



**Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta
Posgrado en Ciencias Biológicas**

Efecto de lesionar químicamente el núcleo
paraventricular (NPV) de conejas lactantes sobre la
periodicidad circadiana del amamantamiento y la
duración del tiempo en el nido

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Miguel Adrián Domínguez Godoy

Directora

Dra. Gabriela González-Mariscal Muriel



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta
Posgrado en Ciencias Biológicas

Efecto de lesionar químicamente el núcleo
paraventricular (NPV) de conejas lactantes sobre la
periodicidad circadiana del amamantamiento y la
duración del tiempo en el nido

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Miguel Adrián Domínguez Godoy

Comité Tutorial

Dra. Gabriela González-Mariscal Muriel

Dr. Ángel Ismael Melo Salazar

Dr. Kurt Hoffman Tiber

Dr. Mario Salvador Caba Vinagre

Dr. Raúl Aguilar Roblero



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Maestría en Ciencias Biológicas



**COORDINACIÓN MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
P R E S E N T E**

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del Proyecto de tesis que **Miguel Adrián Domínguez Godoy** realiza para la obtención del grado de Maestro en Ciencias Biológicas, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es **“Efecto de lesionar químicamente el núcleo paraventricular (NPV) de conejas lactantes sobre: la periodicidad del amamantamiento y la duración del tiempo en el nido”**.

Sin otro particular, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE
TLAXCALA, TLAX., NOVIEMBRE 5 DE 2014

DRA. GABRIELA GONZÁLEZ MARISCAL-MURIEL

DR. RAÚL ANTONIO AGUILAR ROBLERO

DR. ANGEL ISMAEL MELO SALAZAR

DR. KURT LEROY HOFFMAN

DR. MARIO SALVADOR CABA VINAGRE



Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado Bajo la Norma:
ISO 9001:2000-NMX-CC-9001-IMNC-2000



Km. 1.5 Carretera Tlaxcala-Puebla CP 90070 Tel/Fax: 01(246)462-15-57 e-mail: posgradoctbcuat@gmail.com
Tlaxcala, Tlax.

Todo el trabajo experimental de esta tesis se realizó en el Centro de Investigación en Reproducción Animal, CINESTAV-Universidad Autónoma de Tlaxcala, ubicado en la población de Ixtacuixtla, Tlax.

AGRADECIMIENTOS

Al CTBC

A la Universidad Autónoma de Tlaxcala (UAT)

Al CONACyT por la beca (417849) para realizar el proyecto.

A mi comité tutorial:

Dra. Gabriela González-Mariscal Muriel
Dr. Ángel Ismael Melo Salazar
Dr. Kurt Hoffman Tiber
Dr. Mario Salvador Caba Vinagre
Dr. Raúl Aguilar Roblero
Dra. Ángeles Jiménez

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Gracias a todos los que me ayudaron a realizar este trabajo.

A la Dra. Gabriela, por permitirme trabajar en el laboratorio y darme un proyecto.

A Rosario, Toño, Melo, Ana Celia, Ángeles, por compartirme transmitirme sus enseñanzas y técnicas, sacarme de dudas y por cuestionarme. Muchas gracias por soportarme por tanto tiempo.

Gracias a los intendentes del CIRA. Por mantener las instalaciones y a los animales, en óptimas condiciones para trabajar.

A mi familia.



Ilustración: Braulio Domínguez.

RESUMEN

En la coneja, la conducta maternal (CM) inicia antes del parto con la construcción del nido maternal. Este proceso consta de tres actividades: la excavación de una madriguera, el acarreo de paja y el arrancado de su propio pelo incorporados al nido. El inicio y declinación de estas etapas están regidos por cambios en la concentración de hormonas de la gestación. La CM post-parto se centra en la lactancia que dura cerca de 30 días, durante los cuales, la frecuencia con la que la madre entra al nido, se mantiene constante y cada episodio de amamantamiento dura aproximadamente tres minutos y ocurre con periodicidad circadiana. El estímulo mecánico de la succión es indispensable para la regulación de la CM post-parto, pues al reducir la camada a uno ó dos críos, se incrementa: el número de entradas de la madre al nido en un día y el tiempo que pasa la madre con los críos dentro del nido.

Las consecuencias neuroendócrinas de la succión en la coneja incluyen, principalmente, la secreción de la prolactina y la oxitocina (OT), para la producción y la evacuación de la leche, respectivamente. Por otra parte, durante la lactancia, se incrementa el número y el tamaño de las neuronas que sintetizan OT, en el núcleo supraóptico (NSO) y el núcleo paraventricular (NPV), en comparación con el estro y la gestación. Asimismo, el estímulo es suficiente para sincronizar la actividad locomotora y la expresión de PER1 en las neuronas oxitocinérgicas del NPV y el NSO pero no en el núcleo supraquiasmático (NSQ). Por otro lado, en la rata, la lesión del NPV en el embarazo tardío previene el inicio del comportamiento maternal mientras que las lesiones hechas durante la lactancia temprana provocan solamente efectos selectivos sobre algunos aspectos de la conducta maternal.

La evidencia sugiere que, las señales provenientes de la succión impactan sobre regiones específicas del cerebro, que regulan la motivación de la madre para entrar al nido y amamantar a su camada. Sin embargo, se desconoce la participación del NPV en la regulación de la periodicidad y la duración de cada episodio de amamantamiento. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar los efectos de la lesión química del NPV durante la lactancia temprana, sobre la conducta de amamantamiento (i.e. la periodicidad y la duración de cada episodio de succión), en conejas que amamantan a una camada de 6 a 7 críos durante la lactancia temprana. Se utilizaron 21 conejas adultas primíparas (*Oryctolagus cuniculus*), que amamantaban una camada de 6 a 8 críos y mostraron un comportamiento materna normal a lo largo de siete días consecutivos. Se mantuvieron en un bioterio

[fotoperiodo Luz/ Oscuridad (14h:10) a temperatura natural] , dentro del cual se instaló un sistema de circuito cerrado de video para monitorear ininterrumpidamente su comportamiento. Las hembras dispusieron de agua y alimento *ad libitum*, que se cuantificaron diariamente como indicadores de bienestar. Luego de siete días de registro conductual (post-parto), las hembras fueron sometidas a la microinyección bilateral del NPV (coordenadas: A = 1.5, L = ±1, DV = 15) con AK (0.5µg/µl). Las hembras se sacrificaron 15 días después de la cirugía, sus cerebros fueron removidos, crioprotectados y seccionados coronalmente a 40µm. El tejido fue montado en portaobjetos y teñidos con violeta de cresilo para apreciar las estructuras neuroanatómicas y determinar el volumen del área lesionada por medio del método de Cavalieri. Mientras que para calcular la hora del amamantamiento en cada hembra, y si los eventos ocurrían con periodicidad circadiana, se utilizó el análisis de Rayleigh. En cuanto a los indicadores de bienestar, se encontró que el consumo promedio de agua y alimento durante la gestación fue de 407 ± 157.7 ml. y 154 ± 59.7gr respectivamente, mientras durante los primeros días de lactancia, las hembras registraron un incremento significativo (P<0.001) en ambos indicadores (agua: 551.6 ± 157.6 ml; alimento: 237.3 ± 91.8gr Media±DE). Luego de la cirugía, no se encontraron diferencias significativas en el consumo de agua y alimento entre los tres grupos de hembras lesionadas. Sin embargo, cuatro hembras dejaron de comer y/o beber por un día luego de la lesión, tres de ellas pertenecientes al grupo de lesión bilateral del NPV. El 100% de las hembras lesionadas fuera del NPV (n=8) retuvo la motivación para entrar al nido, y amamantar a su camada, una sola vez en 24hrs. El 100% de las hembras con lesión unilateral (n=5), con un daño promedio de 19.9% en el NPV, retuvo la motivación para amamantar a sus críos dentro del nido. El 80% de ellas amamanto una sola vez cada 24hrs, mientras que el 20% restante, incremento la frecuencia de los amamantamientos. De las hembras lesionadas bilateralmente (n=8), el 50%, con un daño promedio de 29.8% en el NPV, retuvo la motivación para amamantar a su camada, sin embargo, alteraron la frecuencia de los amamantamientos en 24 horas. El 50% restante, con un daño promedio de 33.6% en el NPV, perdió la motivación para amamantar. Ninguna lesión modificó la duración de los episodios de amamantamiento. Por lo tanto, el presente trabajo sugiere una participación importante del NPV en la regulación de dos aspectos de la CM de la coneja: la periodicidad circadiana del amamantamiento y la motivación para amamantar.

Índice de temas		Pagina
1 INTRODUCCIÓN.....		1
1.1 Conducta parental.....		1
1.1.1 Conducta maternal.....		1
1.1.2 Conducta maternal en la coneja.....		1
1.1.2.1 Conducta maternal pre-parto (CM pre-parto).....		1
1.1.2.2 Conducta maternal post-parto (CM post-parto).....		2
1.2 Lactancia.....		2
1.2.1 Síntesis y eyección de leche.....		3
1.3 Núcleo paraventricular.....		4
1.3.1 Núcleo paraventricular y conducta maternal.....		6
1.4 Oxitocina y Vasopresina (generalidades).....		7
1.4.1 Oxitocina.....		9
1.4.1.1 Oxitocina y conducta maternal.....		10
1.4.2 Vasopresina.....		13
1.4.2.1 Vasopresina y conducta maternal.....		13
1.5 Regulación de la CM post-parto.....		14
1.5.1 Frecuencia de succión en la coneja.....		16
1.6 Ritmos biológicos.....		18
1.6.1 Regulación de los ritmos biológicos.....		20
2 JUSTIFICACIÓN.....		22
3 HIPÓTESIS.....		23
4 OBJETIVOS.....		24
4.1 Objetivo general.....		24
4.2 Objetivos particulares.....		24
5 MATERIALES Y MÉTODOS.....		25
5.1 Animales y alojamiento.....		25
5.1.1 Apareamientos.....		25
5.2 Indicadores de bienestar.....		25
5.2.1 Medición de agua y alimento.....		25
5.3 Registros conductuales.....		26
5.3.1 Análisis de Rayleigh.....		26
5.4 Procedimiento experimental.....		27
5.4.1 Cirugías.....		27
5.4.2 Sacrificio y perfusión.....		28
5.4.3 Histología y evaluación de la lesión.....		28
5.4.3.1 Método de Cavalieri.....		28
6 RESULTADOS.....		29
6.1 Observaciones pre-lesión.....		29
6.2 Observaciones post-lesión.....		38
6.2.1 Histología.....		38
6.2.1.1 Caracterización e identificación de la lesión.....		38
6.2.1.1 Ubicación de las lesiones.....		38
6.3 Grupo 1 (Hembras lesionadas fuera del NPV).....		41
6.3.1 Histología.....		41
6.3.2 Registro conductual.....		50

6.4 Grupo 2 (Hembras con lesión unilateral del NPV).....	51
6.4.1 Histología.....	51
6.4.2 Registro conductual.....	57
6.5 Grupo 3 (Hembras con lesión bilateral del NPV).....	57
6.5.1 Histología.....	57
6.5.2 Registro conductual.....	58
7 DISCUSIÓN.....	74
7.1 Efectos de la lesión del NPV sobre la CM.....	74
7.2 Efecto de la lesión del NPV sobre la ingestión de agua y alimento.....	80
8 CONCLUSIÓN.....	81
9 APENDICE.....	82
9.1 ÁCIDO KAÍNICO.....	82
9.1.1 Glutamato.....	82
9.1.2 Ácido kaínico (AK).....	82
10 BIBLIOGRAFÍA.....	85

Índice de figuras

Fig.1. Vía ascendente implicada en la liberación de OT y PRL durante la succión.....	3
Fig.2. Reflejo de eyección de leche.....	5
Fig.3. Ubicación de las neuronas AVP y OT en el NPV del conejo.....	6
Fig.4. Neurohipófisis y sus secreciones.....	8
Fig.5. Ubicación de los receptores a AVP y OT en el cerebro de la rata.....	12
Fig.6. Actograma de actividad de los críos y hora del amamantamiento.....	19
Fig.7. Mediciones de agua y alimento.....	26
Fig.8. Sistema de registro de video.....	26
Fig.9. Sistema de microinyección y localización de las cánulas.....	27
Fig.10. Estimación de volumen por el método de Cavalieri.....	29
Fig.11. Grafica de Rayleigh para los primeros ocho días de lactancia.....	33
Fig.12. Consumo de agua y alimento.....	36
Fig.13. Identificación de la lesión con ácido kaínico.....	39
Fig.14. Ubicación de las lesiones.....	40
Fig.15. Ubicación de la lesión y actograma de la hembra 2302.....	42
Fig.16. Ubicación de la lesión y actograma de la hembra 2314.....	43
Fig.17. Ubicación de la lesión y actograma de la hembra H1G2.....	44
Fig.18. Ubicación de la lesión y actograma de la hembra H2G4.....	45
Fig.19. Ubicación de la lesión y actograma de la hembra H5G3.....	46
Fig.20. Ubicación de la lesión y actograma de la hembra H7G2.....	47
Fig.21. Ubicación de la lesión y actograma de la hembra H8G5.....	48
Fig.22. Ubicación de la lesión y actograma de la hembra H9G3.....	49
Fig.23. Análisis de Rayleigh grupo 1 antes de la cirugía.....	50
Fig.24. Ubicación de la lesión y actograma de la hembra 2313.....	52
Fig.25. Ubicación de la lesión y actograma de la hembra H10G2.....	53
Fig.26. Ubicación de la lesión y actograma de la hembra H1G5.....	54
Fig.27. Ubicación de la lesión y actograma de la hembra H2G5.....	55
Fig.28. Ubicación de la lesión y actograma de la hembra H8G2.....	56
Fig. 29. Análisis de Rayleigh grupo 2.....	57

Fig.29. Ubicación de la lesión y actograma de la hembra H9G2.....	60
Fig.30. Ubicación de la lesión y actograma de la hembra H3G4.....	61
Fig.31. Ubicación de la lesión y actograma en la hembra H3G5.....	63
Fig.32. Ubicación de la lesión y actograma en la hembra H4G5.....	64
Fig.33. Ubicación de la lesión en la hembra H4G4.....	65
Fig.33 (C y D). Actogramas de la hembra H4G4.....	66
Fig.34. Análisis de Rayleigh para la hembra H4G4.....	66
Fig.35. Ubicación de la lesión y actograma de la hembra H5G5.....	68
Fig.36. Ubicación de la lesión y actograma de la hembra H6G3.....	69
Fig.37. Ubicación de la lesión y actograma de la hembra H6G5.....	70
Fig.38. Grafica de Rayleigh para la hembra H6G5.....	71
Fig.39. Muerte celular por AK.....	83

Índice de tablas

Tabla I. Nocturnidad.....	30
Tabla II. Duración dentro del nido.....	31
Tabla III. Análisis de Rayleigh.....	32
Tabla IV. Consumo de agua.....	34
Tabla V. Consumo de alimento.....	35
Tabla VI. Peso corporal.....	37
Tabla VII. Estimación de volumen del NPV en el grupo 1.	41
Tabla VIII. Estimación de volumen de la lesión y del NPV en el grupo 2.....	51
Tabla IX. Estimación de volumen de la lesión en el NPV del grupo 3.....	58
Tabla X. Ubicación y volumen de la lesión.....	72
Tabla XI. Número de amamantamientos.....	73

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Conducta parental

Se denomina conducta parental (CP) a la serie de acciones ejecutadas por alguno de los miembros adultos de una especie, hacía uno de los miembros reproductivamente inmaduros para asegurar la supervivencia y crecimiento hasta la madurez (Numan, 1988).

1.1.1 Conducta maternal

Dentro de los cuidados parentales, se encuentran aquéllos proporcionados exclusivamente por la madre para asegurar el desarrollo normal de su descendencia. En los mamíferos placentarios, varía entre las especies en relación al el grado de desarrollo que presentan los críos al momento de nacer (Numan, 1988). Las crías con menor grado de desarrollo al nacimiento (altriciales: ratas, ratones, perros, conejos) requieren de mayores cuidados en comparación con aquellas más desarrolladas (precoces: caballos, ballenas, liebres).

La CM se puede diferenciar en dos etapas. La primera de ellas, tiene lugar durante la gestación y se denomina CM pre-parto. Esta etapa se caracteriza por conductas indirectas hacia la camada como el aislamiento (ovejas y cabras), el incremento en la agresividad (ratas, ratones y hámsters) y la construcción del nido maternal (lagomorfos) (González-Mariscal y Poindron, 2002). La segunda etapa ocurre después del parto, por lo que, se denomina CM post-parto. Durante esta última fase de la CM se presenta una serie completamente diferente de conductas, esta vez, dirigidas exclusivamente a las crías. La CM post-parto incluye el acicalamiento, el acarreo y los lamidos genitales pero el componente más conspicuo entre los mamíferos es el amamantamiento.

1.1.2 Conducta maternal en la coneja

1.1.2.1 Conducta maternal pre-parto (CM pre-parto)

La coneja en vida silvestre, a mediados de la gestación, se aparta del área común, donde se localiza el resto de los conejos, para construir una madriguera maternal en algún sitio oculto (Verga *et al.*, 1978). La CM pre-parto inicia con la construcción del nido maternal puede ser

dividida en tres etapas (Zarrow *et al.*, 1965; González-Mariscal *et al.*, 1994), cuyo inicio y declinación, están regidos por cambios en la concentración de hormonas de la gestación. La excavación inicia alrededor del día 21, alcanzando su máxima expresión entre los días 25 y 27, asociada con altos niveles de estradiol (60 pg/ml) y progesterona (9 ng/ml) en sangre. El acarreo de paja inicia alrededor del día 30 (cuando declina la excavación), alcanzando su máxima expresión uno o dos días después, coincide con un descenso de progesterona y un incremento en los niveles de estradiol (75 pg/ml) en sangre. Finalmente el arrancado de pelo, su máxima expresión se presenta un día después del parto, coincidiendo con altos niveles de testosterona (308 pg/ml) y prolactina (160 ng/ml) en sangre (González-Mariscal *et al.*, 1994; 1996).

1.1.2.2 Conducta maternal post-parto (CM post-parto)

Tan pronto como cada uno de los gazapos atraviesa el canal de parto, la madre se come la placenta (Melo y González-Mariscal, 2003). Al terminar, dedica su atención a la higiene del nido, para luego salir de la madriguera y cerrar el acceso (Verga *et al.*, 1978). La coneja no regresará hasta el día siguiente para amamantar a sus crías. El resto de la CM-post parto se centrará únicamente en la lactancia. En la coneja la lactancia dura cerca de 30 días, durante los cuales la frecuencia con la que entra al nido se mantiene constante (Hoy y Selzer, 2000). Cada episodio de amamantamiento dura aproximadamente tres minutos y ocurre una vez al día cada 24 horas, dentro del nido maternal (González-Mariscal *et al.*, 2013, Gilge 1993, 1995; Hoy y Selzer, 2000).

1.2 Lactancia

La producción de leche, en los mamíferos placentarios, consta de dos fases (Neville, 2006): Una fase de calostro (días 1 a 3), el cual contiene altas concentraciones de sustancias protectoras como inmunoglobulinas (Cowie, 1984) y una fase láctea (días 4 a 30), en la que se producen grandes cantidades de leche, que está constituida por agua, proteínas, azúcares (lactosa), lípidos y minerales, así como factores de crecimiento y hormonas (Delouis y Richard, 1993).

1.2.1 Síntesis y eyección de leche

La leche es sintetizada en el citoplasma de las células alveolares de la glándula mamaria, a partir de moléculas elementales tomadas de la sangre (Delouis y Richard, 1993; Tucker, 2000). Posteriormente la leche es almacenada en el lumen del alveolo para ser evacuada al momento de la succión. Durante el amamantamiento, la activación el plexo nervioso de la piel del pezón, el cual es sensible al tacto, produce impulsos nerviosos que son disparados por los receptores sensoriales del pezón y transmitidos desde los nervios del pezón, hasta la médula espinal, pasando por el núcleo cervical lateral (situado en la parte dorsal del funículo lateral, a nivel de las cervicales C1-C3), el núcleo externo del colículo inferior y la región peripeduncular (Fig 1). Por un lado, la señal inhibe la liberación de dopamina de las neuronas tuberoinfundibulares, del núcleo arcuato del hipotálamo, e induce en los lactotrofos la liberación de prolactina (PRL), el principal componente del complejo galactopoiético (y el único necesario para una producción láctea normal en la coneja) (Cowie, 1984; Clapp *et al.*, 1987). Asimismo, la integración de las señales, del reflejo de succión, tiene lugar en las neuronas oxitocinérgicas del núcleo supraóptico (NSO) y el núcleo paraventricular (NPV). Estas neuronas liberan una descarga de oxitocina (OT) a través la neurohipófisis. Cada liberación arroja cantidades masivas de OT a los vasos portahipofisarios. Una vez en la circulación, llega a las células blanco de la glándula mamaria, donde produce la contracción de las células mioepiteliales de los ductos lactíferos y alveolos (Delouis y Richard, 1993; Clapp, 1987; Tucker, 2000; Gimpl y Faharenholz, 2001; Neville, 2006) (Fig 2).

Fig 1. Vía ascendente implicada en la liberación de OT y PRL durante la succión

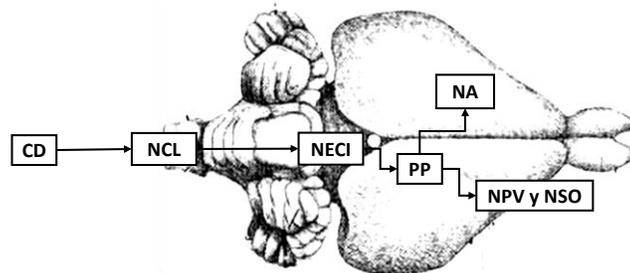


Figura 1. Vía ascendente implicada en la liberación de OT y PRL durante la succión. Cuerno dorsal (CD); Núcleo cervical lateral (NCL), Núcleo externo del colículo inferior (NECI); Región peripeduncular (PP); Núcleo paraventricular (NPV); Núcleo supraóptico (NSO) y Núcleo arcuato (NA). Modificado de Wakerley, 2006.

1.3 Núcleo paraventricular

El núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV) es una estructura bilateral que rodea al tercer ventrículo en sentido anteroposterior. Se caracteriza por ser una estructura altamente vascularizada capaz de integrar señales provenientes de diversas aferencias (i.e.: núcleo arcuato, área preóptica media) y generar señales eferentes, neuroendocrinas y autonómicas, a través de sus axones, hacia otras áreas (i.e.: neurohipófisis, eminencia media, médula espinal) (Simmons y Swanson, 2008; Stern, 2011). Su composición glial es principalmente de astrocitos, mientras que su organización neuronal consta de una población mixta de células magnocelulares y parvocelulares que producen mayoritariamente oxitocina (OT) y vasopresina (AVP), respectivamente (Tasker *et al.*, 2002), así como también, somatostatina, encefalina, angiotensina II, renina, glucagón, hormona liberadora de adrenocorticotropina, colecistoquinina, dinorfina y tirosina hidroxilasa (TH) (Sofroniew, 1985). Además de la producción hormonal, difieren en su tamaño y destino axonal. La mayoría de las neuronas magnocelulares envían sus axones hacia la neurohipófisis y las neuronas parvocelulares se extienden a diversas regiones del cerebro como la estría medular, la estría terminal, la cápsula interna (Buijs *et al.*, 1978), el bulbo olfatorio, el septum lateral, el núcleo de la banda diagonal, la región supramamilar, la amígdala y el hipocampo (Sofroniew 1985). Tan sólo cerca del 0.2% de las neuronas del NPV poseen axones colaterales, es decir, que envían sus axones tanto a la neurohipófisis como regiones fuera del hipotálamo (Gimpl y Fahrenholz, 2001).

Fig 2. Reflejo de eyección de leche.

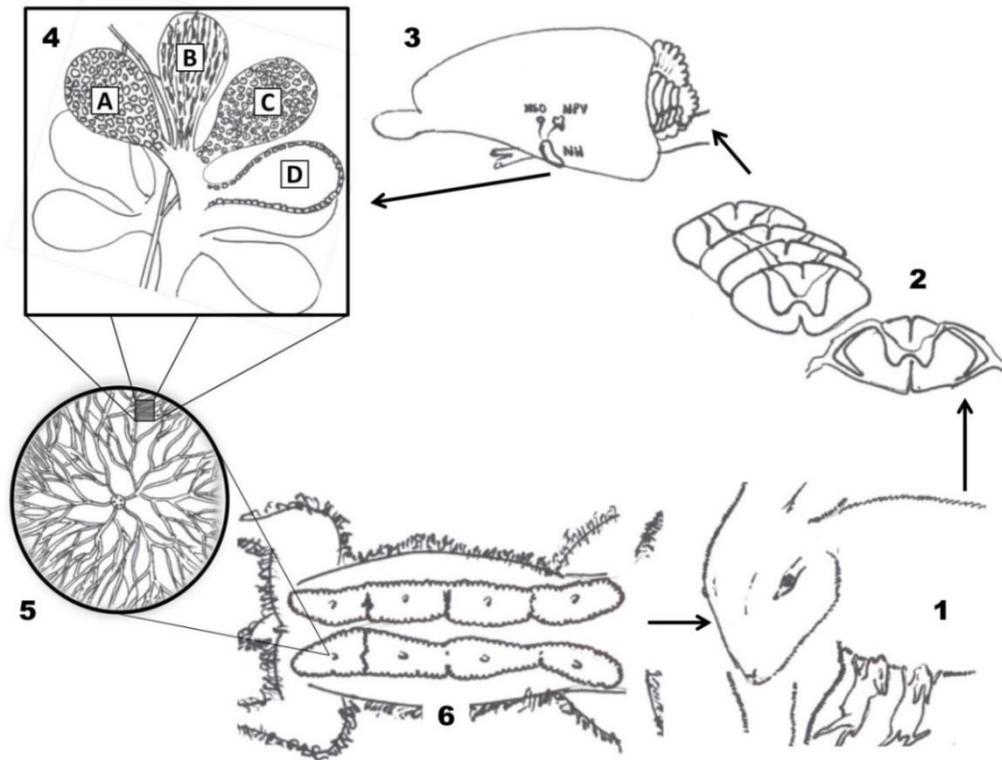


Fig 2.: 1 – Estimulación mecánica de los pezones de la madre provocada por la succión de los críos; 2 – Cortes coronales del cordón espinal, por donde viaja el estímulo de la succión (modificado de Toker A, 2000); 3 – Corte sagital del cerebro de la coneja: el estímulo es recibido por las neuronas del NPV y NSO (modificado de Popesko P, 1992); 4 – Alveolos de la glándula mamaria. A) Capilares, B) Células mioepiteliales, C) Células alveolares, D) Lumen del alveólo (modificado de Cowie T, 1984); 5 – Pezón. Se unen de 5 a 6 galactóforos (modificado de Cowie T, 1984) y 6 – Disección ventral de las glándulas mamarias (modificado de Cooper A, 1840).

En la rata la distribución de las neuronas del NPV es particularmente heterogénea, consiste en una mezcla de neuronas parvocelulares y magnocelulares que se encuentran distribuidas en sub-núcleos. El tamaño y la forma de las neuronas que sintetizan OT y AVP, varía considerablemente: algunas de ellas son ovales mientras que otras son más alargadas (fusiformes), con diámetros que van de los 10 a los 35 μm (Sofroniew, 1985). En el conejo, la parte anterobasal del NPV inicia rostralmente a nivel del núcleo supraquiasmático, se extiende dorsocaudalmente a lo largo del tercer ventrículo y lateralmente hacia el fornix (Fig. 3). Sus poblaciones neuronales varían, morfológicamente, en su aspecto. Mientras que las células AVP son granulosa, las OT son de apariencia lisa y afinada. Adicionalmente, difieren en el tamaño: mientras que en la región anterobasal las neuronas OT tienen mayor área somática ($OT = 256.0 \pm 12.6 \mu\text{m}^2$; $AVP = 255.1 \pm 17 \mu\text{m}^2$), en el cuerpo principal del NPV,

las neuronas AVP son de mayor tamaño ($OT = 218.2 \pm 6.2 \mu m^2$; $AVP = 325.1 \pm 36.9 \mu m^2$). Comparado con el NSO ($243.9 \pm 10.3 \mu m^2$) y el hipotálamo lateral ($227.6 \pm 36.1 \mu m^2$) el NPV es la estructura hipotalámica con las neuronas oxitocinérgicas de menor tamaño (Schimchowitsch *et al.*, 1989). A diferencia de la rata, en el conejo no existe una subdivisión de neuronas parvocelulares o magnocelulares (Schimchowitsch *et al.*, 1989; Caba *et al.*, 1996).

Fig 3. Ubicación de las neuronas AVP y OT en el NPV del conejo



Fig. 3. cortes coronales del NPV en diferentes planos, desde su extensión anterobasal, hasta su cuerpo principal. En cada sección, se pueden apreciar, lado izquierdo de cada corte, las neuronas inmunoreactivas a AVP y del lado derecho las neuronas inmunoreactivas a OT. (QO) Quiasma óptico; (TO) Tracto óptico; (F) Fornix. (Modificado de Schimchowitsch *et al.*, 1989).

1.3.1 Núcleo paraventricular y conducta maternal

Diversos investigadores han estudiado el NPV, con la finalidad de determinar su participación sobre la CM. Se sabe que las lesiones efectuadas durante la gestación tardía previenen el inicio de la CM, mientras que las realizadas en la lactancia temprana afectan selectivamente algunos aspectos de esta conducta. Por ejemplo, en la rata la lesión

electrolítica efectuada el día 15 de gestación, disminuyó significativamente la CM post-parto (acarreo, agrupamiento, postura de amamantamiento y construcción del nido). Al lesionar el NPV el día 4 post-parto, no se encontraron alteraciones significativas en la CM (Insel y Harbaugh, 1989). En 1985 Numan y Corodimas encontraron que las lesiones del NPV, por radiofrecuencia o por cortes a sus conexiones laterales, el día 4 post-parto, no causaron alteraciones significativas de la conducta materna. Las hembras sometidas a una prueba de agresión materna, luego de recibir una lesión electrolítica en el NPV el día 5 post-parto, solamente disminuyeron significativamente la frecuencia y la duración de los ataques, pero no mostraron diferencias significativas en la evaluación de la CM (Consiglio y Lucion, 1996). Las lesiones químicas, con ácido kaínico, que se realizaron en el día 2 de lactancia sólo redujeron significativamente el acarreo de los críos y la construcción del nido (Olazabal y Ferreira, 1997). Las lesiones realizadas con ácido iboténico únicamente incrementaron la frecuencia de ataques contra un intruso durante una prueba de agresividad materna (Giovenardi *et al.*, 1998).

1.4 Oxitocina y Vasopresina (generalidades)

En 1895 Oliver y Schäfer descubrieron que los extractos de pituitaria alteraban la presión sanguínea además de poseer una acción antidiurética (Laycock, 2010). Más tarde, en 1906, Henry Dale encontró que los mismos extractos ocasionaban contracciones uterinas y cuatro años después, Ott y Sott describieron que su efecto sobre la glándula mamaria provocaba la eyección de la leche (Cross, 1966). Finalmente, a inicios de los años 50, Du Vigneaud estableció la estructura de los principios activos responsables de esos efectos, es decir: la AVP, también conocida como hormona antidiurética, responsable de los cambios de presión y antidiuresis y la OT, causante de las contracciones uterinas y la eyección de leche (Zingg, 2002).

Ambas hormonas neurohipofisarias son nonapéptidos cercanamente relacionados entre sí pertenecientes a un grupo de neuropéptidos que virtualmente está presente en todos los vertebrados, la familia de la arginina vasotocina. Difieren únicamente en los aminoácidos ubicados en las posiciones 3 y 8 (Stoop, 2012). Tanto la OT como la AVP, tienen un puente disulfuro entre las cisteínas 1 y 6, lo que da como resultado un péptido constituido por una

parte cíclica de seis aminoácidos y un grupo COOH-terminal con una cola α -amidada de tres residuos (fig. 4b) (Gimpl y Faharenholz, 2001).

Fig 4. Neurohipófisis y sus secreciones

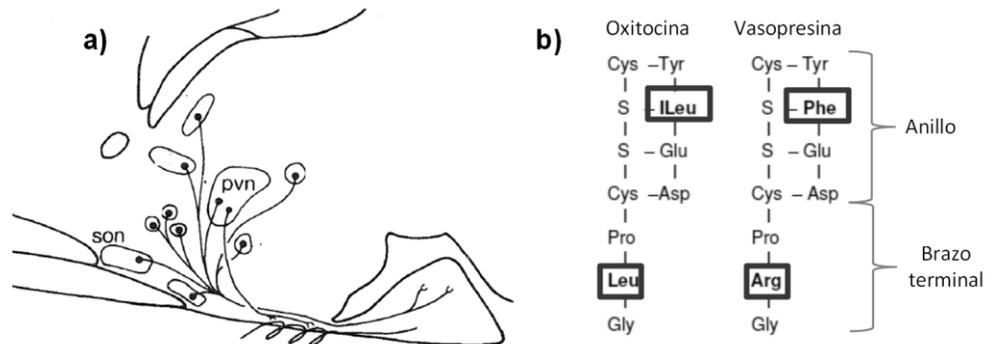


Fig. 4. a) Corte sagital del hipotálamo y la neurohipófisis de la rata. pvn: núcleo paraventricular; son: núcleo supraóptico. Se esquematizan las proyecciones hipofisarias del NPV y el NSO (modificado de Sofroniew, 1985). b) Estructura de la OT y AVP, en rojo, muestra las modificaciones en los aminoácidos de las posiciones 3 y 8 (modificado de Laycock, 2010).

En el cerebro de los vertebrados, la OT y AVP, son sintetizadas por distintas poblaciones celulares ubicadas en el NPV y el NSO, así como en algunos núcleos accesorios (Stoop, 2012). Los axones enviados a la neurohipófisis, salen lateral y caudalmente del NPV para unirse ventro-caudalmente a los axones del NSO. Posteriormente estos grupos de fibras pasan a través de la cápsula interna de la eminencia media y se extienden hasta la neurohipófisis, donde vierten su producción al torrente sanguíneo (Fig. 4a) (Neville, 2006).

