



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Consecuencias de cancelar un episodio de succión
sobre la reactividad conductual y neuroendócrina en
conejos blancos Nueva Zelanda adultos

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Hilda Lizet García Fernández

Dra. Gabriela González-Mariscal Muriel

Tlaxcala, Tlax.

Enero, 2018



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Consecuencias de cancelar un episodio de succión
sobre la reactividad conductual y neuroendócrina en
conejos blancos Nueva Zelanda adultos

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Hilda Lizet García Fernández

Comité Tutoral

Dra. Gabriela González-Mariscal Muriel

Dra. Elvira Morgado

M. en C. Rosario Chirino

Dr. Kurt Hoffman

Dr. Amando Bautista

Tlaxcala, Tlax.

Enero, 2018

El presente trabajo de tesis fue realizado bajo la dirección de la Dra. Gabriela González-Mariscal Muriel y bajo la tutoría de Dra. Elvira Morgado, M. en C. Rosario Chirino y Dr. Kurt Hoffman. El trabajo experimental se desarrolló en las instalaciones del Centro de Investigación en Reproducción Animal (CIRA) CINVESTAV-Universidad Autónoma de Tlaxcala, ubicado en Ixtacuixtla, Tlaxcala.

Esta investigación se llevó a cabo dentro del programa de Maestría en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala. Dicho programa se imparte en las instalaciones del Centro Tlaxcala Biología de la Conducta (CTBC) y está registrado en el Padrón Nacional de Posgrados del Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología.

El proyecto fue financiado por la beca de maestría CONACyT otorgada a la autora de la presente tesis, con el número de registro #584898.



Universidad Autónoma de Tlaxcala
Secretaría de Investigación Científica y Posgrado
Posgrado en Ciencias Biológicas



COORDINACIÓN MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
PRESENTE

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del Proyecto de tesis que **Hilda Lizet García Fernández** realiza para la obtención del grado de Maestra 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 **“Consecuencias de cancelar un episodio de succión sobre la reactividad conductual y neuroendócrina en conejos blancos Nueva Zelanda adultos”**.

Sin otro particular, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE
TLAXCALA, TLAX., ENERO 11 DE 2018



DRA. GABRIELA GONZÁLEZ MARISCAL MURIEL



M.C. ROSARIO CLARINO VARGAS



DR. KURT LEROY HOFFMAN



DRA. ELVIRA MORGADO VIVEROS



DR. AMANDO BAUTISTA ORTEGA



Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado bajo la Norma:
ISO 9001:2015-NMX-CC-9001-IMNC-2015



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

Agradecimientos

Al posgrado en Ciencias Biológicas, del Centro Tlaxcala Biología de la Conducta (CTBC) de la Universidad Autónoma de Tlaxcala.

A CONACyT por haber otorgado la beca #584898, sin su apoyo este trabajo no hubiera sido posible, muchas gracias.

A mi directora de tesis, Dra. Gabriela González-Mariscal Muriel, muchísimas gracias por su apoyo, económico, moral y académico y por impulsarme a ser mejor cada día, a prepararme lo mejor posible para la vida de investigadora. Para mí, usted es un ejemplo de vida, mi admiración y respeto son para usted.

A mis tutores, Dra. Elvira Morgado, M. en C. Rosario Chirino, Dr. Kurt Hoffman y Dr. Amando Bautista, muchas gracias por sus comentarios y sugerencias, no solo para la mejora de esta tesis, también de manera personal, me han ayudado a expresar mejor mis ideas, valor mucho todo el apoyo emocional que me han brindado.

Agradecimientos personales

A mi esposo, Jesús Adonai Maguey González, gracias por tu amor y confianza, por respetar mis decisiones y por ayudarme a alcanzar mis metas, te cielo Maguey.

A mis padres, Hilda Fernández Saavedra y Fernando García López y mi hermana Elizabeth García Fernández, por su apoyo incondicional a lo largo de toda mi vida, gracias a ustedes hoy soy la persona exitosa y responsable que sigue trabajando para conseguir lo que quiere.

A mis abuelitos, Ma. Teresa López Barrón, Fernando García López, Ana María Saavedra y José Luis Fernández, por consentirme y ser cómplices de mis locuras, a mis tías y tíos, María, Janeth, Roberto, Alfredo y al resto de mis tías que siempre están al pendiente de mí.

También quiero agradecer a mi familia política, muchísimas gracias Sra. María de los Ángeles González Neria y al Sr. Pedro Alejandro Maguey Ambriz porque siempre me han tratado como una hija y me han apoyado incondicionalmente, los quiero mucho.

A mis amigas de toda la vida Ángeles, Perlita, Aida, Lorena, Susana, Zizith, Lennis, Gabriela, Erika, gracias por su apoyo, las adoro niñas.

Mil gracias a José Antonio Gallegos Huicochea, por su apoyo moral y por toda su ayuda para realizar las pruebas del experimento, sin tu apoyo no hubiera terminado. También quiero agradecerle a la señora Marcela Sarmiento, ha sido para mí como una madre y una confidente, mil gracias por todo su apoyo emocional y por darme ánimos en los momentos más difíciles.

Gracias a todos mis compañeros de la maestría y a mi compañera de cubículo, Ana Celia, por su ayuda y compañía.

Resumen

La reactividad al estrés está dada por la estimulación directa o indirecta de las neuronas parvocelulares en el núcleo paraventricular (NPV) del hipotálamo (Numan, 2015). Esto, a su vez, provoca la liberación del factor liberador de corticotropina (CRF) y de la Arginina-Vasopresina (AVP), que estimulan a las neuronas corticotropas de la adenohipófisis para que se sintetice y secrete la hormona liberadora de corticotropina (ACTH) al torrente sanguíneo. El aumento de ACTH en sangre, incrementa la biosíntesis y liberación de glucocorticoides desde la glándula suprarrenal (Lui y cols. 1999, Sapolsky 1992, Griffiths y Hunter 2014). El papel de la adrenalina es suministrar energía de manera inmediata, mientras que los glucocorticoides mantienen constante el nivel de glucosa sanguínea para nutrir músculos, corazón y cerebro (Selye 1936).

La reactividad al estrés, se encuentra regulada por el CRF en sus componentes fisiológicos, emocionales y comportamentales. Mientras que los glucocorticoides son los encargados de modular la intensidad y duración de la reactividad, por medio de la retroalimentación negativa a nivel del hipocampo (Lui y cols. 1999). Sin embargo, la exposición (única o repetida) a diversos estímulos (manipulación, separación madre-crías, exposición a olores) durante el periodo posnatal temprano pueden ejercer efectos profundos y duraderos, sobre la magnitud de la respuesta al estrés (aspectos conductuales y neuroendócrinos) cuando adultos (Liu y cols. 1999; González-Mariscal y Kinsley, 2009; González-Mariscal y Melo, 2013; Melo 2015). Debido a la plasticidad adaptativa del cerebro durante el periodo posnatal temprano, momento en el que se llevan a cabo, procesos de proliferación celular, migración neuronal, diferenciación de neuronas y glía, sinaptogénesis, mielinización, apoptosis, entre otros (Rice y Barone Jr. 2000).

En conejos, la separación madre-crías por 48 h es un manejo común en granjas, necesario para cancelar un episodio de succión (bioestimulación), después de este manejo, mejora la receptividad sexual y la fertilidad en hembras lactantes (Bonanno y cols. 1999, Bonanno y cols. 2002, Rebollar y cols. 2006, Eiben y cols. 2013). Para las crías, esta separación es un estímulo estresante, que disminuye la reactividad a largo plazo del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) (Brecchia y cols. 2009). No obstante, se desconocen los efectos de esta separación sobre la reactividad conductual al estrés, por esta razón, en el presente trabajo evaluamos las

consecuencias de la separación madre-crías por 48 h sobre la reactividad conductual y neuroendócrina en conejos blancos Nueva Zelanda adultos (100-120 días).

En el presente trabajo, la separación madre-crías por 48 h no disminuyó en las hembras, la respuesta del eje HHA ante el estímulo de la inyección de solución salina, no obstante, en las hembras experimentales el horario en el que se aplicó la prueba de inyección de solución salina afectó la magnitud de la respuesta del eje HHA, incrementando la cantidad de cortisol y corticosterona en las muestras de la tarde en comparación con las muestras de la mañana. Por otro lado, el horario en el que se aplicaron las pruebas conductuales, no tuvo ningún efecto (controles y experimentales), sobre la reactividad conductual (ambos sexos). También observamos que las consecuencias de la separación madre-crías, fueron selectivas a la conducta sexual, aumentando en los machos experimentales la latencia a la primera eyaculación y el porcentaje de montas que no culminaron en eyaculación (tasa de error) y disminuyendo en las hembras experimentales el cociente de lordosis, sin embargo al eliminar el factor genético en las hembras el cociente de lordosis fue similar en controles y experimentales. Mientras que en el resto de los indicadores conductuales no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre animales controles y experimentales (ambos sexos). Posiblemente, la estimulación proveniente de los hermanos de camada, amortiguó las consecuencias de la separación madre-crías sobre la reactividad conductual y neuroendócrina.

