hormonas ováricas esteroideas en su regulación. Por otro lado, demostramos que las PNN del APOm cumplen un rol importante en la regulación del lamido maternal, y modulan de manera indirecta el desarrollo y supervivencia de las crías en las primeras 24 horas de vida. Por último, observamos que las PNN se asocian a una subpoblación de neuronas del APOm, y en su composición predominan los glucosaminoglicanos. El Agrecano, principal proteoglicano de las PNN, está presente de manera variable en el APOm y es sintetizado por las neuronas que se asocian a estas estructuras. Estos resultados contribuyen a la comprensión de los procesos de neuroplasticidad que ocurren durante la gestación, asociados a la expresión de PNN en el APOm, y su rol en la regulación de la conducta maternal.

INTRODUCCIÓN

Comportamiento maternal

El comportamiento parental, presente tanto en vertebrados como invertebrados (Rosenblatt y Snowdon, 1996; Trumbo et al., 2012), es una de las estrategias reproductivas que aseguran la transmisión de genes de una generación a otra. Si el conjunto de actividades que integran esta conducta no se da de la manera adecuada, la posibilidad de supervivencia de las crías disminuye y su desarrollo puede verse comprometido (Lonstein y Fleming, 2001).

En mamíferos, esta conducta se caracteriza por ser compleja y prolongada en el tiempo. Tal es su importancia, que de manera espontánea, las hembras despliegan la conducta maternal ni bien sus crías emergen del canal de parto, incluso en madres sin experiencia maternal previa (Rosenblatt y Snowdon, 1996; Lonstein et al., 2015). Aunque los machos de algunas especies despliegan algunos componentes del cuidado parental, son las hembras las que generalmente llevan a cabo esta tarea a partir de su madurez reproductiva, especialmente en este grupo en que la alimentación de las crías se da a través de la leche materna. Para ello, en especies donde las crías nacen en camadas, la madre debe reunir las y ajustar su posición para facilitar el amamantamiento. Además, debe protegerlas de factores externos potencialmente peligrosos, como depredadores o co-específicos amenazantes, y en crías altriciales (aquellas que nacen con un grado de desarrollo muy escaso), asegurar una temperatura corporal adecuada, a través de la construcción de nidos y el contacto con ellas (Lonstein et al., 2015).

Además de asegurar la supervivencia de su descendencia, el cuidado maternal cumple otras funciones relevantes. La interacción madre-cría moldea el desarrollo endócrino, afectivo y social de las crías. Es así que en la etapa adulta, los animales presentan diferentes respuestas de estrés o de la función reproductiva, según la experiencia maternal recibida en la etapa temprana (Caldji et al., 1998; Fleming et al., 2002; Uriarte et al., 2007; Franks et al., 2011).

La rata como modelo para el estudio del comportamiento maternal

Las características antes mencionadas han motivado la investigación de la conducta maternal en mamíferos, cuyos sustratos neurobiológicos se encuentran altamente conservados entre las especies. Como bien se sabe, las características biológicas de la rata (*Rattus norvegicus*) facilitan su mantenimiento en un laboratorio, constituyendo uno de los

modelos clásicos y más utilizados en la investigación. La conducta maternal no es la excepción, y ha sido ampliamente estudiada y caracterizada en esta especie (Lonstein y Fleming, 2001; Ferreira et al., 2012).

El comportamiento maternal es una conducta compleja que podemos separar en unidades conductuales específicas con el fin de analizarlo y cuantificarlo. Un protocolo muy utilizado en el laboratorio para evaluar el comportamiento maternal de la rata consiste en separar a la madre de sus crías por diez minutos, y luego re-introducirlas a la caja para observar y cuantificar de manera continua la conducta durante treinta minutos (Ferreira et al, 2012). Inmediatamente luego de que las crías son introducidas en la caja materna, típicamente la hembra lactante las olfatea y comienza a trasladarlas hacia el nido. Para ello, carga a las crías con su boca. A este comportamiento, dependiendo de si la madre se traslada o no con ellas, se le llama acarreo o mouthing, respectivamente. Además, la madre construye el nido trasladando viruta que junta con su boca o empujándola con sus patas y hocico. Una vez que la madre reunió a toda la camada y está conforme con su nido, se queda sobre sus crías (hover over) y comienza a lamerlas en todo el cuerpo y en la zona anogenital. Hacia el final de la prueba maternal la hembra adopta una postura de amamantamiento que permite exponer los pezones a las crías para que las mismas puedan alimentarse. Los olfateos, acarreos, mouthings, lamidos, y construcción del nido, son *componentes activos* de la conducta maternal, motivadas por la atracción de la madre hacia sus crías, y presentan una gran variabilidad en su desempeño. De manera contraria, en los *componentes pasivos*, como el hover over y el amamantamiento, la madre no presenta un rol activo y estas conductas dependen de la estimulación de las propias crías (Stern, 1996; Lonstein y Fleming, 2001; Ferreira et al., 2012).

Regulación neuroendócrina de la conducta maternal

Durante la gestación, el sistema neuroendócrino de la madre va experimentando cambios. El despliegue casi espontáneo de la conducta maternal al nacimiento de las crías es dependiente de los cambios en los niveles hormonales, especialmente de las hormonas ováricas (Figura 1). Los niveles de estrógeno circulantes que se mantienen bajos hasta aproximadamente el día 16 de gestación, comienzan a subir alcanzando un pico máximo durante el parto. La progesterona, de manera contraria, comienza a elevarse al comienzo de la gestación, alcanzando un pico máximo aproximadamente el día 16, donde comienza a reducirse hasta niveles cercanos a cero para el día del parto (Rosenblatt et al., 1988).

Hembras sensibilizadas¹, que no estuvieron expuestas al perfil endócrino propio de la gestación, despliegan una conducta maternal deficiente en comparación con hembras lactantes (Fleming y Rosenblatt, 1974; Lonstein et al., 1999). En el mismo sentido, cuando a hembras vírgenes ovariectomizadas se les administra estradiol y progesterona en un perfil que simula la gestación, el comportamiento maternal se despliega rápidamente luego del parto y con un desempeño similar al de ratas lactantes, lo que muestra la importancia de estas hormonas en la regulación de una respuesta maternal adecuada (Bridges, 1984; Orpen et al., 1987).

Además de estas hormonas gonadales, las hormonas peptídicas prolactina, vasopresina y oxitocina también sufren cambios durante la gestación para preparar a la madre a responder adecuadamente frente a sus crías, y promover la producción de leche (Grattan, 2001; Bosch y Neumann, 2012).

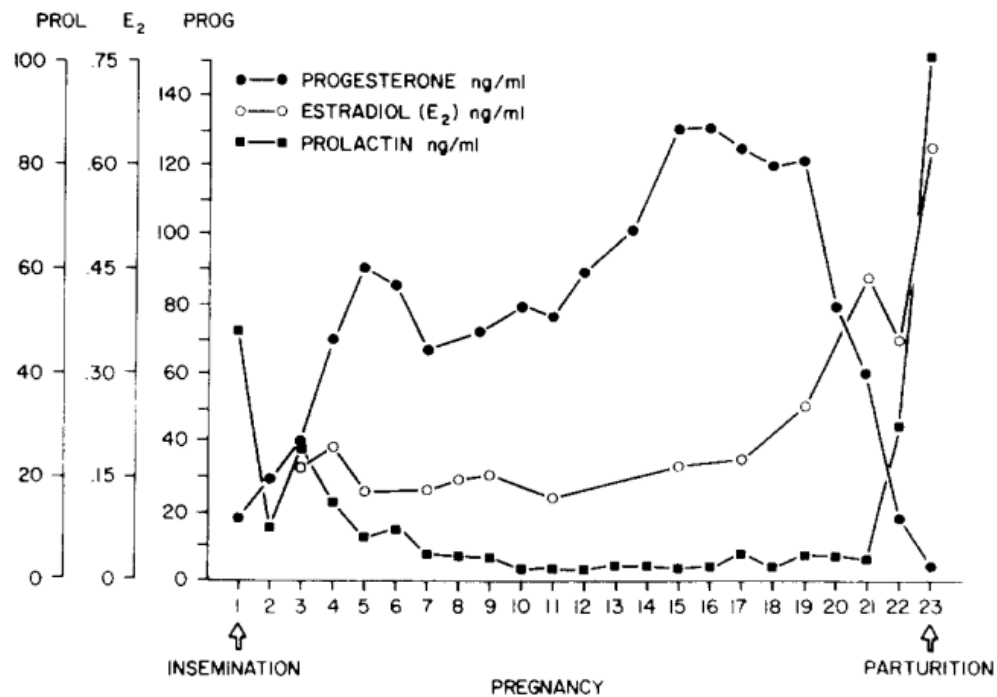


Figura 1. Concentración plasmática de las hormonas progesterona, estradiol y prolactina durante la gestación y el parto en la rata (tomado de Rosenblatt et al., 1988).

¹ Hembras que no atravesaron gestación ni parto, pero desarrollaron conducta maternal luego de ser expuestas continuamente a crías de otras madres.

El papel del área preóptica media

Tanto las hormonas esteroideas como las peptídicas actúan en distintas áreas del Sistema Nervioso Central (SNC). En particular, el *área preóptica media (APOm)* se ha propuesto como un sitio clave cuyas neuronas contienen una alta densidad de receptores a través de los cuales actúan estas hormonas promoviendo el comienzo del comportamiento maternal (Bakowska y Morrell, 1995; Shughrue et al., 1997; Numan et al., 1999; Champagne et al., 2001). Cuando se lesiona o inactiva esta área, la expresión de la conducta maternal se ve afectada (Lee et al., 2000; Pereira y Morrell, 2011), mientras que su estimulación eléctrica la facilita (Morgan et al., 1999). La población neuronal que conforma el APOm es muy heterogénea, y expresa distintos neurotransmisores (GABA, dopamina y glutamato) y neuropéptidos (Simerly et al., 1986; Bakowska y Morrell, 1995; Arrati et al., 2006).

Durante la gestación y el parto, esta área del cerebro experimenta numerosos cambios significativos. Por un lado, se ha observado un aumento en la expresión de receptores hormonales, como de estrógeno y prolactina. Por otro lado, incrementa el volumen, la densidad de espinas dendríticas, y la actividad de las neuronas (Keyser-Marcus et al., 2001; Meurisse et al., 2005; Frankfurt et al., 2011; Bridges, 2014). También se ha documentado un incremento en el número de astrocitos, reflejando la necesidad de un mayor soporte metabólico y de comunicación sináptica en el cerebro maternal (Gómora-Arrati et al., 2010).

Sin embargo, los cambios en el APOm que reflejan la adaptación del cerebro a las nuevas necesidades fisiológicas y comportamentales de la madre, no se dan únicamente a través de sus células. La matriz extracelular también experimenta importantes modificaciones en su organización, facilitando los cambios necesarios para la adaptación maternal (Pomi, 2019; Uriarte et al., 2020).

Redes perineuronales de la matriz extracelular

La matriz extracelular (MEC) representa tan solo entre el quince y el veinte por ciento del volumen cerebral (Cragg, 1979). Sin embargo, lejos está de cumplir un rol meramente “de relleno” en el sistema nervioso, y hoy es considerado el cuarto elemento de la sinapsis tetrapartita (Dityatev y Rusakov, 2011).

Una de las formas en las que se organiza la MEC en el SNC es en un denso entramado que rodea el cuerpo y las prolongaciones de algunas poblaciones neuronales, dejando espacios en donde se dan los contactos sinápticos (Celio y Blumcke, 1994). Estas estructuras, descubiertas por Camilo Golgi (1882) y descritas en mayor detalle por Spreafico et al.

(1999), son conocidas como *redes perineuronales* (PNN por su sigla en inglés, perineuronal nets) (Figura 2).

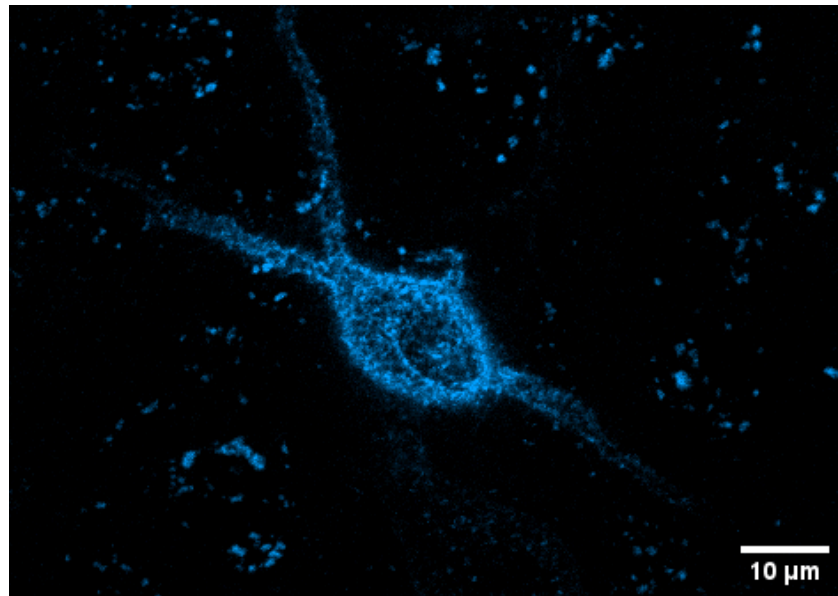


Figura 2. Redes perineuronales en corteza cerebral de rata visualizadas con WFA y estreptavidina conjugada a Alexa Fluor 405. Imagen obtenida con objetivo de inmersión 63x, en nuestro laboratorio.

Las PNN son estructuras especializadas de la MEC que constan de largas cadenas de ácido hialurónico (HA), sintetizadas por la enzima Ácido Hialurónico Sintasa (HAS) en la membrana neuronal (Weigel, 2015). A estos polisacáridos, del tipo glucosaminoglicano, se unen proteoglicanos de condroitín sulfato (CSPGs) a través de proteínas link. Estas estructuras se unen a su vez entre sí, a través de proteínas Tenascinas-R que juegan un papel crucial en la estabilización de la red (Morawski et al., 2014) (Figura 3). Para la formación y el mantenimiento de esta red, es necesaria una colaboración entre células neuronales y gliales, dado que ambas sintetizan distintos componentes de las PNN (Dzyubenko et al., 2016).

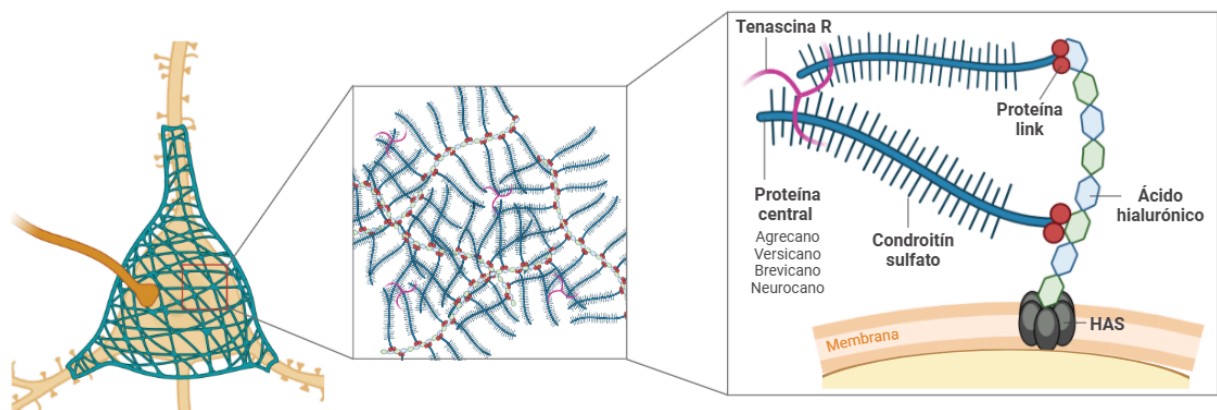


Figura 3. Estructura de las redes perineuronales. Creado con BioRender.com.

En función de la proteína central y el número de moléculas de condroitín sulfato, los proteoglicanos pueden clasificarse en varios tipos: Agreicanos, Versicanos, Brevicanos, o Neurocanos (Deepa et al., 2006; Kwok et al., 2010). La presencia de estos distintos proteoglicanos en las PNN es variable, aunque el Agreicano es el más abundante, y en algunas áreas está presente en todas las PNN (Carulli, et al., 2007; Galtrey, et al., 2008; Suttikus, et al., 2014).

La manera más utilizada para marcar esta red, es a través de la lectina de *Wisteria floribunda* aglutinina biotinilada (WFA), que reconoce la N-acetilgalactosamina de los (CSPGs) (Hartig y Brauer, 1992; Seeger et al., 1996). Esta lectina puede ser revelada con el sistema avidina-biotina que utiliza diaminobenzidina (DAB) como cromógeno (Figura 4), o a través de estreptavidina conjugada a un fluoróforo (Figura 2). Con la técnica de inmunofluorescencia, también pueden detectarse otros componentes de la red, como los distintos CSPGs, o las proteínas de unión al ácido hialurónico.