La neurosecreción es causada por un estímulo en las neuronas (OT o AVP), principalmente en los grupos celulares del NPV y NSO, el potencial de acción viaja por el axón y despolariza la membrana terminal, lo cual, provoca la apertura de los canales de Ca^{2+} , que resulta en la liberación de OT y AVP por exocitosis (Tasker *et al.*, 2002). La liberación de OT, hacia el torrente sanguíneo, ejerce acciones periféricas (e.g. eyección de leche y contracciones uterinas). Por otro lado, las dendritas de las neuronas magno y parvocelulares liberan la OT por *exocitosis dendrítica*, esta OT es vertida dentro del líquido cerebroespinal (LCE) y permanece dentro del SNC, donde participa en la modificación de diversas conductas (Kennedy J y Ehlers D. 2011). Cuando la OT y la AVP se liberan centralmente, son degradadas dentro del cerebro por aminopeptidasas o entran al LCE donde tienen una

vida media de 20 minutos, antes de ser desechadas por el flujo masivo de la circulación (Stoop, 2012).

1.4.1 Oxitocina

La OT es sintetizada intracerebralmente por el NPV y el NSO, para luego ser liberada a través de la neurohipófisis hacia el torrente sanguíneo. Sin embargo, adicionalmente a su fuente en el NPV, también es sintetizada por varios núcleos accesorios como el núcleo intersticial de la estría terminal, el área preóptica, el hipotálamo anterior, el núcleo comisural anterior y el hipotálamo lateral (Sofroniew, 1985) así como por órganos y tejidos periféricos (i.e. el epitelio uterino, los ovarios, los testículos, las células del endotelio vascular y el corazón) (Laycock, 2010).

Además de sus conocidas acciones durante el parto y la lactancia, se le atribuyen funciones como un factor luteinizante en el ovario, en la expulsión de secreciones seminales (por su presencia en los testículos la próstata y el epidídimo), es facilitadora de la filtración glomerular en el riñón y promotora de bradicardia (descenso de la frecuencia cardiaca) (Zingg, 2002).

A nivel central los receptores a OT (OTR) se encuentran ampliamente distribuidos, tanto en los astrocitos como en las neuronas. En la rata se han detectado receptores a OT en abundantes regiones del cerebro, como: corteza del pedúnculo dorsal (área infralímbica), núcleo olfatorio anterior, islotes de Calleja, el grupo ventral de células pálidas (ganglios basales), el núcleo del lecho de la estría terminal, el subículo ventral, el núcleo amigdalino central y el núcleo ventromedial hipotalámico (Gimpl y Fahrenholz, 2001). La distribución de los OTR es extremadamente heterogénea entre las especies, tanto en la ubicación como en su densidad. Por ejemplo, mientras que en la rata el subículo ventral y el área CA3 del hipocampo contienen un alta densidad de receptores, en el conejo y el cuyo son indetectables en dichas regiones (Tribollet, 1992; Gimpl y Fahrenholz, 2001). Entre las acciones centrales asociadas a este neuropéptido, se encuentran: la conducta sexual, el comportamiento social, comportamientos relacionados al estrés, la alimentación, el acicalamiento, la memoria, el aprendizaje y la conducta maternal (Zingg, 2002). Este último punto, se abordara a continuación con mayor detalle.

1.4.1.1 Oxitocina y conducta maternal

Pedersen y Prange (1979) fueron los primeros en encontrar que, en ratas ovariectomizadas pretratadas con estrógenos, la administración intracerebroventricular (ICV) de OT induce el despliegue de la CM en menos de una hora. En 1984, Fahrbach *et al* reportaron que el 50% de las hembras infundidas con OT (400 ng/10µl) desplegaron completamente la CM espontánea, comparado con el 25% de los animales inyectados con solución salina. De manera interesante, otros trabajos han encontrado que, a bajas concentraciones (5 fMol), la administración ICV de OT no es efectiva para inducir la CM, pero sí lo es cuando se implanta en el bulbo olfatorio, donde provocó el despliegue de todos los componentes de la CM en menos de dos horas de exposición a críos ajenos (Yu G-Z *et al.*, 1996).

Otras aproximaciones experimentales para dilucidar la participación del nonapéptido sobre la CM, consisten en el uso de antagonistas o antisueros a OT. Por ejemplo, la infusión ICV o en el bulbo olfatorio de *d(CH2)5-8-ornitina-vasotocina* (un antagonista análogo a oxitocina: OTA), durante el parto, causó un retraso significativo en el inicio de todos los componentes de la CM (acarreo, agrupación y postura de amamantamiento) (Leengoed *et al.*, 1987; Yu G-Z *et al.*, 1996). Por otro lado el empleo de un antisuero de OT en ratas vírgenes ovariectomizadas, pretratadas con benzoato de estradiol más progesterona, causó una incidencia significativamente menor de CM (acarreo, acicalamiento, postura de amamantamiento y agrupamiento), en comparación con animales infundidos con suero normal de conejo, antisuero a neurotensina, no infundidas e infundidas con antisuero a OT más oxitocina. En este último grupo la OT revirtió el efecto del antisuero (Pedersen *et al.*, 1985). De igual modo, al administrar el antisuero OT a ratas, ovariectomizadas e histerectomizadas el día 16 de gestación, pretratadas con benzoato de estradiol, se observó un incremento significativo en la latencia para responder maternalmente a críos ajenos (Fahrbach *et al.*, 1985).

En otros experimentos, al comparar entre ratas seleccionadas como altamente maternales (High LG-ABN) contra ratas menos maternales (Low LG-ABN), se encontró que tras la administración ICV de OTA en el día tres post-parto, las ratas High LG-ABN con una CM exacerbada, lamian y acicalaban a sus críos con la misma frecuencia que las ratas Low LG-ABN (Champagne *et al.*, 2001). Aún cuando algunos investigadores han reportado que

la administración de OTA durante la lactancia (i.e. día 5 post-parto. Fahrbach *et al.*, 1984) no causa efectos significativos sobre el desempeño de la CM, Pedersen y Boccia (2003) investigaron la influencia de la OT sobre la expresión de algunos componentes de la CM post-parto, en ratas lactantes. Por medio de la administración ICV de OTA durante los primeros días de lactancia (días 2-3 y 6-7), encontraron una disminución en frecuencia los episodios largos de acicalamiento a críos ($>2\text{seg}$), mientras que incrementó significativamente ($p=0.015$) la frecuencia de episodios cortos de acicalamiento ($<2\text{seg}$), esto significa que la oxitocina puede estar regulando los niveles de maternalidad exhibida durante la lactancia, cuando la CM está completamente establecida.

Ahora se sabe que los receptores a OT se encuentran distribuidos en áreas relacionadas con la conducta maternal (Fig. 5). En la rata, por medio de autoradiografías, se encontró que el cerebro de ratas High LG-ABN exhibían un mayor número de receptores a OT en el área preóptica media (APOM), el núcleo del lecho de la estría terminal, el núcleo central amigdalino, el septum lateral (SL) y el núcleo paraventricular (Champagne *et al.*, 2001) y que la concentración de estos receptores aumenta significativamente durante la lactancia en el APOM y el SL (Francis *et al.*, 2000). Por otra parte, por medio de ensayos de detección por radioligando, se sabe que en sitios como el área tegmental ventral del mesencéfalo y el APOM los receptores a OT aumentan significativamente durante el parto en comparación con la gestación y que al suministrarse OTA en esas áreas, durante el parto, se retrasa significativamente el acarreo de los críos además de disminuir la duración de la postura de amamantamiento (*crouching*) (Pedersen *et al.*, 1994). Así mismo, estas observaciones se han replicado en otras especies, como el ratón de campo (*Microtus ochrogaster*), donde por medio de autoradiografía se encontró que los animales maternales expresan una mayor cantidad de receptores a OT en el núcleo acumbens y que la administración de OTA en ese sitio inhibe la respuesta maternal hacia los críos (Olazabal y Young, 2006).

Fig 5. Ubicación de los receptores a AVP y OT en el cerebro de la rata

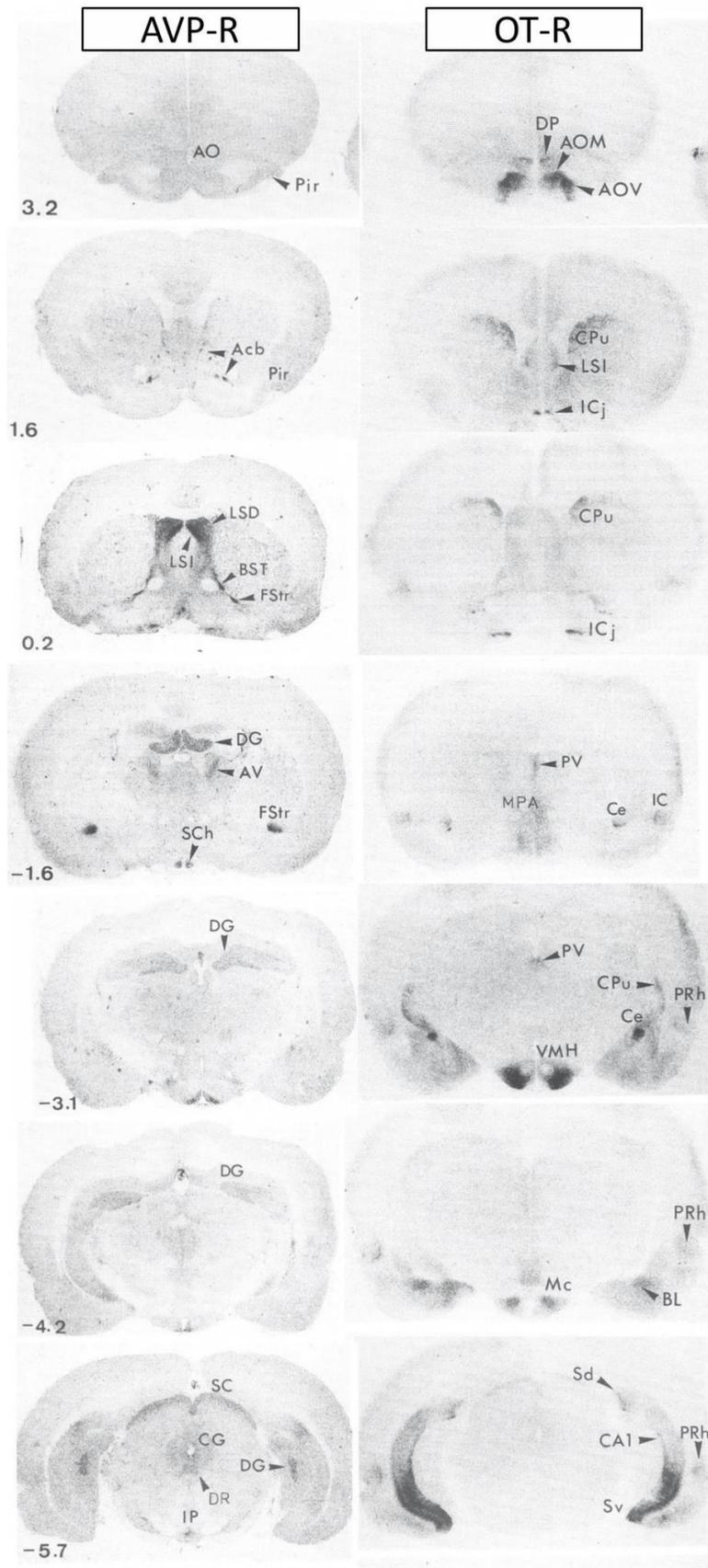


Fig. 5. Los autoradiogramas muestran la ubicación intracerebral de los receptores a AVP (izquierda) y OT (derecha) en cortes de 14µm de grosor. Las series fueron tomadas de ratas adultas (3 meses de edad). **AO**, núcleo acumbens; **AO**, núcleo olfatorio anterior; **AOM**, parte media del núcleo olfatorio anterior; **AOV**, parte ventral del núcleo olfatorio anterior; **AV**, núcleo talámico anteroventral; **BL**, núcleo amigdalóide basolateral; **BST**, núcleo del lecho de la estria terminal; **CA1**, cuerno de Ammon; **Ce**, núcleo amigdalóide central; **CG**, sustancia gris periacueductal central; **CPu**, putamen caudado; **DG**, giro dentado; **DP**, núcleo dorsal del rafe; **FStr**, fundus striati; **IC**, corteza insular; **ICj**, islotes de Calleja; **IP**, núcleo interpeduncular; **LSD**, parte dorsal del núcleo del septum lateral; **LSI**, parte intermedia del núcleo del septum lateral; **Mc**, complejo mamilar; **MPA**, área preóptica media; **PRh**, corteza piriforme; **PRh**, núcleo piriforme; **PV**, núcleo paraventricular; **SC**, colículos superiores; **SCh**, núcleo supraquiasmático; **Sd**, subículo dorsal; **Sv**, subículo ventral; **VMH**, núcleo hipotalámico ventromedial (modificado de Tribollet E, 1992).

1.4.2 Vasopresina

La arginina vasopresina (AVP) es sintetizada principalmente por las neuronas magnocelulares del NSO del hipotálamo, las cuales envían sus axones a la neurohipófisis. Por otro lado, también es producida por las neuronas parvocelulares del NPV y algunos núcleos accesorios, que se localizan en el núcleo del lecho de la estría terminal, el núcleo circular, la amígdala media y el núcleo supraquiasmático (Gerstberge y Fahrenholz, 1989; Birnbaumer, 2002; Caldwell *et al.*, 2008). Aunadas a las áreas de síntesis intracerebral, se han localizado fuentes periféricas de AVP, como los ganglios simpáticos, glándulas adrenales, los ovarios, los testículos, el corazón y el timo (Laycock, 2010).

Los efectos fisiológicos de la AVP son mediados por tres subtipos de receptores: V1_a y V1_b, que activa la fosfolipasa vía proteína Gq/11, y el receptor V₂ que activa la adenilciclase interactuando con la proteína Gs (Birnbaumer, 2002). Por medio del análisis por autoradiografía se han detectado los receptores a AVP en la rata (Fig. 5). Los receptores de tipo V1_a se han encontrado en el septum lateral, en la IV capa neocortical, el núcleo supraquiasmático, la sustancia nigra, el área ventral tegmental mesencefálica, los colículos superiores, el rafe dorsal, el núcleo del tracto solitario, núcleo del lecho de la estría terminal, el núcleo acumbens y el núcleo olivar inferior (Birnbaumer, 2002). Por otro lado, la distribución de los receptores de tipo V1_b no está establecida, aunque se sabe de áreas con presencia del receptor, como las neuronas piramidales de la región CA2 del hipocampo (Gerstberge y Fahrenholz, 1989; Birnbaumer, 2002).

Los efectos de la AVP se han asociado a conductas como la agresión (territorialidad y marcaje), afiliación (formación de parejas y cuidados parentales), aprendizaje y memoria (reconocimiento social, memoria espacial y no espacial) así como al estrés y la depresión (Birnbaumer, 2002). Se sabe que en la rata, los niveles de AVP se incrementan significativamente en el NSO y el NPV, durante el parto (Neumann *et al.*, 1993) por lo que se ha propuesto su participación en la activación de la CM.

1.4.2.1 Vasopresina y conducta maternal

Al administrar antisuero a AVP, a ratas vírgenes ovariectomizadas y pretratadas con benzoato de estradiol más progesterona, se observó que desplegaron CM con una incidencia significativamente menor que los animales tratados con suero normal de conejo, antisuero a neurotensina o no infundidos, durante la prueba de exposición a críos ajenos (Pedersen *et al.*,

1985). Al administrar *d(CH2)5Tyr(me)AVP* (un antagonista al receptor a vasopresina V1a) en el APOM, durante el parto, se retrasó significativamente el acarreo de los críos; además, se aumentó la latencia a presentar la postura de amamantamiento y se redujo su duración total (Pedersen *et al.*, 1994). Por otra parte, al infundir, a finales de la gestación, un antagonista a AVP de manera ICV o en la amígdala central, no se afectó el establecimiento de la CM post-parto, pero sí causó una disminución significativa de la memoria maternal (respuesta maternal hacia críos ajenos, después de haber sido separada de la camada, tras una primer experiencia maternal) cuando se administró en la amígdala central (Nephew y Bridges, 2008^a). Por otro lado al analizar la CM durante una prueba de agresión maternal, tanto la AVP como el antagonista al receptor V1a, únicamente redujeron significativamente la CM (i.e. acarreo, construcción de nido, acicalamiento y postura de amamantamiento), pero no las conductas agresivas (i.e. mordidas, golpes con extremidades anteriores o posteriores). Sin embargo, la administración de AVP ocasiono un incremento en la latencia a iniciar el ataque contra un intruso (Nephew y Bridges, 2008^b).

1.5 Regulación de la CM post-parto

Durante el periodo post-parto la vía principal a través de la cual los críos interaccionan con su madre es el amamantamiento. Se ha sugerido que la vía neuroendócrina que regula la eyección de la leche participa en la manutención de la CM post-parto, debido a que la estimulación del pezón durante la succión es la señal más importante, mediante la cual, los críos indican su presencia a la madre. Además en el hámster (Giordano *et al*, 1984) y en la rata (Giovenardi *et al.*, 1998) la presencia de los críos es esencial durante la lactancia para la expresión de conductas agonistas. Giordano *et al* (1984) analizaron el efecto de la separación madre-crío sobre la expresión de la agresión maternal en los hámsteres (*Mesocricetus auratus*). Encontraron que cuando las madres son separadas de sus críos presentan significativamente menos ataques contra un macho intruso en comparación con hembras expuestas a una prueba de agresión maternal en presencia de sus críos. Por otro lado, los niveles de agresividad fueron restaurados tras probar a las hembras 30 minutos después de ser reunidas con su camada.

Por otra parte, se sabe que las lesiones efectuadas en el mesencéfalo resultan en una disminución significativa de la liberación de OT durante la succión (Juss y Wakerley 1981)

y que al lesionar el núcleo peripeduncular, del mesencéfalo, con ácido iboténico las hembras son incapaces de amamantar a sus críos, aún cuando presentan leche en las glándulas mamarias (Hansen y Köhler 1984; Hansen y Ferreira, 1986). Asimismo, en la rata, la lesión electrolítica del núcleo peripeduncular el día 8 post-parto, no sólo provocó la incapacidad de la madre para proveer alimento a sus críos; también abatió completamente la conducta agresiva hacia un macho intruso. Sin embargo, a pesar de la lesión, las madres continuaron adoptando la postura de amamantamiento sobre los críos (Hansen y Ferreira, 1986).

Otros trabajos han demostrado que la privación del estímulo de la succión a las hembras lactantes repercute sobre la CM. Por ejemplo, en ratones, la telectomía (i.e. remoción quirúrgica de los pezones) realizada antes del parto ocasionó que los ataques en contra de un macho intruso fueran completamente eliminados durante la prueba de agresividad maternal (Svare y Gandelman, 1976). Por el contrario la telectomía realizada durante los primeros dos tercios de la lactancia no causó ninguna influencia sobre la agresión maternal lo cual indica que existe un periodo de sensibilidad durante las primeras horas post-parto en el cual el estímulo de la succión es fundamental para iniciar la conducta de agresividad, probablemente debido a la acción de la serotonina sobre áreas como el órgano vomeronasal (Svare y Gandelman, 1976; Garland y Svare, 1988).

En la rata al modificar la capacidad de los críos para succionar (e.g. al enfriar a los críos, suturar sus bocas o al anestesiarse el nervio infraorbital), se encontró que la calidad del estímulo de la succión es esencial para provocar que la madre adopte correctamente la postura de amamantamiento. Así mismo, al variar el número de críos que succionan en la camada, encontraron que la estimulación de uno o dos críos es eficaz para inducir la inmovilidad de la madre, pero no lo es para provocar una adecuada postura de amamantamiento, como la ocasionada por una camada de ocho críos (Stern y Johnson, 1990).

En ratones (*Mus musculus*) se encontró que las hembras que amamantan camadas de menor tamaño (2-5 críos) pasan más tiempo al cuidado de los críos (e.g. tiempo dentro del nido, acicalamiento y amamantamiento) en comparación a las madres con camadas más numerosas (8 críos), que invierten más tiempo en comer y beber (Priestnall, 1972). Otros investigadores han reportado que en los hámsteres existe una relación inversamente proporcional entre el número de individuos en la camada y la cantidad de interacción madre-crío (Guerra y Nunes, 2001).

1.5.1 Frecuencia de succión en la coneja

Se sabe que durante el periodo de lactancia, la coneja amamanta a sus críos una vez al día durante 3-5 minutos (Zarrow *et al.*, 1965; González-Mariscal *et al.*, 1994; Hoy y Selzer, 2000; Lincoln, 1974). Por su parte Gilge analizó, durante los primeros 15 días de lactancia, el comportamiento de conejas lactantes en busca de un ritmo de amamantamiento predecible. Encontró que las hembras que alimentaban a una camada de 5-8 críos dentro de un bioterio aislado del ruido exterior, con un ciclo de luz-oscuridad 12:12 (Gilge, 1993) o luz continua (Gilge, 1995), amamantan con periodicidad circadiana y que durante los primeros 10 días los episodios se ajustaban a la hora de mayor actividad de los críos.

Por otro lado, se estudiaron las características del estímulo de la succión para determinar si el tiempo que pasaba la coneja, dentro del nido, era modificado por la edad (2-3 y 7-8 días) y el número (1, 2, 4, y 8 críos) de críos en la camada. Se encontró que al reducir el tamaño de la camada, a un crío, se provocaba un incremento en la duración del tiempo que pasa la madre dentro del nido (20.81 ± 6.02 min y 9.81 ± 3.09 min para los grupos de 2-3 y 7-8 días de edad, respetivamente) (González-Mariscal *et al.*, 2012). Asimismo, al analizar la participación de la succión sobre la periodicidad del amamantamiento, se encontró que las hembras, con libre acceso a los críos, en un bioterio con temperatura natural y un fotoperiodo luz/oscuridad (14:10), entran con mayor frecuencia al nido cuando se reduce el número de gazapos en la camada (e.g uno, dos o cuatro críos). Por el contrario, las hembras con una camada de 6-8 críos desplegaron sus amamantamientos con una regularidad circadiana, descrita por un vector poblacional con un ángulo de 58° que corresponde a las 3:51h ($p < 0.001$) (González-Mariscal *et al.*, 2013).

En 1970, Findlay y Roth, encontraron que al anestesiarse conejas lactantes y extraer la leche de las glándulas mamarias, previo a su habitual episodio de amamantamiento, entraban inmediatamente al nido, adoptaban una postura de amamantamiento sobre los críos y permanecían dentro por alrededor de tres minutos. Esto sugiere que la duración del amamantamiento no está determinada por la expulsión de la leche o la saciedad de los críos. En otro modelo experimental González-Mariscal *et al.* (2004) encontraron que el 37% de conejas vírgenes con remoción del bulbo olfatorio accesorio entraron al nido, adoptaron la postura de amamantamiento y se dejaron succionar por 3-4 min, cuando se les proporcionó

una camada de críos ajenos durante una hora, a pesar de no tener leche que proveer a dicha camada. Esta conducta se abatió con la OVX. Posteriormente, encontraron que al lesionar el epitelio del bulbo olfatorio de conejas vírgenes con sulfato de zinc, para determinar la participación del sistema olfatorio principal, el 70% de las hembras vírgenes desplegaron una CM, característica de las hembras lactantes (e.g. rápida entrada al nido, adopción de postura da amamantamiento y de 3 a 5 min dentro del nido) (Chirino *et al.*, 2007). Por otro lado, se sabe que la privación del estímulo de la succión provoca que las madres permanezcan un mayor tiempo dentro del nido con sus críos, e.g.: al anestesiarse los pezones (Findlay, 1968); por telectomía (González-Mariscal *et al.*, 2000) o al cubrir los pezones con cinta (González-Mariscal, 2007).

La información anterior, sugiere que la duración del amamantamiento no está regulada por la evacuación láctea pero sí por las señales recibidas durante la succión. Las señales somatosensoriales generadas por la estimulación del pezón durante la succión, ascienden por la medula espinal, pasando por el núcleo cervical lateral, el núcleo externo del colículo inferior y la región peripeduncular hasta alcanzar las neuronas oxitocinérgicas del NPV y el NSO (Lincoln y Paisley, 1982). Mientras que, la ausencia del estímulo de la succión, por más de 48 horas, causa una disminución significativa en la expresión de PER1, en neuronas inmunoreactivas a OT (NPV y NSO), en neuronas inmunoreactivas a TH, así como en las neuronas del SL.

Por otro lado, al analizar la fuerza de contracción del útero, en respuesta a la succión, para estimar la liberación de OT, encontraron que la fuerza de contracción del útero es mayor si la coneja es succionada por una camada de 4 críos que al amamantar sólo uno o dos críos (Fuchs y Wagner 1963). Adicionalmente, al analizar la influencia de la intensidad de succión sobre la liberación de OT en plasma (a través de muestras de sangre tomadas, antes, durante y después de la succión), se encontró que la succión de una camada de seis críos ocasionó un significativo aumento en los niveles de OT en plasma, así como una mayor ganancia de leche por cápita (15.5gr/crío), comparado con los bajos niveles de OT y la pobre ganancia de leche (2.5gr), encontrados por la succión un sólo crío (Fuchs *et al.*, 1984). Por otra parte, la succión de una camada de 5-6 críos activa a las neuronas del NSO y el NPV pues el número de neuronas inmunoreactivas a c-FOS es mayor que el observado en hembras vírgenes (González-Mariscal *et al.*, 2009). Asimismo, el tamaño y el número de las neuronas que

sintetizan OT en el NSO y el NPV se incrementan significativamente durante la lactancia, comparadas con el estro y la gestación tardía (Caba *et al*, 1996). También, este mismo estímulo es suficiente para sincronizar la actividad locomotora de las hembras a la hora del amamantamiento. Al mismo tiempo, incrementa la expresión de la proteína PER1 en diversas poblaciones neuronales, relacionadas con la producción y la eyección láctea, como las neuronas inmunoreactivas a tirosina hidroxilasa de la región tuberoinfundibular del núcleo arcuato y la región periventricular hipofisiaria (Meza *et al*, 2011), así como las neuronas oxitocinérgicas del NPV y del NSO (Meza *et al*, 2008). Por otro lado, se sabe que el estímulo de la succión que también sincroniza la expresión de la proteína PER1 en áreas relacionadas con la CM, como el área preóptica, el septum lateral (dorsal y ventral) (Meza *et al*, 2015).

1.6 Ritmos biológicos

Los movimientos de rotación y traslación de la tierra son los principales responsables de generar los ciclos (i.e. luz y temperatura) que dotan a nuestro medio de una ritmicidad. A su vez, estos cambios se traducen dentro de un sistema biológico como fenómenos recurrentes (bioquímicos, fisiológicos o conductuales) con intervalos regulares, conocidos como ritmos biológicos. Estos ritmos, son una propiedad de los seres vivos que se presenta como una adaptación al entorno, por lo cual, probablemente todos los organismos expresan un ritmo asociado a las oscilaciones del medio. Los ritmos biológicos se caracterizan por poseer una frecuencia (número de acontecimientos de un evento repetido por unidad de tiempo), un periodo (tiempo que tarda cada ciclo de fluctuación), una amplitud (medida de la magnitud de la oscilación de un ciclo) y una fase (punto de referencia específico en el ciclo de un ritmo) (Morales y Fernández, 2008). Debido a que la principal señal sincronizadora es el ciclo de luz/oscuridad, los ritmos se pueden clasificar dependiendo de la frecuencia con la que se repite dicho ciclo. Los ritmos con una frecuencia cercana a 24 horas se consideran circadianos, mientras que a aquellos con una frecuencia mayor a 24 horas se denominan infradianos (i.e. ciclos anuales y lunares) y por último los ritmos ultradianos (i.e. circamareales), que se repiten más de una vez en 24 horas, (Morales y Fernández, 2008; Aguilar y Escobar, 2002).

El conejo ha presentado ser un excelente modelo para el estudio de los ritmos circadianos. Por ejemplo, con la intención de caracterizar la capacidad del alimento como un

posible sincronizador, se utilizó la restricción de alimento (por cuatro horas) en condiciones de luz constante, sobre: la conducta de locomoción, la excreción de heces duras, la excreción de orina, las aproximaciones al bebedero y al comedero. Se encontró que estas cinco actividades, de los conejos machos, pueden ser sincronizadas por un estímulo no fótico como el alimento (Jilge, 1991 y Jilge et al., 1987). Asimismo, al registrar la temperatura corporal en conejas gestantes, por medio de telemetría, se encontró que la temperatura corporal muestra un ritmo en libre corrimiento con un periodo de duración mayor a 24 horas, sin embargo, después del parto, este ritmo se sincroniza con el amamantamiento y los picos de temperatura coinciden con el amamantamiento (Jilge et al., 2001).

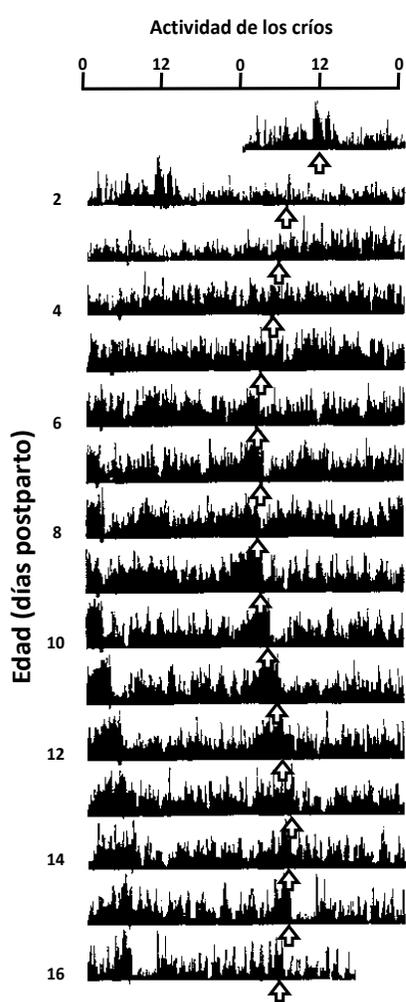


Figura 6. Actograma de la actividad de los críos. Cada columna representa periodos de observación de 7.5min. Eje: (Y) horas del día en un doble ploteo; (X) días post-parto; Flecha abierta: amamantamiento (Jilge 1995).

Por otra parte, al analizar el comportamiento de conejas lactantes durante los primeros 15 días de lactancia, en busca de un ritmo de amamantamiento predecible, se encontró que las hembras que alimentaban a una camada de 5-8 críos dentro de un bioterio aislado del ruido exterior, con un ciclo de luz-oscuridad 12:12 (Jilge, 1993) o luz continua (Jilge, 1995), amamantan con periodicidad circadiana y que durante los primeros 10 días los episodios se ajustaban a la hora de mayor actividad de los críos (Fig. 6). Recientemente, se han mostrado parte del mecanismo responsable de la periodicidad circadiana del amamantamiento. Al analizar las posibles variaciones en la proteína PER1, producto de la expresión del gen *Per1*, en el NPV y el NSO de conejas que amamantaron en dos diferentes horarios, a través de un ciclo de luz/oscuridad (12:12), se encontró un ritmo diario en la expresión de la proteína PER1, el cual se sincroniza en paralelo con la hora programada de amamantamiento, en las neuronas oxitocinérgicas hipotalámicas (del NPV y del NSO) y las células dopaminérgicas de la región tuberoinfundibular del núcleo arcuato y la región periventricular hipofisiaria (Meza *et al*, 2008, 2011).

1.6.1 Regulación de los ritmos biológicos

En el cerebro, en la región ventral del hipotálamo anterior, se encuentra el núcleo supraquiasmático (NSQ), situado por encima del quiasma óptico, el cual es considerado como el principal reloj circadiano en los mamíferos (Mendoza, 2009).

Las investigaciones que consiguieron apuntar directamente al NSQ como la región específica del hipotálamo, encargada de controlar las oscilaciones circadianas, fueron llevadas a cabo en 1972 por dos laboratorios de manera independiente, el grupo de Moore y Eichler y el de Stephan y Zucker. Por un lado, por los estudios del Dr. Robert Y. Moore en la Universidad de Chicago, mediante la técnica del trazado axónico por autorradiografía, demostraron la existencia de un vía anatómica directa desde la retina hasta una región del hipotálamo anterior, el núcleo supraquiasmático (NSQ), posteriormente, mediante lesiones específicas del NSQ se confirmó su participación en la generación de la ritmicidad circadiana de mamíferos (Refinetti, 2005).

La capacidad de las células del NSQ para oscilar depende de un sistema autosostenido, en el cual, la expresión de ciertos genes trabaja conjuntamente para producir una actividad circadiana. Los estudios sobre el funcionamiento molecular del NSQ muestran un sistema de asas de retroalimentación (positivas y negativas) en la expresión de diversos genes reloj, cuyos productos son importantes para la generación y el mantenimiento de la función circadiana del reloj. En cada célula del NSQ, las proteínas producto de los genes reloj *Clock* y *Bmal1* se unen para formar un heterodímero que da inicio a la transcripción de otro grupo de genes reloj como los genes del Periodo (*Per 1, 2 y 3*) y Criptocromo (*Cry 1 y 2*). Posteriormente, *PER* y *CRY* forman un complejo heterodímero *PER:CRY*, que se acumula dentro del núcleo de la célula para inhibir su propia transcripción, a través de una acción en el complejo formado por *CLOCK* y *BMAL1*. Una vez que las proteínas *PER* y *CRY* han sido degradadas en el núcleo, ocurre la reactivación de *Clock* y *Bmal1*, para reiniciar un nuevo ciclo. Por otro lado, el heterodímero de *Clock: Bmal1* activa la transcripción de un gen que codifica para la transcripción de un receptor huérfano nuclear, denominado *Rev-Erba/ROR*. Esta proteína (*Rev-Erba/ROR*) reprime la transcripción de *Bmal1*, mientras que los niveles de los ARNm de *Cry* suben. Cuando el heterodímero *CRY:PER* inhiben la transcripción de *Per* y *Cry*, también inhiben a *Rev-Erba*, activando la

transcripción de Bmal1. El pico máximo del ARNm de Bmal1 se alcanza 12 horas después, en antifase con relación a los ARNm de Per y Cry. Esto causa un incremento en BMAL1 y la formación de heterodímeros con CLOCK, para reactivar la transcripción de Per y Cry (García y Caba, 2008).

2 JUSTIFICACIÓN

Sabemos que a mediados de la gestación la coneja inicia la construcción de un nido maternal, excavando una madriguera subterránea, introduciendo en ella paja y recubriéndola de su propio pelo y que el despliegue secuencial de estas tres actividades está controlado por hormonas de la gestación. Desde el parto y la lactancia, la coneja amamantará a sus críos dentro del nido maternal, sólo una vez al día. Cada episodio de amamantamiento dura alrededor de 3 min y se presenta con periodicidad circadiana. Sabemos, que el estímulo mecánico de la succión juega un papel preponderante. La evidencia sugiere que el estímulo generado por la succión de más de más de cuatro críos, es necesario para alcanzar un umbral inhibitorio que previene a la madre de entrar al nido más de una vez en 24 hrs y por otro lado, este mismo estímulo, regula la duración del episodio de succión. Pues reducir el número de críos de la camada, a uno ó dos críos, provoca un incremento en la duración del tiempo que pasa la madre con los críos dentro del nido y un mayor número de entradas de la madre al nido en un día.