Índice

1. Introducción.....	1
1.1. Bioestimulación.....	1
1.2. Estrés	1
1.3. Reactividad al estrés.....	2
1.3.1. Aspectos fisiológicos	2
1.3.2. Aspectos comportamentales	5
2. Antecedentes.....	6
2.1. Neurodesarrollo	6
2.1.1. Ratas.....	6
2.1.1.1. Manipulación de las crías.....	6
2.1.1.1.1. Efecto sobre la reactividad conductual	7
2.1.1.1.2. Efectos sobre la fisiología.....	7
2.1.2. Conejos	8
2.1.2.1. Manipulación de las crías.....	8
2.1.2.1.1. Efecto sobre la reactividad conductual	11
2.1.2.1.2. Efectos sobre la fisiología.....	13
3. Justificación	16
4. Hipótesis.....	16
5. Objetivos	16
5.1. Objetivo general	16
5.2. Objetivos particulares.....	17
6. Metodología.....	17
6.1. Animales y alojamiento	17
6.2. Grupos experimentales	17
6.3. Pruebas fisiológicas	18
6.3.1. Medición del peso corporal	18
6.3.2. Medición de glucocorticoides en plasma.....	18
6.4. Pruebas conductuales	19
6.4.1. Reflejo de enderezamiento	19
6.4.2. Aproximación al humano	20
6.4.3. Campo abierto	21
6.4.4. Conducta sexual.....	22

6.4.4.1.	Hembras	22
6.4.4.2.	Machos	23
7.	Resultados	24
7.1.	Pruebas fisiológicas.....	24
7.1.1.	Medición del peso corporal.....	24
7.1.2.	Medición de glucocorticoides en plasma	27
7.1.2.1.	Medición de cortisol	27
7.1.2.2.	Medición de corticosterona	31
7.2.	Pruebas conductuales	34
7.2.1.	Reflejo de enderezamiento	35
7.2.1.1.	Considerando todos los animales	35
7.2.1.2.	Considerando animales sin parentesco.....	36
7.2.2.	Aproximación al humano	37
7.2.2.1.	Considerando todos los animales	37
7.2.2.2.	Considerando animales sin parentesco.....	39
7.2.3.	Campo abierto	41
7.2.3.1.	Considerando todos los animales	41
7.2.3.2.	Considerando animales sin parentesco.....	44
7.2.4.	Conducta sexual.....	47
7.2.4.1.	Hembras	47
7.2.4.1.1.	Considerando todos los animales	47
7.2.4.1.2.	Considerando animales sin parentesco	49
7.2.4.2.	Machos	51
7.2.4.2.1.	Considerando todos los animales.....	51
7.2.4.2.2.	Considerando animales sin parentesco	54
8.	Discusión.....	63
8.1.	Medición del peso.....	63
8.2.	Medición de glucocorticoides en plasma	66
8.3.	Pruebas conductuales	69
8.3.1.	Reflejo de enderezamiento	69
8.3.2.	Aproximación al humano	70
8.3.3.	Campo abierto	71
8.3.4.	Conducta sexual.....	74

8.3.4.1. Hembras	74
8.3.4.2. Machos	74
8.4. Discusión general	76
9. Conclusiones.....	81
9.1. Considerando a todos los animales.....	81
9.2. Considerando animales sin parentesco.....	81
10. Perspectivas.....	82
11. Referencias.....	83
12. Glosario	93
13. Anexos	94
14. Publicaciones.....	94

Índice de figuras

Figura 1 Diagrama. Reacción de lucha o huida (Cannon 1929).....	4
Figura 2. Gráfica de los niveles de corticosterona ($\mu\text{g}/\text{dl}$) en gazapos.....	14
Figura 3. Niveles de corticosterona en respuesta a la inyección de solución salina.....	15
Figura 4. Fotografía receptores a glucocorticoides en hipotálamo.....	16
Figura 5. Fotografía de la mesa utilizada para la prueba de reflejo de enderezamiento	20
Figura 6. Fotografía de la arena redonda utilizada para la prueba latencia a aproximarse	21
Figura 7. Fotografía de arena rectangular donde se realiza la prueba de campo abierto.....	22
Figura 8. Peso de los gazapos al nacimiento.	25
Figura 9. Niveles de cortisol en plasma (ng/ml) en hembras experimentales	28
Figura 10. Niveles de cortisol en plasma (ng/ml) muestras de la mañana	29
Figura 11. Niveles de cortisol en plasma (ng/ml) muestras de la tarde.....	30
Figura 12. Niveles de corticosterona en plasma (ng/ml) en hembras experimentales	31
Figura 13. Niveles de corticosterona en plasma (ng/ml) muestras de la mañana.....	32
Figura 14. Niveles de corticosterona en plasma (ng/ml) muestras de la tarde	33
Figura 15. Latencia a enderezarse	35
Figura 16. Latencia a enderezarse (sin parentesco).....	36
Figura 17. Latencia a la primera aproximación.....	37
Figura 18. Número contactos.....	38
Figura 19. Latencia a la primera aproximación (sin parentesco)	39
Figura 20. Número de contactos (sin parentesco)	40
Figura 21. Latencia a salida de la madriguera	41
Figura 22. Número de marcas por minuto	42
Figura 23. Número de líneas cruzadas por minuto.....	43
Figura 24. Latencia a salida de la madriguera (sin parentesco).....	44
Figura 25. Número de marcas por minuto (sin parentesco)	45
Figura 26. Número de líneas cruzadas por minuto (sin parentesco)	46
Figura 27. Cociente de lordosis	47
Figura 28. Porcentaje de hembras gestantes.....	48
Figura 29. Cociente de lordosis (sin parentesco).....	49
Figura 30. Porcentaje de hembras gestantes (sin parentesco)	50
Figura 31. El <i>miss rate</i>	51
Figura 32. Latencia a la primera monta y a la primera eyaculación.....	52
Figura 33. Número de montas y de eyaculaciones	53
Figura 34. <i>Miss rate</i> (sin parentesco)	54
Figura 35. Latencia a la primera monta y a la primera eyaculación (sin parentesco)	55
Figura 36. Número de montas y de eyaculaciones (sin parentesco).....	56

Índice de tablas

Tabla 1. Efecto de las manipulaciones en conejos, durante el periodo posnatal temprano, sobre la reactividad al estrés, evaluada a diferentes edades, utilizando diversas pruebas conductuales.	12
Tabla 2. Peso (g) de las camadas controles y experimentales en el DPN 0 y No. de nacidos vivos.	24
Tabla 3. Peso corporal (g) determinado en días específicos en los grupos, hembras controles, hembras experimentales, machos controles y machos experimentales.	26
Tabla 4. Ganancia de peso total determinada entre días específicos en los grupos, hembras controles, hembras experimentales, machos controles y machos experimentales.	27
Tabla 5. Niveles de probabilidad (U de Mann-Whitney) considerando a todos los animales (am y pm) de los grupos: hembras controles, hembras experimentales, machos controles y machos experimentales.	57
Tabla 6. Niveles de probabilidad (U de Mann-Whitney) de la conducta sexual de las hembras considerando a todos los animales.	57
Tabla 7. Niveles de probabilidad (U de Mann-Whitney) de la conducta sexual de los machos, considerando a todos los animales.	58
Tabla 8. Niveles de probabilidad (U de Mann-Whitney) para los indicadores conductuales sin considerar el valor más alto y el más bajo.	58
Tabla 9. Niveles de probabilidad (U de Mann-Whitney) de la conducta sexual de las hembras, sin considerar el valor más alto y el más bajo.	59
Tabla 10. Niveles de probabilidad (U de Mann-Whitney) de la conducta sexual de los machos, sin considerar el valor más alto y el más bajo.	59
Tabla 11. Niveles de probabilidad (U de Mann-Whitney) para los indicadores conductuales (sin parentesco).	60
Tabla 12. Niveles de probabilidad (U de Mann-Whitney) de la conducta sexual de las hembras (sin parentesco).	60
Tabla 13. Niveles de probabilidad (U de Mann-Whitney) de la conducta sexual de los machos (sin parentesco).	61
Tabla 14. Niveles de probabilidad (U de Mann-Whitney) y valores de mediana para los indicadores conductuales.	62
Tabla 15. Niveles de probabilidad (U de Mann-Whitney) y valores de mediana de la conducta sexual de hembras y machos.	63

1. Introducción

1.1. Bioestimulación

La bioestimulación es una técnica ampliamente utilizada en granjas cunícolas para mejorar la receptividad sexual y la fertilidad en hembras lactantes. Dicha técnica consiste en cancelar un episodio de succión, realizando una separación madre-crías por 48 h, generalmente en el día diez de la lactancia (Bonanno y cols. 1999, Bonanno y cols. 2002, Rebollar y cols. 2006, Eiben y cols. 2013).