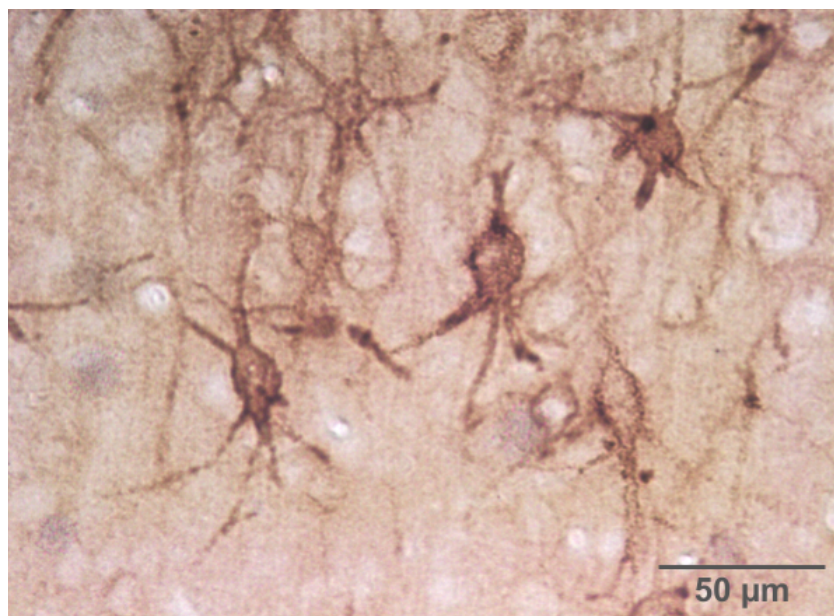


Figura 4. Redes perineuronales en corteza cerebral de rata visualizadas con WFA y reveladas con DAB. Imagen obtenida con objetivo 40x, en nuestro laboratorio.

Pese al denso entramado que forman, las PNN son estructuras dinámicas. Las hialuronidasas, degradan la cadena principal de ácido hialurónico (Stern y Jedrzejka, 2006; Katarzyna y Nowicka, 2021). Sin embargo, son las metaloproteasas las principales enzimas que participan en la remodelación de la red. Específicamente, las de tipo MMP y ADAMTS en forma colectiva, son capaces de degradar todos los elementos de las PNN (Shiomi et al., 2010; Sánchez et al., 2023).

De forma experimental, la técnica más utilizada para degradar esta red, es a través de la *Condroitinasa-ABC* (ChABC). Esta enzima, sintetizada por la bacteria *Proteus vulgaris*, puede ser inyectada directamente en el cerebro, y corta las cadenas laterales de GAGs de Condroitín Sulfato de los proteoglicanos (Moon et al., 2001; Murakami y Ohtsuka, 2003). La desorganización de la red conseguida con esta técnica ha permitido explorar los diversos roles que desempeñan estas estructuras en el sistema nervioso (Testa et al., 2018).

Rol de las redes perineuronales en procesos de neuroplasticidad

Por un lado, las PNN contribuyen a las propiedades intrínsecas de las neuronas, como mantener el potencial de membrana en reposo (Chu et al., 2018), contribuir a la homeostasis iónica (Costa et al., 2007), y prevenir el estrés oxidativo (Cabungcal et al., 2013; Suttikus et al., 2014). Asimismo, se ha demostrado que la barrera física que proporcionan estas estructuras, impiden la muerte neuronal causada por la proteína b-amiloide. Este mecanismo neurotóxico ha sido asociado al Alzheimer, y en el mismo sentido, en personas con dicha enfermedad se ha observado una expresión de PNN reducida (Miyata et al., 2007). Este no es el único trastorno cerebral en el que se ha observado una relación con las PNN. En individuos con esquizofrenia, también se ha observado niveles reducidos de expresión de estas estructuras en la corteza prefrontal medial (CPFm) (Mauney et al., 2013), así como en la amígdala en personas con trastorno bipolar (Pantazopoulos et al., 2015).

Por otro lado, las PNN influyen en el balance de excitación e inhibición cerebral, dado que la degradación de estas estructuras disminuye la actividad de células parvalbúmina-positivas, y por tanto la inhibición de las neuronas piramidales en la CPFm (Dityatev et al., 2007; Slaker et al., 2015; Balmer, 2016). Asimismo, la degradación de las PNN en la corteza cingulada, resulta en una alteración de la actividad de todo el cerebro al alterar las oscilaciones de la banda gamma (Steullet et al., 2014).

Las PNN también han sido asociadas a procesos de neuroplasticidad a través de su rol en el establecimiento de los contactos sinápticos (Bavelier et al., 2010; Sorg et al., 2016). Esta función se evidencia por ejemplo en procesos de memoria. La degradación de las PNN en la amígdala impide que la memoria de condicionamiento al miedo se consolide (Gogolla et al., 2009). Por otro lado en la CPFm, afecta la memoria a largo plazo e impide la conversión de memoria de corto a largo plazo (Hyllin et al., 2013). Las PNN también limitan la capacidad de aprendizaje. Al eliminar las PNN de la corteza perirrinal, se mejora la capacidad de reconocer un objeto novedoso (Romberg et al., 2013). Estos hallazgos son consistentes con

estudios donde se adjudica a las PNN un papel importante en el cierre del período crítico. Esta ventana temporal en el desarrollo postnatal donde hay un mayor grado de plasticidad en todo el cerebro, permite y facilita procesos como el aprendizaje, la memoria, y otras funciones cerebrales de orden superior, que permiten adaptar al individuo a su contexto ambiental. La expresión de las PNN proporcionarían una especie de “freno” que amortigua la plasticidad y ayuda a consolidar los circuitos neuronales al cierre del período crítico (Takesian y Hensch, 2013). Ratones Hapln1 Knock-out, que han sido modificados para no producir la proteína de unión entre los CSPGs y el ácido hialurónico, mantuvieron la plasticidad de la corteza visual más allá del período crítico regular (Carulli et al., 2010). Resultados similares se obtuvieron al tratar ratones y ratas con ChABC en la corteza visual (Pizzorusso et al., 2006), y en la corteza auditiva (Banerjee et al., 2017).

Redes perineuronales durante el ciclo reproductivo

Tradicionalmente se ha considerado que las PNN en la adultez son estables si no son perturbadas por enfermedades o lesiones (Fawcett, 2015). La gran mayoría de estudios acerca de estas estructuras han sido realizados en la corteza cerebral y algunas pocas regiones subcorticales. Dada la implicancia de las PNN en procesos plásticos como los mencionados anteriormente, Uriarte et al., (2020) decidieron estudiar estas estructuras en un momento altamente plástico de la vida de la hembra, como es la maternidad. Como vimos anteriormente, el APOm cumple un rol fundamental en la regulación de la conducta maternal, y sufre numerosos cambios durante la gestación. Además de los cambios ya mencionados, observaron que en esta área las PNN comienzan a expresarse durante la gestación, alcanzan su mayor grado de organización los días previos al parto, y se desorganizan paulatinamente durante la lactancia (Figuras 5 y 6). Asimismo, mostraron que estas estructuras no están presentes en el APOm de ratas macho, así como tampoco en el de hembras ciclantes, sugiriendo que este fenómeno es exclusivo de la etapa reproductiva de la hembra, específicamente desde el día 10 de la gestación hasta el final de la lactancia.

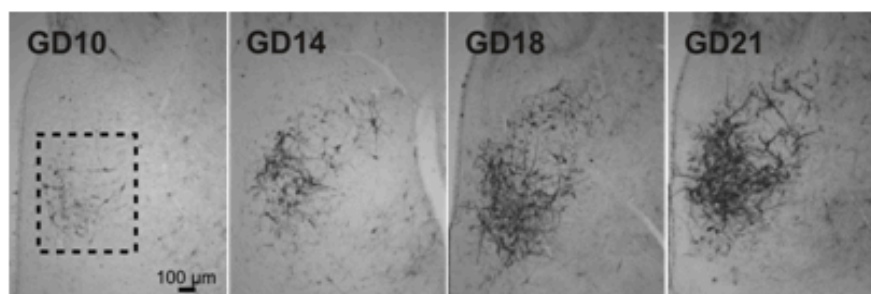


Figura 5: Ensamblaje de las PNN durante la gestación en el APOm. Días de gestación (GD) 10 a 21. Modificado de Uriarte et al., (2020).

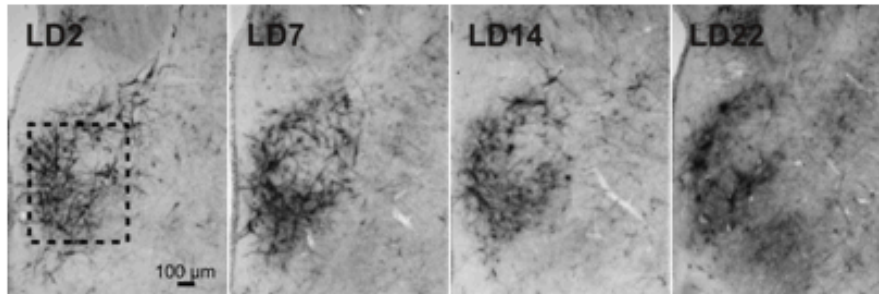


Figura 6: Ensamblaje de las PNN durante la lactancia en el APOM. Días de lactancia (LD) 2 a 22. Modificado de Uriarte et al., (2020).

Redes perineuronales y comportamiento materno

Para comenzar a estudiar la función de las PNN del APOM y evaluar su rol en la regulación de la conducta materna, durante mi tesina final de grado puse a punto una técnica para disolver las PNN de esta área en la gestación (Pomi, 2019). Para ello, utilicé la técnica de disolución de las PNN con la enzima Condroitinasa ABC, a través de una inyección intracerebral puntual mediante cirugía estereotáxica en el período gestacional. Como se muestra en la Figura 7, las PNN del APOM no se detectan a las 24 hs de la inyección con ChABC, pero sí a los siete días, sugiriendo que estas estructuras se rearmen en este período de tiempo.

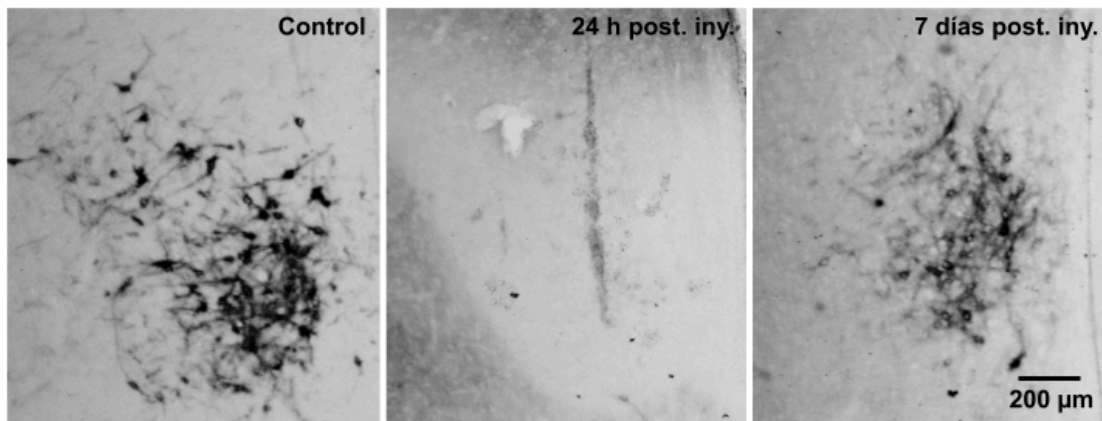


Figura 7. Imágenes representativas de la expresión de las PNN en el APOM de ratas hembras en día 17 de gestación, 24 horas y 7 días luego de ser inyectadas con ChABC, respectivamente. Las PNN fueron marcadas con WFA-DAB. Modificado de Pomi (2019).

De manera interesante, la disolución puntual y posterior rearmado de las PNN en gestación es suficiente para alterar algunos componentes del comportamiento materno. Particularmente, las madres inyectadas con ChABC realizaron menos lamidos anogenitales y estuvieron menos tiempo en hover over que las madres inyectadas con vehículo. Asimismo, tardaron más tiempo en reunir a toda la camada en el nido que las ratas inyectadas con vehículo y que las ratas controles (Pomi, 2019).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA e HIPÓTESIS

Los antecedentes muestran que las PNN del APOm son capaces de rearmarse luego de ser disueltas en la gestación. Aún así, un evento único de disolución de las mismas tiene un efecto significativo sobre el comportamiento maternal, sugiriendo un rol crítico de estas estructuras en el establecimiento y ejecución de esta conducta (Pomi, 2019). Entender la dinámica temporal de la respuesta de las PNN a su perturbación, y su efecto sobre la conducta maternal, es clave para comprender en mayor profundidad la neurobiología de este comportamiento. En ese sentido nos planteamos las siguientes preguntas:

¿Cuánto tardan en re-armarse las PNN del APOm luego de su disolución con ChABC? Por otro lado, dado que la disolución y posterior re-armado de las PNN en el APOm alteró alguno de los componentes de la conducta maternal, ¿cuál sería el efecto si estas estructuras no estuvieran presentes en toda la gestación? ¿Tienen las PNN del APOm la misma composición descrita para otras partes del SNC? ¿Es también en esta área el Agrecano el proteoglicano predominante?

En función de estas preguntas y los antecedentes expuestos me planteé las siguientes hipótesis y objetivos de trabajo:

Hipótesis general:

La organización de la matriz extracelular en redes perineuronales en el APOm de la rata durante la gestación tiene un rol clave en el establecimiento y la ejecución del comportamiento maternal en el postparto temprano.

Objetivos generales:

1. Analizar la dinámica temporal de re-ensamblado de las PNN en el APOm luego de la administración de ChABC.
2. Evaluar el rol de las PNN del APOm durante la gestación en el comportamiento maternal.
3. Comenzar a caracterizar la composición molecular de las PNN del APOm.

Objetivos específicos:

1. Evaluar el grado de organización de las PNN del APOM a las 24, 48 y 72 hs luego de la administración local de ChABC.
2. Evaluar el efecto de la disolución enzimática prolongada de las PNN del APOM sobre la gestación, el parto y la supervivencia de las crías en el posparto temprano.
3. Evaluar el efecto de la disolución enzimática prolongada de las PNN del APOM sobre el establecimiento y ejecución del comportamiento maternal de la rata en el posparto temprano.
4. Evaluar la presencia de Agrecano y Condroitín sulfato en las PNN del APOM.

Asociados a cada uno de los tres objetivos generales planteados, desarrollé un plan de trabajo organizado en tres capítulos experimentales que se desarrollan a continuación.

CAPÍTULO I: Dinámica temporal de re-ensamblado de las PNN en el APOm luego de la administración de ChABC.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Previamente mostramos que el reensamblado de las PNN del APOm ocurría dentro del período de tiempo de siete días comprendido entre la inyección de ChABC y la perfusión y obtención de los encéfalos. A partir de estos resultados nos preguntamos por cuánto tiempo permanecen desensambladas, luego de una inyección local de ChABC. Para ello diseñé el siguiente protocolo experimental:

En el día gestacional (GD) 19, momento en que la expresión de las PNN en el APOm es alta, se realiza una inyección intracerebral con ChABC. En un primer experimento, fijamos y colectamos los encéfalos a las 24 horas luego de la inyección. Posteriormente, fueron procesados y se realizó una reacción histoquímica para observar el grado de disolución de las PNN del APOm. Este procedimiento se repitió variando el tiempo transcurrido entre la inyección y la fijación, de manera de tener varios puntos temporales de expresión de las PNN del APOm luego de su disolución. Es así que, además del primer experimento, realizamos un segundo experimento para observar su expresión a las 48 horas, y un tercer experimento a las 72 horas de su disolución, tal como se observa en la Figura 8.

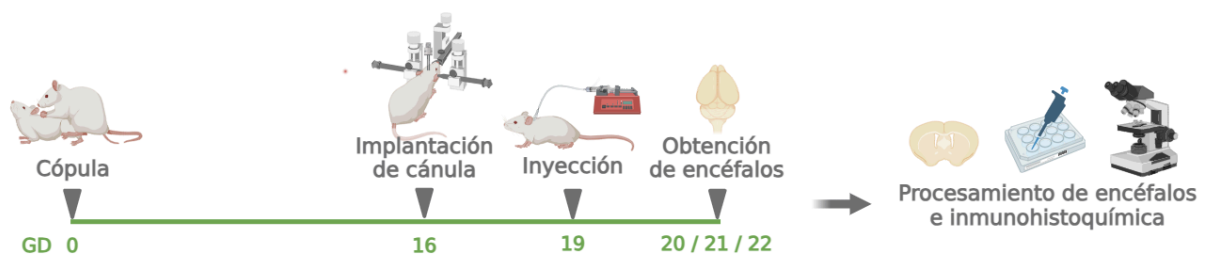


Figura 8: Protocolo experimental. En día gestacional 19 se realizó una inyección de ChABC o solución salina en el APOm. Para ello, se implantó una cánula guía a través de una cirugía en estereotáxico tres días antes. Los cerebros fueron fijados por perfusión transcardiaca 24, 48 o 72 horas luego de la inyección. Los encéfalos colectados fueron procesados y se realizó una técnica histoquímica con WFA biotinilada para detectar las PNN.