Las consecuencias neuroendócrinas de la succión en la coneja incluyen, principalmente, la secreción de dos hormonas: la prolactina (PRL) y la oxitocina (OT) cuyas acciones primordiales son la producción y la evacuación de la leche, respectivamente.

Por otra parte, al cuantificar la proteína c-fos por inmunocitoquímica, se encontró que la succión de una camada de 5-6 críos activa a las neuronas del NSO y el NPV. Asimismo, el número de las neuronas que sintetizan OT en los núcleos NSO y NPV se incrementa entre el estro, el embarazo y la lactancia. Mientras que, el estímulo de la succión de cuatro o cinco críos, sincroniza la expresión de la proteína *PER1* en el NPV y el NSO pero no en el NSQ. Por otro lado, en la rata, la lesión del NPV en el embarazo tardío previene el inicio del comportamiento maternal mientras que las lesiones hechas durante la lactancia temprana provocan solamente efectos selectivos sobre algunos aspectos de la conducta maternal (i.e. disminución del acarreo de los críos y de la construcción del nido). Lo cual sugiere que, las señales provenientes de la succión impactan sobre regiones específicas del cerebro, que regulan la motivación de la madre para entrar al nido y amamantar a su camada. Sin embargo, se desconoce la participación del NPV en la regulación de la periodicidad y la duración de cada episodio de amamantamiento.

3 HIPÓTESIS

La lesión de NPV en conejas que amamantan a una camada de 6 a 7 críos durante la lactancia temprana, modificará la periodicidad y/o la duración de cada episodio amamantamiento.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar los efectos de la lesión química del NPV durante la lactancia temprana, sobre la conducta de amamantamiento (i.e. la periodicidad y la duración de cada episodio de succión).

4.2 Objetivos particulares

Determinar si la lesión del NPV durante la lactancia afecta sólo la conducta maternal o también parámetros no maternos.

Determinar si la lesión del NPV durante la lactancia afecta el consumo de agua y/o alimento, pues se sabe que este núcleo es parte del sistema que regula estas variables.

Determinar si la lesión del NPV durante la lactancia afecta el peso de los animales, como consecuencia de cambios en el consumo del agua y del alimento.

Determinar si los efectos de la lesión del NPV dependen del volumen de la lesión, de su ubicación o de si esta es unilateral o bilateral.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Animales y alojamiento

Se utilizaron 21 conejas adultas primíparas, Nueva Zelanda blancas (*Oryctolagus cuniculus*), que amamantaban una camada de 6 a 8 críos y mostraron un comportamiento materno normal a lo largo de siete días consecutivos. Los animales fueron alojados en jaulas maternas (90 cm de largo x 60 cm de ancho x 41 cm de alto) que contenían una caja nido. Se mantuvieron en un bioterio, bajo condiciones controladas de luz/oscuridad (14h:10h) y temperatura natural, dentro del cual se instaló un sistema de circuito cerrado de video para monitorear ininterrumpidamente su comportamiento. Las hembras recibieron diariamente alimento (*ad libitum*) balanceado (Alimento Purina-Línea conejos, Conejina Mater) y agua potable.

5.1.1 Apareamientos

Las hembras se colocaron en una arena circular (1 m diámetro x 43 cm de alto) con un macho sexualmente activo; luego de recibir de dos a tres eyaculaciones, fueron regresadas a su jaula. Las hembras (gestantes) fueron colocadas en una jaula que contenía una caja-nido de acrílico transparente (50 cm de largo x 30 cm de ancho x 32 cm de alto) para facilitar el monitoreo de la actividad dentro del nido. A cada hembra se le proporcionó material para la construcción del nido materno (cartón para estimular la conducta de excavación y paja para permitir el acarreo de este material al interior de la caja-nido).

5.2 Indicadores de bienestar

5.2.1 Medición de agua y alimento

Como indicadores de bienestar de los animales a lo largo del experimento se midieron la cantidad de agua y de alimento consumidos en 24h. Una vez al día se les proporcionaron 500gr de alimento y un litro de agua. Al siguiente día se cuantificó la cantidad restante en el comedero y el bebedero para determinar la ingestión (Fig 7). Los animales fueron pesados el día del apareamiento, antes de la cirugía y al final del experimento.

Fig 7. Mediciones de agua y alimento

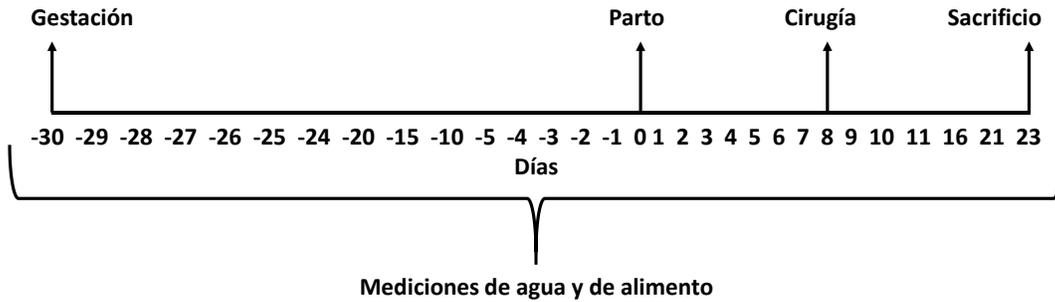


Fig. 7. Días en que se midieron la ingestión de agua y de alimento.

5.3 Registros conductuales

Un día antes del parto se comenzó a registrar, a través del video, el comportamiento de las conejas. Se registró la hora a la que ocurrió el parto y, unas horas después, se removió la camada completa, se contó el número de críos, vivos y muertos, para ajustar todas las camadas a un número entre 6 y 8 críos. En los siguientes 15 días de lactancia se registró en las madres: la hora de ocurrencia y la duración de cada amamantamiento (i.e., el tiempo transcurrido entre la entrada y la salida de la hembra a la caja-nido), la ingestión alimenticia, la bebida de agua, el acicalamiento y otras conductas no anticipadas (Fig.8).

Fig 8. Sistema de registro de video

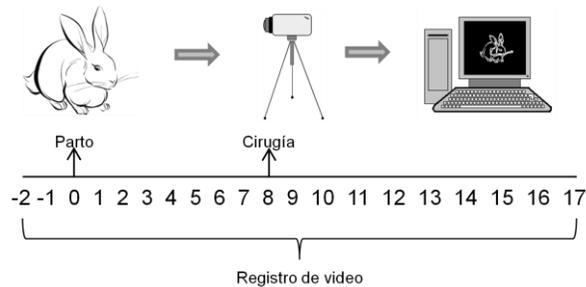


Fig. 8. Muestra los días en los que se registró, en video, la actividad de cada hembra.

5.3.1 Análisis de Rayleigh

Posteriormente, para conocer la hora a la que amamantó cada una de las hembras y si estos eventos ocurrían con periodicidad circadiana, se utilizó el análisis de Rayleigh, el cual, nos permitió determinar si una muestra de valores angulares, se distribuyeron de manera

aleatoria, o si presentaron una dirección. Se obtuvo un vector caracterizado por un ángulo, que indica la hora del amamantamiento, y una longitud (Rho) que es una medida de dispersión angular, con valores que van de cero (máxima dispersión) a uno (máxima concentración). Para el análisis poblacional, únicamente se utilizaron aquellas conejas cuyo vector posee una $P < 0.05$.

5.4 Procedimiento experimental

Luego de siete días de registro conductual (post-parto), las hembras que mostraron un comportamiento maternal normal (amamantamiento: circadiano y de 4 a 5 min. por episodio), fueron seleccionadas para la cirugía.

5.4.1 Cirugías

Las conejas fueron anestesiadas con inyecciones intramusculares de xilacina (Rompun 8 mg/kg) más ketamina (Anesket 25 mg/kg) y posicionadas cuidadosamente en el aparato estereotáxico Kopf. Para la microinyección intracerebral se utilizó una aguja de acero inoxidable (calibre 27) que sobresalía 1mm por debajo del bisel de la cánula guía (calibre 22) (Fig. 9). Las coordenadas del implante, relativas a bregma fueron anterior = 1.5, lateral = ± 1 , dorsoventral = 15, por debajo de bregma, de acuerdo al atlas de Girgis y Shih-Chang (1981). Posteriormente, fueron ajustadas al peso de cada animal.

Fig 9. Sistema de microinyección y localización de las cánulas

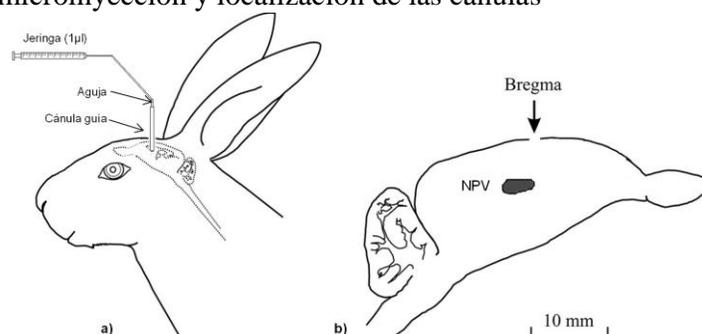


Fig. 9. a) Arreglo utilizado para lesionar el NPV (jeringa, catéter, aguja y cánula guía) y **b)** vista sagital del cerebro, en donde se aprecia la posición del NPV.

Para la lesión bilateral, se utilizó ácido kaínico (ver apéndice A) disuelto en buffer de fosfatos ($0.5\mu\text{g}/\mu\text{l}$) de acuerdo con la concentración usada por Olazábal y Ferreira (1997). La

microinyección se realizó en 10 min (a razón de 0.1 µl/min). Posterior a la microinyección, la aguja se mantuvo dentro de la cánula guía por 5 minutos. Al término de la cirugía, se les inyectó estreptomicina intramuscular (Estreptoenzim 20'000 I.U. por Kg de peso). Posteriormente fueron regresadas al bioterio para su recuperación y continuar con su registro.

5.4.2 Sacrificio y perfusión

Al término del amamantamiento, 15 días después de la cirugía, los animales se sacrificaron con pentobarbital sódico (Anestesal, 60 mg/kg) y se perfundieron por vía transcardiaca con dos litros de solución salina seguido de dos litros de paraformaldehído al 20%. Los cerebros fueron removidos y crioprotegidos sucesivamente en sacarosa al 10%, 20% y 30%. Posteriormente fueron cortados coronalmente (cortes de 40 µm) en el criostato a -21°C. Los cortes se colectaron en crioprotector (polivinilpirrolidona) y se guardaron a -9°C.

5.4.3 Histología y evaluación de la lesión

El tejido se montó en portaobjetos con grenetina y se tiñó con violeta de cresilo para apreciar las estructuras neuroanatómicas. Dos semanas después, se observó el tejido para localizar la lesión. Posteriormente se determinó el volumen del área lesionada por medio del método de Cavalieri (Howard y Reed, 1998).

5.4.3.1 Método de Cavalieri

Es un método desarrollado a partir del principio de los indivisibles, establecido por el matemático Italiano Bonventura Cavalieri en 1635, el cual establece que los volúmenes de dos objetos son iguales, si las sumas de las áreas de sus correspondientes secciones transversales también lo son. Para aplicar este principio es necesario dividir el objeto en una serie de secciones paralelas que cortan el objeto a distancias fijas (Fig. 10a). El volumen (Formula 1) se estima sumando las áreas (Fig. 10b y Formula 2) de todos los transectos y multiplicándolas por el grosor de las rebanadas (Howard y Reed, 1998).

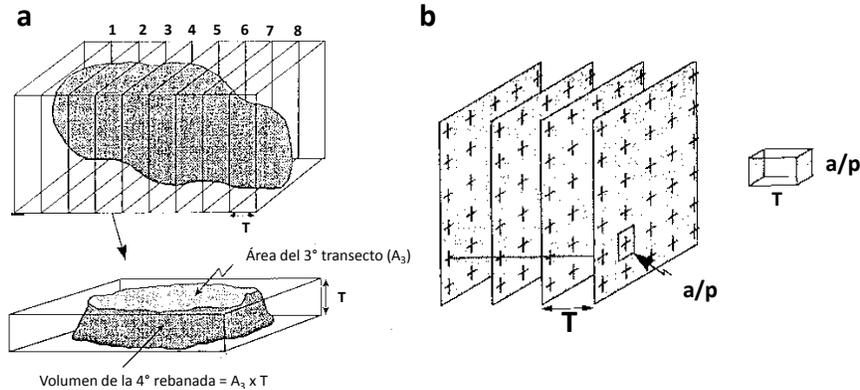


Fig. 10. a) Objeto dividido en secciones equidistantes y **b)** Relación del área asociada a cada punto y su equivalente en volumen.

Formula 1

$$V = (T) \times (\sum A)$$

Donde:

V = volumen estimado

T = distancia entre secciones (grosor)

$\sum A$ = sumatoria del área de los transectos

Formula 2

$$A = (a/p) \times (\sum p)$$

Donde:

A = área estimada

a/p = área asociada a cada punto

$\sum p$ = suma de puntos que cortan el transecto

6 RESULTADOS

6.1 Observaciones pre-lesión

Con el objetivo de determinar si las conejas mostraban una conducta maternal normal (i.e. amamantamientos con periodicidad circadiana con una duración entre 3-5 min.) antes de la cirugía, se determinó la duración y la ocurrencia de cada amamantamiento durante los primeros 8 días post-parto. Se encontró que, en las 21 hembras, el 57.3% los amamantamientos ocurrieron (Tabla I). La duración promedio de esos eventos fue de 3.52 ± 1.25 min (Tabla II).

Para la prueba de Rayleigh poblacional, 15 de las 21 hembras cumplieron con el criterio ($p < 0.05$) para entrar en el análisis (Tabla III). El vector para esta población tuvo un ángulo de fase de 102° (equivalente a las 06:48Hrs), con una $\rho = 0.60$ y una $p = 0.05$ (Fig. 11). En estas hembras, los amamantamientos ocurrieron con una nocturnidad del 43% y el tiempo promedio dentro del nido fue de 3.49 ± 1.2 min.

Tabla I. Nocturnidad

		Hembra	Pre-cirugía		Post-cirugía		Nocturnidad (%)	
			L	O	L	O	Pre-cirugía	Post-cirugía
Lesión	Fuera del NPV	2302	6	3	2	6	33.33	75
		2314	3	6	2	6	66.67	75
		H1G2	7	1	1	7	12.50	87.50
		H2G4	2	5	0	7	71.43	100.00
		H5G3	0	6	6	1	100	14.29
		H7G2	0	6	1	7	100	87.50
		H8G5	4	4	1	4	50	80
		H9G3	8	1	3	5	11.11	62.50
	Unilateral	2313	6	2	3	6	25	66.67
		H10G2	7	0	7	0	0	0
		H1G5	4	5	12	5	55.56	29.41
		H2G5	5	3	3	2	37.50	40
		H8G2	9	4	0	8	30.77	100
	Bilateral	H9G2	4	7	8	3	63.64	27.27
		H3G4	5	3	6	8	37.50	57.14
		H3G5	4	3	0	0	42.86	0
		H4G4	7	1	3	5	12.50	62.50
		H4G5	5	6	0	0	54.55	0
		H5G5	6	0	0	0	0	0
		H6G3	5	3	0	0	37.50	0
	H6G5	1	6	1	3	85.71	75.00	

Tabla I. Número de amamantamientos y porcentaje de nocturnidad pre-cirugía, post-cirugía y durante todo el experimento. (L) horas de luz; (O) horas de oscuridad.

Tabla II. Duración dentro del nido

		Hembra	Tiempo en el nido (min) Media \pm DE		
			Pre-cirugía	Post-cirugía	Total
<i>Lesión</i>	Fuera del NPV	2302	4.06 \pm 0.33	3.31 \pm 0.1	3.5 \pm 0.51
		2314	5.47 \pm 0.75	3.32 \pm 0.14	4.36 \pm 2.12
		H1G2	4.15 \pm 0.44	3.34 \pm 0.08	3.54 \pm 1.05
		H2G4	3.35 \pm 0.37	3.33 \pm 0.06	3.34 \pm 0.43
		H5G3	3.34 \pm 0.14	3.57 \pm 0.08	3.45 \pm 0.32
		H7G2	4.57 \pm 0.76	2.58 \pm 0.06	3.2 \pm 2.05
		H8G5	4.13 \pm 0.38	3.58 \pm 0.12	4.07 \pm 1.01
		H9G3	3.04 \pm 0.13	3.15 \pm 0.06	2.58 \pm 0.56
	Unilateral	2313	3.33 \pm 0.10	5.44 \pm 0.37	4.42 \pm 1.54
		H10G2	3.26 \pm 0.21	2.53 \pm 0.09	3.09 \pm 0.46
		H1G5	2.41 \pm 0.14	2.43 \pm 0.06	2.42 \pm 0.29
		H2G5	3.44 \pm 0.09	4.24 \pm 0.44	4.01 \pm 1
		H8G2	4.32 \pm 0.39	4.38 \pm 0.06	4.34 \pm 1.14
	Bilateral	H9G2	3.45 \pm 0.31	3.11 \pm 0.04	3.27 \pm 0.48
		H3G4	3.16 \pm 0.06	3.37 \pm 0.20	3.29 \pm 0.48
		H3G5	3.47 \pm 0.07	-	3.47 \pm 0.07
		H4G4	4.49 \pm 0.09	4.53 \pm 0.20	4.51 \pm 0.45
		H4G5	5.29 \pm 0.36	-	5.29 \pm 0.36
		H5G5	2.59 \pm 0.12	-	2.59 \pm 0.12
		H6G3	2.22 \pm 0.45	-	2.22 \pm 0.45
		H6G5	3.47 \pm 0.10	4.11 \pm 0.53	3.57 \pm 1.06

Tabla III. Análisis de Rayleigh

Hembra	Pre-cirugía				Post-cirugía				Total						
	Rho	p	Ángulo	Hora	# días	Rho	p	Ángulo	Hora	#días	Rho	p	Ángulo	Hora	# días
2302	0.29	>0.05	157.4	10:29	8	0.94	<0.001	11.39	00:45	7	0.32	>0.05	27.27	01:49	15
2314	0.9	<0.001	70.72	04:42	8	0.76	>0.05	46.83	03:07	7	0.81	<0.001	60.57	04:02	15
H1G2	0.88	<0.001	131.3	08:45	7	0.70	<0.05	66.41	04:25	7	0.67	<0.05	102.9	06:51	14
H2G4	0.33	>0.05	342.6	22:50	6	0.93	<0.001	38.38	02:33	6	0.57	<0.05	24.41	01:37	12
H5G3	0.96	<0.001	6.796	00:27	5	0.87	<0.05	137.6	09:10	7	0.39	>0.05	87.03	05:48	12
H7G2	0.89	<0.05	43.55	02:54	6	0.83	<0.05	35.41	02:21	7	0.85	<0.001	39.31	02:37	13
H8G5	0.57	>0.05	106.9	07:07	8	0.59	>0.05	58.64	03:54	5	0.49	<0.05	88.16	05:52	12
H9G3	0.92	<0.001	106.4	07:55	7	0.89	<0.001	85.32	05:41	7	0.90	<0.001	104.2	06:56	14
2313	0.88	<0.001	121.6	08:06	8	0.52	>0.05	34.13	02:16	7	0.54	<0.05	94.67	06:18	15
H10G2	0.97	<0.001	40.64	02:42	7	0.88	<0.001	35.54	02:22	7	0.92	<0.001	38.21	02:32	14
H1G5	0.37	>0.05	71.19	04:44	8	N				0.37	>0.05	71.19	04:44	8	
H2G5	0.82	<0.05	122.1	08:08	8	0.88	X	112.4	07:29	4	0.84	<0.001	118.7	07:55	12
H8G2	0.70	<0.05	120.1	08:06	8	0.74	>0.05	12.63	00:50	5	0.44	>0.05	81.68	05:26	13
H9G2	0.34	>0.05	112.3	07:29	8	N				0.34	>0.05	112.3	07:29	8	
H3G4	0.72	<0.05	109.8	07:19	8	N				0.72	<0.05	109.8	07:19	8	
H3G5	0.87	<0.001	92.87	06:11	7	-	-	-	-	0	0.87	<0.001	92.87	06:11	7
H4G4	0.63	<0.05	180.4	12:01	8	0.73	<0.05	80.85	05:23	7	0.43	>0.05	130.2	08:40	15
H4G5	0.50	>0.05	65.55	04:22	8	-	-	-	-	0	0.50	>0.05	65.55	04:22	8
H5G5	0.93	<0.001	137.7	09:11	6	-	-	-	-	0	0.93	<0.001	137.7	09:11	6
H6G3	0.93	<0.001	107.1	07:08	8	-	-	-	-	0	0.93	<0.001	107.1	07:08	8
H6G5	0.70	<0.05	349.9	23:19	6	0.68	X	349.6	23:18	4	0.63	<0.05	349.8	23:19	10
		Fuera del NPV				Unilateral				Bilateral					
Lesión															

Tabla III. Análisis de Rayleigh para cada hembra antes y después de la cirugía. (-) Hembras que dejaron de amamantar; (X) Menos de 5 datos registrados (P no calculada); (N) Hembras con múltiples amamantamientos post-lesión.

Fig 11. Grafica de Rayleigh para los primeros ocho días de lactancia

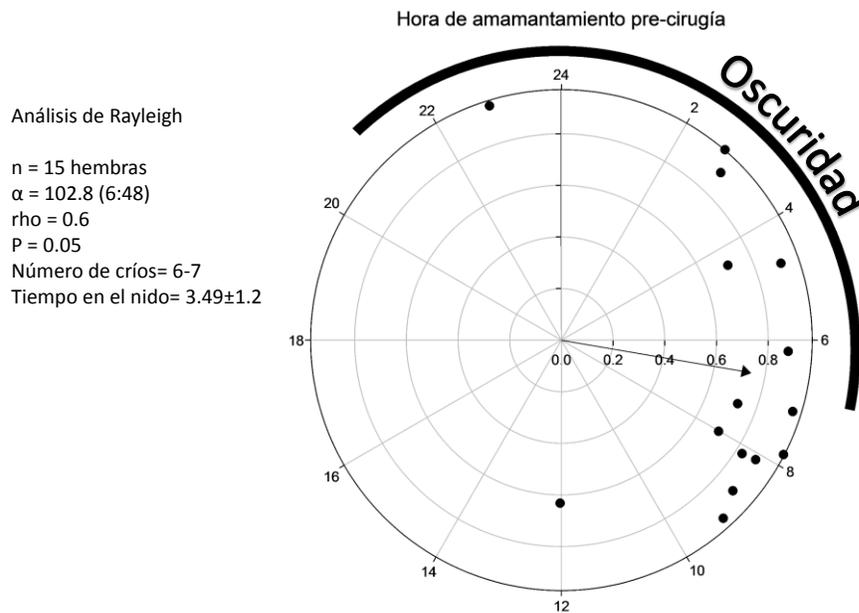


Figura 11. Análisis de Rayleigh, para los primeros ocho días de lactancia, antes de la cirugía. Los puntos señalan un vector individual, obtenido para cada coneja (n=15) que alimentaba a una camada de 7 críos. La flecha representa el vector que describe la hora a la que amamanta la población.

En cuanto a los indicadores de bienestar, agua (Tabla III) y alimento (Tabla IV), se observó que durante la gestación las hembras consumieron 407 ± 157.7 ml. de agua y 154 ± 59.7 gr. de alimento (Media \pm DE). Durante el periodo de lactancia, previo a la cirugía, el consumo de agua fue de 551.6 ± 157.6 ml. y el de alimento de 237.3 ± 91.8 gr. (Media \pm DE; Fig. 12.). Al comparar el consumo entre la gestación y la lactancia, se encontró un incremento significativo en la ingestión del agua (P<0.001) y del alimento (P<0.001). Por otro lado, las hembras tuvieron, en promedio, un incremento de 0.21 ± 0.14 Kg de peso durante ese periodo (Tabla VI).

Tabla IV. Consumo de agua

Consumo de agua (ml) $\bar{X} \pm D.E.$					
	Hembra	Gestación	Lactancia		
			Pre-cirugía	Post-cirugía	
		15 días	6 días	3 días	
Lesión	Fuera del NPV	2302	475.3 \pm 111.2	501.6 \pm 83	600 \pm 69.4
		2314	441.3 \pm 92.6	530 \pm 93.7	426.6 \pm 77.5
		H1G2	443.6 \pm 156.8	675 \pm 152.1	790 \pm 152.6
		H2G4	376 \pm 152.8	445 \pm 149.9	746.6 \pm 157
		H5G3	437.3 \pm 142.5	436.6 \pm 138	380 \pm 134.7
		H7G2	432.6 \pm 180.1	636.6 \pm 174.3	616.6 \pm 177.4
		H8G5	286 \pm 89.5	481.6 \pm 88.2	466.6 \pm 60.8
		H9G3	357.3 \pm 141	403.3 \pm 102.9	366.6 \pm 105.1
	Unilateral	2313	412.6 \pm 91.7	480 \pm 73.9	496.6 \pm 48.5
		H10G2	400.6 \pm 107.7	598.3 \pm 108.4	646.6 \pm 132.7
		H1G5	235.3 \pm 93.26	388.3 \pm 100.3	152.3 \pm 92.5
		H2G5	309.3 \pm 96.4	406.6 \pm 100.4	610 \pm 104.1
		H8G2	459.3 \pm 139.6	723.3 \pm 131.1	803.3 \pm 114.7
	Bilateral	H9G2	465.3 \pm 98	748.3 \pm 108.5	566.6 \pm 125.1
		H3G4	710.6 \pm 116.9	431.6 \pm 128.2	590 \pm 156.7
		H3G5	489.4 \pm 134.1	597.8 \pm 132.8	280 \pm 132.8
		H4G4	282.6 \pm 87.7	521.6 \pm 82.9	586.6 \pm 109.3
		H4G5	491.3 \pm 161	646.6 \pm 165.1	273.3 \pm 149.9
		H5G5	394 \pm 102.8	456.6 \pm 108.5	180 \pm 104.7
		H6G3	260 \pm 67.4	275 \pm 66.9	343.3 \pm 71.3
		H6G5	386 \pm 157.6	700 \pm 148	376.6 \pm 165.4

Tabla V. Consumo de alimento

Consumo de alimento (gr) X± D.E.					
		Hembra	Gestación	Lactancia	
				Pre-cirugía	Post-cirugía
		15 días	6 días	3 días	
Lesión	Fuera del NPV	2302	204.8 ± 36.9	182.3 ± 85.3	378.6 ± 49.2
		2314	198.4 ± 43	208.1 ± 88.6	450 ± 86.6
		H1G2	206 ± 51.5	394.6 ± 49.8	340.6 ± 109
		H2G4	148.5 ± 36.4	256.6 ± 137.3	290 ± 48.5
		H5G3	158.1 ± 50.1	197.3 ± 42	186 ± 47.6
		H7G2	119.7 ± 50.8	277.5 ± 63.9	274 ± 83
		H8G5	118.2 ± 74.7	225.8 ± 110.4	151.6 ± 114.1
		H9G3	135 ± 54.1	177.1 ± 80.9	136.6 ± 16.4
	Unilateral	2313	228.4 ± 50.7	234.3 ± 32	194.6 ± 35.9
		H10G2	152.9 ± 46.4	274 ± 66.3	272.3 ± 89
		H1G5	112.4 ± 44.6	192.8 ± 47	49.3 ± 78.6
		H2G5	140.8 ± 47.3	183.3 ± 69	166.3 ± 81.6
		H8G2	149.7 ± 51.3	352.8 ± 63.7	406.6 ± 51.3
	Bilateral	H9G2	158.5 ± 41.7	272.8 ± 67.9	233.6 ± 143
		H3G4	139.6 ± 77.8	266.3 ± 89.2	386.6 ± 167
		H3G5	122.8 ± 37.4	122.3 ± 95.7	87.3 ± 130.2
		H4G4	152.7 ± 35.9	187.1 ± 79.1	212.3 ± 49.5
		H4G5	166.5 ± 38.1	205.8 ± 57.7	36 ± 49.9
		H5G5	126.9 ± 19.8	146 ± 61.5	49.3 ± 44.3
		H6G3	130 ± 31.8	125 ± 62.2	231 ± 51.9
		H6G5	137.7 ± 50.5	274.6 ± 36.3	167.3 ± 129

Fig 12. Consumo de agua y alimento

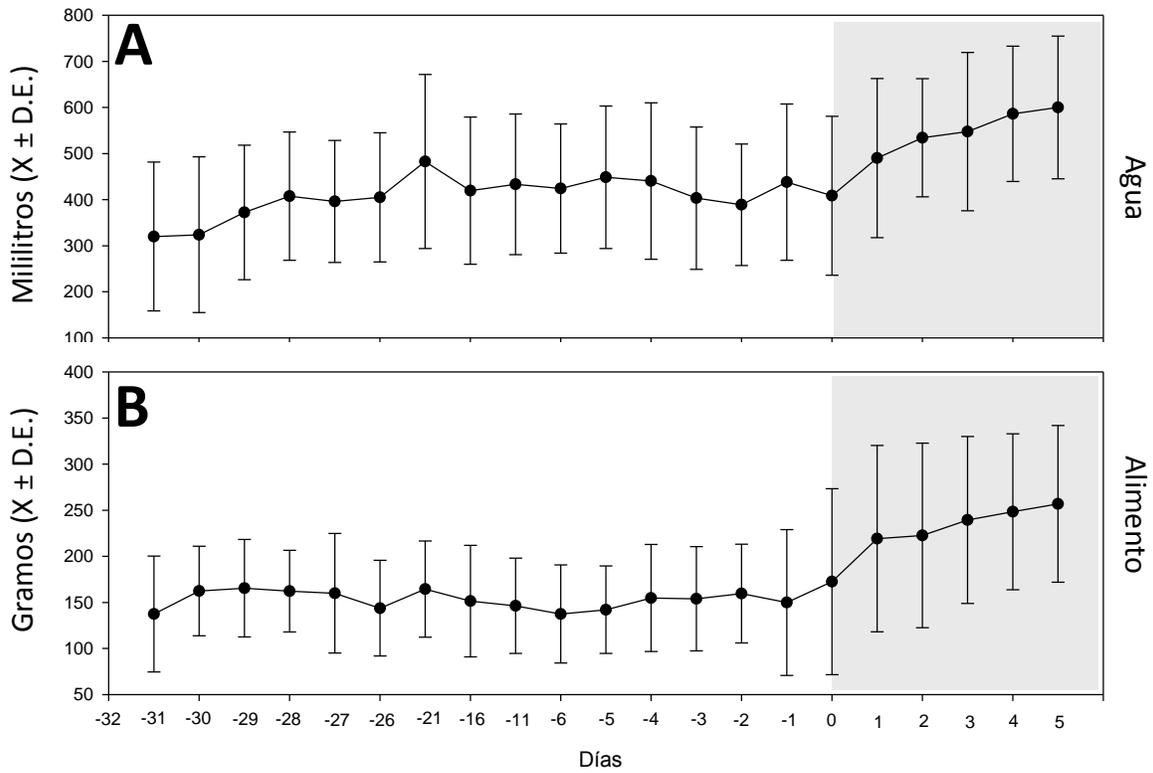


Figura 12. Consumo de agua (A) y alimento (B) durante la gestación y la lactancia previa a la cirugía (n=21). Gestación (área blanca días -31 a 0); Lactancia pre-cirugía (área gris días 1 a 5).

Tabla VI. Peso corporal

		PESO Kg				
		Hembra	Inicio	Cirugía	Sacrificio	Ganancia de peso
<i>Lesión</i>	Fuera del NPV	2302	3.2	3.7	3.7	0.5
		2314	3.5	3.7	3.8	0.3
		H1G2	4.2	4.3	4.3	0.1
		H2G4	4.1	4.4	4.5	0.4
		H5G3	3.5	3.6	3.6	0.1
		H7G2	3.9	3.8	3.8	-0.1
		H8G5	3.4	3.4	3.9	0.5
		H9G3	4.4	4.6	4.8	0.4
	Unilateral	2313	3.3	3.7	3.8	0.5
		H10G2	3.4	3.7	3.8	0.4
		H1G5	3.2	3.6	3.7	0.5
		H2G5	4.7	5	4.8	0.1
		H8G2	3.7	4	4.2	0.5
	Bilateral	H9G2	3.2	3.5	3.6	0.4
		H3G4	4.1	4.3	4.5	0.4
		H3G5	4.4	4.4	4.3	-0.1
		H4G4	3.5	3.8	3.8	0.3
		H4G5	3.5	3.7	3.7	0.2
		H5G5	3.3	3.4	3.3	0
		H6G3	3.3	3.5	3.5	0.2
		H6G5	4.4	4.6	4.5	0.1

Tabla VI. Peso de las hembras al inicio del experimento (apareamiento), el día de la cirugía y el día del sacrificio. La ganancia de peso señalada se calculó en relación con el peso al inicio de experimento.

6.2 Observaciones post-lesión

6.2.1 Histología

6.2.1.1 Caracterización e identificación de la lesión

La lesión causada por el AK se caracterizó por la disminución en el número de cuerpos celulares. Por lo tanto, el área dañada, se apreció como una zona de baja densidad celular, producto de la degeneración neuronal (Fig. 13).

6.2.1.1 Ubicación de las lesiones

En conjunto, las 21 lesiones se localizaron entre los planos A-2.0 y P-3.0. Ocho se localizaron fuera del NPV, cinco causaron un daño unilateral, mientras que las ocho restantes, ocasionaron un daño bilateral. Las lesiones ubicadas en el NPV, entre los planos P-1.0 y P-1.5, causaron alteraciones en la ritmicidad del amamantamiento (●). Por otro lado, algunas de las lesiones del NPV, encontradas entre los planos P-0.5 y P-2.5, provocaron la abolición del amamantamiento (Δ). Por último, la mayoría de las lesiones unilaterales del NPV, así como las que se encontraron alejadas del núcleo, no causaron un efecto significativo sobre las conductas analizadas (*) (Fig. 14).

Luego del análisis histológico, las 21 hembras se dividieron en tres grupos. Tomando como referencia la ubicación de la lesión sobre el NPV, es decir, lesiones fuera del NPV, lesiones unilaterales y lesiones bilaterales.