Durante la lactancia temprana, el estímulo de la succión, inhibe en la madre la secreción del pulso preovulatorio de GnRH, lo que, a su vez, limita la liberación de LH (Pandnabhan y McNeilly 2001, Nicol y cols. 2004). Esto, a su vez, inhibe el desarrollo folicular en el ovario y la secreción de estrógenos (Hamada y cols. 1980, Osteen y Mills 1980, Dorrington y Gore-Langton 1981 citados por Bonanno y cols. 2004). Consecuentemente, la coneja está en estado de anestro, en el que la receptividad sexual está reducida al mínimo y la ovulación no ocurre en respuesta a la cópula (Ubilla y Rebollar 1995, García-Dalmán y González-Mariscal 2012).

Después de la separación madre-crías por 48 h, se restaura el estro en la coneja lactante, y es posible aparearla y provocar el reflejo de ovulación (Bonanno y cols. 1999) o inseminarla artificialmente (Alvariño y cols. 1998, Bonanno y cols. 2004, Rebollar y cols. 2006, Eiben y cols. 2013). Esto lleva a que la hembra esté concurrentemente gestante y lactante (Rebollar y cols. 2006, García-Dalmán y González-Mariscal 2012). Para las crías, la separación por 48 h, en el periodo posnatal temprano, es un estímulo estresante, que modifica su reactividad al estrés cuando adultos (Brecchia y cols. 2009), entendida ésta como la modificación de la respuesta del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA).

1.2. Estrés

El estrés se define como un estímulo puntual, agresivo o no, real o percibido, que amenaza la integridad fisiológica o psicológica de un individuo, frente al cual, el organismo activa un conjunto de reacciones fisiológicas (neuronales, metabólicas y neuroendócrinas) y conductuales adaptativas, que incluyen la activación del sistema nervioso simpático y del eje HHA (Sapolsky 1992, McEwen 2000, Sapolsky 2004, Duval y cols. 2010).

1.3.Reactividad al estrés

La reactividad al estrés está controlada en sus componentes fisiológicos, emocionales y comportamentales, por el factor liberador de corticotropina (CRF). La reacción del eje HHA al estrés, está modulado en su intensidad y su duración por la retroalimentación negativa de los glucocorticoides a nivel del hipocampo (Duval y cols. 2010).

La respuesta al estrés agudo incluye varias regiones cerebrales (e.g. corteza prefrontal, amígdala, hipocampo, hipotálamo) donde se han evidenciado diferencias sexuales, tanto en la estructura como en la función; las regiones límbicas y cerebrales anteriores son extremadamente sensibles a las hormonas liberadas durante el estrés, especialmente a los glucocorticoides (GC). Por otra parte, el estrés crónico causa plasticidad adaptativa en el cerebro, la cual incluye cambios estructurales y funcionales a través de una gran variedad de interacciones entre neurotransmisores locales y hormonas (cortisol, corticosterona, vasopresina, etc.) los cuales reprograman el genoma vía procesos epigenéticos (Duval y cols. 2010, Griffiths y Hunter 2014, Reul 2014, Numan 2015).

1.3.1. Aspectos fisiológicos

La reactividad neuroendócrina al estrés, está dada por la activación del sistema nervioso simpático, que estimula a la glándula adrenal, provocando así la secreción de adrenalina. La adrenalina provoca: aumento en la frecuencia respiratoria (para facilitar el intercambio de oxígeno en los pulmones), incremento de la presión sanguínea (consecuencia de la vasoconstricción), lo cual indirectamente incrementa la fuerza de la contracción cardiaca (ver fig. 1). Además, la vasopresina incrementa la reabsorción de agua en los riñones, incrementando así el volumen sanguíneo (Sapolsky, 1992). Desde 1936, Selye describió el “Síndrome General de Adaptación”, el cual se compone de 3 fases de respuesta ante un estímulo estresante:

1. Fase de alerta. En reacción a un estresor, el hipotálamo estimula a las glándulas suprarrenales (en su parte medular) para secretar la adrenalina, cuyo objetivo es suministrar la energía en caso de urgencia. Habrá entonces una serie de respuestas del organismo como: aumento de la frecuencia cardíaca, vasodilatación, aumento de la vigilancia por efecto de la noradrenalina (NA).

2. Fase de defensa (o resistencia), que se activa solamente si el estrés se mantiene. La corteza suprarrenal va a secretar entonces un segundo tipo de hormona, el cortisol. Su papel, es mantener constante el nivel de glucosa sanguínea para nutrir músculos, corazón y cerebro. Así, la adrenalina suministra la energía de urgencia y el cortisol asegura la renovación de las reservas.

3. Fase de agotamiento (o relajamiento): se instala si la situación persiste, y se acompaña de una alteración hormonal crónica (con consecuencias orgánicas y psiquiátricas). Si la situación persiste, es posible que el organismo se encuentre agotado. Poco a poco las hormonas secretadas son menos eficaces y comienzan a acumularse en la circulación.

En otras palabras, la reactividad al estrés incluye la activación del eje HHA, ya sea por estimulación directa o indirecta de las neuronas parvocelulares en el núcleo paraventricular (NPV) del hipotálamo (Numan, 2015). Esto, a su vez, provoca la liberación del factor liberador de corticotropina (CRF) y de la Arginina-Vasopresina (AVP), que estimulan a las neuronas corticotropas de la adenohipófisis para que se sintetice y secrete la hormona liberadora de corticotropina (ACTH) al torrente sanguíneo. El aumento en los niveles de ACTH en la sangre incrementa la biosíntesis y liberación de glucocorticoides desde la glándula suprarrenal (Lui y cols. 1999, Sapolsky 1992, Griffiths y Hunter 2014).

Los glucocorticoides se encargan de revertir los efectos de la insulina en todas las células; frenan procesos como la absorción de glucosa, la síntesis de proteínas y la síntesis de ácidos grasos (los triglicéridos sufren lipólisis y se liberan ácidos grasos a la circulación) (ver fig. 1). En el músculo, los glucocorticoides detienen el consumo de glucosa y aminoácidos así como la síntesis de glucógeno y proteínas; tanto el glucógeno como las proteínas son degradadas (glucogenólisis y proteólisis, respectivamente) para que la glucosa y los aminoácidos se viertan a la circulación. En el hígado los glucocorticoides, catecolaminas y glucagón estimulan la gluconeogénesis (conversión de los ácidos grasos en aminoácidos y glucosa) (Sapolsky 1992).

Los niveles de glucocorticoides en plasma, están estrechamente controlados mediante la retroalimentación negativa y la secreción de CRF y ACTH gracias a la activación del receptor citoplasmático a mineralocorticoides (MR) localizado en el hipocampo y el septum y/o por la activación de receptores a glucocorticoides (GR) localizados en la adenohipófisis y en todo el SNC (Huot y cols. 2001). No obstante, se sabe que la secreción de glucocorticoides, tiene una ritmicidad circádica (Szeto y cols.2004). Esta ritmicidad, varía de acuerdo al horario de actividad del organismo. En el caso de los conejos, al ser animales crepusculares, su máxima actividad inicia en la tarde, mientras que su periodo de menor actividad es en la mañana (Jilge, 1993, 1995). Szeto y cols. (2004) observaron una tendencia similar en la secreción de glucocorticoides, presentando un pico máximo alrededor de las dieciocho horas y un nivel basal a las seis horas.