MATERIALES Y MÉTODOS

Grupos experimentales

24 horas luego de la inyección:

- a) Ratas gestantes inyectadas en el APOm con solución salina estéril (n=4)
- b) Ratas gestantes inyectadas en el APOm con ChABC (n=3)

48 horas luego de la inyección:

- a) Ratas gestantes inyectadas en el APOm con solución salina estéril (n=3)
- b) Ratas gestantes inyectadas en el APOm con ChABC (n=3)

72 horas luego de la inyección:

- a) Ratas gestantes inyectadas en el APOm con solución salina estéril (n=3)
- b) Ratas gestantes inyectadas en el APOm con ChABC (n=6)

Animales

Se utilizaron ratas (*Rattus norvegicus*, cepa Wistar) hembras criadas en el Laboratorio de Experimentación Animal (LEA) de la Facultad de Ciencias. Las mismas estuvieron bajo temperatura (22°C) y humedad (65%) constante, con un ciclo de luz-oscuridad 12:12, y tuvieron libre acceso a agua y ración. El protocolo experimental en el cual se enmarca este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de Experimentación Animal (N° exp.240011-001 541-17).

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

Implante de cánulas guía

En GD16, tres días previo a la administración del fármaco, se implantaron cánulas guía bilaterales 22-G de acero inoxidable (Plastics One, Roanoke, VA) en el APOm (AP: -0,8 mm de bregma; ML: $\pm 0,5$ mm de la línea media; y DV: -6,5 mm de la superficie craneal; a 2,0 mm dorsalmente del sitio de inyección) (Figura 9).

permitir su difusión completa. Por último, los inyectores fueron retirados y se reinsertaron las cánulas “dummy”.

Obtención y procesamiento de los encéfalos

Según el experimento, se procedió a colectar los encéfalos 24, 48, o 72 horas luego de la administración del fármaco. Para ello los animales fueron anestesiados con tiopental sódico (120 mg/kg) y los cerebros se fijaron por perfusión transcardiaca con buffer fosfato salino (PBS) heparinizado, seguido de solución de paraformaldehído al 4%. Los cerebros extraídos fueron postfijados por 24 hs en la misma solución.

Para obtener cortes de 40 μm conteniendo el área de interés, los cerebros fueron cortados en vibrátomo Leica VT1000S, y conservados en buffer fosfato (PB) + azida de sodio (0,02 %) hasta su procesamiento. Este y el siguiente paso, fueron realizados en el Dpto. de Histología y Embriología de la Facultad de Medicina.

Análisis de la expresión de las PNN

Para confirmar el sitio de inyección y analizar la expresión de las PNN en el APOm, se procedió a realizar la técnica histoquímica para detectar la reactividad a la lectina de WFA biotinilada (Sigma L1516, USA). Los cortes se lavaron tres veces en PB (PH 7,4) para remover el medio en el que estaban embebidos (PB con Azida). Se bloquearon las peroxidasa endógenas por 20 min en 45% etanol (100%) y 0,3% H_2O_2 , seguido de tres lavados en PB y 0,2% tritón x100 (PB-T). Luego se bloquearon los sitios de unión inespecíficos en solución de PB-T y 3% de Seroalbúmina Bovina (BSA), por 30 min. Posteriormente se realizó la incubación con WFA biotinilada a una concentración de 2 mg/ml (1:500, Vector Lab) en la misma solución de bloqueo, durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, luego de tres lavados en PB-T, se incubó en solución avidina-biotina peroxidasa, ABC kit (Vector Lab), durante 2 hs (50 μl de solución A y 50 μl de solución B, cada 5 ml de PB-T). Luego de los últimos tres lavados con PB se procedió al revelado de WFA con el sistema 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (Vector Lab).

Los cortes se montaron y las imágenes del APOm se obtuvieron utilizando un microscopio Nikon Eclipse E400 junto a una cámara digital Micrometrics 319CU CMOS 3.2 Megapixel.

RESULTADOS

En la Figura 10 se muestra un animal representativo de cada grupo de hembras inyectadas. Podemos observar que luego de la inyección de solución salina estéril (grupo control) en el APOm se observa la alta organización de PNN típica del período de gestación, tanto a las 24 como a las 48 y 72 horas. En contraste, no se observaron PNN a las 24 hs de la inyección de ChABC en el APOm, en ninguna hembra tratada con la enzima. A las 48 horas, se observa una leve marca de WFA, que se incrementa a las 72 horas, pero difiere del nivel de organización de las ratas controles.

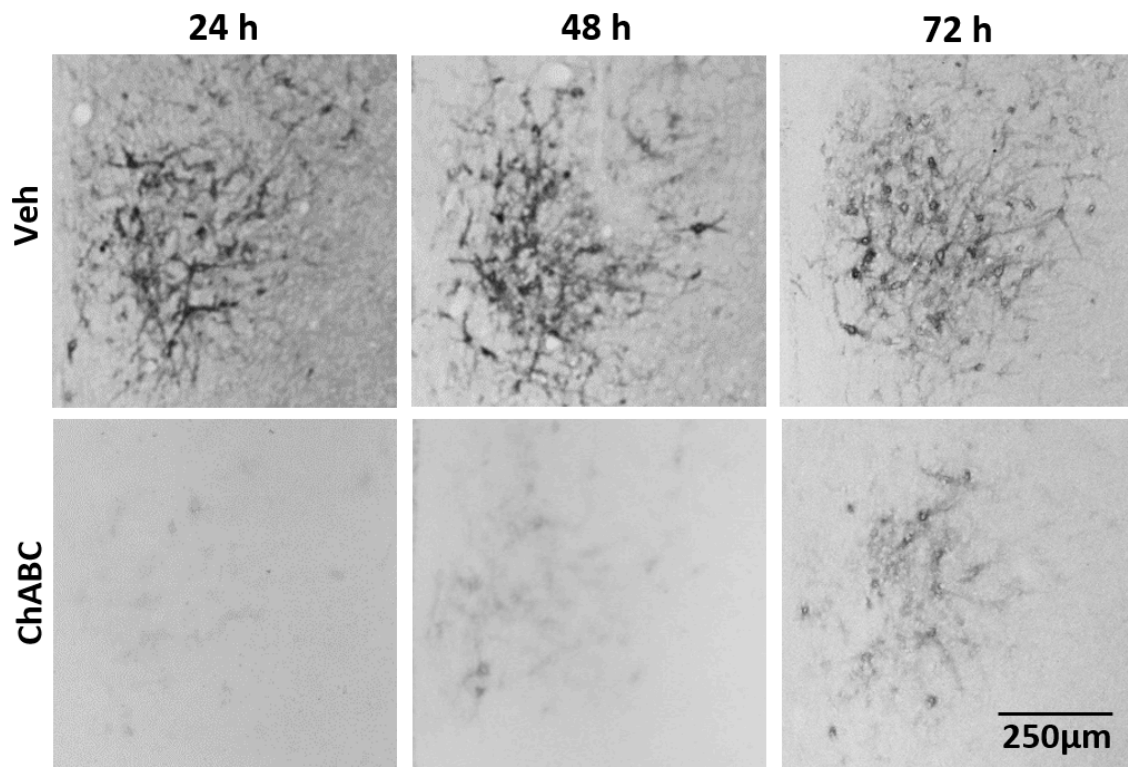


Figura 10. Expresión de las PNN en el APOm de un animal representativo de cada grupo de ratas gestantes a las 24, 48 y 72 horas luego de ser inyectadas con vehículo y ChABC, revelado con WFA-DAB. Imágenes obtenidas con objetivo 4x.

CAPÍTULO II: Rol de las PNN del APOm durante la gestación sobre el comportamiento maternal.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Dado que nuestros resultados previos mostraron algunas alteraciones en el comportamiento maternal con una disolución puntual y posterior re-ensamblado de las PNN (Pomi, 2019), me pregunté qué efectos tendría sobre esta conducta la ausencia de las mismas durante toda la gestación.

En el primer capítulo experimental se determinó que las PNN del APOm se re-ensamblan a las 72 horas de su disolución con ChABC. A partir de este resultado, diseñé el siguiente protocolo experimental (Figura 11): En el día 7 de la gestación se implantó una cánula guía en el APOm a través de una cirugía estereotáxica. A partir del día 10 (momento en el que comienzan a observarse PNN en el APOm), y hasta el día previo al parto (donde la expresión de estas estructuras es máxima) se inyectó cada 72 horas ChABC o solución salina. En total, cada rata recibió cinco inyecciones (día 10, 13, 16, 19 y 22 de la gestación). Se controló el parto y el estado de las crías. En el día 1 de lactancia, es decir, un día luego del parto, se realizó una prueba de comportamiento maternal. Posteriormente, los encéfalos fueron colectados y procesados para detectar la expresión de las PNN y comprobar el sitio de inyección.

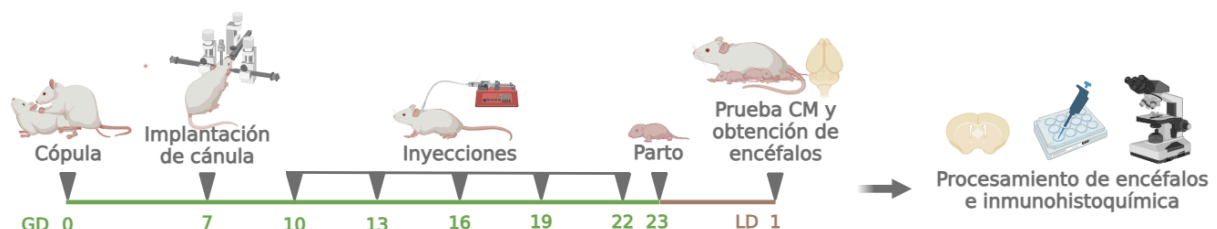


Figura 11: Protocolo experimental. En día gestacional 7 se implantó una cánula guía en el APOm a través de una cirugía en estereotáxico. A partir del día gestacional 10 y hasta el 22 inclusive, se realizaron inyecciones de ChABC o solución salina cada 72 horas. En el primer día de lactancia se realizó una prueba de comportamiento maternal, luego de la cual los cerebros fueron fijados y colectados. Posteriormente, fueron procesados y se realizó una técnica histoquímica para detectar las PNN.

MATERIALES Y MÉTODOS

Grupos experimentales

- a) Ratas gestantes no inyectadas (n=7)
- b) Ratas gestantes inyectadas en el APOm con solución salina estéril en GD 10, 13, 16, 19 y 22 (n=6)
- c) Ratas gestantes inyectadas en el APOm con ChABC en GD 10, 13, 16, 19 y 22 (n=5)

Implante de cánulas y administración del fármaco

Se obtuvieron ratas gestantes, que en el caso de los grupos b) y c), fueron implantadas en GD7 con cánulas guía bilaterales en el APOm, de la misma manera que en el Capítulo I.

En los días 10, 13, 16, 19 y 22 de la gestación (cada 72 horas), se administró 1,4 µl bilateral de ChABC (1,0 U/µl) o solución salina estéril (vehículo) con el mismo procedimiento que fue descrito en el Capítulo I. Previo a la cirugía y a cada inyección las hembras fueron pesadas.

Las ratas del grupo a) no fueron implantadas ni inyectadas. De la misma manera que en los otros dos grupos experimentales, los animales se pesaron en los días 10, 13, 16, 19, y 22 de la gestación.

Parto y prueba comportamental

El parto fue monitoreado, y al día siguiente, se realizó una prueba de comportamiento maternal. Previamente, se controló el estado de las crías, el peso, y la presencia o no de leche. Se evaluó el número total de crías y la proporción de machos y hembras. Luego, se igualó el tamaño de la camada a ocho crías (cuatro hembras y cuatro machos).

Para llevar a cabo la prueba comportamental, se separó a las crías de su madre por diez minutos. Luego de este período, se las re-introdujo en la caja maternal del lado opuesto al nido, momento en que comienza la prueba. De manera continua y durante los próximos treinta minutos, se observaron y cuantificaron las distintas unidades conductuales. Por un lado, se cuantificó el tiempo (s) que demoró la madre en acarrear a la primera cría y en reunir a toda la camada en el nido (*latencia acarreo*; y *RTCN*, respectivamente). Se cuantificó la frecuencia (número) de eventos de los componentes maternos activos (*olfateos*; *acarreos*; *mouthing*; *lamidos corporales* y *anogenitales*; y *construcción del nido*). Para ello, se consideró un evento cada vez que la madre comenzó a realizar la unidad

conductual y la terminó, o hasta los 10 segundos de duración. Pasado este tiempo, comenzó a cuantificarse un segundo evento. Por otro lado, se midió la duración (s) de los componentes pasivos (*hover over*, y *amamantamiento*). El número de veces que la madre realizó otras conductas no maternas también fue cuantificado (*alimentación* y *acicalamiento*).

Análisis estadísticos

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 Dunn. Para el peso de las crías y de las hembras gestantes, las comparaciones entre los grupos se realizaron mediante el test paramétrico ANOVA de 1 y de 2 vías, respectivamente. Para estos datos, se realizaron comparaciones entre dos grupos con una prueba a posteriori de Tukey. Para los análisis se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism 9.

Obtención y procesamiento del encéfalo

Los cerebros de las hembras fueron fijados por perfusión transcardiaca, colectados y procesados de manera similar a lo realizado en el Capítulo I. Se aplicó el mismo procedimiento previamente descrito para el análisis de la expresión de las PNN y para corroborar el sitio de inyección.

RESULTADOS

En la Figura 12 se muestra la sección transversal de un cerebro representativo de una rata implantada en el APOm. Los animales que no fueron inyectados en el sitio correcto no se incluyeron en este trabajo.

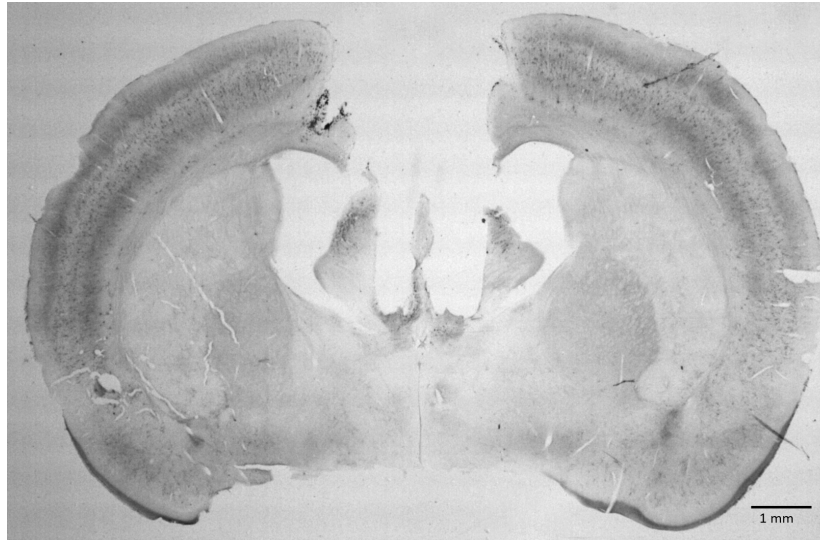


Figura 12. Sección transversal de un cerebro representativo de una rata implantada en el APOm.

Gestación y parto

Como se muestra en la Figura 13, las ratas controles presentaron un peso mayor en comparación con las ratas inyectadas con vehículo en GD13. En GD16, el peso de las ratas controles también fue mayor en comparación a los otros dos grupos experimentales. Entre cada inyección, estas ratas que no atravesaron la manipulación quirúrgica y farmacológica aumentaron de peso, mientras que las ratas implantadas con cánulas e inyectadas igualaron el peso a la situación control en el día gestacional 19.

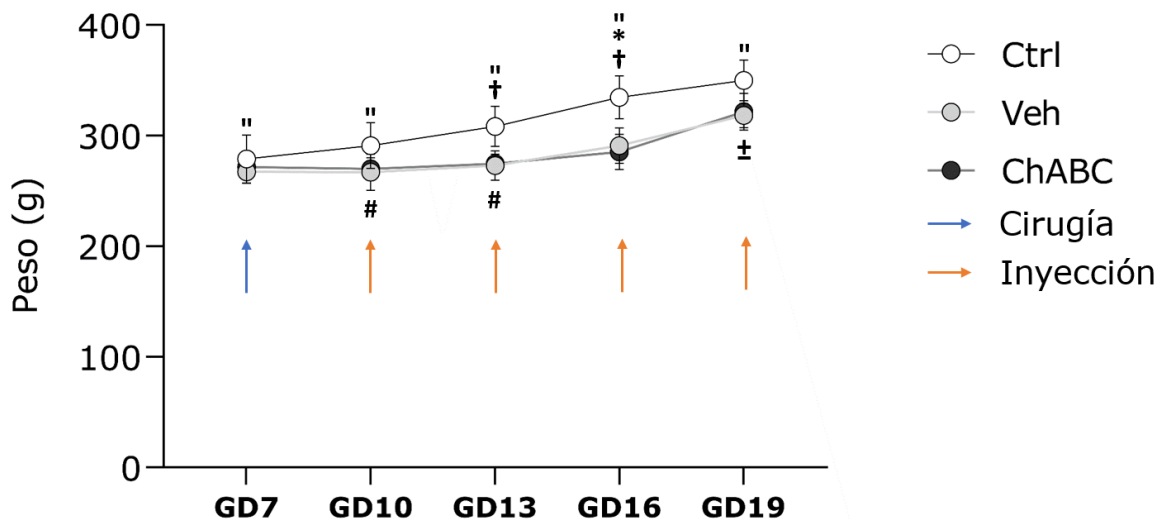


Figura 13. Peso (g) de ratas controles, inyectadas con vehículo, y con ChABC en día gestacional 7, 10, 13, 16 y 19. Los datos se expresan en medias \pm DE. † $p < 0,05$ vs vehículo y * $p < 0,05$ vs. ChABC.