Fig 13. Identificación de la lesión con ácido kaínico

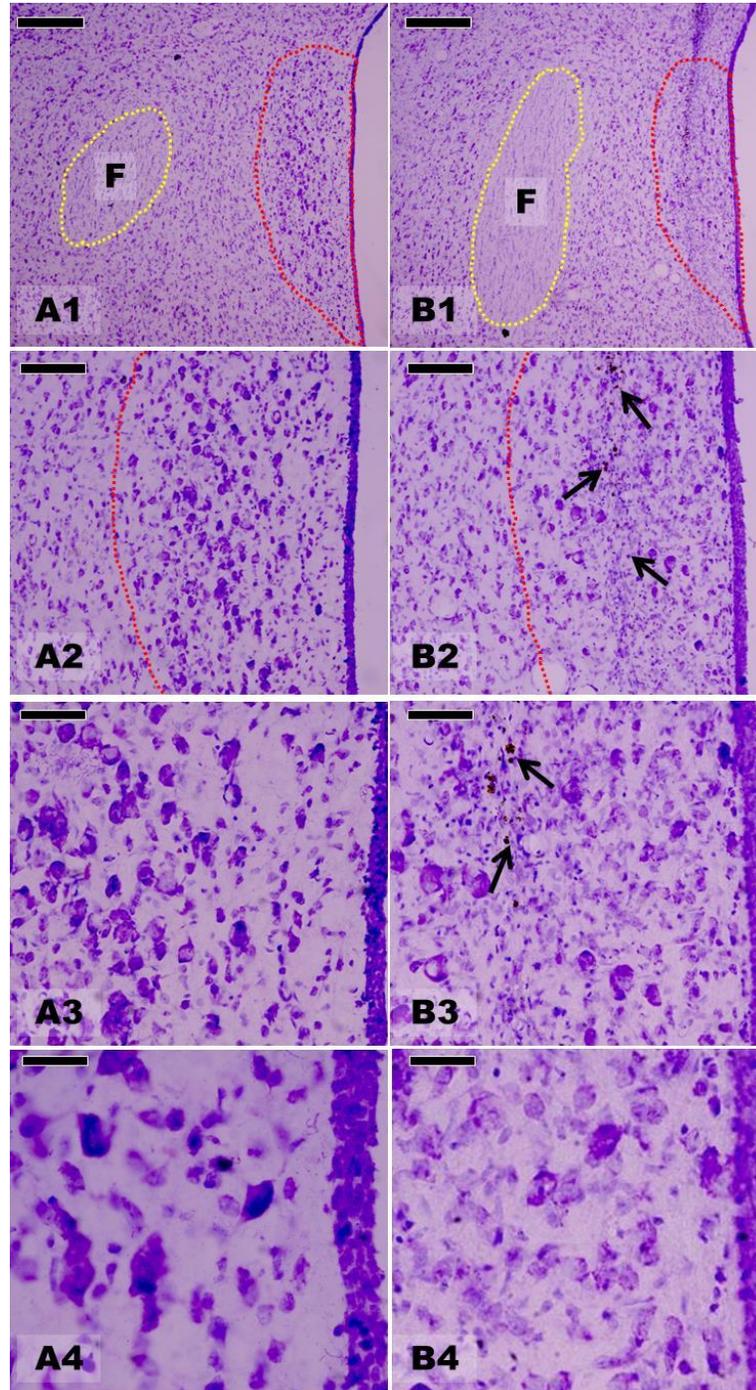


Figura 13. Comparación de la citoarquitectura del NPV, a través de la tinción de Nissl. Las secciones del NPV corresponden al plano 2.5 posterior de acuerdo con el atlas de Girgis y Shih-Chang (1981). En **A** se observa un NPV intacto mientras que en **B** se aprecia la neurodegeneración del tejido que indica la destrucción de las células del NPV, 15 días posteriores a la administración del AK. Las flechas señalan el trayecto de la cánula. En rojo: delimitación del núcleo paraventricular; en amarillo (F): fornix. La barra de escala corresponde en A1 y B1 a 300 μ m, en A2 y B2 a 120 μ m, en A3 y B3 a 60 μ m y en A4 y B4

Fig 14. Ubicación de las lesiones

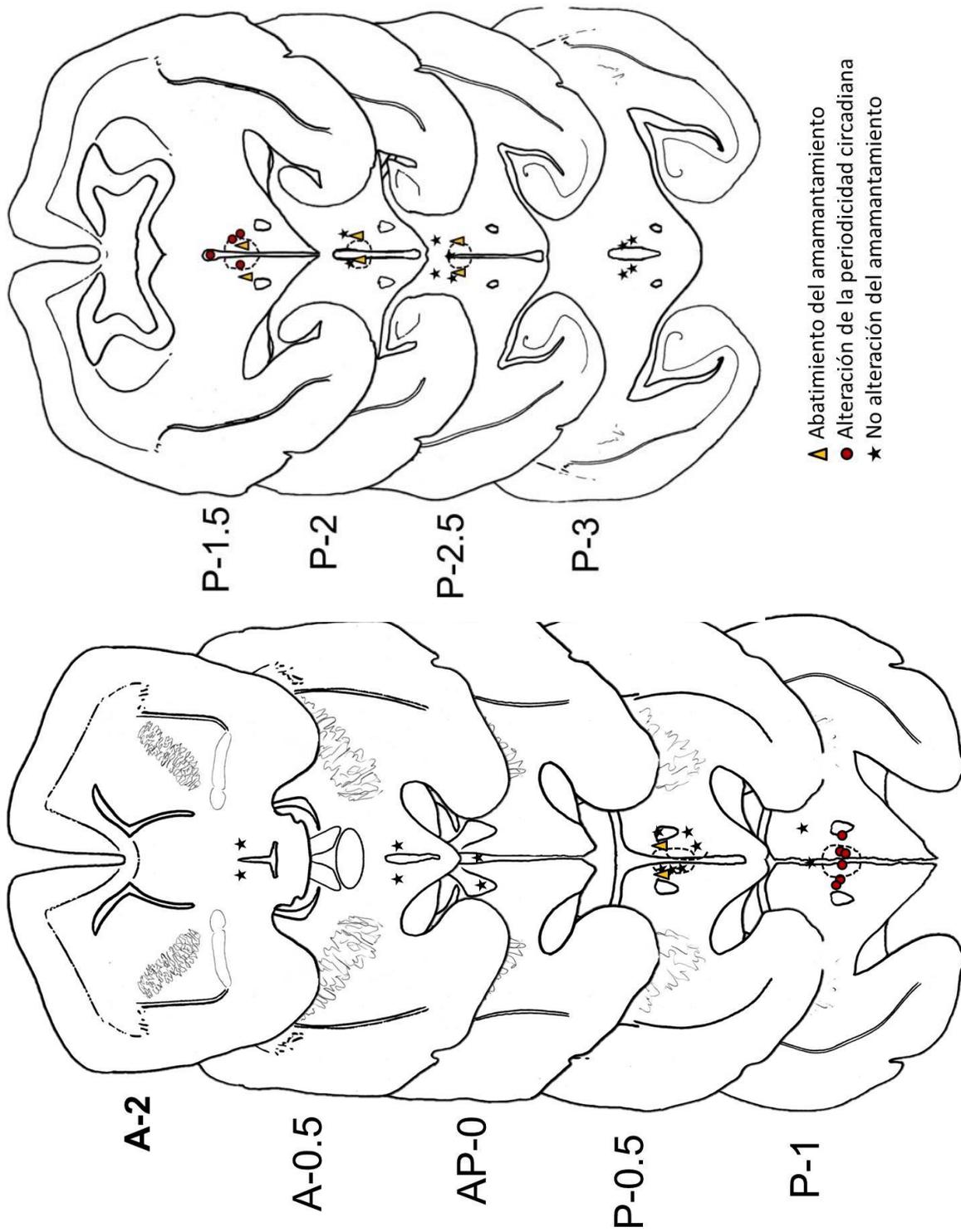


Figura 14. Localización las lesiones en todas las hembras. Planos modificados de Girgis y Shih – Chang (1981).

6.3 Grupo 1 (Hembras lesionadas fuera del NPV)

6.3.1 Histología

En ocho de las hembras, las lesiones se localizaron fuera del NPV en áreas como: la comisura anterior, el fornix, la fimbria del hipocampo, el área hipotalámica anterior, el área dorsal hipotalámica, el área hipotalámica lateral, el núcleo periventricular del tálamo, el núcleo ventromedial del tálamo, el tracto mamilotalámico, el núcleo dorsomedial del hipotálamo, el área hipotalámica posterior, así como en el tercer ventrículo. Debido a que las lesiones no dañaron el NPV, en este grupo fue posible realizar una estimación del volumen de dicho núcleo $8.5 \times 10^8 \pm 0.88 \mu\text{m}^3$ (Media \pm DE; Tabla VII).

Tabla VII. Estimación de volumen del NPV en el grupo 1.

<i>Hembra</i>	Volumen x 10⁸ (μm^3)		
	NPV		
	Izquierdo	Derecho	Total
<i>2302</i>	3.846	4.046	7.893
<i>2314</i>	3.999	4.032	8.031
<i>H1G2</i>	4.479	4.313	8.792
<i>H2G4</i>	4.794	4.256	9.049
<i>H5G3</i>	3.642	3.608	7.250
<i>H7G2</i>	4.584	4.560	9.145
<i>H8G5</i>	3.942	3.946	7.888
<i>H9G3</i>	4.865	5.113	9.978

Figura 15. Ubicación de la lesión y actograma de la hembra 2302

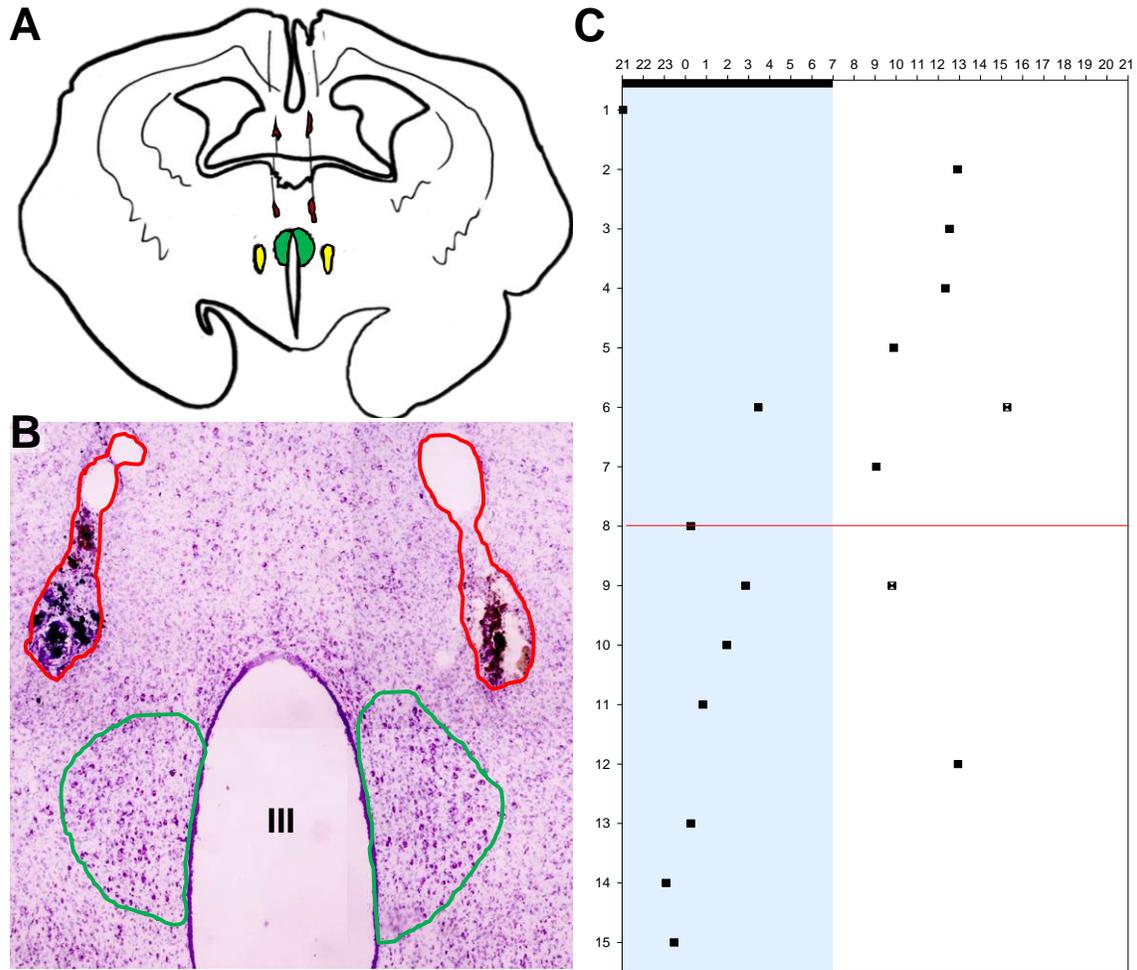


Figura 15. Ubicación de la lesión en la hembra 2302. (A) Esquema representativo del plano de la lesión (P-2.0). (B) Microfotografía (40X) del área lesionada. Rojo: delimitación de la lesión; Verde: NPV; Amarillo: Fornix. (C) Actograma de amamantamiento. Eje Y días; eje X horas. Cada cuadro representa un evento de amamantamiento, la línea roja indica el día de la cirugía y la marca de agua señala el cambio de fase luz-oscuridad (14-10).

Figura 16. Ubicación de la lesión y actograma de la hembra 2314

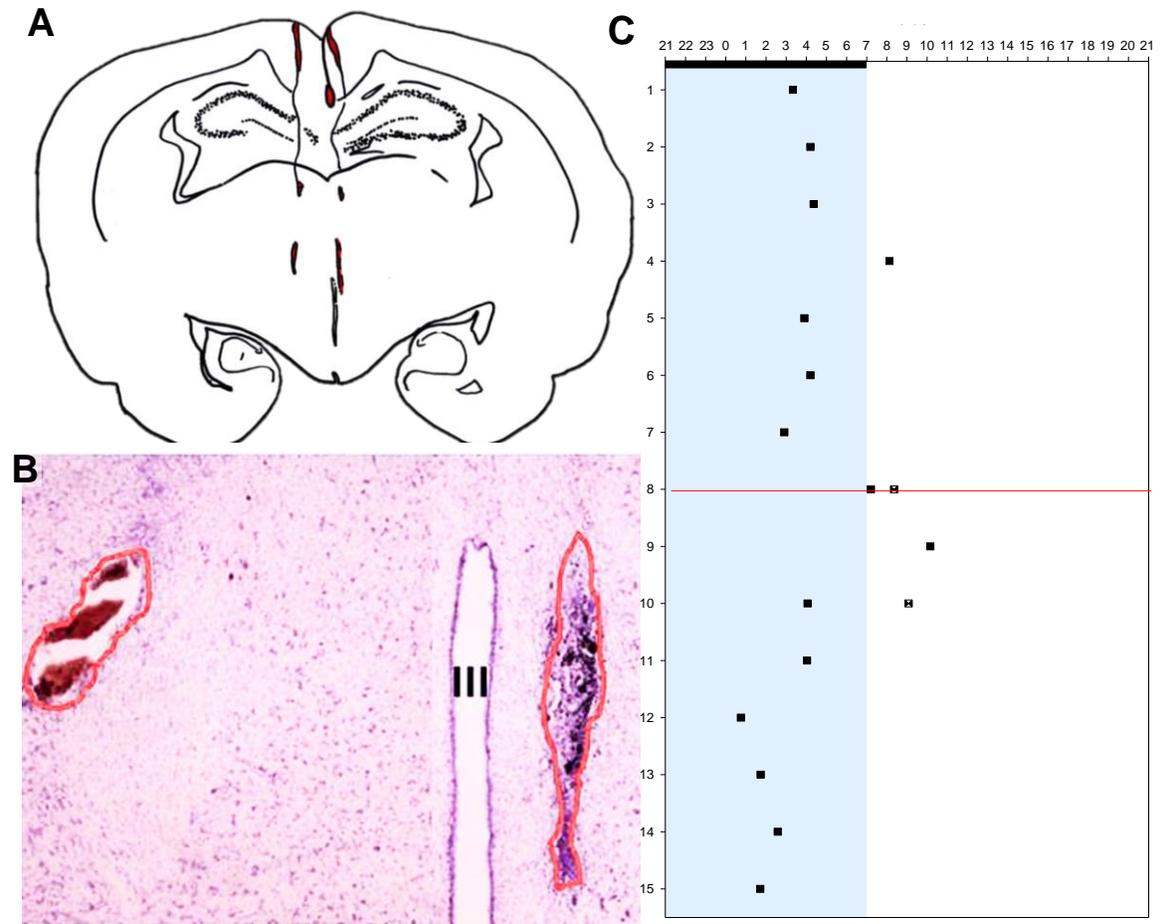


Figura 16. Ubicación de la lesión en la hembra 2314. (A) Esquema representativo del plano de la lesión (P-3.0). (B) Microfotografía (40X) del área lesionada. Rojo: delimitación de la lesión. (C) Actograma de amamantamiento. Eje Y días; eje X horas. Cada cuadro representa un evento de amamantamiento, la línea roja indica el día de la cirugía y la marca de agua señala el cambio de fase luz-oscuridad (14-10).

Figura 17. Ubicación de la lesión y actograma de la hembra H1G2

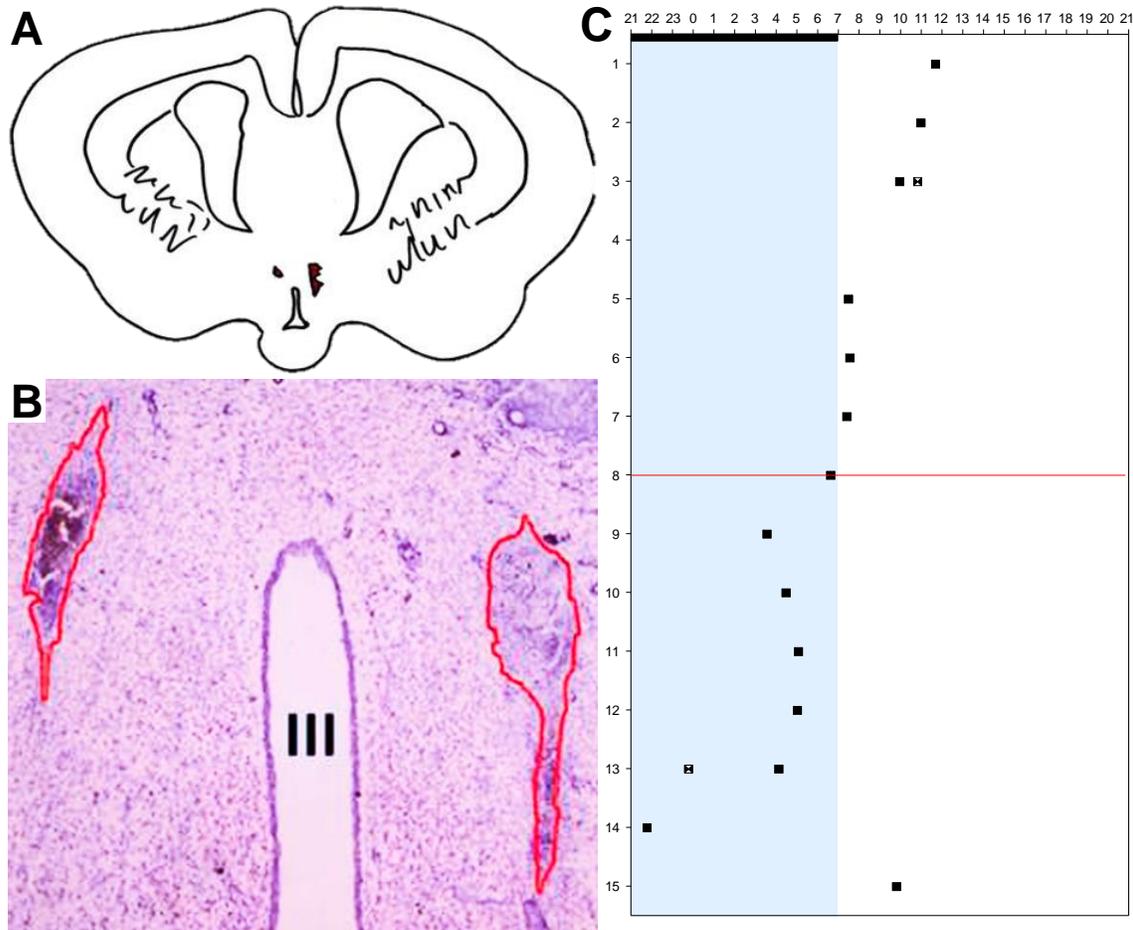


Figura 17. Ubicación de la lesión en la hembra H1G2. (A) Esquema representativo del plano de la lesión (A-2.0). (B) Microfotografía (40X) del área lesionada. Rojo: delimitación de la lesión. (C) Actograma de amamantamiento. Eje Y días; eje X horas. Cada cuadro representa un evento de amamantamiento, la línea roja indica el día de la cirugía y la marca de agua señala el cambio de fase luz-oscuridad (14-10).

Figura 18. Ubicación de la lesión y actograma de la hembra H2G4

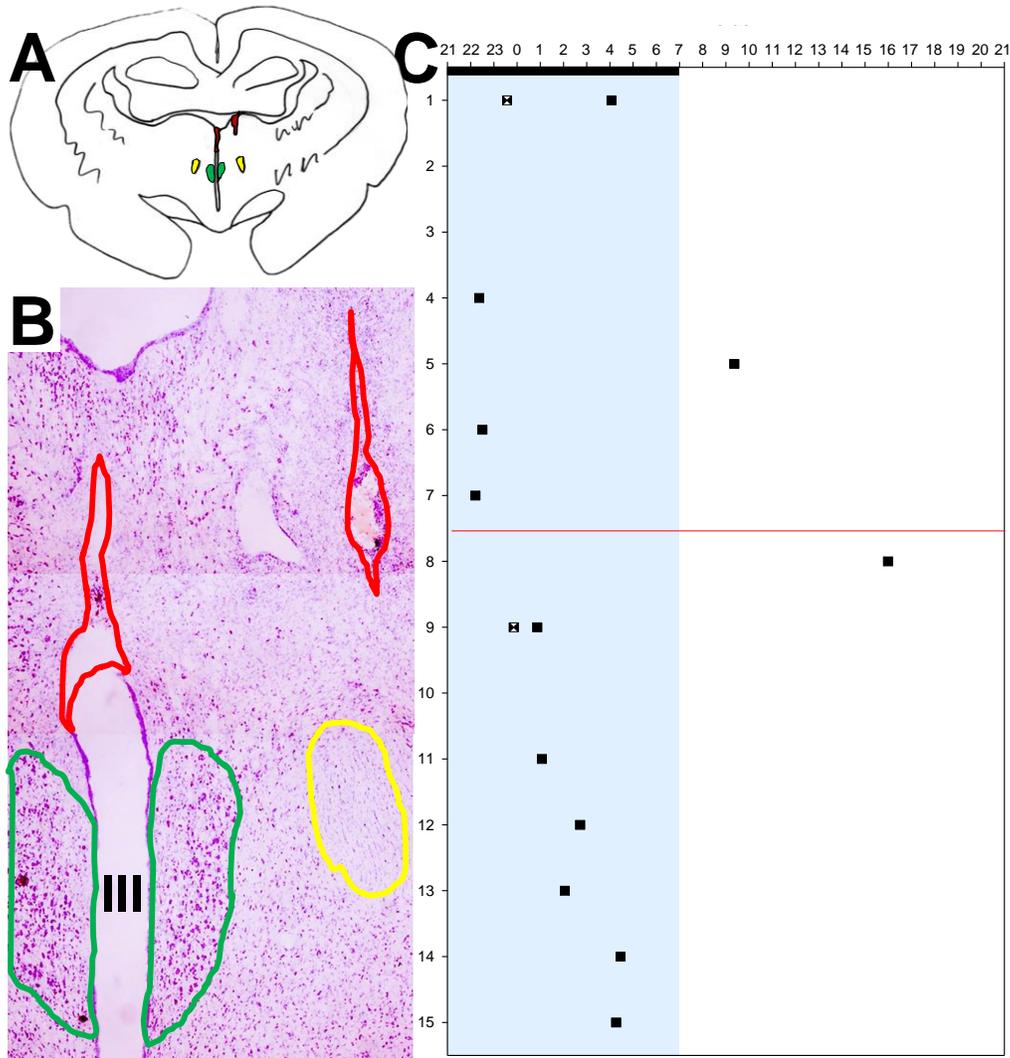


Figura 18. Ubicación de la lesión en la hembra H2G4. (A) Esquema representativo del plano de la lesión (P-1.0). (B) Microfotografía (40X) del área lesionada. Rojo: delimitación de la lesión; Verde: NPV; Amarillo: Fornix. (C) Actograma de amamantamiento. Eje Y días; eje X horas. Cada cuadro representa un evento de amamantamiento, la línea roja indica el día de la cirugía y la marca de agua señala el cambio de fase luz-oscuridad (14-10).

Figura 19. Ubicación de la lesión y actograma de la hembra H5G3

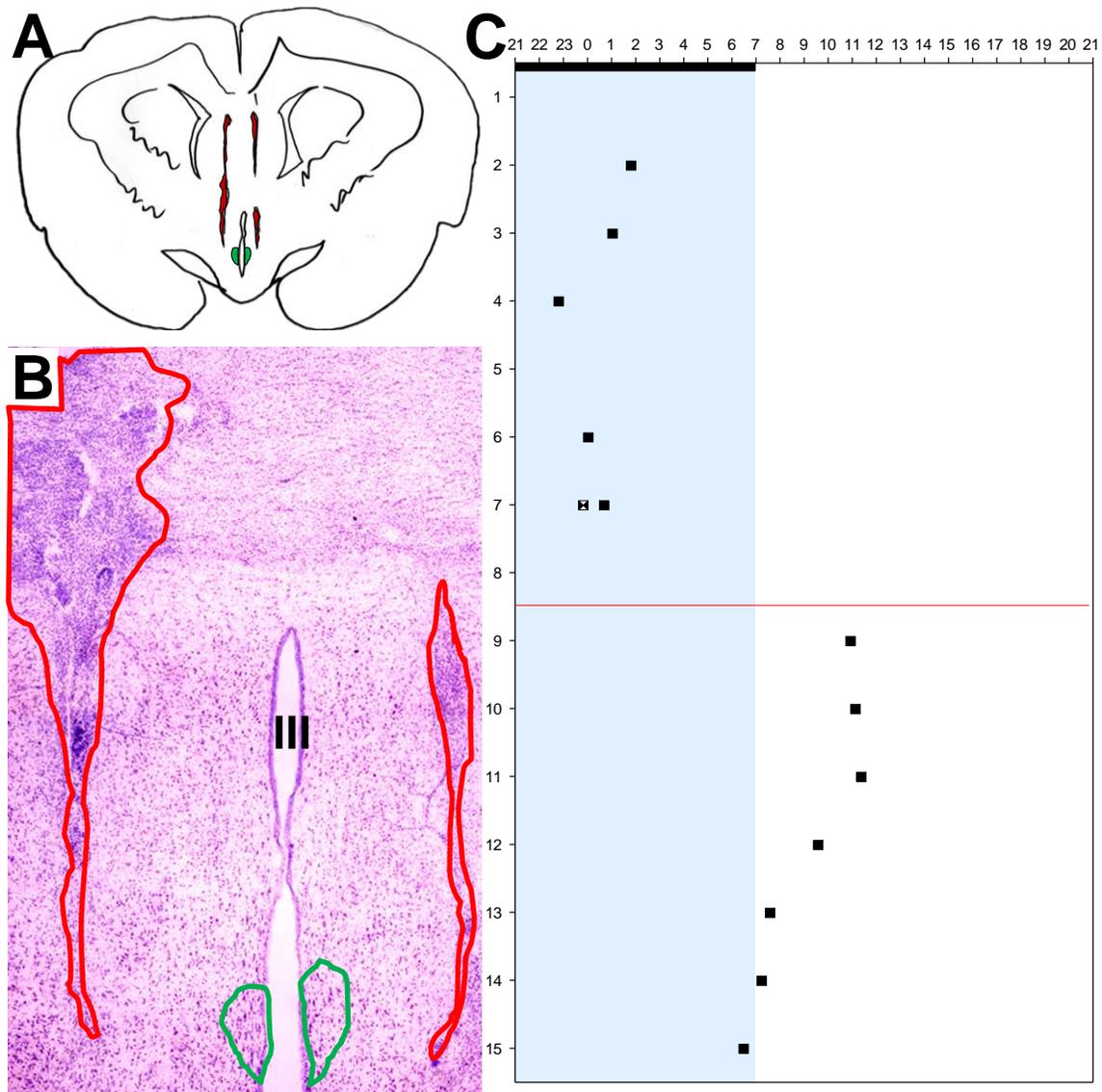


Figura 19. Ubicación de la lesión en la hembra H3G5. (A) Esquema representativo del plano de la lesión (P-1.0). (B) Microfotografía (40X) del área lesionada. Rojo: delimitación de la lesión; Verde: NPV. (C) Actograma de amamantamiento. Eje Y días; eje X horas. Cada cuadro representa un evento de amamantamiento, la línea roja indica el día de la cirugía y la marca de agua señala el cambio de fase luz-oscuridad (14-10).

Figura 20. Ubicación de la lesión y actograma de la hembra H7G2

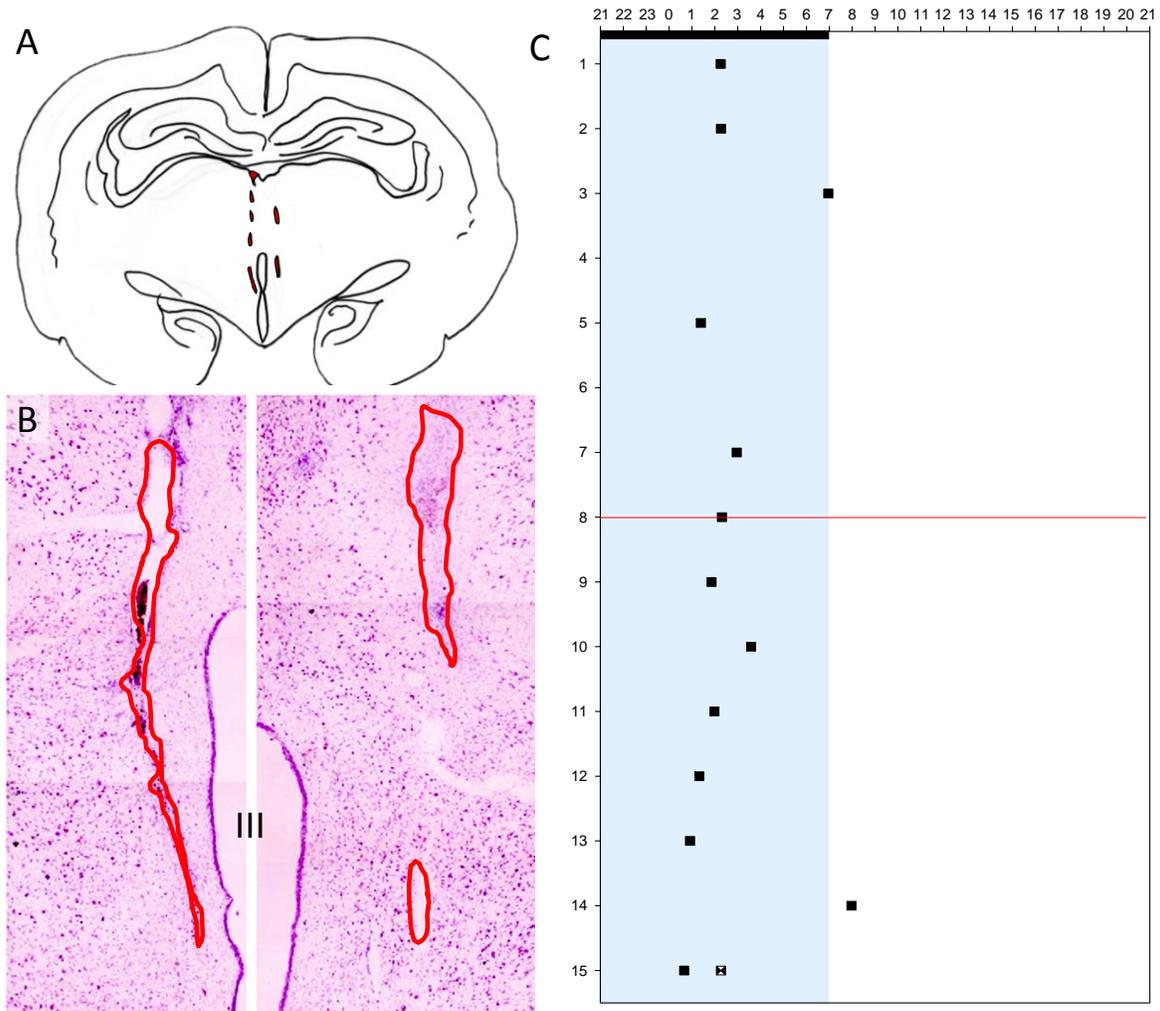


Figura 20. Ubicación de la lesión en la hembra H7G2. (A) Esquema representativo del plano de la lesión (P-3.0). (B) Microfotografía (40X) del área lesionada. Rojo: delimitación de la lesión. (C) Actograma de amamantamiento. Eje Y días; eje X horas. Cada cuadro representa un evento de amamantamiento, la línea roja indica el día de la cirugía y la marca de agua señala el cambio de fase luz-oscuridad (14-10).