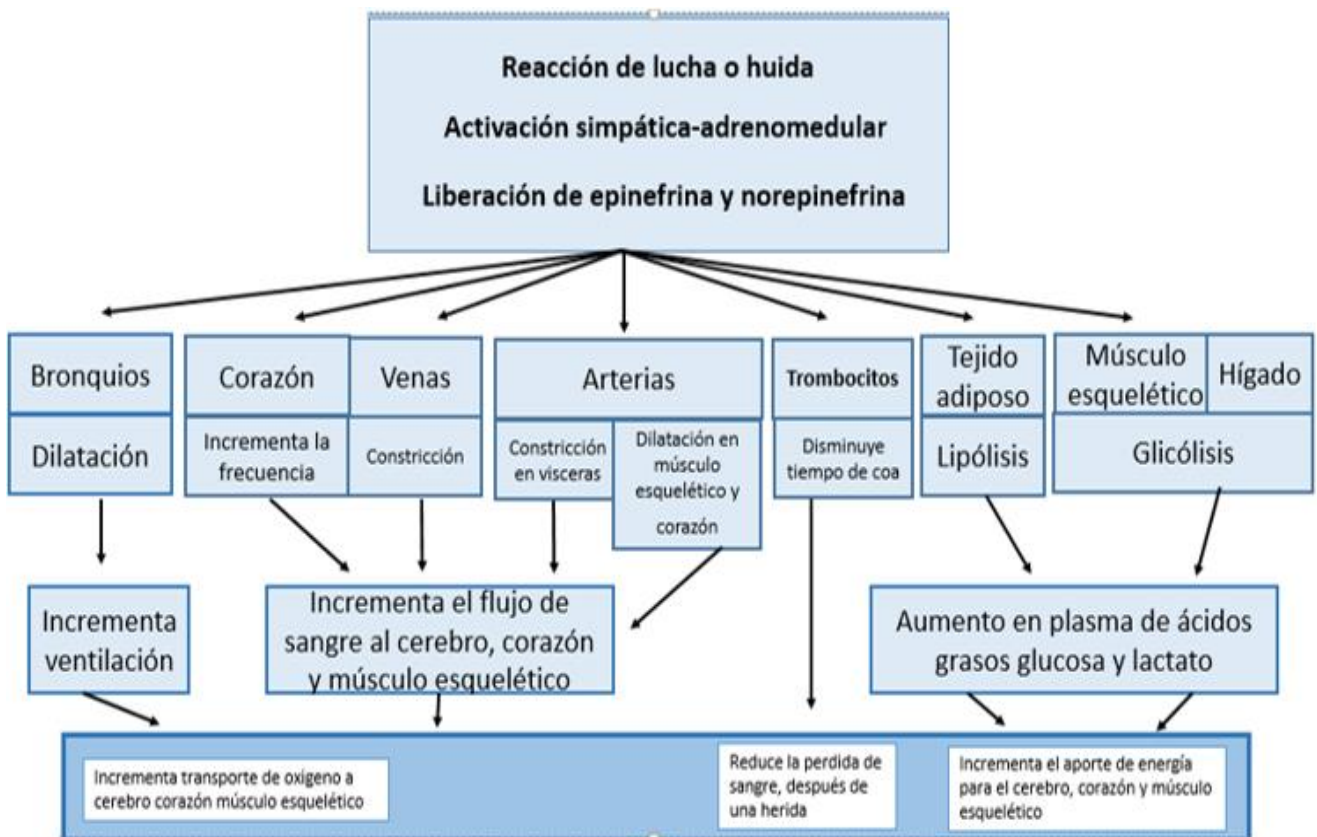


Figura 1 Diagrama. Reacción de lucha o huida (Cannon 1929).

1.3.2. Aspectos comportamentales

El indicador más obvio que tienen los conejos ante la dificultad de hacer frente a una situación estresante, es el cambio en su comportamiento (De la Fuente-Vázquez 2003, Keating y cols. 2012). Las tres respuestas comunes ante una amenaza potencial son: a) reacción de inmovilidad, b) agresión y c) reacción de huida (Brown 2012). Por ejemplo, los conejos al sentirse amenazados por un ave, pueden reaccionar de dos formas: luchando o quedándose inmóviles, por lo tanto, la duración de la inmovilidad se correlaciona positivamente con el nivel de miedo (Filiou y cols. 2012). Generalmente los altos niveles de inmovilidad *freezing* están asociadas con altos niveles de ansiedad, mientras que las conductas proactivas, como la reacción de huir están asociadas con altos niveles de impulsividad y agresión (Benus y cols. 1991, Lopez-Aumatell y cols. 2008 citado por Gorka y cols. 2016).

La forma en la que los conejos reaccionan a situaciones potencialmente peligrosas, se basa en una estrategia activa o pasiva de hacerle frente al ambiente, por ejemplo, los individuos activos (proactivos) se esfuerzan por evitar estímulos estresantes, mientras que los pasivos (reactivos) muestran una reducción en la reactividad (Kowalska y cols. 2008, Zyablisteva y Pavlova 2008, Vindas y cols. 2017). La respuesta conductual ante un estímulo estresante, puede variar considerablemente entre individuos (Wilson 1998). No obstante, los estilos (también conocidos como personalidad) son consistentes a través del tiempo y en diferentes situaciones experimentales (Koolhaas y cols. 1999, Vindas y cols. 2017).

De acuerdo con varios estudios en diferentes especies, el fenotipo conductual o la personalidad de los animales, se define como una serie de respuestas (fisiológicas y conductuales) ante un estímulo estresante, consistentes a través del tiempo (Koolhaas y cols. 1999), que se clasifican en: audaz o tímido (Wilson 1994, Gosling y John 1999, Rödel y cols. 2006, Stamps y Groothuis 2010; citados por Rödel y Monclús 2011). Los animales caracterizados como tímidos exploran menos (campo abierto) y muestran una mayor actividad neofóbica (eje HPA) comparados con los animales caracterizados como audaces, los cuales, son más territoriales y agresivos (Koolhaas y cols. 1999, Rödel y cols. 2006).

Es importante resaltar que las diferencias sexuales son una parte crítica en el entendimiento de la relación entre el estilo conductual (audaz o tímido) y la variación individual en los rasgos de comportamiento (reactivo o proactivo) (Gorka y cols. 2016). Asimismo, es importante tener en cuenta, diversos factores que afectan el estilo conductual de los animales, por ejemplo: las experiencias tempranas, el soporte social, las condiciones ambientales y de alojamiento, y las manipulaciones (Gallup 1974, Bryan Jones 1986, Koolhaas y cols. 1999, Fontani y cols. 1999: citados por Verwer y cols. 2009).

2. Antecedentes

2.1. Neurodesarrollo

Rice y Barone Jr. (2000) indican que durante el período posnatal temprano se llevan a cabo en el cerebro procesos de proliferación celular, migración neuronal, diferenciación de neuronas y glía, sinaptogénesis, mielinización, apoptosis, entre otras. Por esta razón, durante esa etapa los individuos son altamente susceptibles a los estímulos ambientales, que ejercen efectos profundos y duraderos sobre la magnitud de la respuesta al estrés (aspectos conductuales y neuroendócrinos) cuando adultos (Liu y cols. 1999; González-Mariscal y Kinsley, 2009; González-Mariscal y Melo, 2013; Melo 2015).

2.1.1. Ratas

En las ratas, el periodo hiporesponsivo al estrés, protege el cerebro de los neonatos de los efectos catabólicos de los glucocorticoides, reduciendo la sensibilidad del eje HHA. Esta responsividad reducida no es absoluta pues puede ser superada por un fuerte estresor, como es la separación materna (Huot y cols. 2001).

2.1.1.1. Manipulación de las crías

Durante el periodo posnatal temprano, la madre es la principal fuente de estímulos: sociales, sensoriales (visuales, auditivos, olfativos y táctiles) y químicos (a través de la leche) (Melo, 2015). Además, se sabe que la intensidad y frecuencia de los cuidados maternos tienen una fuerte influencia sobre el comportamiento de la progenie (Liu y cols. 1999, 2000, Rödel y Monclús 2011). Así, la manipulación de las crías de rata (retirando a las crías del nido durante

quince minutos al día, durante los primeros catorce días) estimula en la madre, un incremento en la conducta de lamido y acicalamiento (Huot y cols. 2000) asemejando los cuidados que las madres muy lamedoras brindan a sus crías (Macri y cols. 2004, Plotsky y Meaney 1993).

No obstante, los protocolos de separación madre-crías por 180 min (Anisman y cols. 1998), asemeja las condiciones de las crías de madres poco lamedoras (Huot y cols. 2001). Ambas manipulaciones tienen efectos a largo plazo sobre ciertas respuestas fisiológicas al estrés en la progenie cuando adulta (González-Mariscal y Melo en prensa).