" $p < 0,05$ vs los otros días gestacionales dentro del grupo control, # $p < 0,05$ vs GD16 dentro del grupo vehículo y $\pm p < 0,05$ vs GD16 dentro del grupo ChABC. Test de Tukey.

Al momento del parto, no se observaron diferencias en la cantidad de crías o en la proporción de hembras/machos entre los tres grupos (Figura 14).

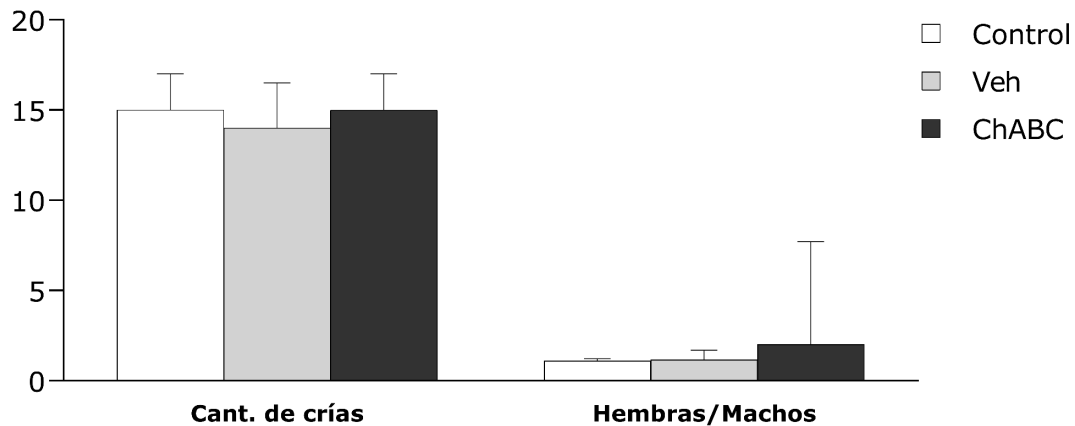


Figura 14. Cantidad de crías y proporción de hembras sobre machos al momento del parto de ratas controles, inyectadas con vehículo y con ChABC. Los datos se expresan en medianas \pm RSIC.

Desarrollo de las crías en las primeras horas de vida

A las 24 horas del parto, las crías de madres tratadas con ChABC presentaron menor peso que las ratas controles (Figura 15). Por otro lado, mientras que las crías de ratas controles e inyectadas con vehículo sobrevivieron en un 100%, varias crías de las madres tratadas con ChABC murieron durante las primeras 24 horas, reduciendo el porcentaje de sobrevivencia a un 62% (Figura 16).

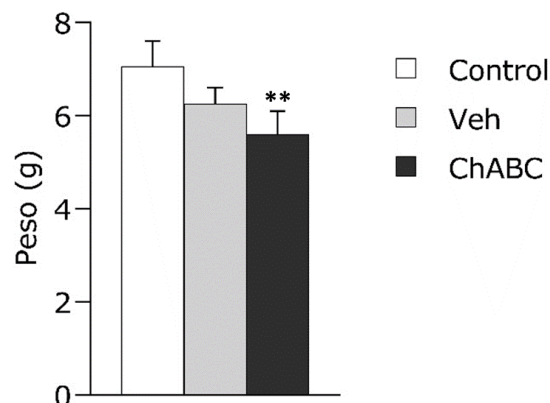


Figura 15. Peso (g) de las crías en día 1 postparto de ratas controles, inyectadas con vehículo, y con ChABC. Los datos se expresan en medias \pm DE. ** $p < 0,01$ vs control, test de Tukey.

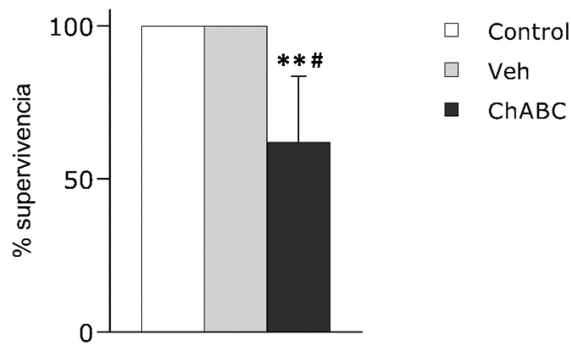


Figura 16. Porcentaje de supervivencia de las crías a las 24 horas de vida, de ratas controles (100%), inyectadas con vehículo (100%) y con ChABC (62%). Los datos se expresan en medianas \pm RSIC. ** $p < 0,01$ vs. control y # $p < 0,05$ vs. vehículo, test de Dunn.

Conducta maternal

Todas las hembras mostraron comportamiento maternal luego del parto. Asimismo, se observó que todas las crías presentaban leche en su estómago, y por tanto, estaban siendo amamantadas.

Con respecto a las conductas pasivas, no se observaron diferencias significativas en el tiempo que la madre permanece sobre sus crías en el nido (hover over) o en postura de amamantamiento (Figura 17).

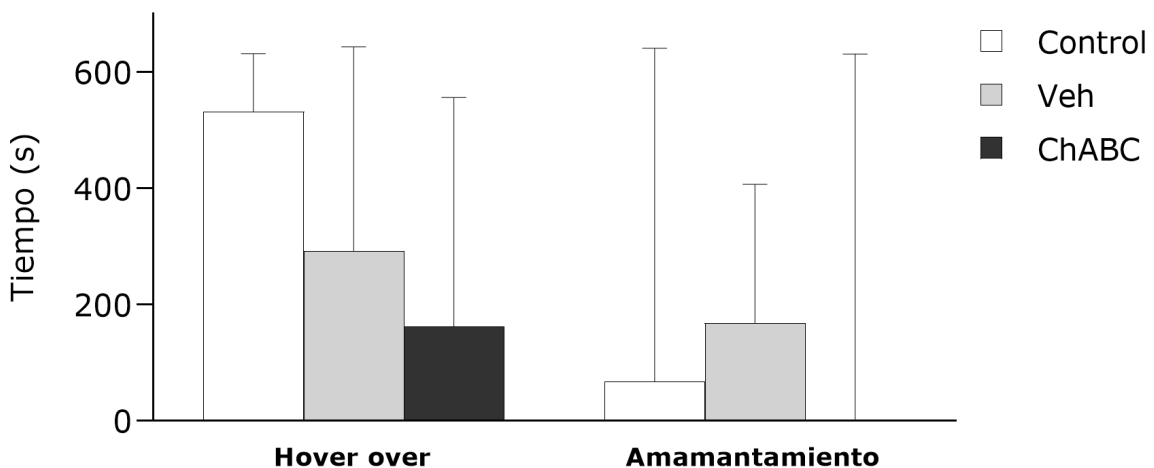


Figura 17. Tiempo (s) en *hover over* (sobre las crías) y de *amamantamiento*, durante los 30 minutos de prueba comportamental realizada en día 1 postparto en ratas control, inyectadas con vehículo, y con ChABC. Los datos se expresan como medianas \pm RSIC.

El tiempo que demoró la madre en acarrear la primera cría, así como en reunir toda la camada en el nido no se vio afectado por la inyección de vehículo o ChABC (Figura 18).

Tampoco se observaron diferencias en la cantidad total de acarreos, olfateos, mouthings, ni construcción del nido, entre los tres grupos (Figura 19).

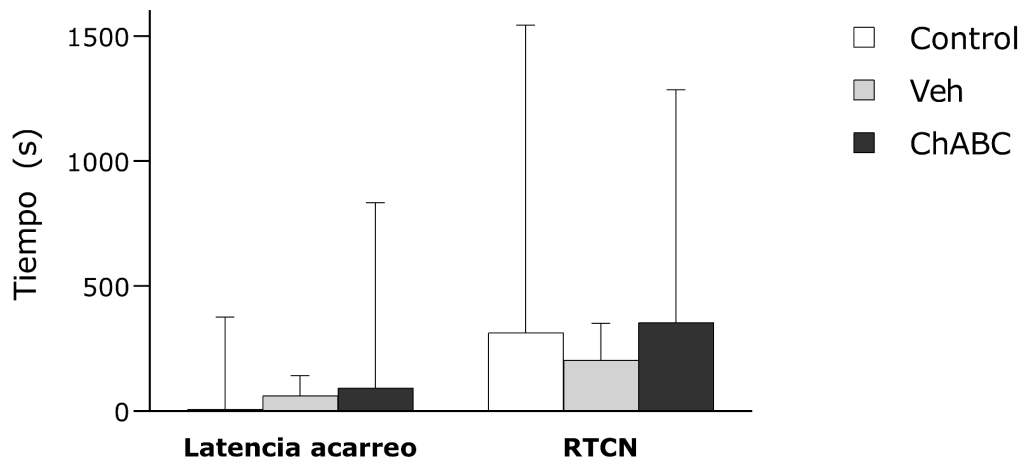


Figura 18. Tiempo (s) que demoran en acarrear a la primer cría (*latencia acarreo*) y en reunir a toda la camada en el nido (*RTCN*), las madres inyectadas con ChABC, vehículo, o no inyectadas (control). Los datos se expresan en medianas \pm RSIC.

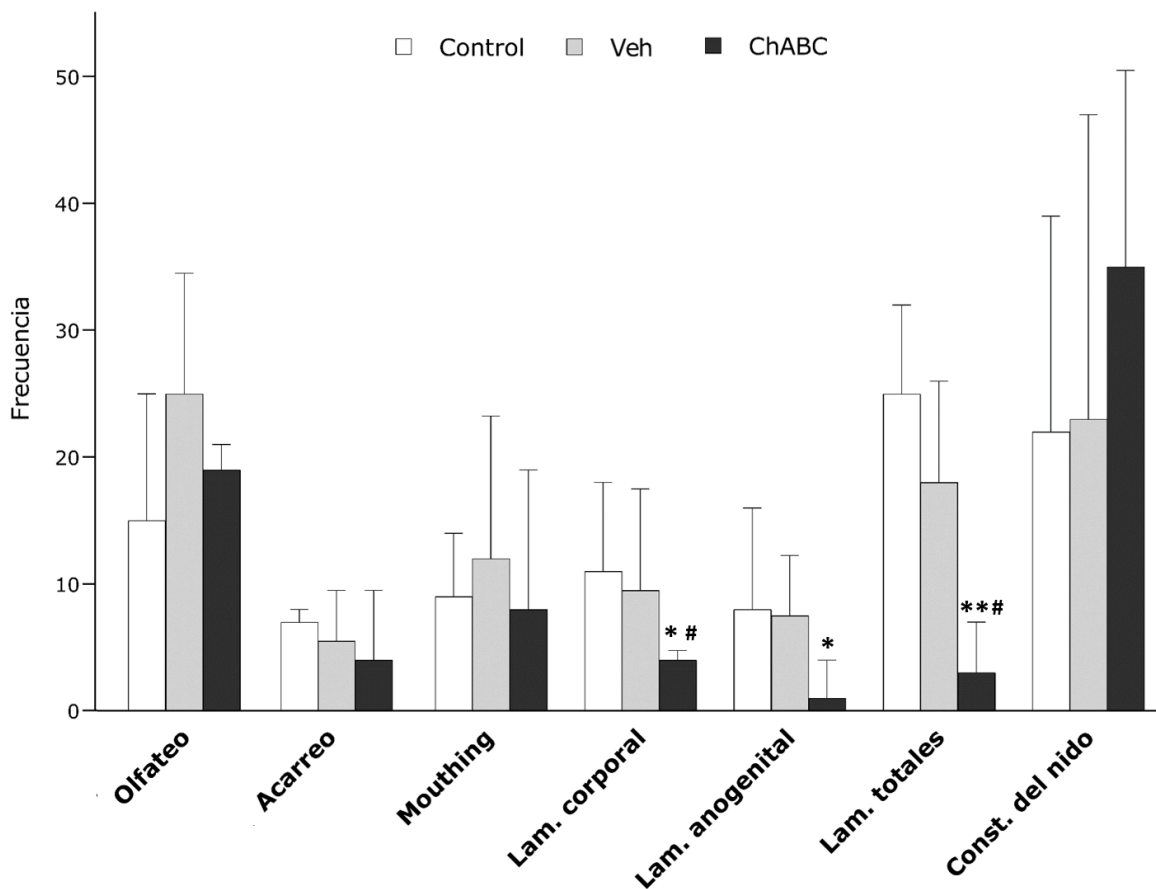


Figura 19. Frecuencia de *acarreo*, *olfateo*, *mouthing*, *lamidos corporales* y *anogenitales*, *lamidos totales*, y *construcción del nido*, durante los 30 minutos de prueba comportamental realizada en día 1

postparto en ratas control, inyectadas con vehículo, y con ChABC. Los datos se expresan como medianas \pm RSIC; * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ vs. control, # $p < 0,05$ vs. vehículo, test de Dunn.

Sin embargo, como se muestra en la misma figura, se observaron diferencias en la cantidad de lamidos corporales, anogenitales, y cantidad total de lamidos durante la prueba. Las ratas tratadas con ChABC realizaron menos lamidos corporales, anogenitales, y cantidad de lamidos totales, que las ratas controles; y menos lamidos corporales y cantidad de lamidos totales que las ratas inyectadas con vehículo durante la gestación. No hubo diferencias en estos comportamientos entre las ratas inyectadas con vehículo y las ratas controles.

Otras conductas

Otras conductas no maternas, como la cantidad de veces que la rata se alimentó o se acicaló durante la prueba, no se vieron afectadas por la administración de ChABC ni por el procedimiento experimental (Figura 20).

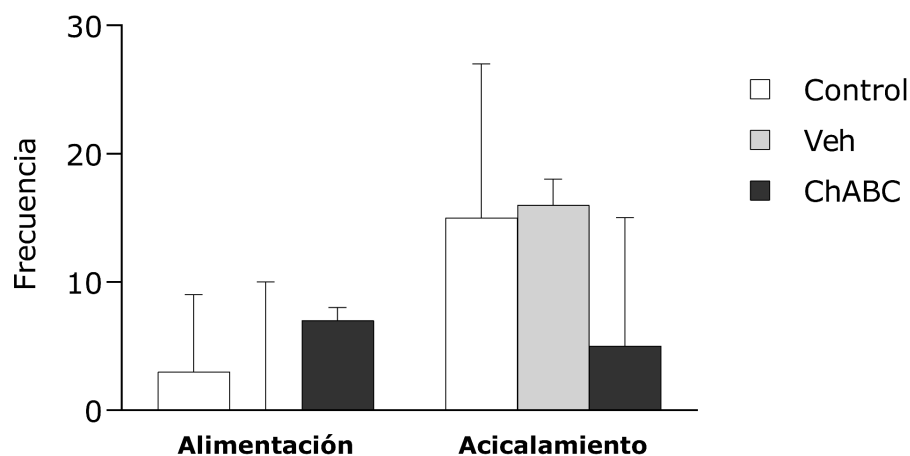


Figura 20. Frecuencia de alimentación y acicalamiento de ratas controles, tratadas con vehículo y con ChABC en día 1 postparto. Los datos se expresan en medianas \pm RSIC.

CAPÍTULO III: Composición molecular de las PNN del APOm.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para comenzar a caracterizar la composición de las PNN asociadas a neuronas del APOm y evaluar la presencia de Agrecano, se realizó una inmunofluorescencia de triple marcado: WFA, anti-Agrecano (Agr) y anti-Proteína Nuclear Neuronal (NeuN). De esta forma evidenciamos la presencia de GAGs de condroitín sulfato de las PNN, de Agrecano, y de las Neuronas del APOm respectivamente. Este procedimiento se realizó en hembras controles (vírgenes en fase de diestro) que no presentan PNN en el APOm, y en hembras gestantes y lactantes, donde las PNN están presentes en esta área.

MATERIALES Y MÉTODOS

Grupos experimentales

- a) Hembras vírgenes ciclantes en fase de diestro (n=2)
- b) Hembras en día gestacional 18 (GD18) (n=2)
- c) Hembras en día 2 de lactancia (L2) (n=2)

Animales y obtención de los grupos experimentales

Para obtener el grupo a) se monitoreó el ciclo estral mediante frotis vaginal. Este procedimiento fue realizado diariamente entre las 09:00 y las 11:00 h hasta obtener al menos dos ciclos regulares. Las fases del ciclo estral se determinaron a través del examen bajo microscopio de las células presentes en el exudado. La citología correspondiente a la fase de diestro se caracteriza por la predominancia de leucocitos (Monies y Luque, 1988). Para obtener los grupos b) y c) se realizó el mismo procedimiento que en los capítulos anteriores.