Figura 21. Ubicación de la lesión y actograma de la hembra H8G5

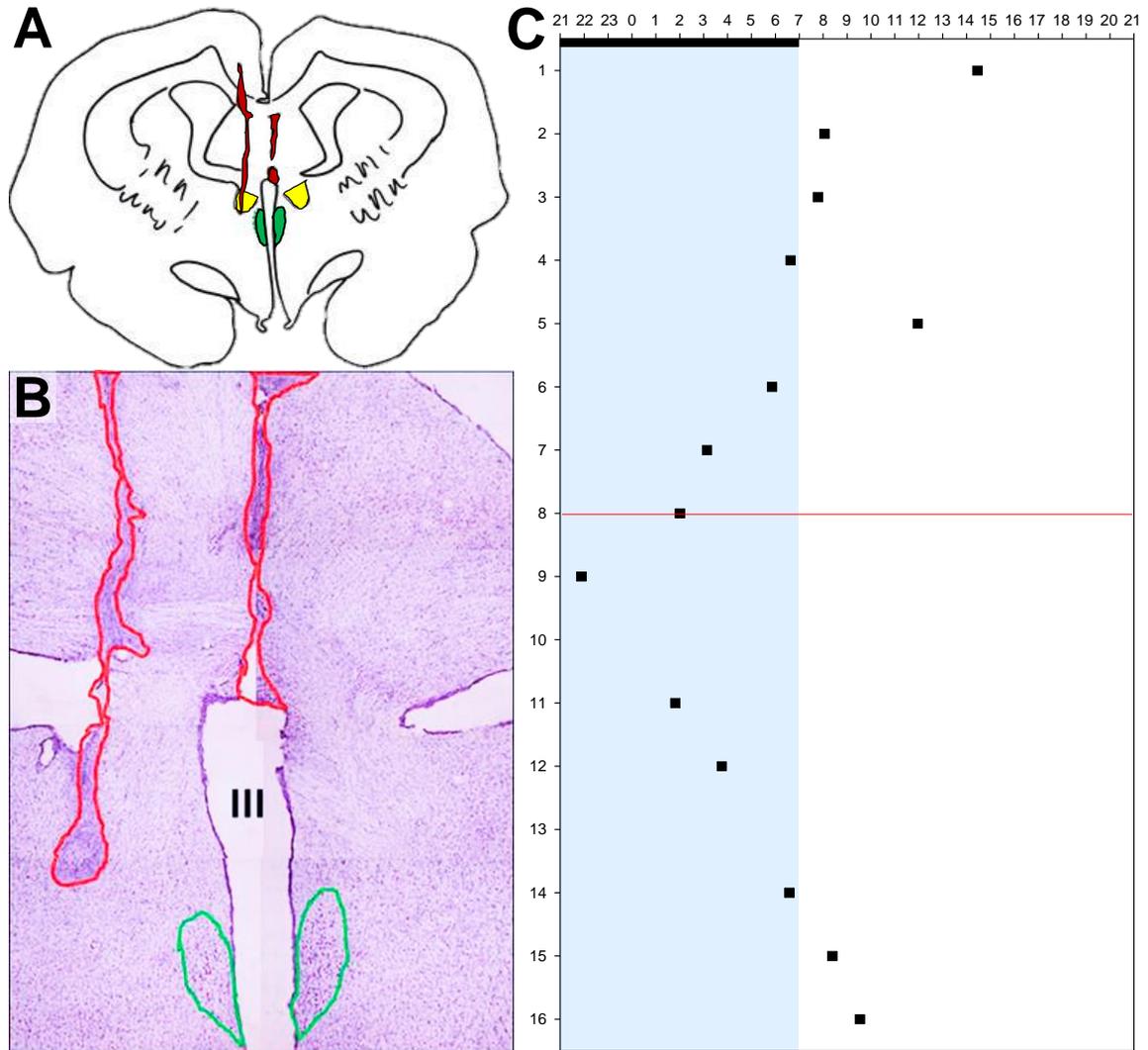


Figura 21. Ubicación de la lesión en la hembra H8G5. (A) Esquema representativo del plano de la lesión (AP-0). (B) Microfotografía (40X) del área lesionada. Rojo: delimitación de la lesión; Verde: NPV; Amarillo: Fornix. (C) Actograma de amamantamiento. Eje Y días; eje X horas. Cada cuadro representa un evento de amamantamiento, la línea roja indica el día de la cirugía y la marca de agua señala el cambio de fase luz-oscuridad (14-10).

Figura 22. Ubicación de la lesión y actograma de la hembra H9G3

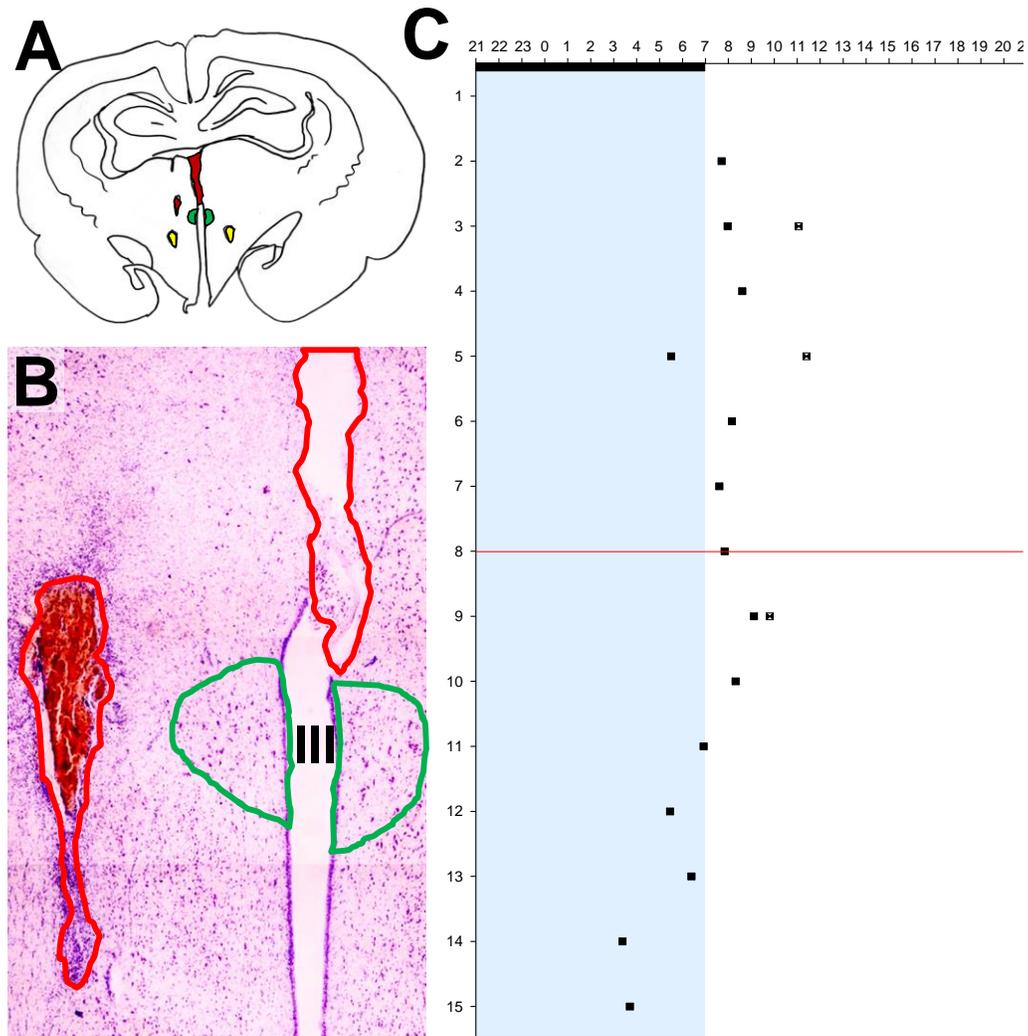


Figura 22. Ubicación de la lesión en la hembra H9G3. (A) Esquema representativo del plano de la lesión (P-2.5). (B) Microfotografía (40X) del área lesionada. Rojo: delimitación de la lesión; Verde: NPV; Amarillo: Fornix. (C) Actograma de amamantamiento. Eje Y días; eje X horas. Cada cuadro representa un evento de amamantamiento, la línea roja indica el día de la cirugía y la marca de agua señala el cambio de fase luz-oscuridad (14-10).

6.3.2 Registro conductual

Al analizar la CM se observó que las ocho hembras continuaron amamantando después de la cirugía. Durante los primeros 15 días de lactancia los amamantamientos tuvieron una duración promedio de 3.45 ± 1.22 min y ocurrieron con un 61.76% de nocturnidad (Tablas I y II). Por medio del análisis de Rayleigh, se observó que seis de ellas obtuvieron un vector individual con una $p < 0.05$, por lo que fue posible calcular un vector poblacional, el cual, tiene un ángulo de fase de 71.92° (equivalente a las 4:47_{hrs}) y una $\rho = 0.63$ con una $p < 0.002$ (Fig 23), que describe los amamantamientos de estas hembras a lo largo del experimento.

Figura 23. Análisis de Rayleigh para las hembras lesionadas fuera del NPV antes de la cirugía

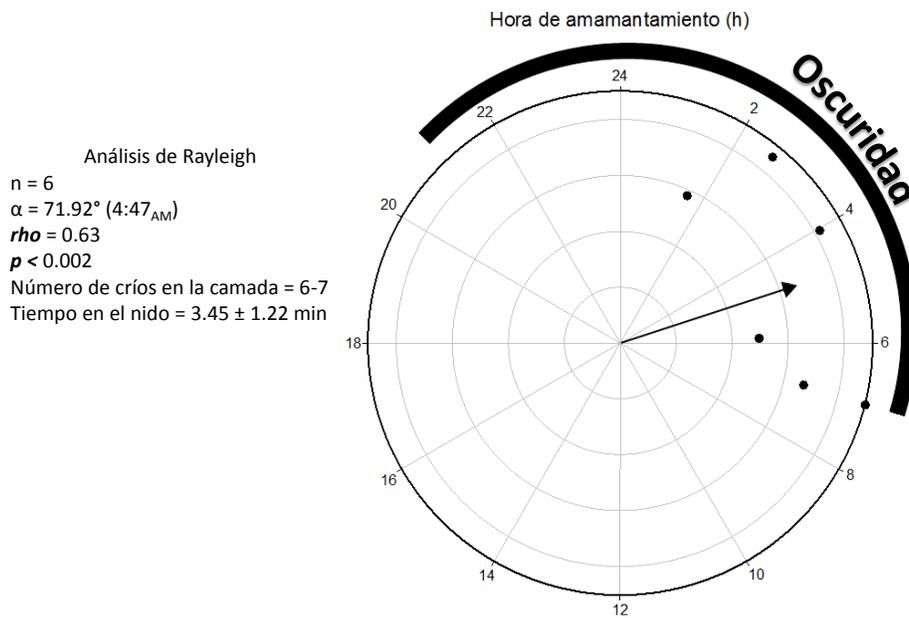


Figura 23. Análisis de Rayleigh para las hembras lesionadas fuera del NPV antes de la cirugía. Los puntos señalan un vector individual, obtenido para cada coneja (n= 6) que alimentaba a una camada de 7 críos. La flecha representa el vector que describe la hora a la que amamanta la población.

Al analizar los indicadores de bienestar, se encontró que posterior a la cirugía consumieron 549.16 ± 200.64 ml. de agua y 270.63 ± 119.64 gr. de alimento (Tablas IV y V). El peso de las hembras al final del experimento reveló que 7 de ellas, obtuvieron una ganancia de peso de 0.32 ± 0.17 Kg., mientras que solo una de ellas perdió 0.1 Kg con respecto a su peso inicial (Tabla VI).

6.4 Grupo 2 (Hembras con lesión unilateral del NPV)

6.4.1 Histología

El análisis histológico reveló que cinco de las 21 hembras lesionadas recibieron un daño unilateral en el NPV (Fig. 21 a 25). Debido a la asimetría de la lesión se determinó, en el lado no lesionado, el volumen del NPV y en el lado si lesionado, el volumen de la lesión (Tabla VIII).

Tabla VIII. Estimación de volumen de la lesión y del NPV en el grupo 2.

<i>Hembra</i>	NPV		Lesión		
	Izquierdo	Derecho	Izquierdo	Derecho	Total
<i>2313</i>	0	4.565	2.290	0	2.290
<i>H10G2</i>	0	4.665	1.671	0	1.671
<i>H1G5</i>	4.379	0	0	0.914	0.914
<i>H2G5</i>	0	3.594	2.109	0	2.109
<i>H8G2</i>	0	4.394	1.500	0	1.500

Figura 24. Ubicación de la lesión y actograma de la hembra 2313

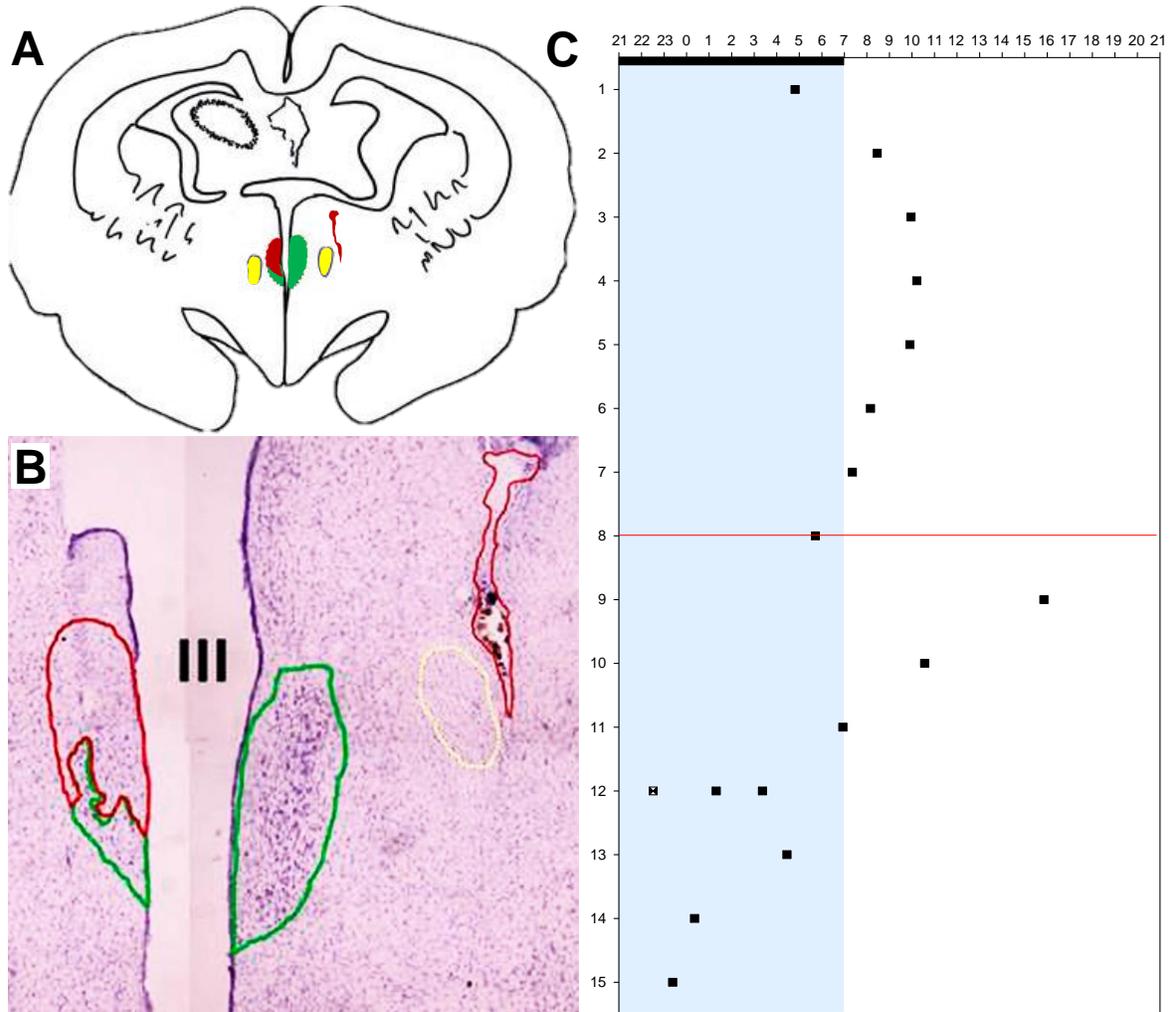


Figura 24. Ubicación de la lesión en la hembra 2313. (A) Esquema representativo del plano de la lesión (P-0.5). (B) Microfotografía (40X) del área lesionada. Rojo: delimitación de la lesión; Verde: NPV; Amarillo: Fornix. (C) Actograma de amamantamiento. Eje Y días; eje X horas. Cada cuadro representa un evento de amamantamiento, la línea roja indica el día de la cirugía y la marca de agua señala el cambio de fase luz-oscuridad (14-10).

Figura 25. Ubicación de la lesión y actograma de la hembra H10G2

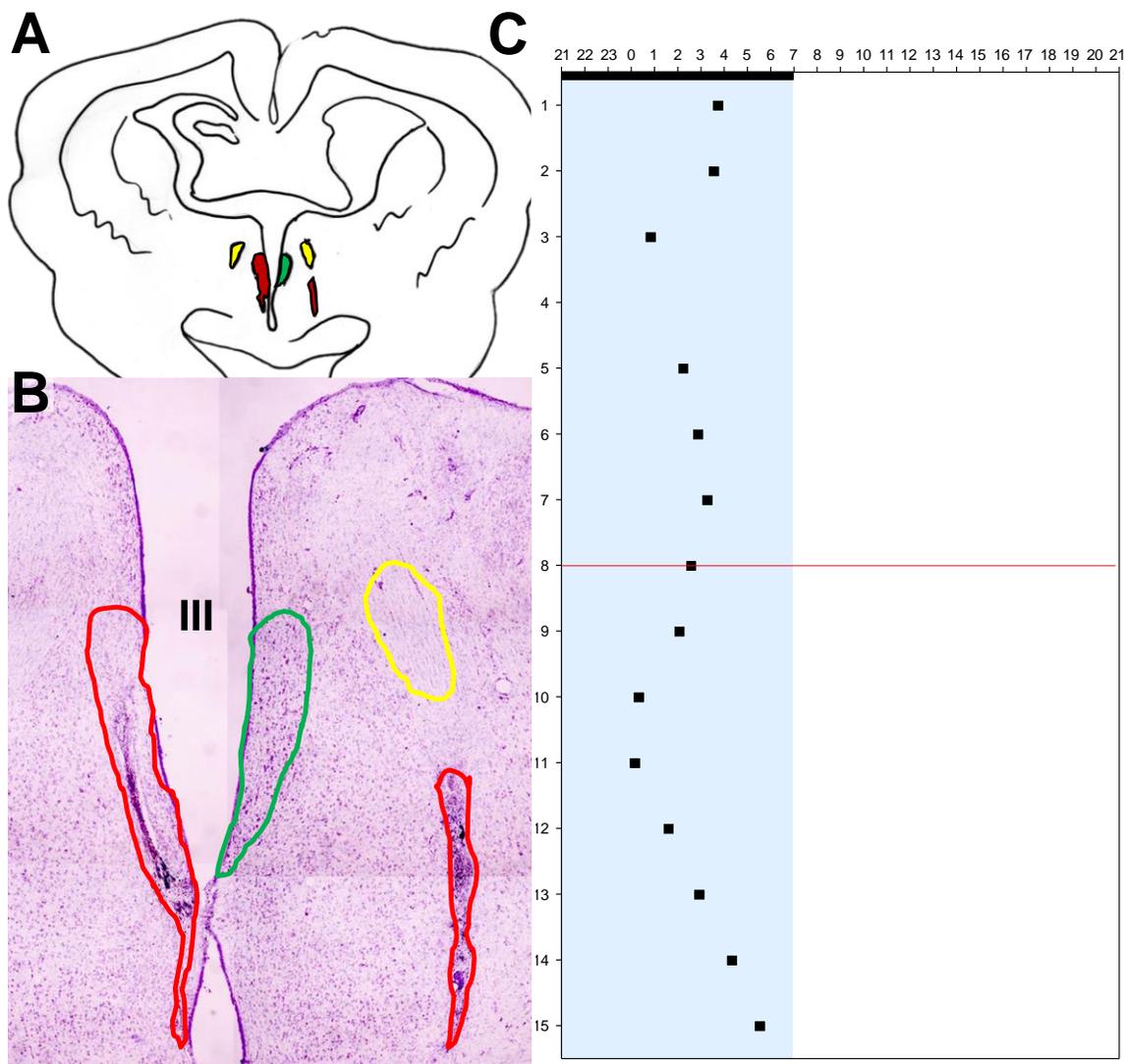


Figura 25. Ubicación de la lesión en la hembra H10G2. (A) Esquema representativo del plano de la lesión (P-0.5). (B) Microfotografía (40X) del área lesionada. Rojo: delimitación de la lesión; Verde: NPV; Amarillo: Fornix. (C) Actograma de amamantamiento. Eje Y días; eje X horas. Cada cuadro representa un evento de amamantamiento, la línea roja indica el día de la cirugía y la marca de agua señala el cambio de fase luz-oscuridad (14-10).

Figura 26. Ubicación de la lesión y actograma de la hembra H1G5

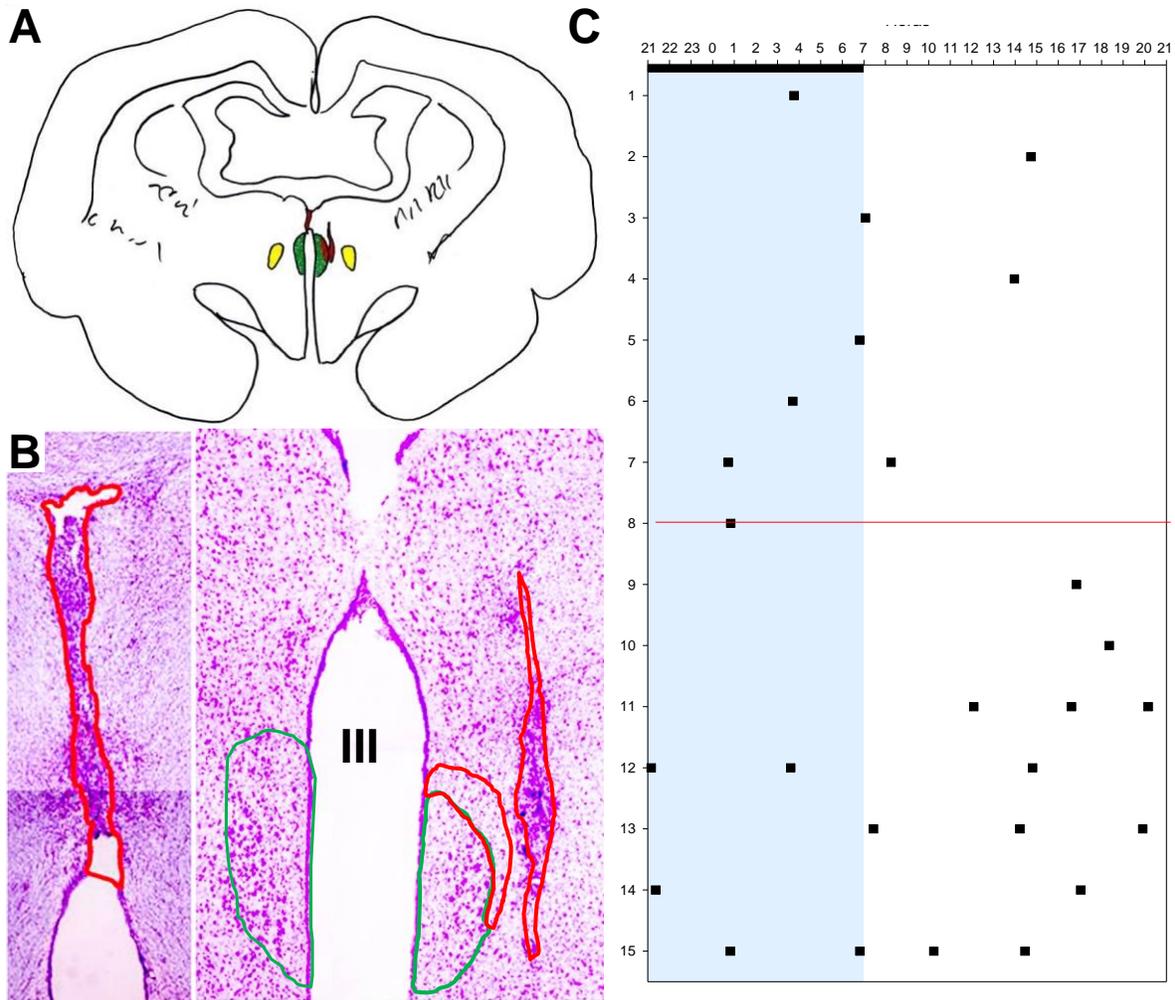


Figura 26. Ubicación de la lesión en la hembra H1G5. (A) Esquema representativo del plano de la lesión (P-1.5). (B) Microfotografía (40X) del área lesionada. Rojo: delimitación de la lesión; Verde: NPV; Amarillo: Fornix. (C) Actograma de amamantamiento. Eje Y días; eje X horas. Cada cuadro representa un evento de amamantamiento, la línea roja indica el día de la cirugía y la marca de agua señala el cambio de fase luz-oscuridad (14-10).

Figura 27. Ubicación de la lesión y actograma de la hembra H2G5

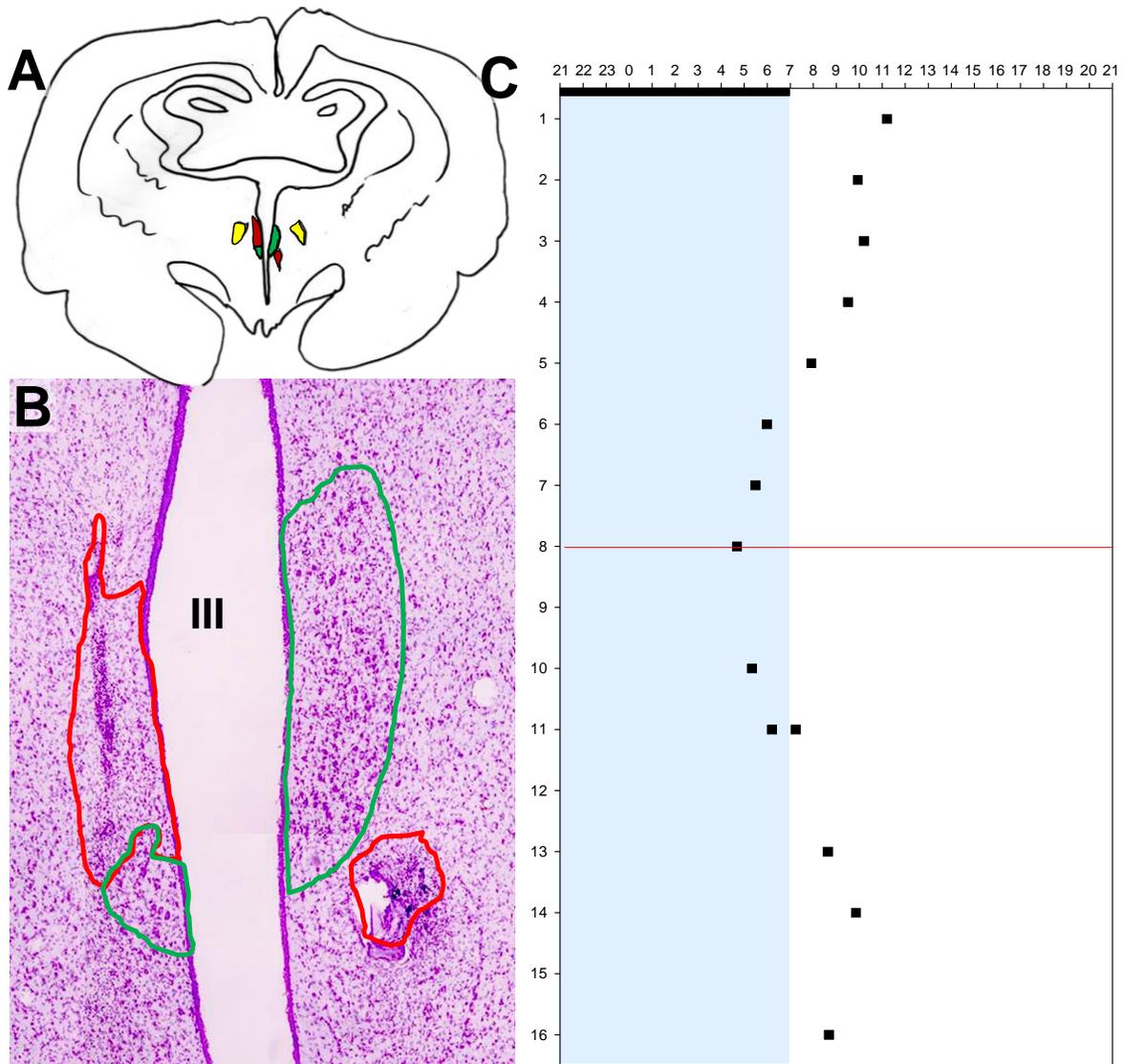


Figura 27. Ubicación de la lesión en la hembra H2G5. (A) Esquema representativo del plano de la lesión (P-0.5). (B) Microfotografía (40X) del área lesionada. Rojo: delimitación de la lesión; Verde: NPV; Amarillo: Fornix. (C) Actograma de amamantamiento. Eje Y días; eje X horas. Cada cuadro representa un evento de amamantamiento, la línea roja indica el día de la cirugía y la marca de agua señala el cambio de fase luz-oscuridad (14-10).

Figura 28. Ubicación de la lesión y actograma de la hembra H8G2

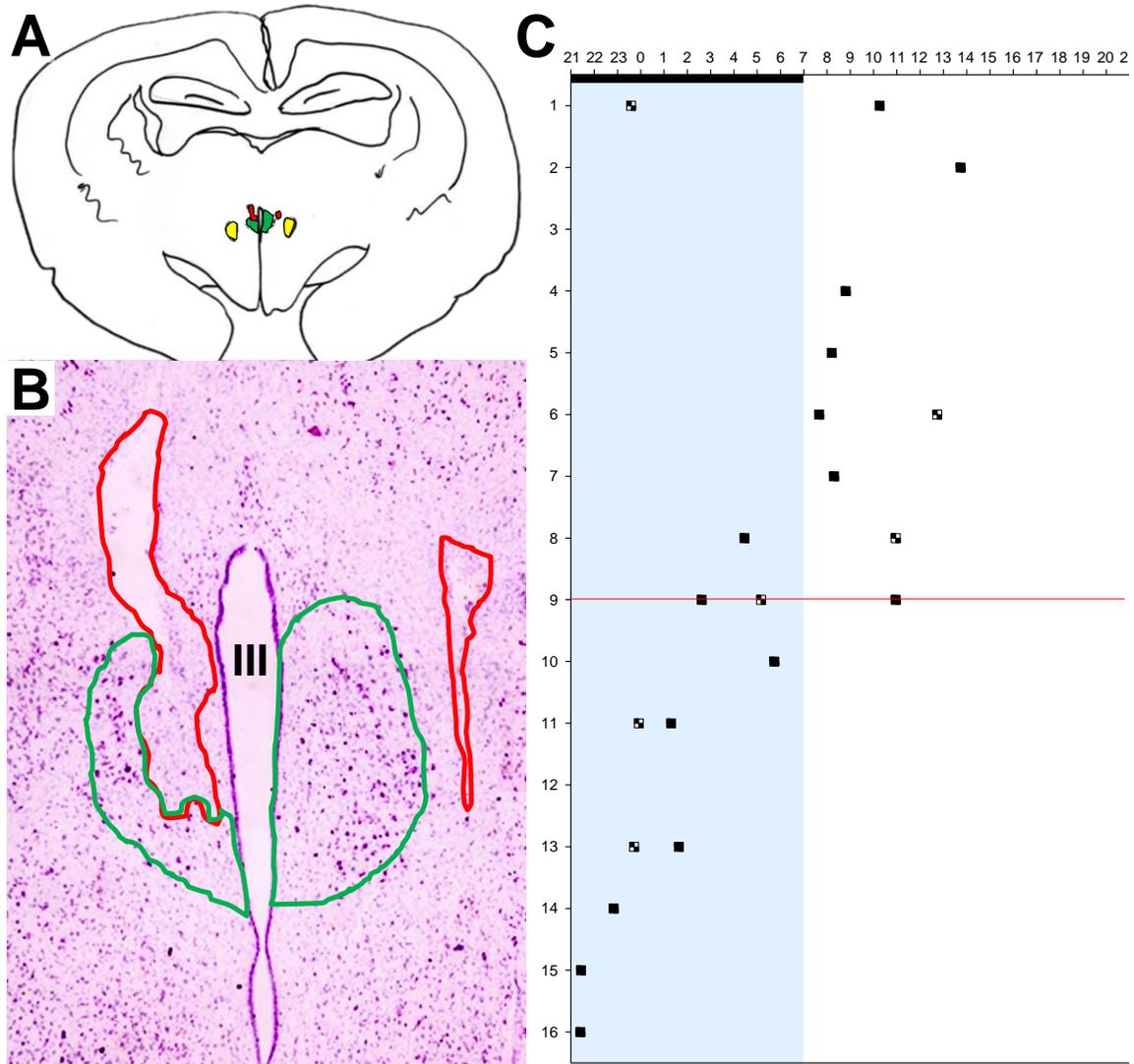


Figura 28. Ubicación de la lesión en la hembra H8G2. (A) Esquema representativo del plano de la lesión (P-2.0). (B) Microfotografía (40X) del área lesionada. Rojo: delimitación de la lesión; Verde: NPV; Amarillo: Fornix. (C) Actograma de amamantamiento. Eje Y días; eje X horas. Cada cuadro representa un evento de amamantamiento, la línea roja indica el día de la cirugía y la marca de agua señala el cambio de fase luz-oscuridad (14-10).

6.4.2 Registro conductual

Al analizar la CM, se observó que las cinco continuaron amamantando durante los días posteriores a la cirugía. Sin embargo, la hembra H1G5 incrementó notablemente el número de amamantamientos, llegando a amamantar hasta en cuatro ocasiones en 24 horas (Fig. 23-C). Tres de las cinco hembras cumplieron con el criterio $p < 0.05$ para el análisis poblacional, con un vector con un ángulo de fase de 79.4° (5:17 hrs), una rho de 0.62 y una $p = 0.002$. Para cada hembra se obtuvo un vector y un ángulo que describe la hora a la que ocurrieron los amamantamientos en los primeros 15 días de lactancia (Tabla III).

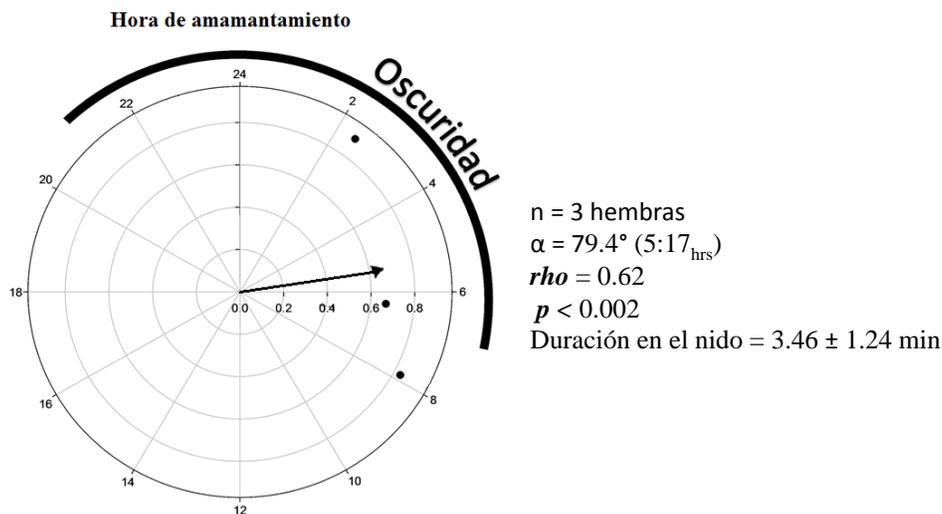


Fig. 29. Análisis de Rayleigh, para los 15 días de lactancia. Cada punto representa un vector individual (n=3) con una camada de 7 críos. La flecha representa el vector que describe la hora a la que amamanta la población.