2.1.1.1.1. Efecto sobre la reactividad conductual

Algunos de las características que se observan en los animales criados por madres muy lamedoras, también se presentan en los animales manipulados. La manipulación consistió en separar a las crías de sus madres durante quince min, una vez al día, durante los primeros catorce días de vida (Macri y cols. 2004, Plotsky y Meaney 1993). Cuando adultos, estos animales son menos emocionales, y se adaptan mejor a ambientes nuevos, tienen una respuesta cognitiva más eficiente (atención y aprendizaje) y son menos agresivos. Además muestran menos conductas que asemejan ansiedad, depresión y un menor número de respuestas al estrés, lo que refleja una moderada reactividad del eje HAA y un bajo nivel de miedo (Menard y Hakvoort 2007, Caldji y cols. 2000, Macri y cols. 2004, Cirulli y cols. 2003). En la prueba de intruso-residente, dichos animales muestran más conductas exploratorias en un ambiente novedoso, pasan menos tiempo enterrando la sonda de choque y desarrollan pocas respuestas defensivas (Padoin y col. 2001). Además, se desempeñan mejor en pruebas de memoria y aprendizaje espacial (Kember y cols. 2012, Liu y cols. 2000).

2.1.1.1.2. Efectos sobre la fisiología

Cuando adultos, los animales criados por madres altamente lamedoras tienen menos ACTH y corticosterona en plasma en respuesta a un estrés por restricción, gracias a una mayor sensibilidad hacia los glucocorticoides y su retroalimentación negativa, lo que incrementa la transcripción del gen Nr3c1 de los receptores a glucocorticoides (Francis y cols. 1999).

Además tienen incrementada la expresión de RNAm de receptores a glucocorticoides en el hipocampo. Estos animales muestran una disminución en la expresión de RNAm del CRF en el hipotálamo, una disminución en los niveles de receptores a GABA/benzodiazepinas, un incremento en los receptores a benzodiazepinas en la amígdala y un incremento en la liberación de dopamina en el núcleo accumbens (Liu y cols. 1997, 2000, Caldji y cols. 1998, 2000, Francis y cols. 1999, Sapolsky y cols. 1985).

Además, ocurren cambios neuroanatómicos tales como: el incremento en la supervivencia y la sinaptogénesis hipocampal, el incremento en la ramificación y densidad dendrítica de las neuronas piramidales del CA1, así como el incremento de la supervivencia neuronal hipocampal (Liu y cols. 1997)

2.1.2. Conejos

A diferencia de las ratas, los gazapos no tienen periodo hiporesponsivo al estrés, pues diferentes autores (Rovirosa y cols. 2005, Morgado y cols. 2008, 2010, Brecchia y cols. 2009) han descrito la secreción rítmica de corticosterona en las crías de conejo desde el día posnatal (DPN) dos. De acuerdo con Morgado y cols. (2011) el horario en el que se realiza el amamantamiento (comparando entre grupos alimentados a las dos o a las diez horas) sincroniza en las crías, la actividad anticipatoria (AA), los niveles de glucosa en plasma y la secreción de corticosterona. Los niveles de corticosterona se incrementan alrededor del amamantamiento, donde el pico máximo coincide con la AA.

2.1.2.1. Manipulación de las crías

De manera natural, las hembras amamantan a sus gazapos una vez al día, con ritmicidad circadiana (Jilge 1993, 1995), durante la fase de oscuridad (entre las 2-4 de la mañana) (Morgado y cols. 2010, González-Mariscal y cols. 2013). La coneja entra al nido, adopta la posición de cifosis sobre los gazapos y los amamanta durante 3-5 min (González-Mariscal y cols. 1994, Bautista y cols. 2005, Caba y González-Mariscal 2009, González-Mariscal y cols. 2016).

Como se dijo anteriormente, la bioestimulación consiste en cancelar un episodio de succión, al separar a los gazapos de su madre durante 48 h (cerrando la puerta del nido), procedimiento que restaura el estro en la madre lactante. Esta manipulación se puede realizar entre los DPN 2-4 (Rebollar y cols. 2006) o entre los DPN 9-11 (Bonanno y cols. 2002, 2004, Brecchia y cols. 2009, García-Dalmán y González-Mariscal. 2012, Eiben y cols. 2013). La cancelación de un episodio de succión, disminuye la supervivencia y el peso de los gazapos en el periodo pre-destete (Bonanno y cols. 2004, Rebollar y cols. 2006) y su reactividad al estrés cuando adultos (Brecchia y cols. 2009).

Por otro lado la manipulación crónica de los animales (tocando con la mano a las crías) ha mostrado ser efectiva para reducir el miedo de los animales hacia el humano (Jones y Faure 1981) en borregos, puercos, ratas y conejos. En conejos se encontró que el periodo más sensible para el aprendizaje es la primera semana de vida, alrededor del amamantamiento (Hudson y Distel, 1994, Bilkó y Altbäcker 2000, Pongrácz y Altbäcker 2003 Csatádi y cols.2005, Dúcs y cols. 2009). Debido en parte a la actividad anticipatoria (AA) (2-3 h antes del amamantamiento). Durante la AA se incrementa el estado de alerta, la movilidad y la excitabilidad del cerebro (Caba y González-Mariscal 2009, Morgado y cols. 2010). Lo que favorece en los gazapos un aprendizaje rápido, con efectos a largo plazo (6 meses) (Bilkó y cols. 1994, Bilkó y Altbäcker 2000, Pongrácz y Altbäcker 2003).

Por ejemplo, Kersten y cols. (1989) no observaron diferencias significativas entre los conejos manipulados y no manipulados en la prueba de campo abierto. La manipulación consistió en remover a los gazapos del nido, uno por uno, y colocarlos en una charola de plástico durante tres min; posteriormente los gazapos se regresaban al nido. Esta manipulación se realizó diariamente durante los DPN 0-10 o durante los DPN 11-20. En este experimento no se realizaba lactancia controlada, es decir, el nido permaneció siempre abierto, por lo que la hembra amamantaba a sus gazapos *ad libitum*

Posteriormente, Pongrácz y Altbäcker (1999) mostraron que las manipulaciones (acariciar con la mano a los gazapos dentro del nido) realizadas varias horas antes, o varias horas después del amamantamiento, durante la primera semana de vida, no modificaron la conducta de los animales a largo plazo. Por el contrario, los gazapos manipulados 15 min antes o después del amamantamiento, durante la primera semana de vida, mostraron una reducción en la respuesta de miedo hacia el humano, desde el DPN 28 y hasta los 6 meses de edad (Bilkó y Altbäcker 2000).

Pongrácz y cols. (2001) compararon 3 grupos de conejos: a) Controles o no manipulados, b) Manipulados por un humano (la manipulación consistió en tomar a los gazapos con la mano, de forma individual, y colocarlos en una charola de plástico vacía, y posteriormente los regresaban al nido), c) Expuestos a un gato (colocaron un gato dentro del nido, durante 3 min). La manipulación se realizaba 15 minutos antes del amamantamiento y las consecuencias de ello se evaluaron en el DPN 28. Sorprendentemente, los animales no manipulados (a) evitaban tener contacto tanto con humanos como con gatos. Por otro lado, los animales manipulados por humanos (b), evitaron el contacto con gatos, pero no con humanos. Los conejos que fueron expuestos a un gato (c), evitaron el contacto con el humano, pero no con el gato. Estos resultados sugieren que durante el periodo posnatal temprano los conejos son capaces de desarrollar una memoria de reconocimiento, que va asociada a una pérdida de miedo a un estímulo específico.

Otro de los protocolos de manipulación utilizados comúnmente en conejos, consiste en sacar del nido a los gazapos, colocarlos dentro de una charola de plástico con aserrín, llevarlos a pesar (sobre una báscula) de manera individual y posteriormente regresarlos al nido (esta manipulación no excede los 5 min por camada) (Bilkó y Altbäcker 2000). Verwer y cols. (2009) realizaron esta manipulación en conejos (machos) durante las primeras 4 semanas de vida, 15 min antes del amamantamiento y encontraron que los animales que fueron manipulados (pesados 6 veces a la semana) expresaban más comportamientos proactivos en comparación con los animales no manipulados (pesados 1 vez a la semana) que fueron más reactivos.

Debido a su condición altricial, los gazapos nacen sin pelo, incapaces de regular su temperatura corporal, con poca coordinación y con los ojos y oídos cerrados (Whyly y cols. 1974, Caba y González-Mariscal 2009). No obstante el sentido del olfato es funcional desde el nacimiento, por lo que podría ser la modalidad sensorial primaria en procesos de aprendizaje temprano (Nowak y cols. 2000, Caba y González-Mariscal 2009). Ayudando a distinguir entre conespecíficos y predadores, mejorando así su supervivencia (Pongrácz y Altbäcker 2000). Consistentemente, Dúcs y cols. (2009) encontraron que la simple exposición al olor de un humano (colocando la mano dentro del nido a 5 cm de los gazapos durante dos minutos, quince minutos antes del amamantamiento, durante la primera semana de vida) altera el comportamiento y el estado fisiológico de los animales, del mismo modo que la manipulación, tocando a los gazapos con la mano (Pongrácz y Altbäcker 2001). Cuando adultos, los animales no manipulados reaccionan al humano (experimentador) como a un predador (Suarez y Gallup 1981; citado por Dúcs y cols. 2009), mientras los animales manipulados podrían responder al humano como a un conespecífico (Pongrácz y cols. 2001), mostrando bajos niveles de miedo y emocionalidad, y una mayor conducta exploratoria (Denenberg y cols. 1997, Dúcs y cols. 2009).