Obtención y procesamiento de las imágenes

Los cerebros se colectaron en PB + Azida, y se procesaron en vibrátomo Leica VT1000S para obtener cortes de 40µm. Los cortes conteniendo la región de interés se lavaron tres veces en PB-T 0,5% (PH 7,4) para remover el medio en el que estaban embebidos y permeabilizar las membranas. Se bloquearon los sitios de unión inespecíficos en solución

de PB-T 0,5% y 3% BSA por 60 min. En la misma solución de bloqueo durante toda la noche y a 4° C, se realizó la incubación de 2 mg/ml de WFA biotinilada (dilución 1:500) y de los anticuerpos primarios anti-Agrecano (dilución 1:500, rabbit) y anti-NeuN (dilución 1:500, mouse). Al día siguiente, luego de tres lavados en PB-T 0,2%, durante 120 min a temperatura ambiente, se realizó la incubación con estreptavidina conjugada a Alexa Fluor 405 (dilución 1:250), y los anticuerpos secundarios anti-rabbit conjugado a Alexa Fluor 594 (dilución 1:500), y anti-mouse conjugado a Alexa Fluor 488 (dilución 1:500). Luego de los últimos tres lavados con PB se procedió al montaje con PVA-DABCO.

Las imágenes de fluorescencia fueron obtenidas usando un Microscopio Confocal Zeiss LSM 800 de la Unidad de Bioimagenología Avanzada del Instituto Pasteur de Montevideo. Posteriormente, se analizaron a través del software ImageJ.

RESULTADOS

Como se observa en la Figura 21, el APOm de las hembras vírgenes en fase de diestro no presenta marca ni para WFA ni para Agrecano. En cambio, en hembras gestantes (GD18) y lactantes (L2) se observa una marca de WFA y de Agrecano alrededor del cuerpo y algunos segmentos proximales de las prolongaciones neuronales, correspondiente a las redes perineuronales. Cabe destacar que esta marca está presente en una población pequeña de neuronas del APOm, comparado con el número de neuronas totales marcadas con NeuN.

A mayor detalle en la Figura 22, se aprecia en la mayoría de los casos el núcleo y el citoplasma de las células delimitados a través de la inmunoreactividad para NeuN. Se observa también que la presencia del Agrecano en las PNN del APOm es variable. No todas las neuronas WFA+ presentan Agrecano, así como también existen neuronas rodeadas por Agrecano que no presentan marca de WFA. De todos modos, estas imágenes muestran que de estos dos componentes que conforman las redes, los glicosaminoglicanos de condroitín sulfato son el componente principal.

De forma interesante, como se observa en las Figuras 23 y 24, el Agrecano presente en el APOm de las ratas gestantes se encuentra presente también en el citoplasma de las neuronas que están rodeadas por PNN.

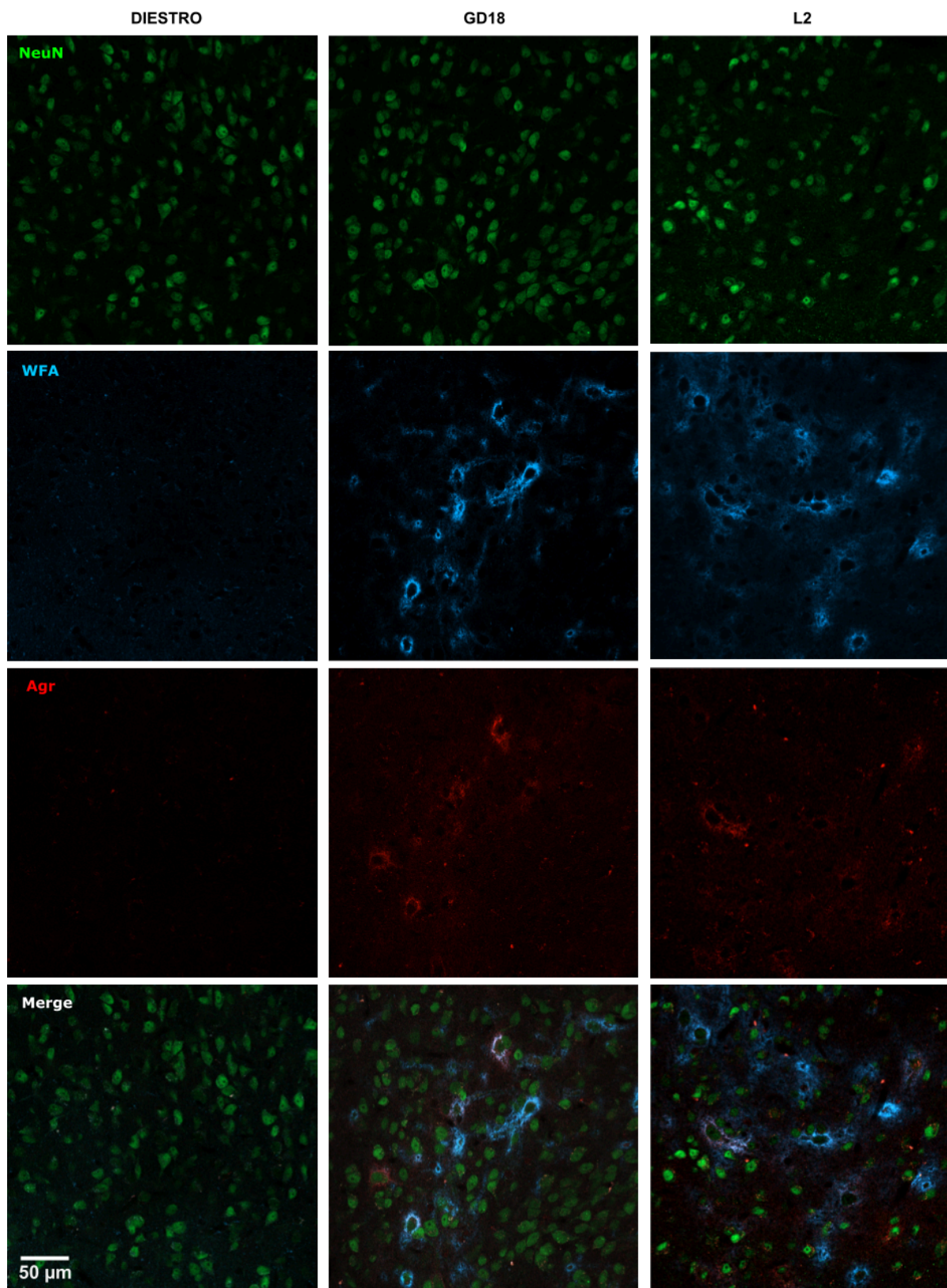


Figura 21. Imágenes representativas del APOm de hembras en diestro, en día 18 de gestación, y en día 2 de lactancia. Inmunorreactividad para NeuN (cuerpos neuronales, en verde), WFA (GAG, en azul), Agr (Agregano, en rojo), y la colocalización de los tres (Merge). Imágenes obtenidas con objetivo 20x.

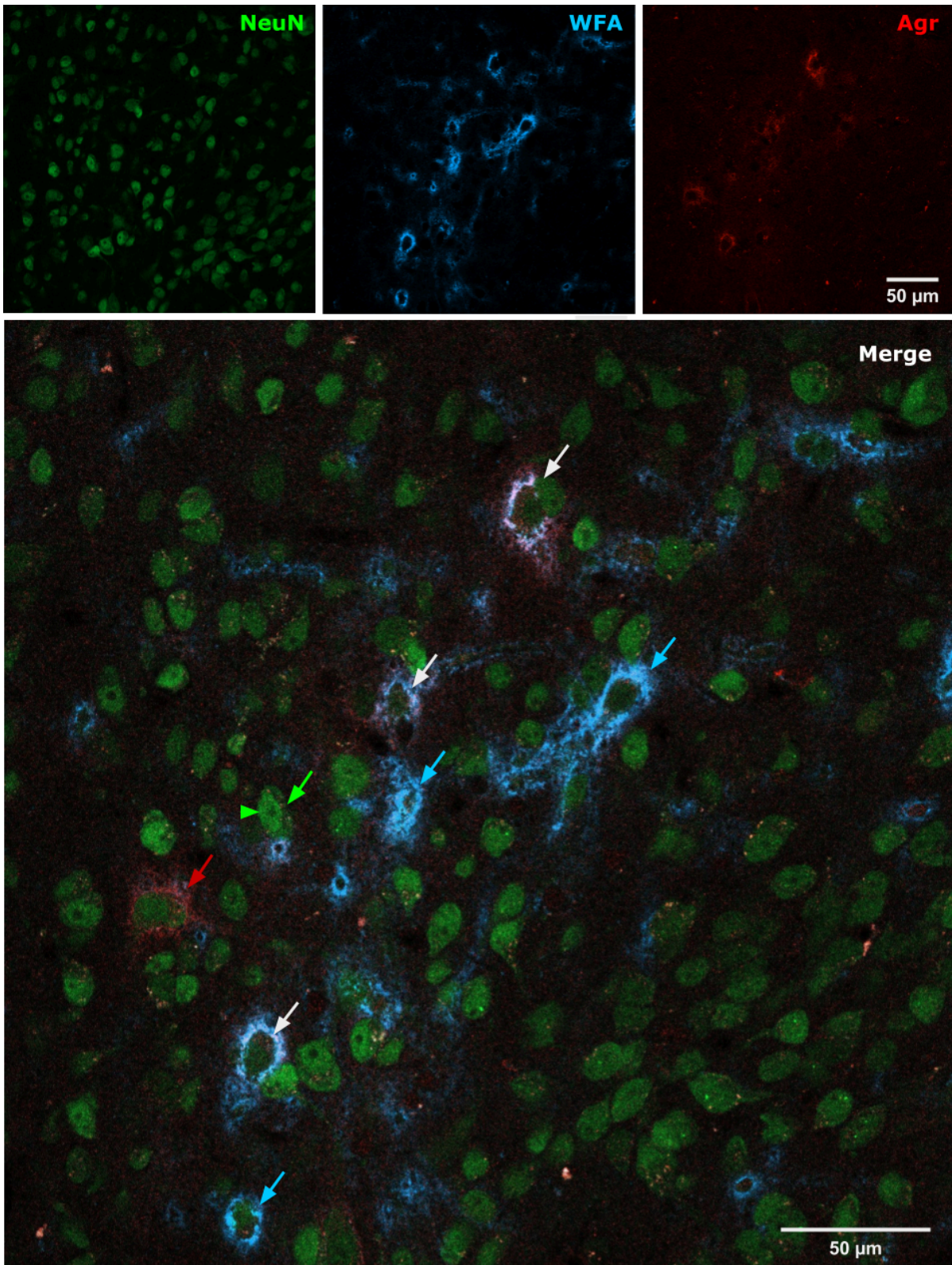


Figura 22. Imagen representativa del APOm de hembras en día 18 de gestación. Inmunoreactividad para NeuN (cuerpos neuronales, en verde), WFA (GAGs, en azul), Agr (Agregano, en rojo), y la colocalización de los tres (Merge). Se aprecian los cuerpos y núcleos neuronales (flecha y punta de flecha verde, respectivamente). Se observan PNN compuestas principalmente por GAGs, por Agregano, o por ambos componentes (flechas azules, rojas y blancas, respectivamente). Imagen obtenida con objetivo 20x.

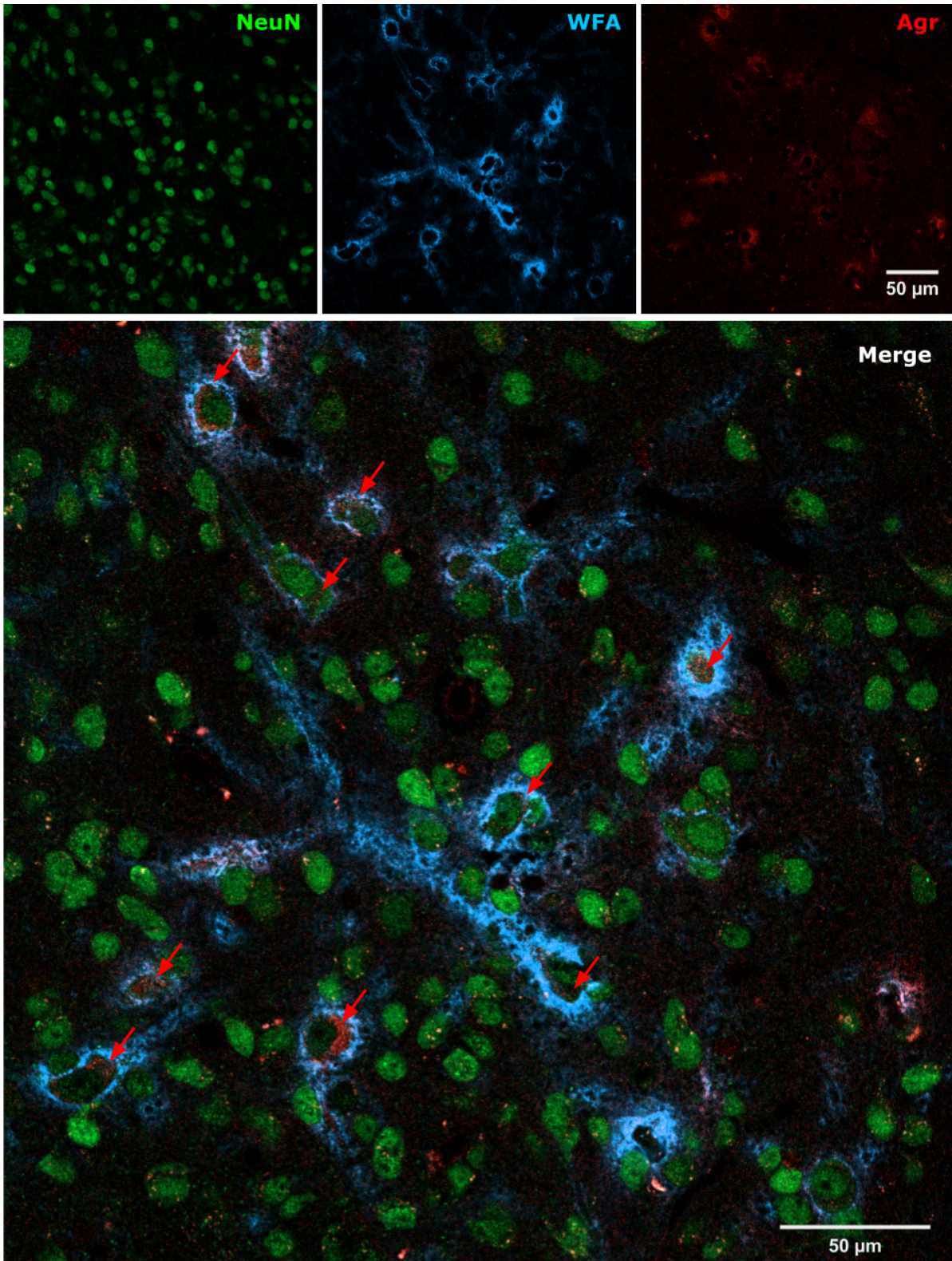


Figura 23. Imagen representativa del APOm de hembras en día 18 de gestación. Inmunorreactividad para NeuN (cuerpos neuronales, en verde), WFA (redes perineuronales, en azul), Agr (Agregano, en rojo), y la colocalización de los tres (Merge). Se observa Agregano dentro del citoplasma de las neuronas (flechas rojas). Imagen obtenida a 20x.