Durante el experimento, el 38.46% de los amamantamientos ocurrieron durante las horas de oscuridad (Tabla I) y tuvieron una duración promedio de 3.46 ± 1.24 min (Tabla II). Por otro lado, no se observaron diferencias significativas ($p=0.27$) al comparar la duración de los amamantamientos post-cirugía, entre este grupo y el grupo 1.

Al analizar los indicadores de bienestar se encontró que luego de la cirugía el consumo de agua (541.8 ± 258.8 ml.) no fue significativamente diferente ($p=0.94$) al del grupo 1. La ingestión de alimento (217.8 ± 136.2 gr.) tampoco fue significativamente diferente a la del grupo 1 ($p=0.41$). Sin embargo, una de las hembras del grupo (H1G5) consumió, en promedio, menos agua (152.3 ± 92.5) y alimento (49.3 ± 78.6) que el resto, debido a que durante el primer día post-lesión, no ingirió agua ni alimento (Tablas IV y V).

El pesaje de las hembras reveló que al final del experimento obtuvieron una ganancia de 0.4 ± 0.17 Kg. con respecto a su peso inicial (Tabla VI).

6.5 Grupo 3 (Hembras con lesión bilateral del NPV)

6.5.1 Histología

En ocho de las hembras se encontró que la lesión afectó asimétricamente ambos lados del NPV. Por ello, en este grupo, únicamente se determinó el volumen de la lesión (Tabla IX). Con la finalidad de estimar la magnitud de la lesión del NPV se utilizó como referencia el volumen promedio del NPV obtenido en el grupo 1, se determinó que para este grupo, en pr Tabla IX. Estimación de volumen de la lesión en el NPV del grupo 3

<i>Hembra</i>	Volumen x 10 ⁸ (μm ³)					
	Lesión					
	Izquierdo	% dañado	Derecho	% dañado	Total	% dañado
<i>H9G2</i>	2.437	28.7	0.709	8.3	3.147	37.0
<i>H3G4</i>	1.328	15.6	0.581	6.8	1.909	22.4
<i>H3G5</i>	1.495	17.6	1.576	18.5	3.070	36.1
<i>H4G4</i>	1.295	15.2	1.495	17.6	2.790	32.8
<i>H4G5</i>	1.019	12.0	1.338	15.7	2.356	27.7
<i>H5G5</i>	0.947	11.1	1.285	15.1	2.233	26.3
<i>H6G3</i>	1.738	20.4	2.028	23.8	3.765	44.3
<i>H6G5</i>	0.819	9.6	1.466	17.2	2.285	26.9

Tabla IX. El porcentaje al final de la tabla se calculó usando como referencia el volumen promedio del NPV en grupo 1.

6.5.2 Registro conductual

Al analizar la CM de las hembras en este grupo, se observó que, luego de la cirugía, cuatro continuaron entrando al nido para amamantar, aunque con alteraciones en su conducta. En las cuatro restantes se abatió el amamantamiento, a cada una de estas conejas se les proporcionaron diariamente críos provenientes de una madre sustituta, con la finalidad de continuar con el registro conductual hasta el día 15 post-parto.

En este grupo no fue posible determinar un vector poblacional, para describir la hora de sus amamantamientos, debido a que la mitad del grupo dejó de amamantar y a que en el resto de las hembras se alteró el número de amamantamientos en 24 horas. Sin embargo, para cada una de las hembras se obtuvo un vector individual, así como un ángulo, que describe la hora a la que ocurrieron los amamantamientos antes de la cirugía (Tabla III).

Al analizar los indicadores de bienestar se encontró que luego de la cirugía el consumo de agua (399.5 ± 221.1 ml.) no fue significativamente diferente a lo consumido por el grupo 1 ($P=0.08$) ó el grupo 2 ($P=0.22$) (Tabla IV).

El consumo de alimento mostró una tendencia similar. Luego de la lesión, las hembras en este grupo, no mostraron una diferencia significativa en el consumo de alimento (175.4 ± 143 gr.) comparado con las hembras del grupo 1 ($P=0.1$) y el grupo 2 (0.55) (Tabla V).

El pesaje de las hembras reveló que, al final del experimento, obtuvieron una ganancia de peso de 0.4 ± 0.17 Kg. con respecto a su peso inicial (Tabla VI).

Debido a la variabilidad encontrada entre las hembras, como respuesta a la lesión bilateral del NPV, a continuación se describen con detalle las características de la conducta en cada una de las hembras lesionadas bilateralmente.

Durante los primeros ocho días de lactancia, la hembra H9G2 entró a amamantar a su camada una vez al día (Fig. 30-C) de manera irregular [ángulo de 112.39° (7:29 hrs), $\rho = 0.34$ y $p > 0.05$] (Tabla III). Los amamantamientos tuvieron una duración promedio de 3.45 ± 0.31 min. y el 63.6% ocurrieron durante las horas de oscuridad (Tablas I y II). Luego de la cirugía, el análisis histológico reveló que recibió un daño parcial, en ambos lados del NPV, con un volumen total de $3.14 \times 10^8 \mu\text{m}^3$ (Izquierda $2.43 \times 10^8 \mu\text{m}^3$; Derecha $0.70 \times 10^8 \mu\text{m}^3$), equivalente a una lesión del 37% del NPV (Fig. 30-A y Tabla IX). Luego de la cirugía incrementó considerablemente el número de amamantamientos por día (Fig. 30-C). La duración promedio de los amamantamientos, durante la lactancia post- lesión, fue de 3.11 ± 0.04 min. y ocurrieron con una nocturnidad del 27.2% (Tablas I y II).

Durante los primeros ocho días de lactancia, la hembra H3G4 entró a amamantar a su camada una vez al día (Fig. 31-C) con periodicidad circadiana [ángulo de 109.88° (7:19 hrs), $\rho = 0.72$ y $p < 0.05$] (Tabla III). Los amamantamientos tuvieron una duración promedio de 3.16 ± 0.06 min. y el 37.7% ocurrieron durante las horas de oscuridad (Tablas I y II). Luego de la cirugía, el análisis histológico reveló que recibió un daño parcial, en ambos lados del NPV, con un volumen total de $1.9 \times 10^8 \mu\text{m}^3$ (Izquierda $1.32 \times 10^8 \mu\text{m}^3$; Derecha $0.58 \times 10^8 \mu\text{m}^3$), equivalente a una lesión del 22.4% del NPV (Fig. 30-A y Tabla IX). Luego de la cirugía, incrementó considerablemente el número de amamantamientos por día (Fig. 31-C). La duración promedio de los amamantamientos, durante la lactancia post-lesión, fue de 3.37 ± 0.20 min. y ocurrieron con una nocturnidad del 57.1% (Tablas I y II).

Figura 30. Ubicación de la lesión y actograma de la hembra H9G2

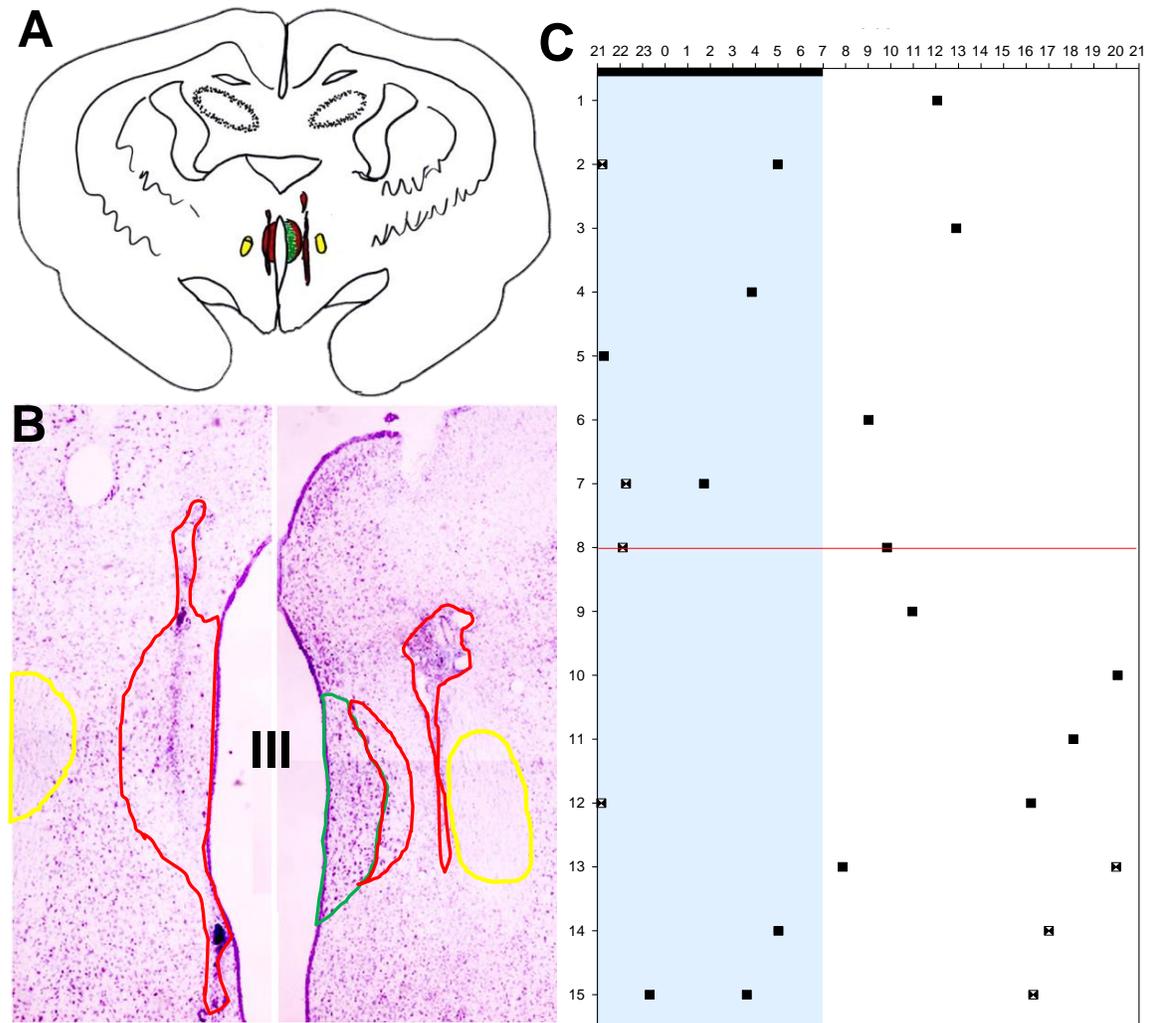


Figura 30. Ubicación de la lesión en la hembra H9G2. (A) Esquema representativo del plano de la lesión (P-1.5). (B) Microfotografía (40X) del área lesionada. Rojo: delimitación de la lesión; Verde: NPV; Amarillo: Fornix. (C) Actograma de amamantamiento. Eje Y días; eje X horas. Cada cuadro representa un evento de amamantamiento, la línea roja indica el día de la cirugía y la marca de agua señala el cambio de fase luz-oscuridad (14-10).

Figura 31. Ubicación de la lesión y actograma de la hembra H3G4

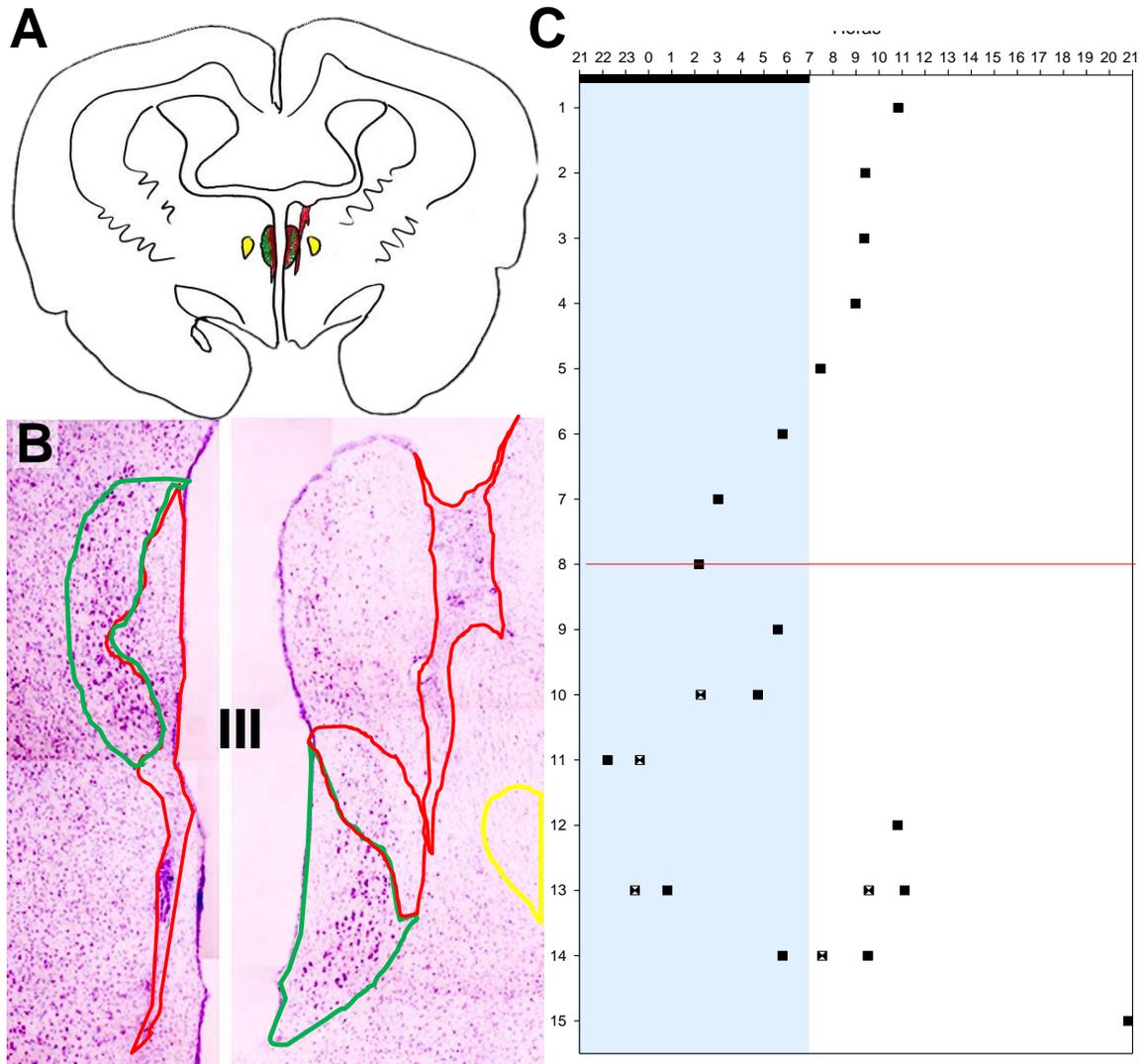


Figura 31. Ubicación de la lesión en la hembra H3G4. (A) Esquema representativo del plano de la lesión (P-1.0). (B) Microfotografía (40X) del área lesionada. Rojo: delimitación de la lesión; Verde: NPV; Amarillo: Fornix. (C) Actograma de amamantamiento. Eje Y días; eje X horas. Cada cuadro representa un evento de amamantamiento, la línea roja indica el día de la cirugía y la marca de agua señala el cambio de fase luz-oscuridad (14-10).

Durante los primeros ocho días de lactancia, la hembra H3G5 entró a amamantar a su camada una vez al día (Fig. 32-C) con periodicidad circadiana [ángulo de 92.87° (6:11 am), $\rho = 0.87$ y $p < 0.001$] (Tabla III). Los amamantamientos tuvieron una duración promedio de 3.47 ± 0.07 min. y el 42.8% ocurrieron durante las horas de oscuridad (Tablas I y II). Luego de la cirugía, el análisis histológico reveló que recibió un daño parcial, en ambos lados del NPV, con un volumen total de $3.07 \times 10^8 \mu\text{m}^3$ (Izquierda $1.49 \times 10^8 \mu\text{m}^3$; Derecha $1.57 \times 10^8 \mu\text{m}^3$), equivalente a una lesión del 36.1% del NPV (Fig. 32-A y Tabla IX). Luego de la cirugía, la hembra dejó de amamantar a su camada. Sin embargo, el día 14 de lactancia varios críos lograron salir del nido maternal y asirse a los pezones de la madre, provocando que adoptara la postura de sifosis por varios minutos (4.26 min). En cuanto a los indicadores de bienestar, esta hembra no consumió agua ni alimento durante el día posterior a la cirugía, sin embargo, el consumo se reestableció para el día 15. Mientras que al final de experimento obtuvo una pérdida de peso de 0.01Kg con respecto a su peso inicial (Tabla VI).

Durante los primeros ocho días de lactancia, la hembra H4G5 entró a amamantar a su camada una vez al día (Fig. 33-C) de manera irregular [ángulo de 65.55° (4:22 am), $\rho = 0.5$ y $p > 0.05$] (Tabla III). Los amamantamientos tuvieron una duración promedio de 5.29 ± 0.36 min. y el 42.8% ocurrieron durante las horas de oscuridad (Tablas I y II). Luego de la cirugía, el análisis histológico reveló que recibió un daño parcial, en ambos lados del NPV, con un volumen total de $2.35 \times 10^8 \mu\text{m}^3$ (Izquierda $1.01 \times 10^8 \mu\text{m}^3$; Derecha $1.33 \times 10^8 \mu\text{m}^3$), equivalente a una lesión del 27.7% del NPV (Fig. 32-A y Tabla IX). Luego de la cirugía el comportamiento maternal fue abolido: la hembra dejó de entrar al nido para amamantar (Fig. 33-C). En cuanto a los indicadores de bienestar, esta hembra no consumió alimento luego de la cirugía y posteriormente el consumo de alimento se mantuvo bajo hasta el día 15. Por su parte el consumo de agua no se vio afectado. Al final de experimento obtuvo una ganancia de peso de 0.02Kg con respecto a su peso inicial (Tabla VI).

Figura 32. Ubicación de la lesión y actograma en la hembra H3G5

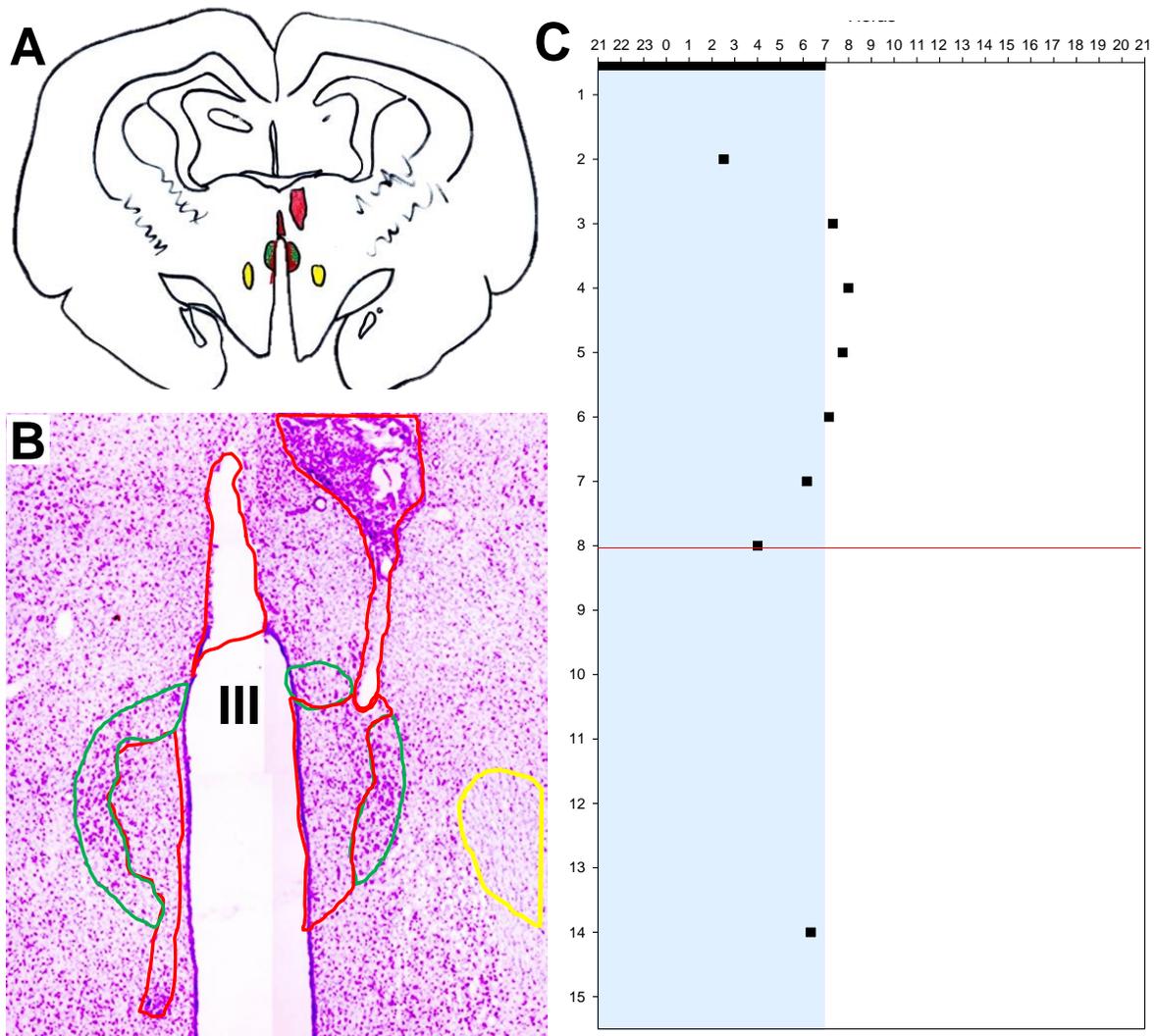


Figura 32. Ubicación de la lesión en la hembra H3G5. (A) Esquema representativo del plano de la lesión (P-2.0). (B) Microfotografía (40X) del área lesionada. Rojo: delimitación de la lesión; Verde: NPV; Amarillo: Fornix. (C) Actograma de amamantamiento. Eje Y días; eje X horas. Cada cuadro representa un evento de amamantamiento, la línea roja indica el día de la cirugía y la marca de agua señala el cambio de fase luz-oscuridad (14-10).

Figura 33. Ubicación de la lesión y actograma en la hembra H4G5

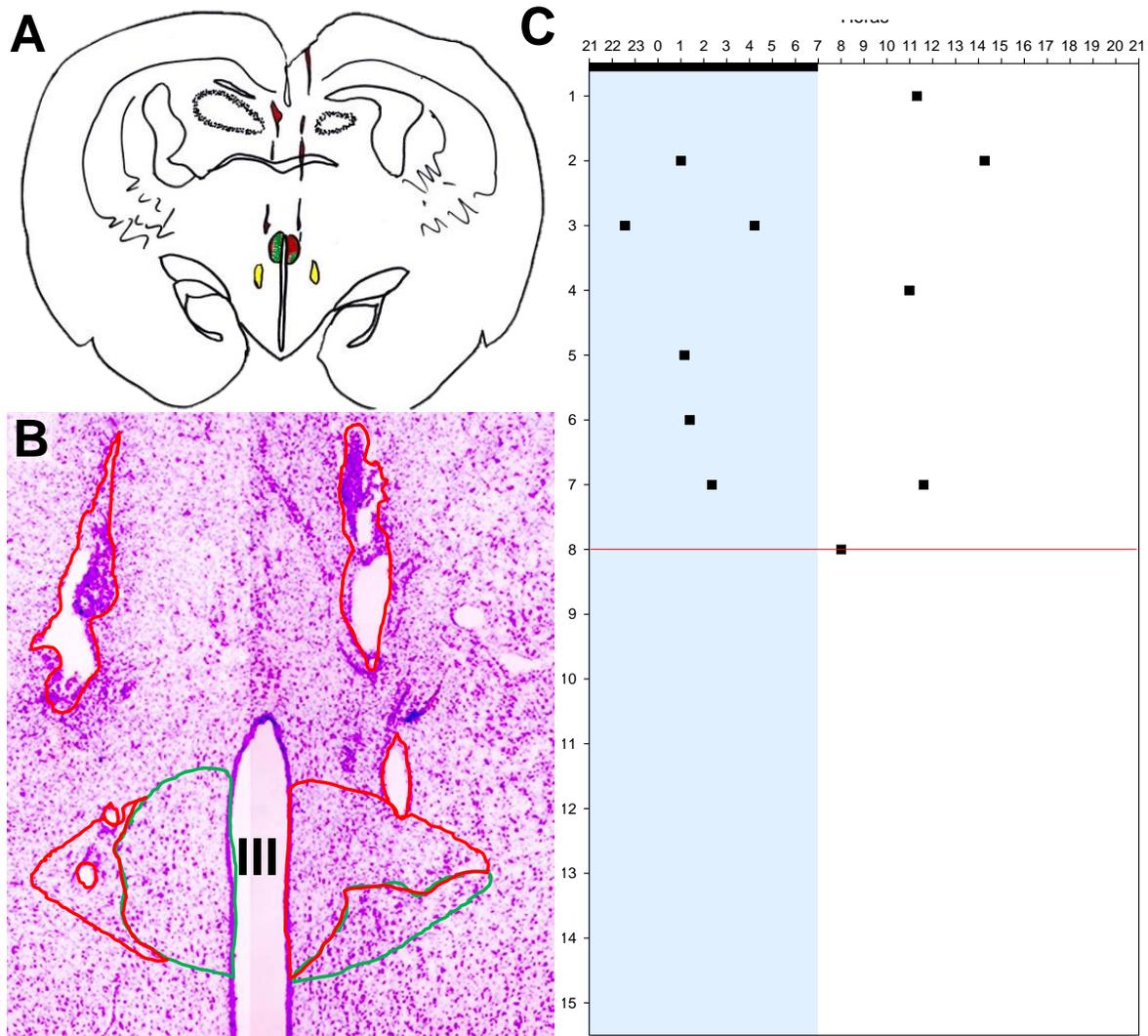


Figura 33. Ubicación de la lesión en la hembra H4G5. (A) Esquema representativo del plano de la lesión (P-2.5). (B) Microfotografía (40X) del área lesionada. Rojo: delimitación de la lesión; Verde: NPV; Amarillo: Fornix. (C) Actograma de amamantamiento. Eje Y días; eje X horas. Cada cuadro representa un evento de amamantamiento, la línea roja indica el día de la cirugía y la marca de agua señala el cambio de fase luz-oscuridad (14-10).

Durante los primeros ocho días de lactancia, la hembra H4G4 entró a amamantar a su camada una vez al día (Fig. 34-C) con periodicidad circadiana [ángulo de 180.4° (12:01 hrs), $\rho = 0.63$ y $p < 0.05$] (Tabla III). Los amamantamientos tuvieron una duración promedio de 4.49 ± 0.09 min. y el 12.5% ocurrieron durante las horas de oscuridad (Tablas I y II). Luego de la cirugía, el análisis histológico reveló que recibió un daño parcial, en ambos lados del NPV, con un volumen total de $2.78 \times 10^8 \mu\text{m}^3$ (Izquierda $1.29 \times 10^8 \mu\text{m}^3$; Derecha $1.49 \times 10^8 \mu\text{m}^3$), equivalente a una lesión del 32.8% del NPV (Fig. 34 y Tabla IX).

Figura 34. Ubicación de la lesión en la hembra H4G4

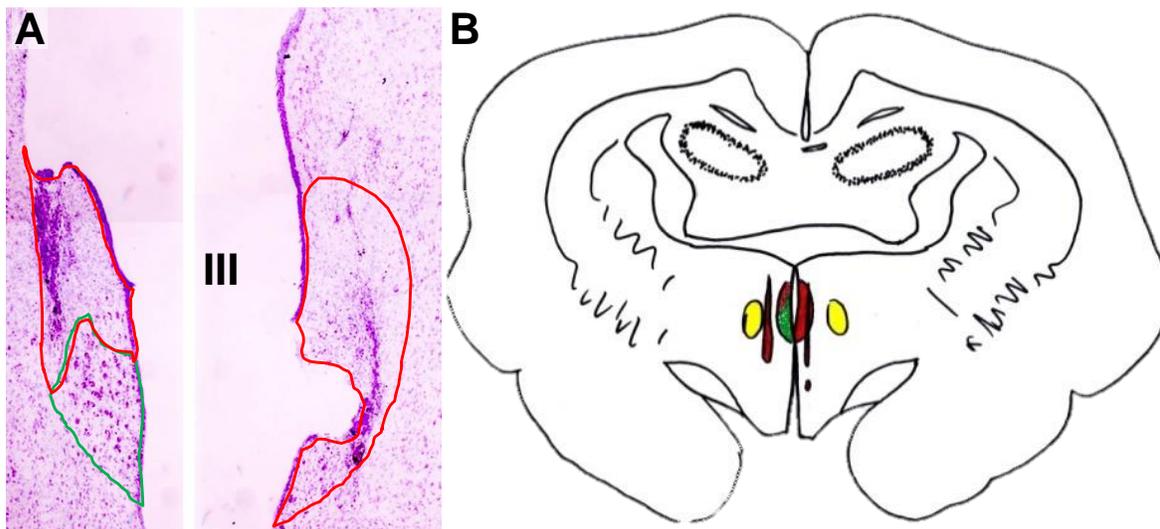


Figura 34. Ubicación de la lesión en la hembra H4G4. (A) Microfotografía (40X) del área lesionada. (B) Esquema representativo del plano de la lesión (P-1.0). Rojo: delimitación de la lesión; Verde: NPV; Amarillo: Fornix.

Luego de la cirugía, se observó que la coneja continuó amamantando (Fig. 34-C) con periodicidad circadiana [ángulo de 180.4° (12:01 hrs), $\rho = 0.63$ y $p = 0.041$] (Tabla III). Esos amamantamientos tuvieron una duración promedio de 4.53 ± 0.20 min. con un 62.5% de nocturnidad (Tablas I y II). Sin embargo, adicionalmente realizó numerosas entradas sin amamantamiento (Fig. 34-D). Estas “falsas” entradas se caracterizaron por evitar activamente a los críos y por permanecer dentro sin adoptar la postura de amamantamiento. La duración promedio de las entradas falsas fue de 2.10 ± 0.39 min con un porcentaje de nocturnidad de 47.3%.

Debido a que esta hembra continuó desplegando amamantamientos con periodicidad circadiana, después de la cirugía, fue posible determinar un vector para los primeros 15 días de lactancia, el cual tiene un ángulo de 130° (equivalente a las 8:40 hrs) y una $\rho = 0.43$ con

una $p = 0.05$ (Fig. 34 y Tabla III). Estos amamantamientos tuvieron una duración de $4.51 \pm 0.45\text{min}$ con un porcentaje de nocturnidad de 37.5%.

Figura 34 (C y D). Actogramas de la hembra H4G4

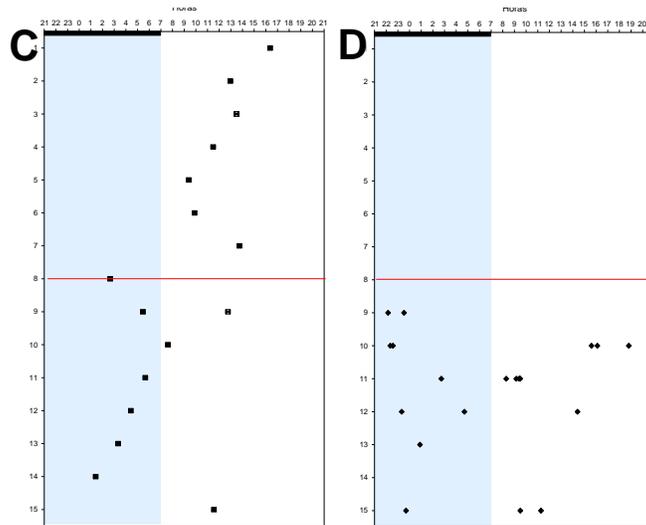


Figura 34. (C) Actograma de amamantamiento. (D) Actograma de entradas “falsas”. Eje Y días; eje X horas. Cada cuadro representa una entrada a la caja nido, la línea roja indica el día de la cirugía y la marca de agua señala el cambio de fase luz-oscuridad (14-10).

Figura 35. Análisis de Rayleigh para la hembra H4G4

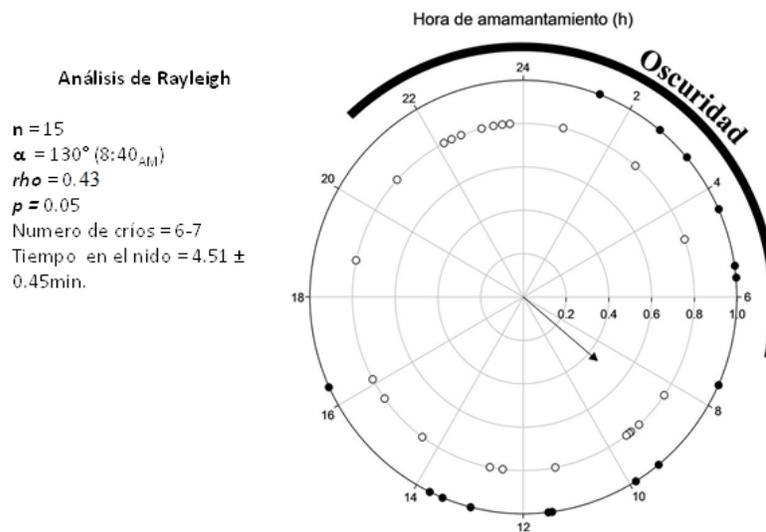


Figura 35. El vector, señalado con una flecha, indica la hora de amamantamiento para la hembra H4G4, durante los 15 días del experimento. Los puntos cerrados representan un evento de amamantamiento mientras que cada punto abierto indica una entrada “falsa”.