2.1.2.1.1. Efecto sobre la reactividad conductual

Cuando los gazapos son amamantados una vez al día, muestran una típica actividad anticipatoria al amamantamiento, destapándose del material del nido (paja y pelo), moviéndose y lamiéndose a sí mismos y encimándose entre ellos. Por el contrario, después de la cancelación de un episodio de succión (DPN 10) los gazapos disminuyen su actividad, se destaparon del material del nido pero permanecen más quietos y más juntos entre sí, amontonándose y durmiendo (muy pocos animales se muestran activos, encimándose sobre el resto de los gazapos inactivos) (Brecchia y cols. 2009).

En la tabla 1 se observan diferentes protocolos de manipulación en el periodo posnatal temprano y sus efectos sobre la reactividad al estrés, evaluada a diferentes edades, utilizando diversas pruebas conductuales.

Tabla 1. Efecto de las manipulaciones en conejos, durante el periodo posnatal temprano, sobre la reactividad al estrés, evaluada a diferentes edades, utilizando diversas pruebas conductuales.

Prueba	Edad	Controles	Manipulados	P	Referencia	Observaciones
<i>Reflejo de enderezamiento</i>	84 d	Sensibilidad=45% LE= 57.09 ± 76.92 (s)	Sensibilidad=60% LE= 31.75 ± 23.4 (s)	>0.05	Verwer y cols. 2009	Machos
	112 d	Sensibilidad=20% LE= 73.81 ± 95.35 (s)	Sensibilidad=80% LE=112.5±138.7 (s)	>0.05		Machos castrados
<i>Aproximación a: Humano</i>	28 d	LA=250 (s) NC=0.5	LA=50 (s) NC=6	<0.05 <0.05	Bilkó y Altbäcker 2000	Conejos Salvajes
	28 d	LA=160 (s) NC=1	LA=20 (s) NC=6.5	<0.05 <0.05		Conejos domésticos
<i>Humano</i>	28 d	LA= 25.54 (s) NC=1.8	LA= 41.21 (s) NC=6.74	<0.01 <0.05	Pongrácz y cols. 2001	Ambos sexos
<i>Humano</i>	28 d	LA=140 (s) NC=1.8	LA= 17.14 (s) NC=9.97	<0.001 <0.01	Pongrácz y cols. 2001	Ambos sexos
<i>Gato</i>	28 d	LA=122 (s) NC=1.8	LA=120 (s) NC=1.8	>0.05 >0.05	Pongrácz y cols. 2001	Ambos sexos
<i>Humano</i>	28 d	LA=170 (s) NC=2	(G2) LA=15.52 (s) (G2) NC=33 (G1) LA=160 (s) (G1) NC=2.5	<0.001 <0.001	Pongrácz y Altbäcker 2003	G1= manipulados 6h después del amamantamiento G2= manipulados 0.25h antes del amamantamiento
<i>Humano</i>	70 d	LA=84.29 ± 101.58 (s) NC=0.4 ± 0.75	LA=27.86 ± 47.22 (s) NC=1.9 ± 1.41	0.054 <0.05	Verwer y cols. 2009	Solo machos
<i>Campo abierto</i>	98 d	LSM= 90.2 (s) R= 10.1	(G1) LSM= 94 (s) (G1) R= 11.9 (G2) LSM= 76.1 (s) (G2) R= 14.3	>0.05 >0.05 >0.05 >0.05	Kersten y cols. 1989	Ambos sexos G1= manipulados los DPN 1-10 G2= manipulados los DPN 11-20
<i>Campo abierto</i>	85 d	TE= 21.15 ± 12.49 (s) TC= 5.26 ± 3.11 (s)	TE= 40.88 ± 11.12 (s) TC= 10.07 ± 3.19 (s)	<0.001 <0.001	Verwer y cols. 2009	Solo machos
<i>Objeto novedoso</i>	49 d	LA= 43.02 ± 34.21 (s) LC= 58.59 ± 43.56 (s)	LA= 13.99 ± 18.12 (s) LC= 30.69 ± 35.97 (s)	0.002 0.04	Verwer y cols. 2009	Solo machos

En la prueba de reflejo de enderezamiento se evaluaron: la Sensibilidad= Porcentaje de animales que entraron en inmovilidad con 3 intentos o menos; LE= Latencia a enderezarse, entendido como el tiempo en segundos que los animales permanecieron en posición supina.

En la prueba de Aproximación se evaluaron: LA= Latencia a la primera aproximación, entendido como el tiempo en segundos que el animal tardó en aproximarse a la mano del experimentador o al gato (menos de 5 cm de distancia); NC= Número de contactos que el animal realizó durante la prueba (tocando con su nariz la mano del experimentador).

En la prueba de campo abierto se evaluaron: LSM= Latencia a salida de la madriguera, entendido como el tiempo en segundos que se tardó el animal en salir de la madriguera hacia el campo abierto; R= Recorrido o número de líneas cruzadas; TE=Tiempo explorando, entendido como el tiempo en segundos que el animal dedicó a explorar el entorno; TC=Tiempo caminando, entendido como el tiempo en segundos durante el cual el animal caminó.

En la prueba de objeto novedoso se evaluaron: LA= Latencia a la primera aproximación, entendido como el tiempo en segundos que el animal tardó en aproximarse al objeto novedoso; LC= Latencia al primer contacto, entendido como el tiempo en segundos que el animal tardó en tocar con su nariz el objeto novedoso.

2.1.2.1.2. Efectos sobre la fisiología

Brecchia y cols. (2009) tomaron muestras de sangre de los gazapos desde el DPN 2 hasta el DPN 14, para comparar la secreción de corticosterona entre los gazapos separados de su madre por 48 h (SMC) y aquellos en los cuales no se canceló un episodio de succión. Encontraron que en el DPN 10 los niveles de corticosterona eran similares entre los animales controles y los del grupo SMC. En el DPN 11 los niveles de corticosterona en plasma se incrementaron a $17.7 \pm 1.3 \mu\text{g/dl}$ en los animales SMC, nivel significativamente mayor al observado en los animales controles ($9.3 \pm 1.2 \mu\text{g/dl}$) (ver fig. 2).

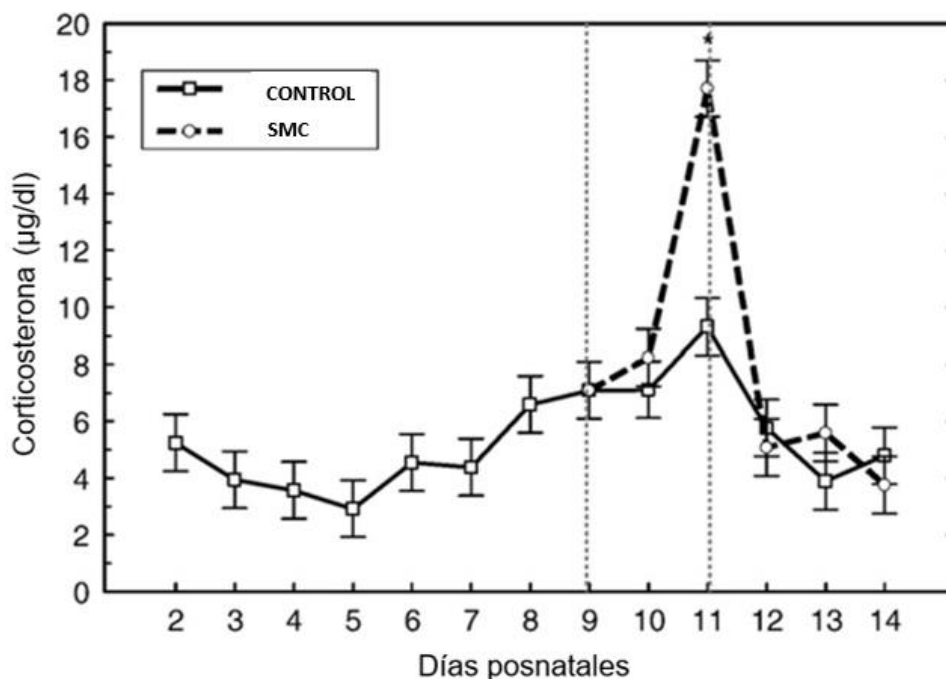


Figura 2. Grafica de los niveles de corticosterona ($\mu\text{g/dl}$) en gazapos.