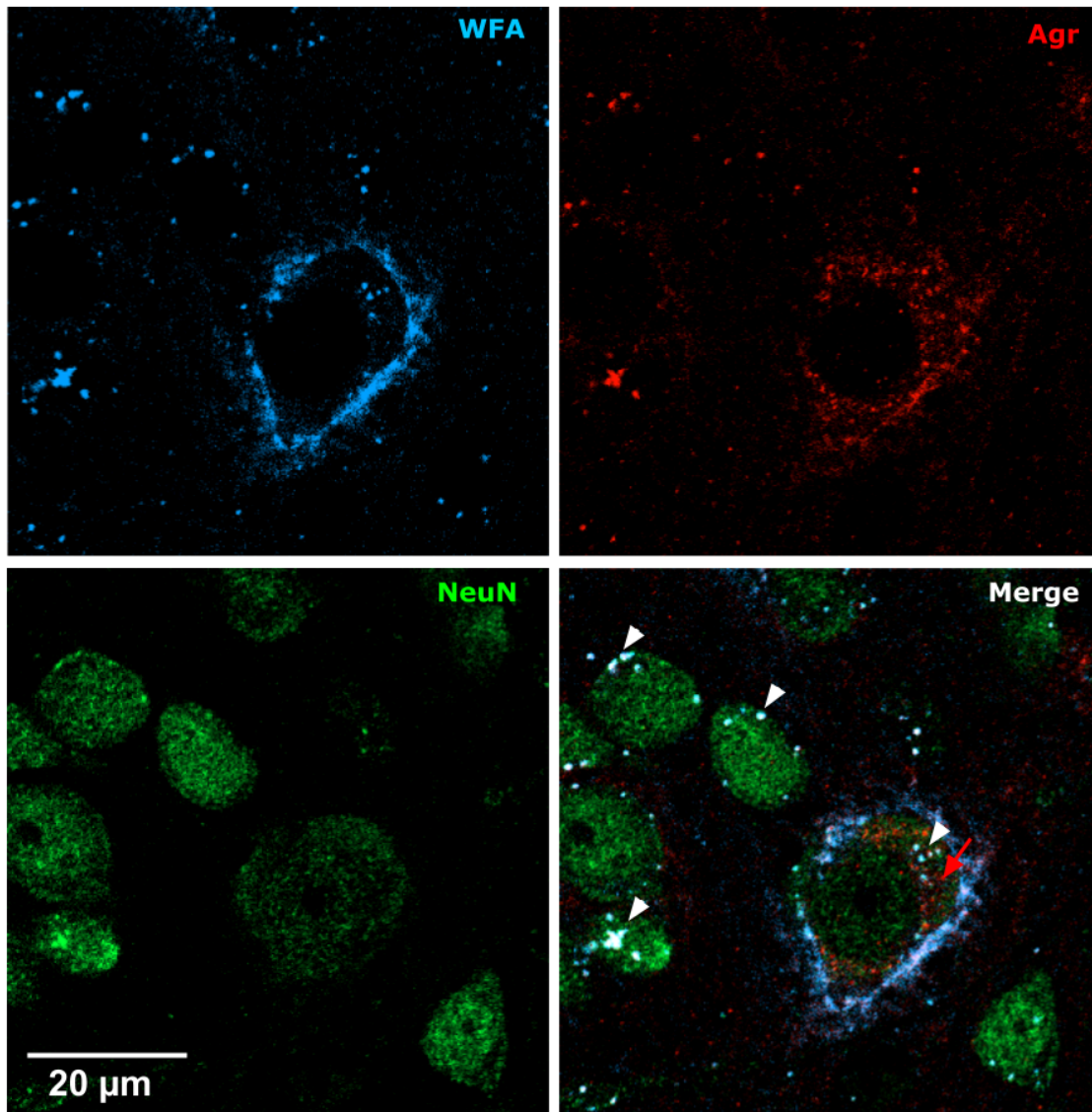


Figura 24. Imagen representativa del APOm de hembras en día 18 de gestación. Inmunorreactividad para NeuN (cuerpos neuronales, en verde), WFA (GAGs, en azul), Agr (Agregano, en rojo), y la colocalización de los tres (Merge). Se observa Agregano dentro del citoplasma de la neurona (flecha roja), y vesículas compuestas por Agregano y GAGs (puntas de flecha blancas). Imagen obtenida con un objetivo de inmersión en aceite 63x.

A mayor aumento (Figura 24) se puede apreciar que en el APOm, los dos componentes de las PNN estudiados en este trabajo, también están presentes en forma vesicular dentro de neuronas tanto PNN positivas como negativas.

Por otro lado, cabe notar en la misma figura que las neuronas rodeadas por PNN parecen tener un tamaño mayor a las neuronas que no presentan PNN.

DISCUSIÓN GENERAL

Los principales resultados obtenidos en esta tesis son:

- Las PNN del APOm se degradan luego de una única inyección de ChABC y comienzan a re-ensamblarse paulatinamente, alcanzando una organización incipiente luego de 72 horas.
- La ausencia de PNN en el APOm durante la gestación provocada por la administración seriada de ChABC cada 72 horas, afecta significativamente la cantidad de lamidos corporales y anogenitales que realiza la madre a sus crías, así como el peso y la supervivencia de las mismas en las primeras 24 horas de vida.
- Las PNN se asocian a un número discreto de neuronas del APOm, y parecen presentar una composición variable de Agrecano. Durante la gestación, este componente también está presente en el citoplasma de las neuronas rodeadas por PNN.

Dinámica temporal del re-ensamblado de las PNN en el APOm

A partir de los resultados obtenidos en el Capítulo I determinamos que el tiempo en que las PNN del APOm comienzan a ensamblarse luego de la administración local de la enzima Condroitinasa ABC es de 72 horas. Estos resultados contrastan con los obtenidos por otros autores, que han reportado tiempos mucho mayores para otras áreas cerebrales (Lensjo, 2013; Romberg et al., 2013; Murrall, 2022). Lensjo (2013) administró 3 μ l de ChABC en la corteza visual de ratas macho, y a las 72 horas no se observó expresión de PNN. El autor muestra una expresión incipiente a partir de los 10 días, y una expresión similar a los cerebros controles a los sesenta días de la inyección del fármaco. Aunque el volumen inyectado por Lensjo fue el doble, la enzima también fue diluída al doble que en nuestro trabajo, y debemos considerar que el APOm es un área mucho más pequeña. En el caso de un núcleo cerebral no cortical, Murrall (2022) estudió el efecto de disolver con la misma enzima las PNN del Bed Nucleus de la Estría Terminal (BNST) en ratones, y observó que a los treinta días post inyección, las PNN seguían ausentes. Resulta interesante que los resultados obtenidos en este trabajo para el APOm de ratas gestantes difieren notablemente de estos reportes, ya que luego de 72 horas de la inyección ya observamos una expresión incipiente de las PNN.

¿A qué se deben estas diferencias? La regulación de la expresión de las PNN es aún poco comprendida. En la corteza cerebral la mayoría de las neuronas rodeadas por PNN son

interneuronas parvalbúmina-positivas (Hartig y Brauer, 1992; Lensjo et al., 2017). Estudios recientes muestran que la expresión de las PNN en esta área es regulada por cambios locales en la actividad de la red, desencadenados por la modulación de estas neuronas (Devienne et al., 2021). En cuanto al APOm, aunque aún no se conoce la identidad de las neuronas rodeadas por la red, Uriarte et al., (2020) mostraron que la organización de las PNN es fuertemente regulada por las hormonas esteroideas ováricas, puesto que estas estructuras exhiben un alto patrón de expresión si se somete a hembras ovariectomizadas a un tratamiento hormonal de estrógeno y progesterona que simula los niveles de estas hormonas durante la gestación (Galea et al, 2001). Como se mencionó anteriormente, las PNN no se expresan en el APOm de hembras ciclantes, ni tampoco si esas hormonas son administradas por separado, resaltando la necesidad de un nivel alto y sostenido de ambas hormonas para su síntesis, como el observado en la gestación (Figura 1). De hecho, estos autores muestran que las neuronas del APOm rodeadas por PNN presentan receptores de estrógeno y progesterona. Aunque los mecanismos específicos de regulación sean aún desconocidos, estos resultados sustentan fuertemente que estas hormonas están involucradas y explicarían el rápido ensamblado de las PNN en el APOm durante la gestación observado en el presente trabajo.

A su vez, los resultados de este capítulo sugieren que el ensamblado de las PNN difiere en gran medida entre distintas áreas del SNC, lo que es importante a considerar a la hora de emplear la enzima ChABC para su digestión.

Rol de las PNN en la gestación y el parto.

La degradación de las PNN no alteró el desarrollo de la gestación ni el desencadenamiento del parto. Si bien las ratas controles tuvieron un mayor aumento de peso a lo largo de la gestación, no hubo diferencias entre los pesos de las ratas inyectadas con solución salina y con ChABC, sugiriendo que estos resultados se asocian a la manipulación experimental. Por otro lado, no se observaron diferencias en el tamaño de la camada ni en la proporción de sexos entre los tres grupos experimentales. Estos resultados sugieren que las PNN no están involucradas ni en el desarrollo de la gestación ni en el proceso del parto.

Rol de las PNN en el desarrollo de las crías y en los componentes pasivos de la conducta maternal

Aunque no hubo diferencias en el tamaño de la camada, fue menor el peso de las crías de madres tratadas con ChABC a las 24 horas de vida. Por otro lado, en ese tiempo, las crías de este grupo presentaron un menor porcentaje de supervivencia. Aunque se observó la

presencia de leche a simple vista en el estómago de todas las crías, sugiriendo que todas habían sido alimentadas en este período (datos no mostrados), estas diferencias podrían explicarse si el tiempo de amamantamiento hubiese sido menor en las madres sin PNN, pero esto no se observa en los resultados de la prueba comportamental a las 24 hs del parto. Por tanto, los datos no nos permiten establecer si esta diferencia de peso se debe a diferencias en el desarrollo intrauterino o al comportamiento de la madre durante las primeras 24 horas de vida. No obstante, todas las hembras establecieron comportamiento maternal luego del parto.

De manera interesante, aunque las madres parieron la misma cantidad de crías, la supervivencia de las mismas varió en las primeras 24 horas. La supervivencia de las crías no depende únicamente de la alimentación, sino también del contacto materno directo. El calor de la madre es necesario para mantener su temperatura a un nivel adecuado (Stern y Johnson, 1990). Entonces, este resultado podría explicarse si las madres tratadas con ChABC hubiesen pasado menos tiempo junto a sus crías, sin embargo esta diferencia tampoco se observó en la prueba comportamental.

En este sentido, si bien la prueba comportamental utilizada es la más indicada para evaluar los distintos componentes de la conducta maternal, permite visualizar sobre todo aquellos que implican un rol activo de la madre a sus crías. Sin embargo, la variabilidad que muestran los componentes pasivos de estos resultados, se debe a que el momento en que la madre se acomoda en el nido sobre sus crías y comienza a amamantarlas suele darse hacia el final de la prueba, y en algunos casos, no llega a observarse en los 30 minutos de duración de la misma. Esta información podría ser complementada utilizando pruebas con períodos de separación madre-crías mayores, en las que la madre suele pasar más rápido a la postura de hover over y amamantamiento, o recurrir a registros de comportamiento maternal continuos de tipo spot-check, sin interferencias en la interacción madre-cría y durante períodos más prolongados de observación (Lonstein y Fleming 2001; Ferreira et al., 2012).

Rol de las PNN sobre los componentes activos de la conducta maternal

Acorde a lo observado anteriormente para una inyección puntual de ChABC (Pomi, 2019), observamos que las hembras tratadas con ChABC lamieron menos a sus crías que las hembras controles, así como también realizaron menos lamidos corporales y lamidos totales que las hembras tratadas con vehículo. Resulta interesante que frente a la compleja estructura de la conducta maternal, la ausencia de PNN en el APOm afecte únicamente un componente tan específico de la misma. Es importante destacar que otras conductas no maternales pero asociadas al lamido, como son la alimentación (ingesta de agua y comida)

o el acicalamiento, no se vieron afectadas por la administración de ChABC. Esto sugiere que el rol de las PNN en el APOm no se asocia al acto de lamer de por sí, sino específicamente al lamido maternal hacia las crías.

¿Cómo podrían explicarse estos resultados? ¿Podrían las PNN del APOm estar jugando un papel en la regulación de la motivación maternal? De ser así, esperaríamos que el tiempo que tarda la madre en acarrear a sus crías (latencia de acarreo) y en reunir las en el nido (RTCN) también se hubiera visto afectado, dado que ambas medidas son buenos indicadores del estado motivacional de la madre (Pereira y Ferreira, 2006). Sin embargo, estas variables no presentaron diferencias entre los grupos experimentales. Aunque quizás, podríamos evaluarlo a través de un test de preferencia. Sabemos que las crías presentan un gran valor motivacional para la madre, eligiéndolas frente a cualquier otro incentivo social, como otra hembra, o un macho durante el estro posparto, e incluso frente a la administración de cocaína durante el postparto temprano (Mattson et al., 2001; Agrati et al., 2008; Ferreño, 2018). Sería interesante evaluar y comparar el estado motivacional de madres tratadas con ChABC y controles, en un modelo de preferencia en el que las hembras deban decidir entre las crías y otro estímulo altamente motivante.

Luego del amamantamiento, el lamido es el componente maternal dirigido a las crías más común en la mayoría de las especies de mamíferos (Lehrman, 1961). El lamido maternal representa un componente de gran importancia para las crías, incluso para su supervivencia. Por un lado, las crías al nacer son incapaces de eliminar sus desechos por sí mismas. Lamiendo la zona anogenital, la madre limpia a sus crías activando su micción refleja, e ingiere la orina recuperando así el agua y los electrolitos perdidos durante el amamantamiento (Gubernick y Alberts, 1987). De hecho, el lamido anogenital disminuye si se le suministra a la madre una solución de NaCl (Gubernick y Alberts, 1987). ¿Podría ser entonces que las madres tratadas con ChABC presentan una menor necesidad de recuperar agua y electrolitos? De ser así, esperaríamos que la administración de ChABC hubiese afectado el amamantamiento. Sin embargo, eso no se refleja en los resultados de este trabajo, al menos con la prueba maternal realizada como ya fue discutido. Por otro lado, si las crías necesitan del lamido de su madre para eliminar los desechos, y por ende para sobrevivir, ¿podrá ser que la menor supervivencia en las primeras 24 horas de las crías de madres tratadas con ChABC se debe a la ausencia de lamido? Las madres naturalmente lamen más a unas crías que a otras (Cavigelli et al., 2010), y siendo que las madres tratadas con la enzima lamieron poco a las crías sobrevivientes, quizás las que no sobrevivieron no fueron lamidas por sus madres. En este sentido, un estudio de Brouette-Lahlou et al., (1992) demostró que la ausencia de lamido anogenital provoca una tasa de mortalidad de las crías de un 35%. Teniendo en cuenta que en este trabajo el

porcentaje de supervivencia de las crías de madres tratadas con ChABC fue de 62% (38% de mortalidad), y que esas madres lamieron menos a sus crías, la hipótesis planteada parece coherente.

En cuanto a los mecanismos que desencadenan el lamido anogenital, Smotherman et al., (1974) y posteriormente Brouette-Lahlou et al., (1992) reportaron que en la mayoría de casos, aunque las necesidades fisiológicas de agua y sodio no sean altas, la madre acude a lamer a sus crías cuando éstas emiten vocalizaciones ultrasónicas de llamado. Sin embargo, este llamado induce también la conducta de acarreo, que no se vio afectada con la administración de ChABC. Por otro lado, el éster propionato de dodecilo que se encuentra en las glándulas prepuciales de las crías macho, regula la duración del lamido anogenital, y cuando el autor extrajo estas glándulas, el comportamiento de lamido se redujo. Estos estudios sugieren que la regulación de la conducta del lamido maternal es compleja e implica más de una señal sensorial, al menos auditivas y olfativas.

Además de la supervivencia, la estimulación táctil de los lamidos tanto corporales como anogenitales, tiene efectos importantes en el desarrollo emocional, endócrino y sexual de las crías. Por ejemplo, ratas adultas que fueron menos lamidas por sus madres, presentan un aumento en la densidad de receptores de la hormona liberadora de corticotropina en el Locus Coeruleus, y una disminución en el hipocampo, que se traduce en un perfil neuroendócrino más reactivo al estrés, mayor ansiedad en el test de campo abierto, y un aumento en el miedo en respuesta a situaciones novedosas (Liu et al., 1997; Caldji et al., 1998; Uriarte et al., 2007; Hane y Philbrook, 2012). También se ha mostrado que una rata adulta expuesta a cocaína tiende a consumir más cantidad cuanto menos lamida fue por su madre en la primera etapa de vida (Francis y Kuhar, 2007). Por otro lado, ratas macho que fueron menos lamidas por sus madres, presentan una mayor latencia a la eyaculación y a la intromisión (Moore, 1984). Teniendo en cuenta estos estudios, los resultados obtenidos en este trabajo resultan de gran importancia dado que entonces, las PNN del APOm regulando el lamido maternal, influyen en la supervivencia de las crías, pero también en varios aspectos de su desarrollo neuroendócrino y comportamental sostenido en la adultez. De qué manera las PNN que rodean neuronas del APOm están vinculadas con esta regulación, continúa siendo una gran interrogante.

Composición de las PNN en el APOm

Para avanzar en la comprensión del rol de estas estructuras es importante caracterizarlas. Complementando los antecedentes de nuestro laboratorio y mi tesina de grado, a partir del Capítulo III comenzamos a caracterizar la estructura de las PNN del APOm. Como vimos antes, las PNN están formadas por varios proteoglicanos en una composición variable,

aunque el Agrecano parece ser predominante. Varios autores han estudiado el rol de estas proteínas en la red a través de modelos *knock out* para los genes que las codifican. En ratones deficientes de brevicano, las PNN se forman pero con una menor densidad, mientras que en ratones deficientes de neurocano, la expresión de las PNN no varía con respecto al control (Zhou, et al., 2001; Brakebusch, et al., 2002). En cambio, la deficiencia de Agrecano tanto para un modelo *knock out* como para uno en el que el Agrecano no se puede procesar correctamente dentro del retículo endoplasmático, las PNN no se expresan (Giamanco, et al., 2010; Rowlands, et al., 2018). Esto sugiere un rol variable de los proteoglicanos que forman la red, siendo el Agrecano crítico en la formación y el mantenimiento de estas estructuras. Por esta razón, nos pareció adecuado comenzar evaluando la expresión del Agrecano, pero sería interesante poder continuar con otros componentes de la red.