Durante los primeros ocho días de lactancia, la hembra H5G5 entró a amamantar a su camada una vez al día (Fig. 36-C) con periodicidad circadiana [ángulo de 137.7° (9:11 am), $\rho = 0.93$ y $p < 0.001$] (Tabla III). Los amamantamientos tuvieron una duración promedio de 2.59 ± 0.12 min. y el 100% ocurrió durante las horas de luz (Tablas I y II). Luego de la cirugía, el análisis histológico reveló que recibió un daño parcial, en ambos lados del NPV, con un volumen total de $2.23 \times 10^8 \mu\text{m}^3$ (Izquierda $0.94 \times 10^8 \mu\text{m}^3$; Derecha $1.28 \times 10^8 \mu\text{m}^3$), equivalente a una lesión del 26.3% del NPV (Fig. 32-A y Tabla IX). Luego de la cirugía esta hembra dejó de amamantar el noveno día de lactancia (Fig. 36-C). En cuanto a los indicadores de bienestar, esta hembra no consumió agua ni alimento después de la cirugía. Los días posteriores, el consumo de agua se recuperó, a diferencia del consumo de alimento, que se mantuvo bajo hasta el día 15. Mientras que al final de experimento no ganó ni perdió peso, con respecto a su peso al inicio del experimento (Tabla VI).

Durante los primeros ocho días de lactancia, la hembra H6G3 entró a amamantar a su camada una vez al día (Fig. 37-C) con periodicidad circadiana [ángulo de 107.19° (7:08 hrs), $\rho = 0.93$ y $p < 0.001$] (Tabla III). Los amamantamientos tuvieron una duración promedio de 2.22 ± 0.45 min. y el 37.5% ocurrieron durante las horas de oscuridad (Tablas I y II). Luego de la cirugía, el análisis histológico reveló que recibió un daño parcial, en ambos lados del NPV, con un volumen total de $3.76 \times 10^8 \mu\text{m}^3$ (Izquierda $1.73 \times 10^8 \mu\text{m}^3$; Derecha $2.02 \times 10^8 \mu\text{m}^3$), equivalente a una lesión del 44.3% del NPV (Fig. 36-A y Tabla IX). Luego de la cirugía, la hembra continuó entrando al nido, sin embargo, dejó de amamantar (Fig. 37-D). Estas “falsas” entradas al nido, se caracterizaron por su larga duración ($20.53 \text{ min} \pm 1 \text{ h } 9 \text{ min}$) así como por un completo desinterés hacia los críos. Durante ese tiempo en el nido, la hembra entró a consumir la paja y/o dormir, pero nunca adoptó una postura de amamantamiento.

Figura 36. Ubicación de la lesión y actograma de la hembra H5G5

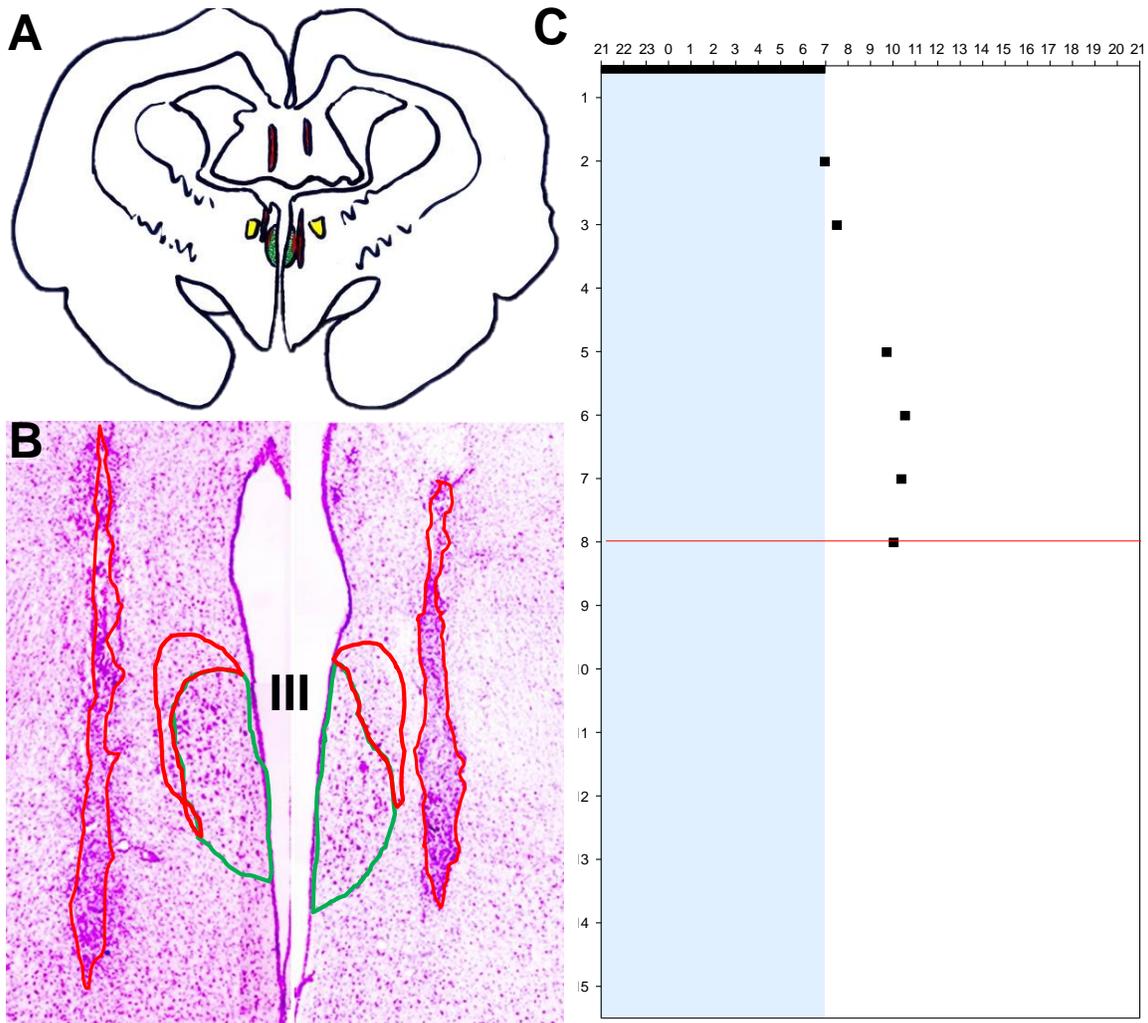


Figura 36. Ubicación de la lesión en la hembra H5G5. (A) Esquema representativo del plano de la lesión (P-0.5). (B) Microfotografía (40X) del área lesionada. Rojo: delimitación de la lesión; Verde: NPV; Amarillo: Fornix. (C) Actograma de amamantamiento. Eje Y días; eje X horas. Cada cuadro representa un evento de amamantamiento, la línea roja indica el día de la cirugía y la marca de agua señala el cambio de fase luz-oscuridad (14-10).

Figura 37. Ubicación de la lesión y actograma de la hembra H6G3

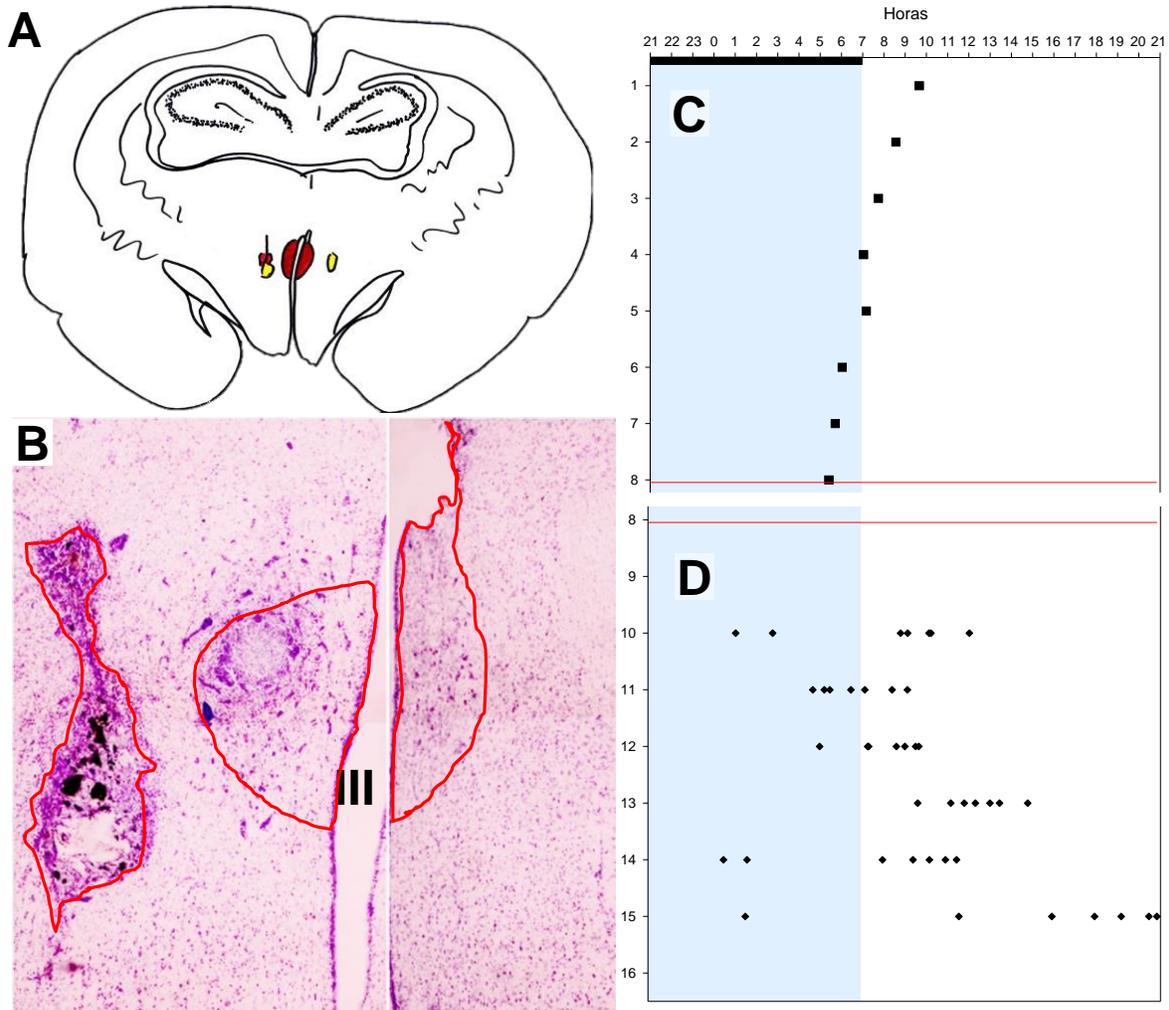


Figura 37. Ubicación de la lesión en la hembra H6G3. (A) Esquema representativo del plano de la lesión (B) Microfotografía (40X) del área lesionada. (P-1.5). Rojo: delimitación de la lesión; Amarillo: Fornix. (C) Actograma de amamantamiento, cada cuadro representa un evento de amamantamiento, (D) Actograma de entradas falsas, cada rombo representa una entrada a la caja nido. Eje Y días; eje X horas. La línea roja indica el día de la cirugía y la marca de agua señala el cambio de fase luz-oscuridad (14-10).

Durante los primeros ocho días de lactancia, la hembra H6G5 entró a amamantar a su camada una vez al día (Fig. 38-C) con periodicidad circadiana [ángulo de 349.94° (23:19 hrs), $\rho = 0.7$ y $p < 0.05$] (Tabla III). Los amamantamientos tuvieron una duración promedio de 3.47 ± 0.10 min. y el 85.7% ocurrieron durante las horas de oscuridad (Tablas I y II). Luego de la cirugía, el análisis histológico reveló que recibió un daño parcial, en ambos lados del NPV, con un volumen total de $2.28 \times 10^8 \mu\text{m}^3$ (Izquierda $0.81 \times 10^8 \mu\text{m}^3$; Derecha $1.46 \times 10^8 \mu\text{m}^3$), equivalente a una lesión del 26.9% del NPV (Fig. 37-A y Tabla IX).

Figura 38. Ubicación de la lesión y actograma de la hembra H6G5

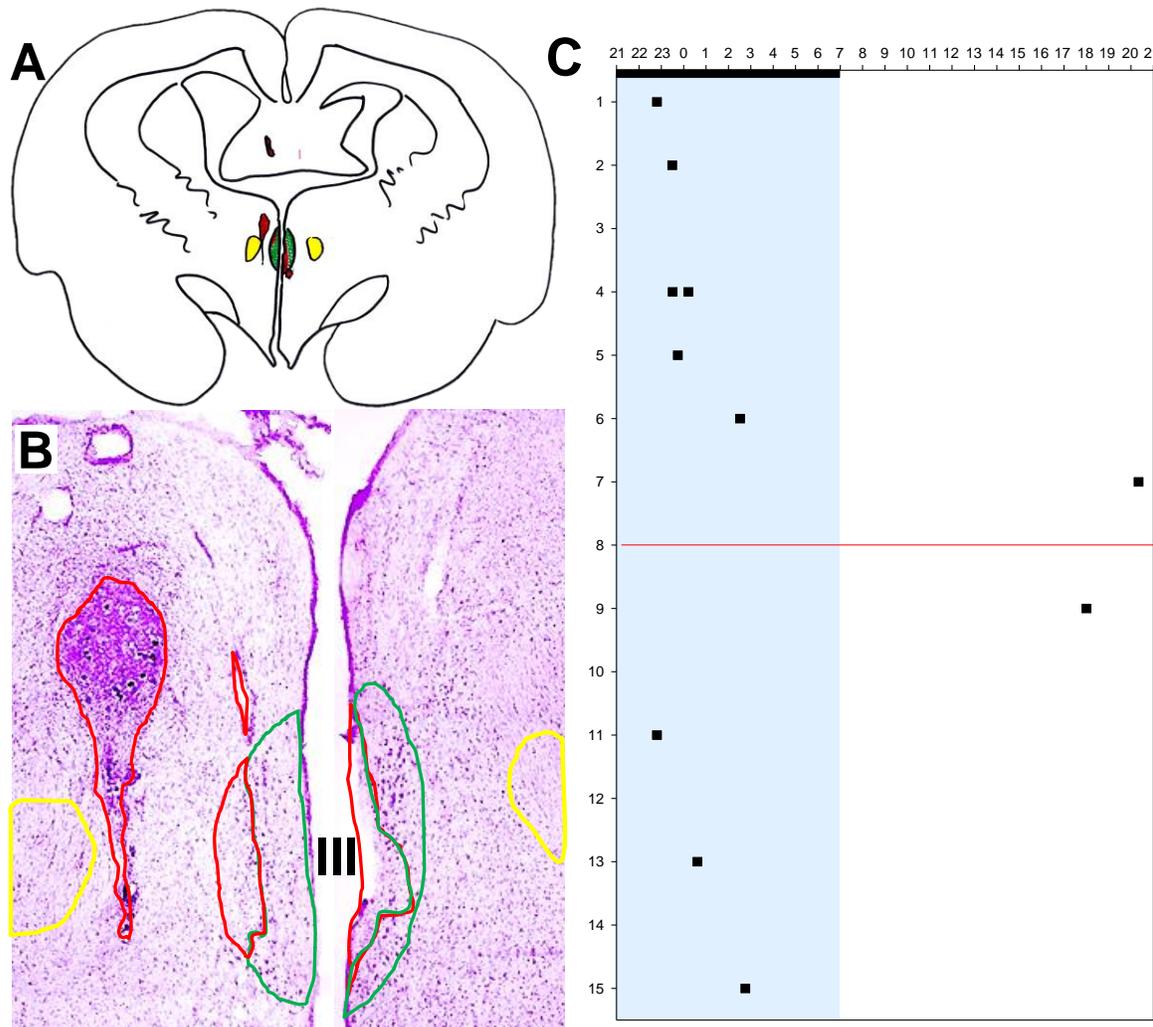


Figura 38. Ubicación de la lesión en la hembra H6G5. (A) Microfotografía (40X) del área lesionada. (B) Esquema representativo del plano de la lesión (P-1.0). Rojo: delimitación de la lesión; Verde: NPV; Amarillo: Fornix. (C) Actograma de amamantamiento. Eje Y días; eje X horas. Cada cuadro representa un evento de amamantamiento, la línea roja indica el día de la cirugía y la marca de agua señala el cambio de fase luz-oscuridad (14-10).

Luego de la cirugía incremento el intervalo entre los amamantamientos, con latencias cercanas a las 48hrs (Fig. 38-C). La duración promedio de sus amamantamientos fue de 4.11 ± 0.53 min. con un porcentaje de nocturnidad de 75% (Tablas I y II). Debido a que esta hembra continuó amamantando a su camada una vez al día, después de la cirugía, fue posible determinar un vector para los primeros 15 días de lactancia, el cual tiene un ángulo de 349.8° (equivalente a las 23:19 hrs) y una $\rho = 0.63$ con una $p = 0.011$ (Fig. 39). Estos amamantamientos tuvieron una duración de 3.57 ± 1.06 min con un porcentaje de nocturnidad de 81.8% (Tablas I y II).

Fig 39. Grafica de Rayleigh para la hembra H6G5

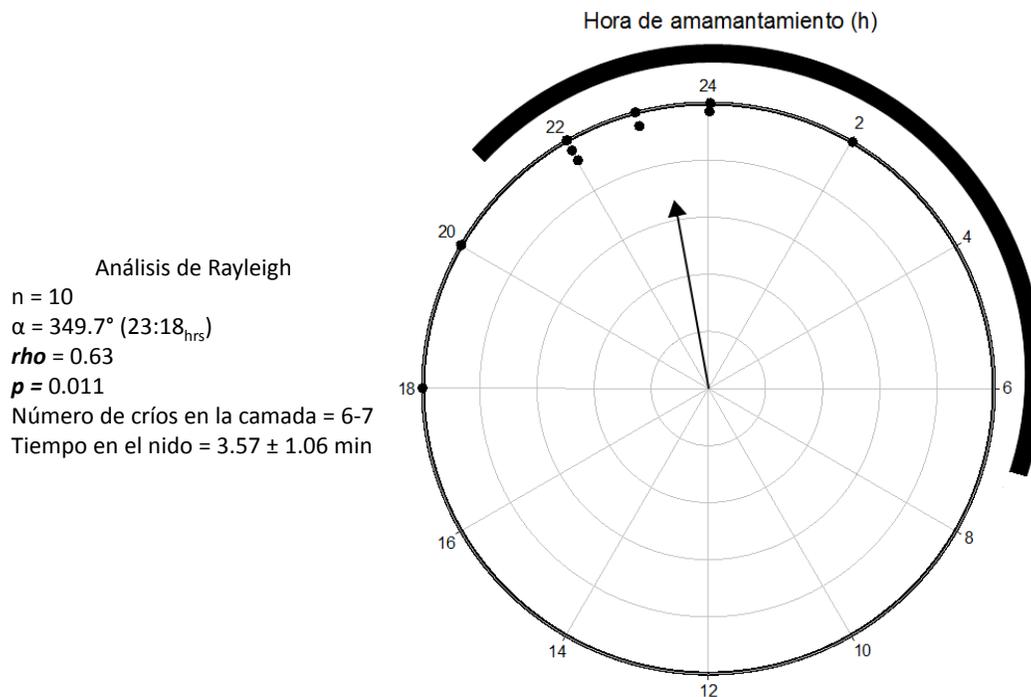


Figura 39. El vector, señalado con una flecha, indica la hora de amamantamiento para la hembra H6G5. Cada punto indica la hora a la que ocurrió cada amamantamiento.

Tabla X. Ubicación y volumen de la lesión

Hembra	Localización de la lesión			Volumen x 10 ⁸ (µm ³)					
	Fuera del NPV	En el NPV		NPV		Lesión		Total	
		Unilateral	Bilateral	Izquierdo	Derecho	Izquierdo	Derecho		
2302	x			3.846	4.046	-	-	-	
2314	x			3.999	4.032	-	-	-	
H1G2	x			4.479	4.313	-	-	-	
H2G4	x			4.794	4.256	-	-	-	
H5G3	x			3.642	3.608	-	-	-	
H7G2	x			4.584	4.560	-	-	-	
H8G5	x			3.942	3.946	-	-	-	
H9G3	x			4.865	5.113	-	-	-	
2313		x		-	4.565	2.290	-	2.290	
H10G2		x		-	4.665	1.671	-	1.671	
H1G5		x		4.379	-	-	0.914	0.914	
H2G5		x		-	3.594	2.109	-	2.109	
H8G2		x		-	4.394	1.500	-	1.500	
H9G2			x	-	-	2.437	0.709	3.147	
H3G4			x	-	-	1.328	0.581	1.909	
H3G5			x	-	-	1.495	1.576	3.070	
H4G4			x	-	-	1.295	1.495	2.790	
H4G5			x	-	-	1.019	1.338	2.356	
H5G5			x	-	-	0.947	1.285	2.233	
H6G3			x	-	-	1.738	2.028	3.765	
H6G5			x	-	-	0.819	1.466	2.285	

Tabla XI. Número de amamantamientos

		Hembra	Pre-cirugía							Post-cirugía							16		
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		15	
Lesión	Fuera del NPV	2302	1	1	1	1	1	2	1	1	2	1	1	1	1	1	1		
		2314	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	1	1	1	1	1	1	
		H1G2	1	1	2	-	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	
		H2G4	2	X	-	1	1	1	1	1	2	-	1	1	1	1	1	1	
		H5G3	-	1	1	1	X	1	2	-	1	1	1	1	1	1	1	1	
		H7G2	1	1	1	-	1	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	
		H8G5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-	1	1	-	1	1	1	
		H9G3	-	1	2	1	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	
	Unilateral	2313	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	
		H10G2	1	1	1	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
		H1G5	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	3	3	3	2	4	1	
		H2G5	1	1	1	1	1	1	1	1	-	1	2	-	1	1	X	1	
		H8G2	2	1	-	1	1	2	1	2	3	1	2	-	2	1	1	1	1
	Bilateral	H9G2	1	2	1	1	1	1	2	2	1	1	1	1	2	2	3	1	
		H3G4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	4	3	1	1	
		H3G5	-	1	1	1	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	
		H4G4	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	
		H4G5	1	2	2	1	1	1	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	
		H5G5	-	1	1	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		H6G3	1	1	1	1	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	
		H6G5	1	1	-	2	1	1	1	-	1	-	1	-	1	-	1	1	

Tabla XI. Número de amamantamientos que realizó cada una de las hembras, durante los días del experimento. La (X) indica fallo en el sistema de video; (-) No entro a amamantar.

7 DISCUSIÓN

7.1 Efectos de la lesión del NPV sobre la CM

El principal objetivo de esta tesis fue evaluar la participación del NPV sobre dos aspectos fundamentales de la conducta maternal en la coneja: la periodicidad circadiana del amamantamiento y la duración del tiempo en el nido. Para cumplir con este objetivo, comparamos por 15 días la conducta maternal de conejas lactantes, específicamente la hora y la duración de cada evento de amamantamiento, antes y después de ser lesionadas químicamente en el NPV.

Al analizar la conducta maternal de todas las hembras, durante los primeros días de lactancia (pre-cirugía), en busca de un patrón circadiano en los amamantamientos, se encontró por medio del análisis de Rayleigh, que 15 de las 21 conejas mostraban una ritmicidad circadiana en sus entradas al nido. Mientras que el análisis poblacional para las hembras ($n=15$), bajo estas condiciones experimentales (Fotoperiodo luz/oscuridad 14h:10h, 6-8 críos en la camada, temperatura natural y ruido habitual), mostró que amamantaron con periodicidad circadiana ($\text{ángulo} = 102^\circ$, $\rho = 0.60$, $p = 0.05$) y con una duración promedio dentro del nido de 4.06 ± 2.16 min. Estas observaciones confirman los resultados encontrados por otros investigadores (Jilge, 1993 y 1995; Zarrow *et al.*, 1965; González-Mariscal *et al.*, 1994; Hoy y Selzer, 2000; Lincoln, 1974), quienes señalan que las hembras lactantes entran al nido maternal una vez cada 24 horas para alimentar a su camada, al igual que en el presente estudio. Sin embargo, difiere del vector reportado por González-Mariscal *et al* (2013) ($\text{ángulo} = 58^\circ$; hora 3:51h; $\rho = 0.78$; $p < 0.001$). Las diferencias entre ambos resultados, probablemente se deban al tamaño de la muestra, ya que el análisis de Rayleigh es sensible al número de datos utilizados para estimar el ángulo. En consecuencia, al usar sólo siete días para analizar cada hembra, y no 15 como en el trabajo del 2013, el vector resultante presenta un ángulo/hora diferente al reportado anteriormente.

Después de la cirugía, el análisis histológico de los cerebros reveló que el AK actuó selectivamente sin dañar las fibras de paso. Provocó una marcada pérdida de neuronas parvocelulares, mientras que las neuronas magnocelulares fueron afectadas en menor medida, al igual que en reportes previos (Giovenardi *et al.*, 1998; Olazabal y Ferreira, 1997). Lo anterior sugiere que las secuelas conductuales producidas por la lesión con AK se deben

principalmente a la pérdida de neuronas parvocelulares. Esto permite a las hembras lesionadas en el NPV adoptar una postura de amamantamiento y permite la eyección de leche, al mantener parcialmente la síntesis de OT en las neuronas magnocelulares que proyectan hacia la neurohipófisis. Aun cuando algunos autores reportan una pérdida de peso en los críos de las madres lesionadas en el NPV, probablemente por la interrupción del reflejo de eyección láctea (Olazabal y Ferreira, 1997), otros trabajos respaldan esta aseveración (Giovenardi *et al.*, 1997). Sin embargo, es importante considerar que ningún trabajo, independientemente de las características de la lesión del NPV, ha reportado un completo abatimiento de la eyección láctea (Consiglio y Lucion, 1996; Insel y Harbaugh, 1985; Numan y Corodimas, 1985).

Las hembras lesionadas fuera del NPV (grupo 1) no mostraron cambios significativos en su CM post-parto, es decir, continuaron amamantando a su camada dentro del nido con periodicidad circadiana, de manera similar a lo acontecido antes de la cirugía. Al final del experimento las ocho hembras continuaron entrando al nido para amamantar a sus críos. Estos amamantamientos tuvieron una duración promedio de 3.45 ± 1.22 min y ocurrieron con un 61.76% de nocturnidad (Tablas I y II), seis de ellas cumplieron con el criterio ($p < 0.05$) para el análisis de Rayleigh poblacional, y establecieron un vector con un ángulo de 71.92° (equivalente a las 4:47_{hrs}) y una $\rho = 0.63$ con una $p < 0.002$ (Tabla III). Probablemente, la diferencia entre este resultado y el vector reportado por González-Mariscal *et al* (2013), radica nuevamente en la cantidad de datos usados para el análisis, ya que en el trabajo anteriormente citado, el número de hembras en la población fue mayor ($n = 15$) al utilizado para obtener este vector ($n = 6$). Sin embargo, es muy importante reconocer que, pese a haber sido sometidas a un procedimiento experimental (altamente invasivo) las hembras no sólo continuaron amamantando individualmente con periodicidad circadiana sino que, además, poblacionalmente obtuvieron un vector significativo ($p < 0.002$) lo que indica claramente que mantienen una periodicidad en el amamantamiento.

La identificación de las lesiones de este grupo fue particularmente complicado, debido a que en algunas de las hembras las lesiones se situaron sobre fibras o en áreas del cerebro carentes de los receptores al AK. Sin embargo, se identificaron indirectamente por la trayectoria de la cánula y la acumulación de neuroglia alrededor del AK. Las lesiones se ubicaron en áreas como: la comisura anterior, el fornix, la fimbria del hipocampo, el área

hipotalámica anterior, el área dorsal hipotalámica, el área hipotalámica lateral, el núcleo periventricular del tálamo, el núcleo ventromedial del tálamo, el tracto mamilotalámico, el núcleo dorsomedial del hipotálamo, el área hipotalámica posterior, así como en el tercer ventrículo. Empero, en ninguno de estos casos el daño se reflejó en una alteración significativa de las conductas analizadas.

Luego de la cirugía las cinco hembras lesionadas unilateralmente en el NPV (grupo 2) continuaron amamantando a su camada dentro del nido hasta el final del experimento. Esos amamantamientos tuvieron una duración promedio de 3.46 ± 1.24 min, similar a la duración reportada por otros grupos de investigadores (Zarrow *et al.*, 1965; González-Mariscal *et al.*, 1994; Hoy y Selzer, 2000; Lincoln, 1974), lo que indica que en este grupo no se afectó ese componente de la CM.

Por otra parte, al analizar la periodicidad de los amamantamientos, se observó que una de las hembras en este grupo (H1G5), mostró una alteración en la periodicidad de los amamantamientos, al incrementar considerablemente el número de amamantamientos llegando a amamantar hasta en cuatro ocasiones en 24 horas (Fig. 26-C); la duración de esos amamantamientos fue de 2.43 ± 0.06 min (Tabla II). El análisis histológico reveló que una de las cánulas se ubicó dentro del tercer ventrículo mientras que la otra, causó un daño en la cara externa del lado derecho del NPV, con un volumen de $0.914 \times 10^8 \mu\text{m}^3$ (Fig. 26-A y Tabla VIII). Sin embargo, a pesar de que otras hembras presentan lesiones ubicadas en el tercer ventrículo, sin mostrar cambios significativos en su CM, es difícil determinar si la alteración conductual observada en esta hembra se debió exclusivamente al daño ocasionado en el NPV.

Por último, en el tercer grupo (n=8) se encuentran las hembras que presentaron una lesión asimétrica en ambos lados del NPV, las lesiones se localizaron principalmente entre los planos (P-1 y P-2). Al analizar la conducta de las hembras luego de a cirugía se observó, que no había una respuesta conductual homogénea como resultado de la lesión bilateral del NPV. Tres de las hembras en este grupo dejaron de amamantar a su camada, una continuó entrando al nido sin amamantar a los críos (entradas falsas), tres modificaron la periodicidad de los amamantamientos y otra más añadió múltiples entradas “falsas” además de sus amamantamientos.

Cuatro hembras dejaron de amamantar por completo. Sin embargo, dos de ellas mostraron algunos elementos de la CM post-parto. La hembra H3G5 evitó activamente el contacto con los críos, sin embargo, en el día 14 permitió un episodio de amamantamiento con una duración de 4.26 min, luego de ser alcanzada por al menos cuatro críos fuera del nido, lo que indica que persiste la capacidad para adoptar la postura de amamantamiento. Por otro lado, la hembra H6G3 continuó entrando a la caja nido que contenía a los críos, pero sin adoptar la postura de sifosis. Esto último sugiere que, a pesar de la lesión del NPV, persiste la motivación para acercarse a los críos, pero no la capacidad de culminar la acción, debido a que dentro del nido no interaccionó con los críos. Estos resultados coinciden con, los reportes realizados por Insel y Harbaugh (1989), que encontraron que algunas de las ratas lesionadas en el NPV el día cuatro post-parto, durante la prueba de acarreo, fueron capaces de acercarse a los críos y sujetarlos, pero no de depositarlos correctamente dentro del nido, dejándolos dispersos en el camino.

En el presente estudio se encontró que en tres hembras (H9G2, H3G4, H6G5) la lesión bilateral del NPV modificó la frecuencia de amamantamiento en las conejas, al aumentar o disminuir el intervalo entre cada episodio de succión. Lo anterior sugiere una interrupción en la integración de las señales provenientes de la succión, pues se sabe que, el estímulo de la succión de una camada (de 5 a 8 críos) sincroniza la temperatura (Jilge *et al.*, 2001) y la locomoción (Meza *et al.*, 2008) de las conejas e incrementa, en el NPV, el número de neuronas c-FOS-ir (GonzálezMariscal *et al.*, 2009). Por otra parte, cuatro horas después, este mismo estímulo causa un incremento en la expresión de la proteína *PER1* en las células oxitocinérgicas (Meza *et al.*, 2008) en el NPV.

El NPV está altamente interconectado con el NSQ (Vrang, 1995). Se sabe que en la rata, al lesionar electrolíticamente el NPV, los niveles de melatonina en la glándula pineal, así como su principal metabolito (6-hydroxymelatonina), disminuyen cerca del 90% durante la noche, en comparación con ratas control (Klein *et al.*, 1983). Mientras que, la misma lesión en el hámster macho, inhibe la regresión gonadal inducida por un fotoperiodo luz/oscuridad 6h:18h, sin afectar el ritmo de actividad locomotora (Pickard y Turek, 1983), lo que sugiere que el NPV participa como una estación de relevo sináptico del NSQ.

Por otra parte, se sabe que el NPV requiere de señales provenientes del NSQ para generar un ritmo, es decir, es incapaz de generar y mantener un ritmo auto-sostenido, como

se ha demostrado por estudios *in vitro* (Tousson y Meissl, 2004). Estudios *in vitro*, realizados en cultivos aislados, para analizar la expresión del gen *Per1* en diferentes áreas de tejido neural, provenientes de ratas portadoras del trans-gen *Per1*-liciferasa, mostraron que el NPV exhibe un ritmo con mayor expresión de *PER1* durante la noche (Abe *et al.*, 2002). Mientras que otros estudios, realizados en ratones transgénicos, portadores de una proteína fluorescente en el gen *Per1*, demostraron que en el NPV, la proteína *PER1* exhibe ritmos diurnos, con una mayor expresión de *PER1* durante el día en comparación de la noche (Kriegsfeld *et al.*, 2003), lo que sugiere que el NSQ comunica información al NPV, a través de sus aferencias, para regular sus oscilaciones. Evidencia reciente demuestra que diversas áreas del cerebro expresan la proteína *PER1*, en poblaciones celulares neuroendocrinas (Meza *et al.*, 2008 y 2011), incluyendo las neuronas oxitocinérgicas del NPV y que además, el estímulo diario de la succión de más de cinco críos, es suficiente para sincronizar la actividad locomotora y la expresión de *PER1* en las neuronas oxitocinérgicas del NPV (Meza *et al.*, 2008). Por lo tanto, en el presente trabajo, la lesión del NPV estaría interrumpiendo la integración de las señales provenientes del NSQ y de la succión al, al NPV, causando así, la alteración de la periodicidad circadiana del amamantamiento.

Sabemos que en el NPV se sintetizan principalmente OT y AVP y que durante la lactancia, en la coneja se incrementan el número y el tamaño de las neuronas inmunoreactivas a OT y AVP dentro del NPV (Caba *et al.*, 1996). Ambos péptidos han sido estudiados en relación a su participación en la CM (Fahrbach *et al.*, 1984; Fahrbach *et al.*, 1985; Leengood *et al.*, 1987; Pedersen *et al.*, 1985; Pedersen *et al.*, 1994; Pedersen y Prange 1979; Yu G-Z *et al.*, 1996). Sin embargo, las lesiones del NPV sólo han permitido sugerir que esta estructura participa en la iniciación de la CM, más no en su manutención (Consiglio y Lucion, 1996; Insel y Harbaugh, 1989; Numan y Corodimas, 1985; Olazabal y Ferreira, 1997). El presente trabajo muestra por primera vez que el NPV participa en la regulación de la CM durante la lactancia, al afectar uno de los componentes analizados, y el más característico de la coneja, la periodicidad circadiana del amamantamiento.