Los valores se encuentran expresados en media \pm error estándar. Las muestras de sangre se obtuvieron entre los DPN 2 a 14 por punción cardiaca utilizando animales diferentes cada día ($N=5$) (Brecchia y cols. 2009).

En el mismo estudio Brecchia y cols. (2009) compararon en el DPN 14 los niveles de corticosterona en plasma, después de inyectar solución salina intramuscular, entre animales controles y SMC. Encontraron que los niveles de corticosterona basal fueron similares en animales controles y SMC (2.19 ± 0.4 vs 2.35 ± 1.1 $\mu\text{g/dl}$) respectivamente. Después de la inyección de solución salina, los animales SMC mostraron una baja reactividad, con un modesto cambio en la concentración de corticosterona (30 min), mientras los animales controles respondieron con un incremento significativo en la concentración de corticosterona en plasma (ver fig. 3a).

Brecchia y cols. (2009) repitieron la prueba de inyección salina a los 120 días de edad en 5 hembras por grupo, y nuevamente los valores basales de corticosterona fueron similares entre controles y SMC (8.8 ± 3.2 vs 9.7 ± 2.8 $\mu\text{g/dl}$) respectivamente. En respuesta a la inyección de solución salina, la concentración de plasma en los animales controles aumento a partir del minuto 30 post-inyección, mientras el grupo de animales separados apenas incremento levemente (ver fig. 3b).

Posteriormente, se les administró una inyección de ACTH, y los niveles de corticosterona en plasma fueron similares en ambos grupos (ver fig. 3c), lo que indica, que la capacidad de la glándula adrenal para secretar corticosterona no se vio afectada por la separación madre-crías durante 48 h.

Figura 3. Niveles de corticosterona en respuesta a la inyección de solución salina

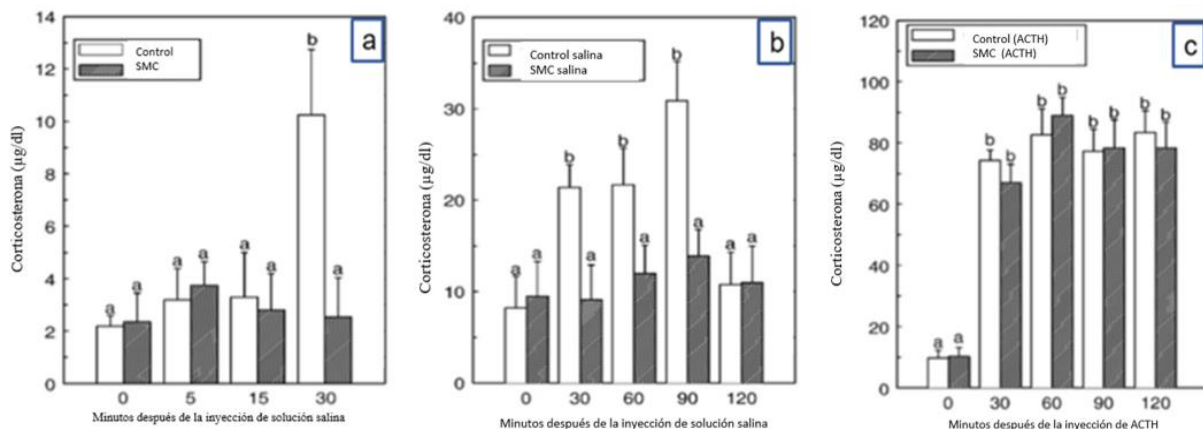


Figura 3. Graficas de los niveles de corticosterona en plasma (µg/dl). Después de la inyección de solución salina en el DPN 14 (a). Después de la inyección de solución salina a los 120 días (b). Después de la inyección de ACTH a los 120 días (c) (Brecchia y cols. 2009).

Brecchia y cols. (2009) evaluaron la cantidad de receptores a glucocorticoides en el hipocampo y en el área dorso-medial del hipotálamo en animales controles y SMC en el DPN 14. No observaron diferencias en el número de receptores a glucocorticoides en el hipocampo en ambos grupos (94.2 ± 1.1 vs 93.9 ± 0.9 , respectivamente). Por otro lado, el número de receptores a glucocorticoides en el hipotálamo fue mayor en los animales SMC (21.4 ± 2.9), comparado con los controles (7.8 ± 1.3) (ver fig. 4 e, f). Estos resultados sugieren que la retroalimentación negativa de los animales SMC pudiera ser más eficiente en comparación con los animales controles.

Figura 4. Fotografía receptores a glucocorticoides en hipotálamo

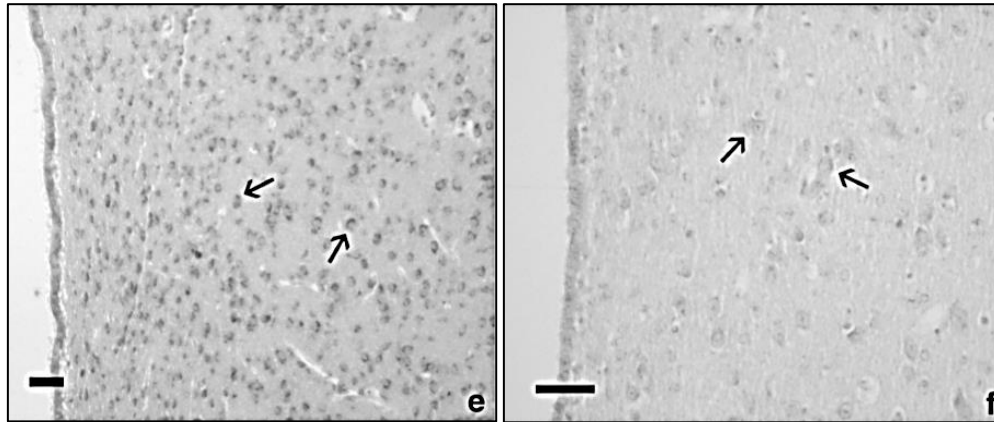


Figura 4. Fotografía de la localización inmunohistoquímica de receptores a glucocorticoides (GR) en la región dorso-medial del hipotálamo en gazapos de 14 días de edad de los grupos, SMC (e) y controles (f). Las flechas indican un punto positivo de localización de GR. La barra = 40 μ m (Brecchia y cols. 2009).

3. Justificación

La separación madre-crías durante 48 horas es un manejo común en granjas cunícolas para restaurar el estro en conejas lactantes. Sin embargo, se desconocen las consecuencias de este procedimiento a largo plazo, sobre la reactividad conductual y neuroendocrina de las crías cuando adultas (ambos sexos).

4. Hipótesis

Las crías separadas de su madre por 48 horas en el día 10 de vida tendrán una reactividad conductual y neuroendócrina diferente a los animales controles cuando adultos.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Evaluar las consecuencias de la separación madre-crías por 48 h sobre la reactividad conductual y neuroendócrina de conejos blancos NZ adultos.

5.2. Objetivos particulares

- Evaluar la reactividad conductual (ambos sexos) a través de una batería de pruebas ya validadas
- Evaluar la reactividad neuroendócrina (ambos sexos) a través de la medición de glucocorticoides en plasma
- Evaluar la reactividad de los animales con base en el horario en el que se aplican las pruebas

6. Metodología

6.1. Animales y alojamiento

Los animales se alojaron bajo condiciones de bioterio, con un fotoperiodo 14 h luz:10 h oscuridad (la luz se encendía a las siete horas), a temperatura ambiente (13-25 °C). Los conejos fueron alimentados con agua y alimento comercial (Conejina Purina) *ad libitum*. Se utilizaron dieciocho hembras nodrizas (nueve nulíparas y nueve múltiparas), raza Nueva Zelandia blanca, de cuatro a doce meses de edad, con un peso vivo de 3.6 a 4.2 kg, procedentes de la colonia del Centro de Investigación en Reproducción Animal (CIRA). Las hembras fueron apareadas con machos sexualmente activos, de la misma raza y provenientes de la misma colonia. Todas las hembras fueron alojadas en jaulas maternas de alambre galvanizado (90 cm largo X 60 cm ancho X 40 cm de alto). El día veinticuatro de gestación se les introdujo dentro de la jaula una caja nido de madera (50 cm largo X 30 cm ancho X 32 cm alto) y 300 g de paja.