Las imágenes obtenidas con inmunofluorescencia complementan el estudio de las PNN con la técnica citoquímica de DAB, pudiendo marcar distintos componentes con anticuerpos acoplados a distintos fluoróforos. De esta manera confirmamos que en hembras vírgenes en fase diestro, no se observan redes perineuronales dada la ausencia de marca tanto de WFA como de Agrecano. En cambio, las PNN que rodean las neuronas del APOm en ratas gestantes y lactantes están formadas por ambos componentes, Agrecano y GAGs. A su vez, a partir de esta técnica que permite identificar de manera más confiable los cuerpos neuronales independientemente de su tamaño, observamos que las PNN del APOm se asocian a una población neuronal discreta. Hasta el momento desconocemos la identidad neuroquímica y cuál es su rol dentro del circuito neural maternal, pero sabemos ahora que regulan específicamente la conducta del lamido maternal.

Observamos que la expresión de Agrecano en las PNN del APOm es muy variable, y no presenta niveles detectables en todas las PNN. Por otro lado, hay neuronas rodeadas por Agrecano, que no marcan para WFA, sugiriendo que la glicosilación del Agrecano también es variable. Esta variabilidad se ha reportado para otras áreas del cerebro (Matthews et al., 2002; Vitellaro-Zuccarello et al., 2007). Cabe destacar que de los dos componentes estudiados, los GAGs son notoriamente predominantes en las PNN del APOm. Este resultado sugiere que aunque existen otras técnicas para desarmar las PNN, parece adecuado utilizar la ChABC en el APOm, ya que además de ser la enzima más utilizada, actúa degradando los GAGs (Moon, et al., 2001; Murakami y Ohtsuka, 2003). Sin embargo, sería interesante evaluar si luego de la administración de la enzima, continúan expresándose los componentes proteicos de las PNN, o la misma también los degrada. Para comenzar a analizarlo, realizamos un estudio preliminar en el que observamos que la inyección de ChABC en el APOm de la rata gestante disuelve tanto los GAGs como el

Agrecano, marcados con la misma técnica de inmunofluorescencia que la utilizada en este Capítulo (ver Anexo).

Haber contado con una selección de fluoróforos que también nos permitiera usar 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), hubiese sido interesante para marcar los núcleos neuronales. De todos modos, la marca de NeuN sugiere en muchos casos el límite entre el núcleo y el citoplasma, y de manera interesante, observamos que en las neuronas rodeadas por PNN, el Agrecano también está presente en este último y no solo formando parte de la MEC. Esto indica probablemente la síntesis de Agrecano dentro de la neurona, y es coherente con los hallazgos de Matthews et al., (2002), quien reporta que la expresión del ARNm del Agrecano en el núcleo central del cerebro sigue la distribución de las neuronas con redes perineuronales. Asimismo, el autor no encontró una superposición en la marca de Agrecano y de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), sugiriendo que este proteoglicano es sintetizado por las neuronas y no por la glía. Es interesante que también se observan en las otras neuronas del área agregados en forma vesicular de Agrecano y GAGs, sugiriendo que la síntesis de estos componentes no se da exclusivamente en las células rodeadas por PNN. El hecho de que los componentes de la red están siendo sintetizados y estén disponibles en el citoplasma neuronal tanto en GD18 como en L2, donde las PNN presentan un alto grado de organización, explicaría por qué estas estructuras se arman en un corto período de tiempo si las desarmamos farmacológicamente, como observamos en el Capítulo I. Como ya discutimos previamente, este proceso es mediado por el perfil hormonal ovárico, puesto que las neuronas del APOm, rodeadas o no por las PNN, presentan receptores de estrógeno y progesterona (Uriarte et al., 2020).

Por otro lado, resulta llamativo que las neuronas rodeadas por PNN parecen tener mayor tamaño que las otras neuronas de su alrededor. Como se introdujo previamente, las PNN funcionan como una barrera protectora de la superficie neuronal, estabilizando las conexiones sinápticas establecidas (Bavelier et al., 2010; Sorg et al., 2016). Las neuronas más grandes podrían necesitar PNN para mantener sus extensos contactos con otras neuronas. Por otro lado, se ha reportado que la actividad neural promueve la formación de PNN (Brückner y Grosche, 2001; Dityatev et al., 2007). Asociado a esta actividad, se ha demostrado que las PNN en la corteza cerebral rodean neuronas con grandes demandas metabólicas, tasas elevadas de respiración mitocondrial, y un balance local iónico cuidadosamente mantenido (Costa et al., 2007; Morawski et al., 2014; Burket et al., 2017). Por otro lado, se sabe que el APOm integra la información proveniente de múltiples modalidades sensoriales y de algunas áreas cerebrales (Bakowska y Morrell, 1997; Shughrue et al., 1997; Numan et al., 1999; Champagne et al., 2001; Numan, 2006; Pereira y Morrell, 2011; Bridges, 2014), y proyecta hacia otras, como al Área Tegmental Ventral (VTA)

para modular la respuesta maternal (Numan, 2006; Pereira y Morrell, 2011; Bridges, 2014). Teniendo en cuenta estos reportes, podría ser que el gran tamaño de las neuronas rodeadas por PNN se deba a una mayor actividad y número de conexiones sinápticas con otros núcleos cerebrales. Las PNN que rodean estas neuronas estarían jugando un rol en el mantenimiento de estas conexiones sinápticas, necesarias para que se de este componente de la conducta maternal, que como ya discutimos, tiene implicancias importantes para la supervivencia y el desarrollo neuroendócrino de las crías.

Puesta a punto de la técnica de inyección seriada en hembras gestantes

Los resultados arrojados en el Capítulo I, complementarios a los obtenidos previamente (Pomi, 2019), permitieron diseñar un protocolo experimental para disolver las PNN del APOm durante toda la gestación. Sabiendo que luego de una disolución puntual las PNN comienzan a ensamblarse a las 72 horas, decidí administrar ChABC cada este período de tiempo para mantener disueltas a las PNN de manera prolongada. Esto implicó implantar una cánula guía a través de cirugía estereotáxica en GD7 y realizar 5 inyecciones desde GD10 hasta el día previo al parto, período en que se expresan las PNN en el APOm. Cabe destacar que este protocolo experimental desafiante desde el punto de vista técnico fue llevado a cabo con éxito, y resulta importante que el mismo no haya alterado ni la gestación ni el proceso de parto, pese a haber administrado el fármaco hasta el día anterior al mismo. Si bien el peso de las ratas inyectadas aumenta más lentamente, hacia el final de la gestación el mismo es recuperado, y no parece acompañarse de daños o pérdida de los fetos, dado que el tamaño de la camada no varió.

Como se introdujo previamente, durante la gestación ocurren numerosos cambios en el cerebro y específicamente en el APOm. Por esta razón, es importante que los procesos neurales no se estudien únicamente en machos o en hembras ciclantes. Esta técnica experimental puesta a punto en este trabajo ahora puede formar parte de la batería de herramientas para seguir explorando este y otros procesos cerebrales en la rata gestante.

CONCLUSIONES

En suma, los experimentos realizados en esta tesis nos permitieron profundizar sobre los procesos de neuroplasticidad cerebral asociados a la gestación y la lactancia, específicamente en el rol de las PNN del APOm sobre la expresión de la conducta maternal. Pusimos a punto una técnica para disolver a las PNN del APOm durante toda la gestación, a través de la cual demostramos que estas estructuras juegan un rol importante en la regulación del lamido maternal, así como en el desarrollo y supervivencia de las crías en las primeras 24 horas de vida. Por otro lado, mostramos que estas estructuras tienen una alta capacidad de reensamblaje en comparación con otras áreas del SNC, lo que sugiere un alto grado de robustez en el circuito maternal que asegura el establecimiento de una conducta clave en la vida del animal y en la supervivencia de la especie. Por último, comenzamos a caracterizar la composición de las PNN del APOm, y observamos que los GAGs son un componente principal en esta red. El Agrecano, presente de manera variable, forma parte de estas estructuras y está presente en el interior de las neuronas, lo que refleja una síntesis activa de este proteoglicano. A partir de los resultados de esta tesis surgen nuevas interrogantes que nos permitirán seguir trabajando en la comprensión de esta línea.

PERSPECTIVAS DE TRABAJO

En el primer Capítulo de esta tesis estudiamos la dinámica temporal de ensamblado de las PNN luego de ser disueltas con ChABC en el APOm. Los resultados obtenidos nos permitieron conocer en cuánto tiempo comienzan a ensamblarse las PNN de manera de diseñar el protocolo experimental de inyecciones seriadas llevado a cabo en el Capítulo II. Sin embargo, sería interesante continuar este Capítulo, y determinar en cuánto tiempo las PNN alcanzan su grado máximo de organización. De hecho, sería interesante poder cuantificarlo como lo hicieron algunos autores (Lensjo, 2013; Romberg et al., 2013; Murrall, 2022).

Por otro lado y como se mencionó anteriormente, los resultados del Capítulo II podrían complementarse con otra prueba maternal, aumentando el tiempo de separación previa entre madre-crías o realizando una prueba de mayor duración, que sean más adecuadas para evaluar la postura de hover over y de amamantamiento. De esta manera, podríamos conocer qué efecto tiene la disolución de las PNN en el APOm sobre estas conductas pasivas. Asimismo, para determinar si el comportamiento maternal es regulado por las PNN del APOm mediante el sistema motivacional, sería interesante realizar una prueba de preferencia que permita evaluar si las madres tratadas con ChABC tienen la misma motivación por sus crías que las madres controles. Por otra parte, sería bueno avanzar en la comprensión del rol de las PNN del APOm en la lactancia, para complementar este trabajo que se centra en la gestación.

La última perspectiva de trabajo, se asocia a continuar caracterizando la expresión de las PNN en el APOm. Por un lado, seguir determinado su composición, que en este trabajo comenzamos con el Agrecano y los GAG. Por otro lado, caracterizar las neuronas del APOm asociadas a las PNN. En primer lugar, evaluando si las mismas se activan durante el despliegue de la conducta maternal, a través de una detección inmunohistoquímica de doble marcado de WFA y de la proteína c-FOS. En segundo lugar, determinar el fenotipo de estas neuronas, a través de la inmunodetección de algunos neurotransmisores y neuropéptidos. En este sentido, comenzaría evaluando la inmunodetección de Galanina, ya que las neuronas galaninérgicas están involucradas en la expresión del CM, y presentan receptores de estrógeno, los cuales están presentes en las neuronas rodeadas por PNN del APOm (Lonstein et al., 2000; Wu, et al., 2014; Tsuneoka, et al., 2017; Uriarte et al., 2020). Por último, sería interesante poder identificar las conexiones de las neuronas del APOm asociadas a PNN, a través de trazadores anterógrados y retrógrados. Específicamente, comenzaría evaluando si estas neuronas proyectan hacia el Área Tegmental Ventral, para modular la respuesta maternal del lamido.

ANEXO

EFFECTO DE LA ChABC SOBRE DISTINTOS COMPONENTES DE LAS PNN EN EL APOm.

Para evaluar el efecto de la ChABC sobre distintos componentes de las PNN en el APOm, realizamos una inyección local de esta enzima en el día 19 de la gestación y evaluamos la expresión de GAG y de Agrecano 24 horas después.

MATERIALES Y MÉTODOS

Grupos experimentales:

- a) Hembras en día gestacional 19 inyectadas con vehículo (n=1)
- b) Hembras en día gestacional 19 inyectadas con ChABC (n=2)

Para obtener estos grupos experimentales se procedió de la misma manera que en el Capítulo II.

Inyección y obtención de las imágenes:

En el día 16 de gestación, los animales fueron implantados con cánulas bilaterales en el APOm a través de cirugía estereotáxica, y en día 19 de gestación se administró 1,4 µl de ChABC (1,0 U/µl) o solución salina estéril (Vehículo) a una velocidad de 0,25 µl/min. Veinticuatro horas después, los cerebros fueron fijados, extraídos y procesados de la misma forma que en los tres capítulos experimentales de esta tesis.

Para obtener las imágenes, se realizó una reacción de inmunofluorescencia con triple marcado, en forma similar a lo realizado en el Capítulo III: WFA, anti-Agrecano (Agr) y anti-Proteína Nuclear Neuronal (NeuN), para evidenciar GAGs, Agrecano, y cuerpos neuronales, respectivamente.

RESULTADOS PRELIMINARES

Como se observa en la Figura 25, la inyección de Vehículo en el APOm no altera la expresión de las PNN, expresando tanto GAG como Agrecano. Sin embargo, ambos componentes son degradados por la inyección de ChABC en el día 19 de gestación.

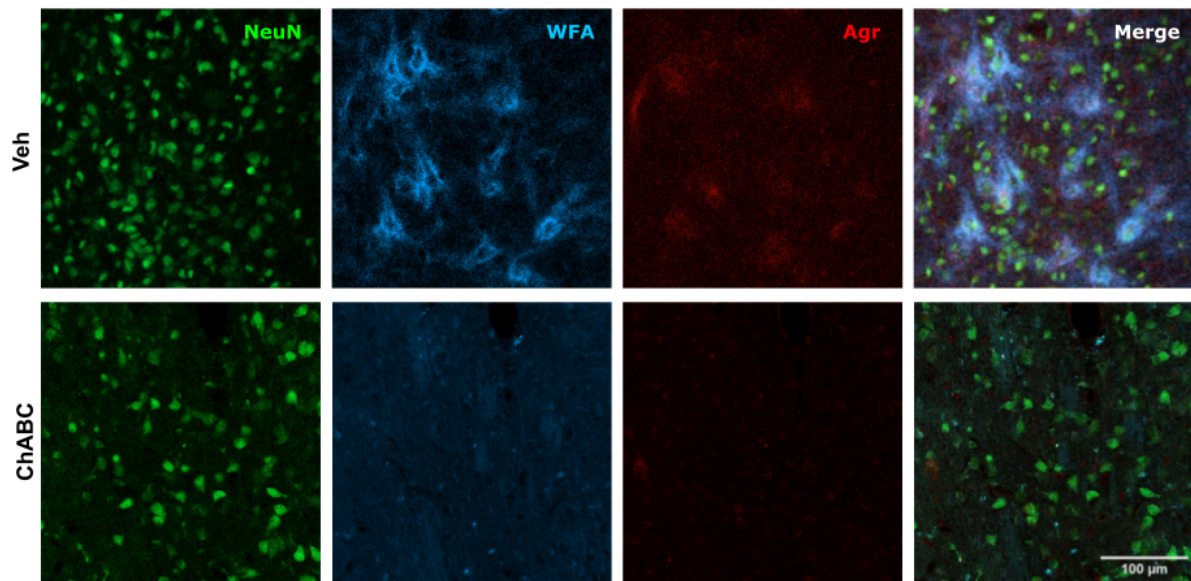


Figura 25. APOm de hembras en día 20 de la gestación inyectadas con Vehículo y con ChABC. Inmunorreactividad para NeuN (cuerpos neuronales, en verde), WFA (redes perineuronales, en azul), Agr (Agregano, en rojo), y la colocalización de los tres (Merge). Imágenes obtenidas con objetivo 20x.

CONCLUSIÓN

A pesar de que estos resultados son preliminares y es necesario un número mayor de animales para confirmarlo, observamos que la ChABC inyectada en el APOm de la rata gestante, no sólo disuelve los GAGs, sino también el Agregano, resultando en la disgregación total de las PNN.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrati, D., Fernández-Guasti, A., & Ferreira, A. (2008). The reproductive stage and experience of sexually receptive mothers alter their preference for pups or males. *Behavioral Neuroscience*, 122(5), 998–1004.
- 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.
- 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.
- 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. *J. Comp. Neurol.*, 386(2), 161–177.
- Balmer, T. S. (2016). Perineuronal nets enhance the excitability of fast-spiking neurons. *ENeuro*, 3(4).
- 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.
- 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.
- Bosch, O. J., & Neumann I. D. (2012). Both oxytocin and vasopressin are mediators of maternal care and aggression in rodents: from central release to sites of action. *Horm Behav.*, 61(3), 293-303.
- Brakebusch, C., Seidenbecher, C. I., Asztely, F., Rauch, U., Matthies, H., Meyer, H., ... & Fässler, R. (2002). Brevican-deficient mice display impaired hippocampal CA1 long-term potentiation but show no obvious deficits in learning and memory. *Molecular and cellular biology*, 22(21), 7417-7427.
- Bridges, R. S. (1984). A quantitative analysis of the roles of dosage, sequence and duration of estradiol and progesterone exposure in the regulation of maternal behavior in the rat. *Endocrinology*, 114, 930-940.