Se encontró que el 100% de las hembras lesionadas fuera del NPV retuvo la motivación para entrar al nido, y amamantar a su camada, una sola vez en 24hrs. Mientras del 100% de las hembras lesionadas unilateralmente, que continuaron amamantando a su camada, solamente el 20% incremento la frecuencia de los amamantamientos.

Por último, de las ocho hembras lesionadas bilateralmente en el NPV, el 50% continuó entrando a la caja nido para alimentar a sus crías, aunque lo hicieron con alteraciones en la frecuencia de los amamantamientos. Mientras que en el 50% se perdió la motivación de entrar al nido para amamantar.

Es posible que la AVP y la OT participen como parte del mecanismo regulador del reloj circadiano. Se sabe que el nivel de AVP en el líquido cerebroespinal (LCE) exhibe un ritmo endógeno (Wim *et al.*, 1982) y que esta misma hormona aparentemente facilita el efecto sincronizador de la luz, sobre diferentes ritmos circadianos (temperatura corporal, frecuencia cardíaca, actividad locomotora) (Murphy *et al.*, 1998).

A diferencia de la AVP, los niveles de OT dentro del LCE no cambian significativamente durante el transcurso del día (Wim *et al.*, 1982), independientemente de la fase de luz/oscuridad (Roizen *et al.*, 2007). Sin embargo la evidencia sugiere que los niveles de OT se incrementan durante el parto (Burbach, 2006) y la lactancia (en la succión) (Fuchs y Wagner, 1963; Fuchs *et al.*, 1984). Asimismo, Roizen *et al.* (2007) encontraron que, al estimar la ocurrencia del parto en ratones, mediante el análisis de Rayleigh los animales con un knockout al gen de OT sólo exhibieron periodicidad circadiana en los partos ($p < 0.01$), cuando se mantuvo el fotoperiodo inicial. Por el contrario, los sujetos sometidos a un adelanto de 6 horas en la fase luz/oscuridad, parieron de forma aleatoria durante el día ($\rho = 0.56$, $p = 0.08$); lo mismo se encontró cuando fueron sometidos a un retraso de fase ($\rho = 0.20$, $p = 0.68$). A diferencia de los sujetos control, quienes continuaron expresando vectores significativos (adelanto de fase: $p < 0.01$; retraso de fase: $p < 0.05$; sin cambio: $p < 0.001$) independientemente de la condición del fotoperiodo.

Es importante notar que la CM de la rata y la coneja, difieren considerablemente, al igual que el criterio empleado para determinar la maternalidad de un individuo. Una coneja considerada “maternal” no sólo debe amamantar a su camada, sino que además, debe hacerlo con periodicidad circadiana y una duración de entre tres y cinco minutos. Por el contrario, en la rata comúnmente se evalúa la presencia y/o la consumación de algunos patrones conductuales (acarrear, agrupar, acicalar), que no representa la coneja. Sin embargo, algunos autores han reportado que luego de la lesión del NPV, disminuyó la frecuencia y la duración de los ataques contra intrusos (Consiglio y Lucion, 1996) y que la administración de un

antagonista a OT, redujo la duración de los acicalamientos y aumentó su frecuencia (Pedersen y Boccia, 2003).

7.2 Efecto de la lesión del NPV sobre la ingestión de agua y alimento

Durante la gestación y los primeros siete días de lactancia, no se observaron diferencias significativas entre las hembras lesionadas fuera (grupo 1) o en el NPV (grupos 2 y 3) ni en el consumo de agua ni en el de alimento. Únicamente se registró un incremento significativo en el consumo de alimento durante la lactancia, conforme se ha reportado en trabajos anteriores (Szendrő *et al.*, 1999; González-Mariscal *et al.*, 2009). En cuanto a la ingestión de agua nuestros resultados son, hasta donde sabemos, los primeros en medir el consumo individual durante la gestación y la lactancia en la coneja. Encontramos que durante la gestación las hembras consumen en promedio 407 ± 157.7 ml. y registran un incremento significativo ($P < 0.001$) en la ingestión del agua durante los primeros días de lactancia (551.6 ± 157.6 ml; Media \pm DE). Luego de la cirugía, no se encontraron diferencias significativas en el consumo de agua y alimento entre los tres grupos de hembras lesionadas. Sin embargo, cuatro hembras dejaron de comer en el día posterior a la lesión

Tres de las hembras en las que se inhibió transitoriamente el consumo de agua y/o alimento, un día después de la cirugía, pertenecen al grupo 3 (lesión bilateral del NPV), y en los tres casos, las hembras dejaron de amamantar a su camada. Mientras que la hembra H4G5 solo dejó de comer alimentos comprimidos, las hembras H5G5 y H3G5, no ingirieron agua ni alimento, esta última hembra permitió un episodio de succión fuera del nido, lo que sugiere que perduró la capacidad para amamantar. Por último una de las hembras perteneciente al grupo 2 (lesión unilateral del NPV), incrementó el número de entradas para amamantar, lo cual, insinúa que el ayuno de 24 horas producto de la lesión, no interfirió significativamente la crianza de su camada hasta el destete.

Se ha descrito que la lesión del NPV provoca hiperfagia (Aravich y Sclafani, 1983; Leibowitz *et al.*, 1981; Shor-Posner *et al.*, 1985) y polidipsia (Aravich y Sclafani, 1983; Leibowitz *et al.*, 1981). Desafortunadamente, estos trabajos se han limitado a explorar el modelo de la rata macho y pocos han usado hembras, dejando al margen la condición reproductiva (Leibowitz *et al.*, 1981). Los dos estudios en los que se lesionó el NPV durante la lactancia, únicamente registraron el peso de los individuos y no se encontraron diferencias

significativas entre el peso de las hembras lesionadas y los controles (Olazabal y Ferreira, 1997; Numan y Corodimas, 1985). Sin embargo, sabemos que la lactancia es una condición que induce naturalmente un incremento en el consumo de agua y de alimento, es decir, las conejas lactantes consumen más agua y alimento (Szendrő *et al.*, 1999; González-Mariscal *et al.*, 2009) que las hembras en estro, al igual que se observa en nuestros resultados (Tablas IV y V). Por lo tanto la condición reproductiva de nuestras hembras podría enmascarar la hiperfagia y la polidipsia inducidas por la lesión del NPV, como la que se ha observado en roedores.

Es importante reconocer que el NPV es un núcleo complejo, compuesto por dos poblaciones neuronales que producen principalmente oxitocina y vasopresina, así como otros péptidos (somatostatina, encefalina, angiotensina II renina, glucagón, hormona liberadora de adrenocorticotropina, colecistoquinina, dinorfina) y la enzima tirosina hidroxilasa. Asimismo, algunas neuronas pueden sintetizar más de un sólo péptido. Por lo tanto, a pesar de la aparente selectividad del AK por las neuronas parvocelulares, no es posible determinar que los efectos encontrados se deban a la disminución de una hormona en particular.

8 CONCLUSIÓN

El NPV participa en la regulación de algunos aspectos de la conducta maternal post-parto en la coneja. La proporción del volumen lesionado del NPV se correlaciona con la afectación de la CM, puesto que: a) El 100% de las hembras lesionadas fuera del NPV (n=8) retuvo la motivación para entrar al nido, y amamantar a su camada, una sola vez en 24hrs. b) El 100% de las hembras con lesión unilateral del NPV (n=5), con un daño promedio de 19.9% en el NPV, retuvo la motivación para amamantar a sus críos dentro del nido. El 80% de estas hembras continuaron amamantando una sola vez cada 24hrs, mientras que sólo el 20%, incremento la frecuencia de los amamantamientos. c) En tanto que, de las ocho que recibieron una lesión bilateral, únicamente el 50% de las hembras (con un daño promedio de 29.8% en el NPV) retuvieron la motivación para amamantar a su camada, sin embargo, incrementaron la frecuencia de los amamantamientos en 24 horas. Mientras que el 50% restante (con un daño promedio de 33.6% en el NPV) se perdió la motivación de entrar al nido para amamantar.

9 APENDICE

9.1 ÁCIDO KAÍNICO

9.1.1 Glutamato

El glutamato (Glu) se encuentra en concentraciones particularmente altas en el sistema nervioso central: entre 40 y 45% de las sinapsis son mediadas por Glu en los vertebrados (Farooqui *et al.*, 2008). El Glu actúa sobre receptores de membrana clasificados en dos subclases: a) Los receptores ionotrópicos, responsables de la muerte neuronal por excitotoxicidad (Verdaguer *et al.*, 2002), N-metil-D-aspartato (NMDA), α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionato (AMPA) y kainato (KA). Son los responsables de las sinapsis excitatorias rápidas (Kandel *et al.*, 2001). b) El receptor metabotrópico *trans*-1-amino-ciclopentano-1,3-dicarboxilato (t-ACPD), acoplado a un sistema de segundos mensajeros, asociados a respuestas sinápticas lentas (Farooqui *et al.*, 2008).

9.1.2 Ácido kaínico (AK)

En 1953 Murakami aisló una sustancia del alga marina (*Diageana simplex*) que inicialmente fue usada como tratamiento para ascariasis. Ahora se sabe que el ácido kaínico (AK) es un aminoácido sintético (no degradable) análogo al glutamato. Estudios neurofisiológicos indican que es de 30 a 100 veces más poderoso que el Glu, como excitador neuronal (Coyle y Schwarcz, 1983). Es conocido por sus propiedades convulsivas: cuando se administra por vía intraperitoneal, intramuscular, intracerebral o intracerebroventricular, es capaz de producir prolongados estados epilépticos. De igual forma es reconocido como una poderosa herramienta en el área de las neurociencias dada su capacidad para provocar lesiones en células nerviosas sin dañar fibras de paso (Gary *et al.*, 1980; Farooqui *et al.*, 2008; Coyle y Schwarcz, 1983). Una de las características más peculiares del AK es la marcada variación que exhiben las neuronas a sus efectos. Así pues, hay áreas cuyas neuronas son extremadamente sensibles a su acción, como las células piramidales del hipocampo (Coyle y Schwarcz, 1983) y otras que no se ven afectadas aún con altas concentraciones, como las células del núcleo supraquiasmático. De manera interesante, algunos núcleos como el supraóptico y el paraventricular, expresan diferencialmente la sensibilidad al AK, debido a

que sólo las neuronas parvocelulares expresan el receptor al AK (Gary *et al.*, 1980; Zhang y Ciriello, 1985; Herman y Wiegand, 1986). Además, estas variaciones en la sensibilidad al AK, difieren entre especies y entre poblaciones celulares. “Por ejemplo, una dosis que, en la rata causa una modesta lesión en el núcleo estriado, produce una lesión con un radio 2 a 3 veces más grande en el núcleo estriado del mono (Coyle y Schwarcz, 1983).” El AK actúa como un potente agonista de los receptores AMPA y kainato, para inducir muerte celular por excitotoxicidad. La activación de los receptores al AK, produce una despolarización de la membrana que resulta en una entrada masiva de calcio, la cual, detona la cascada de muerte neuronal (Fig. 40). También induce la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH), y un decremento en los niveles de bromuro de 3-(4 5-dimetiltiazol-2-il)-2 5-difeniltetrazolio (MTT), que resulta en un daño de la función mitocondrial (Zhang y Jie Zhu, 2010).

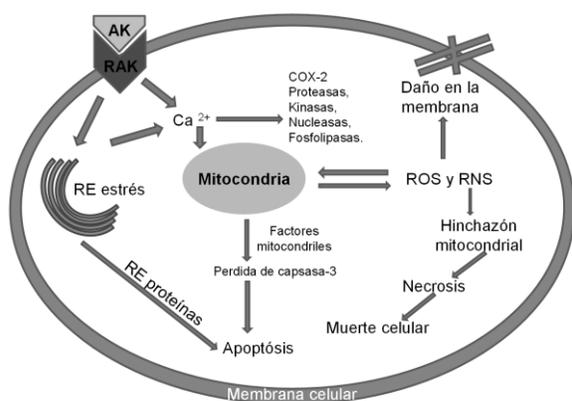


Figura 40. Muerte celular por AK. (1) La estimulación del receptor a glutamato (RAK), el AK, produce un incremento intracelular Ca^{2+} , la activación de una enzima Ca^{2+} dependiente y la liberación de radicales libres. (2) El exceso de Ca^{2+} y radicales libres causan disfunción mitocondrial, liberación de factores mitocondriales y la activación de capsasa-3 que conducen a la apoptosis. (3) Desintegración del

retículo endoplásmico (RE), estrés del RE con activación de proteínas Bip, Chop, y caspasas-12, envueltas en la apoptosis neuronal. (4) El exceso de radicales libres y la sobrecarga de Ca^{2+} causan directamente hinchazón mitocondrial, que conduce a la necrosis neuronal. COX: ciclooxygenasa; ROS: oxígeno reactivo (modificado de Zhang y Jie Zhu, 2010).

10 BIBLIOGRAFÍA

Abe M, Herzog E, Yamazaki S, Straume M, Tei H, Sakaki Y, Menaker M y Block G. 2002. Circadian rhythms in isolated brain regions. *J. Neurosci.* 22:350-356.

Aguilar R. y Escobar C. 2002. Ritmos biológicos y mecanismos generales de regulación. En: Escobar C. y Aguilar R. (Eds). *Motivación y conducta: sus bases biológicas. El manual moderno.* Mex.

Aravich P y Sclafani A. 1983. Paraventricular hypothalamic lesions and medial hypothalamic knife cuts produce similar hyperphagia syndromes. *Behav. Neurosci.* 97:970-983

Birnbaumer M. 2002. Vasopressin receptor. En: *Hormones brain and behavior.* Pfaff. D, Arnold A, Etgen A, Fahrbach S y Rubin R. (eds.) Editorial Academic Press. New York. Pp.803

Buijs R, Swaab, D, Dogterom J y van Leeuwen F. 1978. Intra- and extrahypothalamic vasopressin and oxytocin pathways in the rat. *Cell Tiss. Res.* 186:423-433

Burbach P, Young L y Russell J. 2006. Oxytocin: Synthesis, Secretion, and Reproductive Functions. En: *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* (Eds). Neill JD, New York: Elsevier; 2006. pp. 3055–3128.

Caba M, Silver R, Gonzalez-Mariscal G, Jiménez A y Beyer C. 1996. Oxytocin and vasopressin immunoreactivity in rabbit hypothalamus during estrus, late pregnancy and postpartum. *Brain Res.* 720:7-16

Champagne F, Diorio J, Sharma S y Meaney M. 2001. Naturally occurring variations in the maternal behavior in the rat associated with differences in the estrogen-inducible central oxytocin receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98:12736-12741

Chirino R, Beyer C y González-Mariscal G. 2007. Lesion of the main olfactory epithelium facilitates maternal behavior in virgin rabbits. *Behav. Brain Res.* 180:127-132

Clapp C, Martinez- Escalera G, Aguayo D y Mena F. 1987. Regulación integrativa de la lactancia. *Bol. Estud. Med. Biol.* 35:63-107

Consiglio A y Lucion A. 1996. Lesion of hypothalamic paraventricular nucleus and maternal aggressive behavior in female rats. *Physiol. Behav.* 59:591-596

Coverdill A, McCarthy M, Bridges S, y Nephew B. 2012. Effects of chronic central arginine vasopressin (AVP) on maternal behavior in chronically stressed rat dams. *Brain Sci.* 2:589-604

Cowie T. 1984. Lactation. En: *Reproduction in mammals: Hormonal control of reproduction*. Austin C y Short R. (eds) Cambridge University Press. Pp. 195-231

Coyle J y Schwarcz R. 1983. The use of excitatory amino acids as selective neurotoxins. En: *Handbook of chemical neuroanatomy. Method in chemical neuroanatomy*. Björklund A, Hökfelt (eds.). Editorial Elsevier Sciences. Amsterdam. Pp. 508-527

Cross B. 1966. Neural control of oxytocin secretion. En: *Neuroendocrinology*. Martini L y Ganong W (eds). Academic press. New York. Pp. 217-259

Delouis C y Richard P. 1993. Lactation. En: *Reproduction in mammals and man*. Thibault C, Levasseur M y Hunter R. (eds). Ellipses Paris. Pp.503-530

Fahrbach S, Morrell J y Pfaff D. 1984. Oxytocin induction of short-latency maternal behavior in nulliparous, estrogen-primed female rats. *Horm. Behav.* 18:267-286

Fahrbach S, Morrell J y Pfaff D. 1985. Possible role for endogenous oxytocin in estrogen-facilitated maternal behavior in rats. *Neuroendocrinology*. 40:526-532

Farooqui A, Ong W y Horrocks L. 2008. Excitatory amino acid receptors in brain. En: *Neurochemical aspects of excitotoxicity*. Farooqui A, Ong W, Horrocks L. (eds.) Springer New York. Pp. 21-35

Findlay A y Roth L. 1970. Long-term dissociation of nursing behavior and the condition of the mammary gland in the rabbit. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 72:341-344

Findlay A. 1968. The effect of teat anaesthesia on the milk-ejection reflex in the rabbit. *J. Endocrinol.* 40:127-128

Francis D, Champagne F y Meaney J. 2000. Variations in maternal behaviour are associated with differences in oxytocin receptor levels in the rat. *J. Endocrinol.* 12:145-1148

Fuchs A y Wagner G. 1963. Quantitative aspects of release of oxytocin by suckling in unanaesthetized rabbits. *Act. Endocrinol.* 44:581-592

Fuchs A, Cubile L, Dawood M y Jorgensen F. 1984. Quantitative aspects of release of oxytocin and prolactin by suckling rabbits throughout lactation. *Endocrinol.* 114:462-469

García J y Caba M. 2008. Mecanismo molecular del reloj circadiano. Bases de los ritmos biológicos. En: *Bases celulares y moleculares de los ritmos biológicos*. Ed. Caba M. Editorial Publidisa Mexicana S.A de C.V.

Garland M y Svare B. 1988. Suckling stimulation modulates the maintenance of postpartum aggression in mice. *Physiol. Behav.* 44:301-305

Gerstberger R, Fahrenholz F. 1989. Autoradiographic localization of V1 vasopressin binding sites in rat brain and kidney. *Eur J Pharmacol.* 167:105-116

Gimpl G y Fahrenholz F. 2001. The Oxytocin Receptor System: Structure, Function, and Regulation. *Physiol. Rev.* 81:630-683

Giordano A, Siegel H y Rosenblatt J. 1984. Effects of mother-litter separation and reunion on maternal aggression and pup mortality in lactating hamsters. *Physiol. Behav.* 33:903-906

Giovenardi M, Padoin M, Cadore P y Lucion A. 1998. Hypothalamic paraventricular nucleus modulates maternal aggression in rats: Effects of ibotenic acid lesion and oxytocin antisense. *Physiol. Behav.* 63:351-359

Girgis M y Shih-Chang W. 1981. New stereotaxic atlas of the rabbit brain. Warren H. Green Inc. St. Louis MO, USA.

González-Mariscal G y Poindron P: 2002 Parental care in mammals: immediate, internal and sensory factors of control. En: *Hormones, Brain, and Behavior*. Pfaff D, Arnold A, Etgen A, Fahrenbach S y Rubin R. (eds). Academic Press, San Diego. pp. 215-298.

González-Mariscal G, Chirino R, Beyer C y Rosenblatt J. 2004. Removal of the accessory olfactory bulbs promotes maternal behavior in virgin rabbits. *Behav. Brain Res.* 152:89-95

González-Mariscal G, Díaz- Sánchez V, Melo A, Beyer C y Rosenblatt J. 1994. Maternal behavior in New Zealand white rabbits: Quantification of somatic events, motor patterns, and steroid plasma levels. *Physiol Behav.* 55:1081-1089

González-Mariscal G, Gallegos J, Sierra-Ramírez A y Garza J. 2009. Impact of concurrent pregnancy and lactation on maternal nest-building, estradiol and progesterone concentrations in rabbits. *World Rabbit Sci.* 17:145-152

González-Mariscal G, Jiménez A, Chirino R y Beyer C. 2009. Motherhood and nursing stimulate c-FOS expression in the rabbit forebrain. *Behav. Neurosci.* 123:731-739

González-Mariscal G, Lemus A, Vega Gonzalez A y Roblero Aguilar R. 2013. Litter size determines circadian periodicity of nursing in rabbits. *Chronobiol. Int.* 30:711-718

González-Mariscal G, Melo A, Beyer C y Rosenblatt J. 1996. Estradiol, progesterone, and prolactin regulate maternal nest-building in rabbits. *J. Neuroendocrinol.* 8:901-907

González-Mariscal G, Melo A, Parlow F, Beyer C y Rosenblatt J. 2000. Pharmacological evidence that prolactin acts from late gestation to promote maternal behavior in rabbits. *J. Neuroendocrinol.* 12:983-992

González-Mariscal G, Toribio A, Gallegos J y Serrano-Meneses M. 2012. The characteristics of suckling stimulation determine the daily duration of mother young contact and milk output in rabbits. *Dev. Psychobiol.* 55:809-817

González-Mariscal G. 2007. Mother rabbits and their offspring: Timing is everthing. *Dev. Psychobiol.* 49:71-76

Guerra R y Nunes C. 2001. Effects of litter size on maternal care, body weight and infant development in golden hamsters (*mesocricetus auratus*). *Behav. Proc.* 55:127-142

Hansen S y Ferreira A. 1986. Food intake, aggression, and fear behavior in the mother rat: Control by neural systems concerned with milk ejection and maternal behavior. *Behav. Neurosci.* 100:64-70

Hansen S y Köhler C. 1984. The importance of the peripeduncular nucleus in the neuroendocrine control of sexual behavior and milk ejection in the rat. *Neuroendocrinol.* 39:563-572

Herman J y Wiegand S. 1986. Ibotenate-induced cell death in the hypothalamic paraventricular nucleus: differential susceptibility of magnocellular and parvicellular neurons. *Brain Research.* 383:367-372

Howard C y Reed M. 1998. *Unbiased stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy.* Springer-Verlag, New York. Pp 246

Hoy S y Selzer D. 2002. Frequency and time of nursing in wild and domestic rabbits housed outdoors in free range. *World Rabbit Sci.* 10:77-83

Insel T y Harbaugh C. 1989. Lesion of hypothalamic paraventricular nucleus disrupt the initiation of maternal behavior. *Physiol. Behav.* 45:1033-1041

Jilge B. 1993. The ontogeny of the circadian rhythms in the rabbit. *J. Biol. Rhythms.* 8:247-260

Jilge B. 1995. Ontogeny of the rabbit's circadian rhythms without an external zeitgeber. *Physiol. Behav.* 58:131-140

Jilge B. Restrictive feeding: a nonphotic zeitgeber in the rabbit. *Physiol. Behav.* 51:157-166

Jilge B, Hörnicke H y Stähle H. 1987. Circadian rhythms of rabbits during restrictive feeding. *Am. J. Physiol.* 253:46-54

Jilge B, Kuhnt B, Landerer W y Rest S. 2001. Circadian temperature rhythms in rabbit pups and in their does. *Lab Animal*, 35:364-373

Juss T y Wakerley B. 1981. Mesencephalic areas controlling pulsatile oxytocin release in the suckled rat. *J. Endoc.* 91:233-244

Kandel E y Siegelbaum S. Integración sináptica. 2001. En: *Principios de neurociencia*. Kandel E, Jessel T y Schwartz J. (eds). Madrid, España, McGraw-Hill. Pp. 1400

Kennedy J y Ehlers D. 2011. Mechanisms and function of dendritic exocytosis. *Neuron*. 69:856-875

Klein D, Smoot R, Weller J, Higa S, Markey S, Creed G, Jacobowitz D. 1983. Lesions of the paraventricular nucleus area of the hypothalamus disrupt the suprachiasmatic leads to spinal cord circuit in the melatonin rhythm generating system. *Brain Res. Bull.* 10:647-652

Kriegsfeld L, Korets R y Silver R. 2003. Expression of the circadian clock gene *Period 1* in neuroendocrine cells: an investigation using mice with a *Per1::GFP* transgene. *Eur. J. Neurosci.* 17:212-220.

Laycock F. 2010. Introduction to vasopressin. En: *Perspectives on vasopressin*. Laycock F. (ed). Imperial College Press. Pp. 1-20

Leengoed E, Kerker E y Swanson. 1986. Inhibition of post-partum maternal behaviour in the rat by injecting an oxytocin antagonist into the cerebral ventricles. *J. Endocrinol.* 112:275-282

Leibowitz S, Hammer N y Chang K. 1981. Hypothalamic Paraventricular Nucleus Lesions Produce Overeating and Obesity in the Rat. *Physiol. Behav.* 27:1031-1040

Lincoln D y Paisley A. 1982. Neuroendocrine control of milk ejection. *J.Reprod.Fert.* 65:571-586

Lincoln D. 1974. Suckling: a time constant in the nursing behavior of the rabbit. *Physiol. Behav.* 13:711-714

Melo A y González-Mariscal G. 2003. Placentophagia in rabbits: Incidence across the reproductive cycle. *Dev. Psychobiol.* 43:1-8

Mendoza J. 2009. Neurobiología del sistema circadiano: su encuentro con el metabolismo. *Suma Psicológica.* 16:85-95

Mens W, Andringa-Bakker E y Van Wimersma Greidanus T. 1982. Changes in cerebrospinal fluid levels of vasopressin and oxytocin of the rat during various light-dark regimes. *Neurosci. Lett.* 34:51-56

Meza E, Aguirre J, Waliszewski S y Caba M. 2015. Suckling induces a daily rhythm in the preoptic area lateral septum but not in the bed nucleus of the stria terminalis in lactating rabbit does. *Eur. J. Neurosci.* 41:196-204

Meza E, Waliszewski S y Caba M. 2011. Circadian nursing induces PER1 protein in neuroendocrine tyrosine hydroxylase neurons in the rabbit doe. *J. Neuroendocrinol.* 23: 472-480

Meza E, Juárez C, Morgado E, Zavaleta Y y Caba M. 2008. Brief daily suckling shifts locomotor behavior and induces PER1 protein in paraventricular and supraoptic nuclei, but not in the suprachiasmatic nucleus, of rabbit does. *Eur. J. Neurosci.* 28:1394-1403

Morales A y Fernández M. 2008. Bases de los ritmos biológicos. En: Bases celulares y moleculares de los ritmos biológicos. Ed. Caba M. Editorial Publidisa Mexicana S.A de C.V.

Murphy H, Wideman C y Nadzam G. 1998. The role of vasopressin in modulating circadian rhythm responses to phase shifts. *Peptides* 19:1191-1208

Nephew B y Bridges R. 2008(a). Arginine vasopressin and V1a receptor antagonist impairs maternal memory in rats. *Physiol Behav.* 95:182-186

Nephew B y Bridges R. 2008(b). Central actions of arginine vasopressin and V1a receptor antagonist on maternal aggression, maternal behavior, and grooming in lactating rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 91:77-83

Neumann I, Russell J, Landgraf R. 1993. Oxytocin and vasopressin release within the supraoptic and paraventricular nuclei of pregnant, parturient and lactating rats: A microdialysis study. *Neuroscience* 53:65-75

Neville M. Lactation and its hormonal control. En: Physiology of reproduction Vol 2. Neill J, Challis J, Pfaff D, Plant T, Kretser D Richards S y Wassarman P. (Eds). Academic Press. St. Louis Pp. 2993

Numan M y Corodimas K. 1985. The effects of paraventricular hypothalamic lesions on maternal behavior in rats. *Physiol. Behav.* 35:417-425

Numan M. 1988. Maternal behavior. En: The physiology of reproduction. Knobil E, Neill J, Ewing L, Greenwald G, Markert C y Pfaff D (Eds). Raven Press. New York. Pp.1569

Olazabal D y Ferreira A. 1997. Maternal behavior in rats with kainic acid-induced lesions of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Physiol. Behav.* 61:779-784

Olazábal D y Young L. 2006. Oxytocin receptors in the nucleus accumbens facilitate “spontaneous” maternal behavior in adult female prairie voles. *Neuroscience* 141:559-568

Pedersen C y Boccia M. 2003. Oxytocin antagonism alters rat dams` oral grooming and upright posturing over pups. *Physiol. Behav.* 80:233-241

Pedersen C y Prange J. Induction of maternal behavior in virgin rats after intracerebroventricular administration of oxytocin. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 76:6661-6665

Pedersen C, Caldwell J, Johnson M, Fort S y Prange A. 1985. Oxytocin antiserum delays onset of ovarian steroid-induced maternal behavior. *Neuropeptides.* 6:175-182

Pedersen C, Caldwell J, Walker C, Ayers G y Mason G. 1994. Oxytocin activates the postpartum onset of rat maternal behavior in the ventral tegmental and medial preoptic areas. *Behav. Neurosci.* 108:1163-1171

Peterson G. Moore R. 1980. Selective effects of kainic acid on diencephalic neurons. *Brain Research.* 202:165-182

Pickard G y Turek F. 1983. The hypothalamic paraventricular nucleus mediates the photoperiodic control of reproduction but not the effects of light on the circadian rhythm of activity. *Neurosci. Lett.* 43:67-72

Popesko P, Rajtovà V y Horák J. 1992. A colour atlas of anatomy of small laboratory animals. Rabbit and guinea pig. London, Wolfe publishing Ltd. Pp 255

Priestnall R. 1972. Effects of litter size on the behavior of lactating female mice (*Mus musculus*). *Anim. Behav.* 20:386-394

Refinetti R. 2006. Pacemakers. En: *Circadian Physiology*. Refinetti, R. (Ed). Taylor & Francis, Boca Raton, FL.

Roizen J, Luedke E, Herzog E y Muglia L. Oxytocin in the circadian timing of birth. 2007. *PLoS ONE* 2(9): e922. doi:10.1371/journal.pone.0000922

Schimchowitsch S, Moreau C, Laurent F y Stoeckel M. 1989. Distribution and morphometric characteristics of oxytocin and vasopressin-immunoreactive neurons in the rabbit hypothalamus. *J. Comp. Neurol.* 285:304-324

Shor-Posner G, Azar A, Insinga S y Leibowitz S. 1985. Deficits in the control of food intake after hypothalamic paraventricular nucleus lesions. *Physiol. Behav.* 35:883-890

Silver R y Rainbow M. 2013. The suprachiasmatic nucleus and the circadian timekeeping system of the body. En: *Neuroscience in the 21st Century. Form basic to clinical*. Vol. 9 *Regulation of Natural Behaviors*. Donald W. Pfaff (Eds). Springer N.Y. pp. 1847-1888

Simmons D y Swanson L. 2008. High resolution paraventricular nucleus serial section model constructed within a traditional rat brain atlas. *Neuroscience Letters*. 483:85-89

Sofroniew M. 1985. Vasopressin, oxytocin and their related neurophysins. En: *Handbook of chemical neuroanatomy. Gaba and neuropeptides in the CNS*. Björklund A, Hökfelt (eds.) Editorial Elsevier Sciences. Amsterdam. Pp. 93-165

Stern J. 2011. Autonomic and neuroendocrine roles of paraventricular nucleus. En: *Central regulation of autonomic functions*. Llewellyn-Smith J. y Verbene J. (eds.). Oxford Scholarship. Pp. 62-80

Stern J y Johnson S. 1990. Ventral somatosensory determinants of nursing behavior in Norway rats. I. Effects of variations in the quality and quantity of pup stimuli. *Physiol. Behav.* 47:993-1011

Stoop R. 2012. Neuromodulation by Oxytocin and Vasopressin. *Neuron* 76:142-159

Svare B y Gandelman R. 1976. Postpartum aggression in mice: The influence of suckling stimulation. *Horms. Behav.* 7:407-416

Szendrő Zs, Papp Z y Kustos K. 1999. Effect of environmental temperature and restrictive feeding on production of rabbit does. *CHIEAM Cahier. Opt. Mediteran.* 41:11-17

Tasker J, Boudaba C, Poulain D, Theodosios D. 2002. Vasopressin receptor. En: Hormones brain and behavior. Pfaff. D, Arnold A, Etgen A, Fahrbach S y Rubin R. (eds.) Editorial Academic Press. New York. Pp.811

Tousson E y Meissl H. 2004. Suprachiasmatic nuclei grafts restore the circadian rhythm in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J. Neurosci.* 24:2988-2983

Tribollet E. 1992. Vasopressin and oxytocin receptors in the rat brain. En: Handbook of chemical neuroanatomy. Gaba and neuropeptides in the CNS. Björklund A, Hökfelt (eds.) Editorial Elsevier Sciences. Amsterdam. Pp. 289-320

Tucker A. 2000. Neuroendocrine regulation of lactation and milk ejection. En: Neuroendocrinology in physiology and medicine. Conn M y Reeman M. (eds). Humana Press. Pp. 163-180

Verdaguer E, Jordà-García E, Jiménez A, Stranges A, Sureda F, Canudas A, Escubedo E, Camarasa J, Pallàs M y Camins A. 2002. Kainic acid-induced neuronal cell death in cerebellar granule cells is not prevented by caspase inhibitors. *Br. J. Pharmacol.* 135:1297-1307

Verga M, Dell'Orto y Carenzi C. 1978. A general review and survey of maternal behaviour in the rabbit. *App. Anim. Ethol.* 4:235-252

Vrang N, Larsen P, Moller M y Mikkelsen J. 1995. Topographical organization of the rat suprachiasmatic-Paraventricular projection. *J. Comp. Neurol.* 353:585-603

Wakerley J. 2006. Milk Ejection and Its Control. En: Physiology of reproduction Vol 2. Neill J, Challis J, Pfaff D, Plant T, Kretser D Richards S y Wassarman P. (Eds). Academic Press. St. Louis Pp. 2993

Yu G-Z, Kaba H, Okutani F, Takahashi y Higuchi T. 1996. The olfactory bulb: a critical site of action for oxytocin in the induction of maternal behaviour in the rat. *Neuroscience* 72:1083-1088

Zarrow M, Denenberg V y Anderson C. 1965. Rabbit: Frequency of sucking in the pup. *Science.* 150:1835-1836

Zhang X y Cirello J. 1985. Kainic acid lesions of paraventricular nucleus neurons reverse the elevated arterial pressure after aortic baroreceptor denervation in the rat. 358:334-338

Zhang X y Zhu J. 2011. Kainic Acid-Induced Neurotoxicity: Targeting Glial Responses and Glia-Derived Cytokines. *Curr. Neuropharmacol.* 9:388-98

Zingg H. 2002. Oxytocin. En: Hormones brain and behavior, Vol. 3. Pfaff. D, Arnold A, Etgen A, Fahrbach S y Rubin R. (eds.) Academic Press. New York. Pp.779