- Bridges, R. S. (2014). Neuroendocrine regulation of maternal behavior. *Front Neuroendocrinol.*, 36, 178-96.
- Brouette-Lahlou, I., Vernet-Maury, E., & Vigouroux, M. (1992). Role of pups' ultrasonic calls in a particular maternal behavior in Wistar rat: pups' anogenital licking. *Behavioural brain research*, 50(1-2), 147-154.
- Burket, J. A.; Urbano, M. R.; & Deutsch, S. I. (2017). Sugarcoated Perineuronal Nets Regulate "GABAergic" Transmission. *Clinical Neuropharmacology*, 40(3), 120–130.
- Brückner, G., & Grosche, J. (2001). Perineuronal nets show intrinsic patterns of extracellular matrix differentiation in organotypic slice cultures. *Experimental brain research*, 137, 83-93.
- Cabungcal, J. H., Steullet, P., Morishita, H., Kraftsik, R., Cuenod, M., Hensch, T. K., & Do, K. Q. (2013). Perineuronal nets protect fast-spiking interneurons against oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(22), 9130-9135.
- 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.
- 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.
- Carulli, D., Rhodes, K. E., & Fawcett, J. (2007). Upregulation of Aggrecan, Link Protein 1, and Hyaluronan Synthases during Formation of Perineuronal Nets in the Rat Cerebellum. *The Journal of Comparative Neurology*, 501(1), 83–94
- Cavigelli, S. A., Ragan, C. M., Barrett, C. E., & Michael, K. C. (2010). Within-litter variance in rat maternal behaviour. *Behavioural processes*, 84(3), 696-704.
- 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.
- 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.

- 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.
- Costa, C., Tortosa, R., Domènech, A., Vidal, E., Pumarola, M., & Bassols, A. (2007). Mapping of aggrecan, hyaluronic acid, heparan sulphate proteoglycans and aquaporin 4 in the central nervous system of the mouse. *Journal of chemical neuroanatomy*, 33(3), 111-123.
- Cragg, B. (1979). Brain extracellular space fixed for electron microscopy. *Neuroscience letters*, 15(2-3), 301-306.
- Deepa, S. S.; Carulli, D.; Galtrey, C.; Rhodes, K.; Fukuda, J.; Mikami, T.; Sugahara, K.; Fawcett, J. W. (2006). Composition of Perineuronal Net Extracellular Matrix in Rat Brain: A DIFFERENT DISACCHARIDE COMPOSITION FOR THE NET-ASSOCIATED PROTEOGLYCANS. *Journal of Biological Chemistry*, 281(26), 17789–17800.
- Devienne, G., Picaud, S., Cohen, I., Piquet, J., Tricoire, L., Testa, D., ... & Lambolez, B. (2021). Regulation of perineuronal nets in the adult cortex by the activity of the cortical network. *Journal of Neuroscience*, 41(27), 5779-5790.
- Dityatev, A., Brückner, G., Dityateva, G., Grosche, J., Kleene, R., & Schachner, M. (2007). Activity-dependent formation and functions of chondroitin sulfate-rich extracellular matrix of perineuronal nets. *Developmental neurobiology*, 67(5), 570-588.
- Dityatev, A., & Rusakov, D. A. (2011). Molecular signals of plasticity at the tetrapartite synapse. *Current opinion in neurobiology*, 21(2), 353-359.
- Dityatev, A., & Schachner, M. (2003). Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(6), 456.
- Dzyubenko, E., Gottschling, C., & Faissner, A. (2016). Neuron-glia interactions in neural plasticity: contributions of neural extracellular matrix and perineuronal nets. *Neural plasticity*, 2016(1), 5214961.
- 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.
- 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 Sign post*, 73-88.

- Ferreño, M. (2018). *Bases neurales y endócrinas de la flexibilidad comportamental de ratas madres*. [Tesis de doctorado, Universidad de la República, Uruguay].
- Fleming, A. S., Kraemer, G. W., Gonzalez, A., Lovic, V., Rees, S., & Melo, Á. (2002). Mothering begets mothering: the transmission of behavior and its neurobiology across generations. *Pharmacol Biochem Behav*, 73, 61-75.
- Fleming, A., & Rosenblatt, J. (1974). Maternal behavior in the virgin and lactating rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 85(5), 957-972.
- Francis, D. D., & Kuhar, M. (2008). Frequency of maternal licking and grooming correlates negatively with vulnerability to cocaine and alcohol use in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 90(3), 497-500.
- 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.
- Franks, B., Curley, J. P., & Champagne, F. A. (2011). Measuring Variations in Maternal Behavior: Relevance for Studies of Mood and Anxiety. *Neuromethods*, 209–224.
- Galea, L. A., Wide, J. K., & Barr, A. M. (2001). Estradiol alleviates depressive-like symptoms in a novel animal model of post-partum depression. *Behavioral Brain Research*, 122, 1-9.
- Galtrey, C. M., Kwok, J. C., Carulli, D., Rhodes, K. E., & Fawcett, J. W. (2008). Distribution and synthesis of extracellular matrix proteoglycans, hyaluronan, link proteins and tenascin-R in the rat spinal cord. *European Journal of Neuroscience*, 27(6), 1373-1390.
- Giamanco, K. A., Morawski, M., & Matthews, R. T. (2010). Perineuronal net formation and structure in aggrecan knockout mice. *Neuroscience*, 170(4), 1314-1327.
- Gogolla, N., Caroni, P., Lüthi, A., & Herry, C. (2009). Perineuronal nets protect fear memories from erasure. *Science*, 325(5945), 1258-1261.
- Golgi, C. (1882) *Sistema Nervoso*, Enciclopedia Médica, pp. 93–122, Vallardi
- 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.

- Grattan, D. R. (2001). The actions of prolactin in the brain during pregnancy and lactation. *Prog. Brain Res.*, 133, 153-171.
- 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.
- Hane, A. A., & Philbrook, L. E. (2012). Beyond licking and grooming: Maternal regulation of infant stress in the context of routine care. *Parenting*, 12(2-3), 144-153.
- Härtig, W., & Brauer, K. (1992). Agglutinin-labelled nets surround parvalbumin-containing neurons. *Neuroreport*, 3, 872.
- 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.
- Katarzyna, G. A & Nowicka, D. (2021). Hyaluronidase inhibition accelerates functional recovery from stroke in the mouse brain. *J Neurochem.*, 157(3), 781-801.
- 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.
- Kwok, J. C., Carulli, D., & Fawcett, J. W. (2010). In vitro modeling of perineuronal nets: hyaluronan synthase and link protein are necessary for their formation and integrity. *Journal of neurochemistry*, 114(5), 1447-1459.
- Lee, A., Clancy, S., & Fleming, A. (2000). Mother rats bar-press for pups: effects of lesions of the mPOA and limbic sites on maternal behavior and operant responding for pup reinforcement. *Behavioural Brain Research*, 108(2), 215-231.
- Lehrman, D. S. (1961). Hormonal regulation of parental behavior in birds and infrahuman mammals. In *Sex and Internal Secretions*. *Williams & Wilkins Company*, pp. 1268-1382.
- Lensjo, K. (2013). Perineuronal nets in cortical processing and plasticity. [Tesis de maestría, University of Oslo].
- Lensjo, K. K., Lepperød, M. E., Dick, G., Hafting, T., & Fyhn, M. (2017). Removal of perineuronal nets unlocks juvenile plasticity through network mechanisms of decreased inhibition and increased gamma activity. *Journal of Neuroscience*, 37(5), 1269-1283.

- Liu, D., Diorio, J., Tannenbaum, B., Caldji, C., Francis, D., Freedman, A., ... & Meaney, M. J. (1997). Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science*, 277(5332), 1659-1662.
- Lonstein, J. S., & Fleming, A. S. (2001). Parental behaviors in rats and mice. *Current protocols in neuroscience*, 17(1), 8-15.
- Lonstein, J., Greco, B., De Vries, G., Stern, J., & Blaustein, J. (2000). Maternal behavior stimulates c-fos activity within estrogen receptor alpha-containing neurons in lactating rats. *Neuroendocrinology*, 72, 91-101.
- Lonstein, J. 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.
- Lonstein, J., Wagner, C., & De Vries, G. (1999). Comparison of the "Nursing" and Other Parental Behaviors of Nulliparous and Lactating Female Rats. *Horm Behav*, 36, 242-251.
- Matthews, R. T., Kelly, G. M., Zerillo, C. A., Gray, G., Tiemeyer, M., & Hockfield, S. (2002). AggreCAN Glycoforms Contribute to the Molecular Heterogeneity of Perineuronal Nets. *The Journal of Neuroscience*, 22(17), 7536–7547
- Mattson, B. J., Williams, S. K., Rosenblatt, J., & Morrell, J. (2001). Comparison of two positive reinforcing stimuli: pups and cocaine throughout the postpartum period. *Behavioral Neuroscience*, 115, 683-694.
- Mauney, S. A., Athanas, K. M., Pantazopoulos, H., Shaskan, N., Passeri, E., Berretta, S., & Woo, T. U. W. (2013). Developmental pattern of perineuronal nets in the human prefrontal cortex and their deficit in schizophrenia. *Biological psychiatry*, 74(6), 427-435.
- 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.
- Miyata, S., Nishimura, Y., & Nakashima, T. (2007). Perineuronal nets protect against amyloid β -protein neurotoxicity in cultured cortical neurons. *Brain research*, 1150, 200-206.
- Monies, G. S., & Luque, E. H. (1988). Effects of ovarian steroids on vaginal smears in the rat. *Cells Tissues Organs*, 133(3), 192-199.

- Moon, L. D., Asher, R. A., Rhodes, K. E., & Fawcett, J. W. (2001). Regeneration of CNS axons back to their target following treatment of adult rat brain with chondroitinase ABC. *Nature neuroscience*, 4(5), 465-466.
- Moore, C. L. (1984). Maternal contributions to the development of masculine sexual behavior in laboratory rats. *Developmental Psychobiology: The Journal of the International Society for Developmental Psychobiology*, 17(4), 347-356.
- Morawski, M., Dityatev, A., Hartlage-Rübsamen, M., Blosa, M., Holzer, M., Flach, K., ... & Schachner, M. (2014). Tenascin-R promotes assembly of the extracellular matrix of perineuronal nets via clustering of aggrecan. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1654), 20140046.
- Morawski, M., Filippov, M., Tzinia, A., Tsilibary, E., & Vargova, L. (2014). ECM in brain aging and dementia. *Progress in brain research*, 214, 207-227.
- 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.
- Murakami, T., & Ohtsuka, A. (2003). Perisynaptic barrier of proteoglycans in the mature brain and spinal cord. *Archives of histology and cytology*, 66(3), 195-207.
- Murrall, K. (2022). *The role of perineuronal nets in the anterior bed nucleus of the stria terminalis in regulating emotional behaviour and neuronal transmission*. [Tesis de doctorado, University of Exeter].
- Numan, M. (2006). Hypothalamic neural circuits regulating maternal responsiveness toward infants. *Behavioral and Cognitive Neuroscience Reviews*, 5(4), 163-190.
- 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.
- Orpen, B., Furman, N., Wong, P., & Fleming, A. (1987). Hormonal influences on the duration of postpartum maternal responsiveness in the rat. *Physiology & Behavior*, 40(3), 307-315.
- Pantazopoulos, H., Markota, M., Jaquet, F., Ghosh, D., Wallin, A., Santos, A., ... & Berretta, S. (2015). Aggrecan and chondroitin-6-sulfate abnormalities in schizophrenia and bipolar disorder: a postmortem study on the amygdala. *Translational psychiatry*, 5(1), 496-496.

Paxinos, G. & Watson, C. (2004) *The Rat Brain: In Stereotaxic Coordinates: The New Coronal Set*. Elsevier Academic Press.

Pereira, M., & Ferreira, A. (2006). Demanding pups improve maternal behavioral impairments in sensitized and haloperidol-treated lactating female rats. *Behavioural Brain Research*, 175(1), 139-148

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.

Pizzorusso, T., Medini, P., Landi, S., Baldini, S., Berardi, N., & Maffei, L. (2006). Structural and functional recovery from early monocular deprivation in adult rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(22), 8517-8522.

Pomi, J. (2019). *Efecto de la desorganización de la matriz extracelular en el área preóptica media sobre el comportamiento maternal de la rata (Rattus norvegicus)*. [Tesis de grado, Universidad de la República, Uruguay]. Colibrí.

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.

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.

Rosenblatt, J.S., & Snowdon, C.T., (1996). *Parental Care: Evolution, Mechanisms, and Adaptive Significance*. (Vol. 25). Academic Press.

Rowlands, D., Lensjø, K. K., Dinh, T., Yang, S., Andrews, M. R., Hafting, T., ... & Dick, G. (2018). AggreCAN directs extracellular matrix-mediated neuronal plasticity. *Journal of Neuroscience*, 38(47), 10102-10113.

Sanchez, B., Kraszewski, P., Lee, S., & Cope, E. C. (2023). From molecules to behavior: Implications for perineuronal net remodeling in learning and memory. *Journal of Neurochemistry*.

Seeger, G., Lüth, H. J., Winkelmann, E., & Brauer, K. (1996). Distribution patterns of Wisteria floribunda agglutinin binding sites and parvalbumin-immunoreactive neurons in the human visual cortex: a double-labelling study. *J Hirnforsch*, 37(3), 351-366.

- Shiomi, T., Lemaître, V., D'Armiento, J., & Okada, Y. (2010). Matrix metalloproteinases, a disintegrin and metalloproteinases, and a disintegrin and metalloproteinases with thrombospondin motifs in non-neoplastic diseases. *Pathology International*, 60(7), 477–496.
- 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.
- 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.
- Slaker, M., Churchill, L., Todd, R. P., Blacktop, J. M., Zuloaga, D. G., Raber, J., ... & Sorg, B. A. (2015). Removal of perineuronal nets in the medial prefrontal cortex impairs the acquisition and reconsolidation of a cocaine-induced conditioned place preference memory. *Journal of Neuroscience*, 35(10), 4190-4202.
- Smotherman, W. P., Bell, R. W., Starzec, J., Elias, J., & Zachman, T. A. (1974). Maternal responses to infant vocalizations and olfactory cues in rats and mice. *Behavioral biology*, 12(1), 55-66.
- Sorg, B. A., Berretta, S., Blacktop, J. M., Fawcett, J. W., Kitagawa, H., Kwok, J. C. F., & Miquel, M. (2016). Casting a wide net: Role of perineuronal nets in neural plasticity. *Journal of Neuroscience*, 36(45), 11459-11468.
- Spreafico, Roberto; De Biasi, Silvia; Vitellaro-Zuccarello, Laura (1999). The Perineuronal Net: A Weapon for a Challenge. *Journal of the History of the Neurosciences*, 8(2), 179–185.
- Stern, J. M. (1996). *Somatosensation and maternal care in Norway rats*. In *Advances in the study of behavior*. (Vol. 25), pp. 243-294. Academic Press.
- Stern, R. & Jedrzejas, M. J. (2006). Hyaluronidases: their genomics, structures, and mechanisms of action. *Chem Rev.*, 106(3), 818-39.
- 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.
- Steullet, P., Cabungcal, J. H., Cuénod, M., & Do, K. Q. (2014). Fast oscillatory activity in the anterior cingulate cortex: dopaminergic modulation and effect of perineuronal net loss. *Frontiers in cellular neuroscience*, 8, 244.

- Suttkus, 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. *Cell death & disease*, 5(3), 1119-1119.
- Takesian, A. E., & Hensch, T. K. (2013). Balancing plasticity/stability across brain development. *Progress in brain research*, 207, 3-34.
- Testa, D., Prochiantz, A., & Di Nardo, A. A. (2018). Perineuronal nets in brain physiology and disease. In *Seminars in cell & developmental biology*, Academic Press, 89, pp. 125-135.
- Trumbo, S. T., Royle, N. J., & Smiseth, P. T. (2012). *Patterns of parental care in invertebrates*. The evolution of parental care, 81-100.
- Tsuneoka, Y., Yoshida, S., Takase, K., Oda, S., Kuroda, M., & Funato, H. (2017). Neurotransmitters and neuropeptides in gonadal steroid receptor-expressing cells in medial preoptic area subregions of the male mouse. *Sci Rep*, 7, 9809.
- Uriarte, N., 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.
- Uriarte, N., Ferreño, M., Méndez, D., & Nogueira, J. (2020). Reorganization of perineuronal nets in the medial Preoptic Area during the reproductive cycle in female rats. *Scientific reports*, 10(1), 5479.
- Vitellaro-Zuccarello, L.; Bosisio, P.; Mazzetti, S.; Monti, C.; & De Biasi, S. (2007). Differential expression of several molecules of the extracellular matrix in functionally and developmentally distinct regions of rat spinal cord. *Cell Tissue Res.*, 327(3), 433-47.
- Weigel, P. H. (2015). Hyaluronan synthase: The mechanism of initiation at the reducing end and a pendulum model for polysaccharide translocation to the cell exterior. *International Journal of Cell Biology*, 2015(1), 367579.
- Wu, Z., Autry, A. E., Bergan, J. F., Watabe-Uchida, M., & Dulac, C. G. (2014). Galanin neurons in the medial preoptic area govern parental behavior. *Nature*, 509(7500), 325-330
- Zhou, X. H., Brakebusch, C., Matthies, H., Oohashi, T., Hirsch, E., Moser, M., ... & Fässler, R. (2001). Neurocan is dispensable for brain development. *Molecular and Cellular Biology*, 21(17), 5970-5978.