6.2. Grupos experimentales

Siguiendo el procedimiento descrito por Bautista y cols. (2005) en el día del parto se ajustó la camada a seis gazapos, seleccionando a los animales más pesados. Después del ajuste de camada se cerró el nido, para poder controlar la hora del amamantamiento (Bonanno y cols. 2004). El nido se abrió todos los días a las once horas (para que la madre amamantara a sus crías) y se cerró inmediatamente después de que salía la hembra. Este procedimiento fue igual para todos los grupos del día postnatal (DPN) 1 al DPN 9 pero, en el DPN 10, no se abrió la puerta de los nidos correspondientes a las camadas experimentales. Así, los gazapos

experimentales se mantuvieron separados de su madre durante 48 h, i.e., desde las once horas del DPN 9, hasta las once horas del DPN 11, entonces, se abrió nuevamente la puerta del nido y se le permitió a la hembra amamantar a sus crías.

El control de la lactancia se realizó hasta el DPN 14. A partir de este día, el nido permaneció abierto, por lo que tanto la coneja como los gazapos tuvieron libre acceso a agua y alimento y permanecieron en la misma jaula hasta el destete en el DPN 30. El destete se realizó retirando el nido y la madre de la jaula maternal. Todos los gazapos de la camada permanecieron en esa jaula hasta que fueron sexados, por observación de la zona genital, como lo describen Bautista y cols. (2005), y reubicados en jaulas individuales en el DPN 45.

6.3. Pruebas fisiológicas

6.3.1. Medición del peso corporal

Seguimos el procedimiento descrito por (Bilkó y Altbäcker 2000), para pesar a todos los animales. En el DPN 0 se extrajo a los gazapos de la caja nido, se transportaron hasta la báscula, en un recipiente de plástico cubierto con papel, donde se pesaron de forma individual, después de registrar los pesos de todos los gazapos, se ajustó la camada, seleccionando a los 6 animales más pesados. En el DPN 16 y 30, los gazapos fueron pesados, nuevamente, se retiró a todos los animales de la caja nido y se transportaron en una caja de plástico, hasta la báscula, donde fueron pesados de forma individual. En los DPN 45 y 120 se pesó a los animales de forma individual. Se transportó a cada animal de forma individual en una caja de plástico, desde su jaula hasta la báscula, se registró su peso y se devolvió a su jaula. Todos los manejos de pesaje se realizaron después de las catorce horas.

6.3.2. Medición de glucocorticoides en plasma

Seguimos el procedimiento de Brecchia y cols. (2009). Se le colocó a cada animal un catéter intravenoso un día antes de la prueba de inyección de solución salina. Para colocar el catéter, primero se rasuró la oreja y 20 min antes de cateterizar, se le aplicó un anestésico local en forma de pomada (contenido: clorhidrato de lidocaína 2 g, naproxeno 10 g, salicilato de metilo 15.2 g y mentol 7.7 g, excipiente c.b.p. 100g). Pasados los 20 min, se retiró la pomada con una torunda de algodón, se colocó el catéter intravenoso (Punzocat No. 19) y se

administraron 0.6 ml de heparina dentro del catéter para evitar la coagulación. Inmediatamente después se tapó y fijó el catéter con cinta adhesiva.

Al día siguiente, se extrajo al animal de su jaula y se llevó a la mesa de madera, donde se le retiró la tapa al catéter y se colectó en un tubo de vidrio la muestra de sangre basal (Tiempo 0), inmediatamente después se colocó de nuevo el tampón del catéter. Después de colectar la muestra de sangre el animal fue levantado, sujetándolo con ambas manos, y se le aplicó una inyección intramuscular (IM) de 0.5 ml de solución salina. Posterior a esto, el animal se devolvió a su jaula. A los 30, 90 y 120 min post-inyección, se colectaron las muestras de sangre (Tiempos 30, 90 y 120 respectivamente) sacando al animal de su jaula en cada ocasión para llevarlo a la mesa de madera y regresándolo a su jaula después de la toma de sangre. Después de la última muestra (Tiempo 120) se le retiró con cuidado el catéter de la oreja, dando por concluida la prueba.

6.4. Pruebas conductuales

La mitad de los animales de cada grupo se asignó al azar, para probarse en la mañana (8-10 am) o en la tarde (4-6 pm). En el DPN 100 se realizaron los siguientes tres grupos de pruebas conductuales: 1) reflejo de enderezamiento; 2) aproximación al humano; 3) campo abierto. Las pruebas se aplicaron en orden aleatorio para cada animal, dejando un día de descanso entre cada prueba conductual y una semana de descanso para la prueba de conducta sexual. A continuación se describe la manera específica en la que se realizó cada prueba.

6.4.1. Reflejo de enderezamiento

Seguimos el procedimiento descrito por Verwer y cols. (2009). Se extrajo al animal de su jaula y se llevó hasta una mesa de madera sobre la cual se posó al animal por unos segundos antes de colocarlo sobre la mesa de prueba. Esta consistió en una superficie de acero inoxidable con una bisagra al centro, lo cual nos permitía tener una superficie en forma de V (ver fig. 5). Se sujetó al animal por la piel suelta encima de las escapulas, para luego alzarlo y girarlo 180° con gentileza hasta que quedara en posición supina (si después de 20 s el animal seguía forcejando o intentando enderezarse, se colocaba nuevamente en la mesa de madera y se repetía el procedimiento, máximo 3 veces). Una vez que el animal dejó de forcejear, se colocó en la

mesa de prueba. A partir de entonces se midió la latencia del animal a enderezarse (s). La duración máxima de la prueba fue de 180 segundos. Aquellos conejos que permanecieron en posición supina más de 179 s, se tocaron en alguna de sus extremidades para que se enderezaran, con lo cual se terminaba la prueba. Inmediatamente después el animal fue devuelto a su jaula.

Figura 5. Fotografía de la mesa utilizada para la prueba de reflejo de enderezamiento



Figura 5. Fotografía de la mesa de cirugía en forma de V donde se coloca al animal en posición supina para realizar la prueba de reflejo de enderezamiento.

6.4.2. Aproximación al humano

Seguimos el procedimiento descrito por Dúcs y cols. (2009). Dentro del bioterio se colocó una arena redonda de 1 metro de diámetro. A un costado de la arena, se encontraba una persona sentada, que introducía una mano dentro de la arena (ver fig. 6). Para esta prueba el animal se extrajo de su jaula y se colocó dentro de la arena, en el extremo opuesto a la persona. Se midieron: la latencia (s) a aproximarse a la mano de la persona (menos de 5 cm de distancia entre el conejo y la persona) y el número contactos hechos (número de veces que el conejo tocó la mano de la persona con su nariz), durante los 5 minutos que duró la prueba. Al terminar, el animal fue devuelto a su jaula.

Figura 6. Fotografía de la arena redonda utilizada para la prueba latencia a aproximarse



Figura 6. Fotografía de la arena redonda (1m de diámetro) donde se realiza la prueba de latencia a aproximarse, con una persona que introduce la mano a la arena, en el extremo opuesto a donde se coloca al animal.

6.4.3. Campo abierto

Utilizamos el método descrito por Zucca y cols. (2012). Dentro del bioterio se colocó una arena rectangular de malla de alambre (200 cm largo X 150 cm ancho X 50 cm alto), cuyas paredes estaban cubiertas con pellón blanco, sobre un piso marcado con líneas negras, que dividía el área en 9 cuadrantes del mismo tamaño. En el cuadrante del centro se colocaron 3 pilas de ladrillos (3 ladrillos por pila) (Hoffman y cols. 2010). En el cuadrante superior derecho se colocó una madriguera de madera (50 cm largo X 30 cm ancho X 32 cm alto) cuya puerta media 19 cm largo X 15 cm alto (ver fig. 7). El animal se extrajo de su jaula y se colocó en la madriguera, con la puerta cerrada, durante un minuto. Posteriormente se abrió la puerta para permitir que el conejo saliera a la arena. A partir de entonces se midieron: la latencia a salir de la madriguera (s), el número de veces que el animal frotó el mentón (ya sea sobre las pilas de ladrillos, o sobre cualquier superficie dentro de la arena), y el recorrido del animal dentro de la arena (sumando el número de líneas cruzadas), durante los diez minutos que duró la prueba. Al finalizar el animal fue devuelto a su jaula.

Figura 7. Fotografía de arena rectangular donde se realiza la prueba de campo abierto



Figura7. Fotografía de la arena rectangular (2 X 1.5 X 0.5 m) que se utiliza en la prueba de campo abierto, el piso de la arena está dividido en 9 cuadrantes iguales, en el centro de la arena se colocan 3 pilas de ladrillos, en el cuadrante superior derecho se coloca la madriguera.

6.4.4. Conducta sexual

6.4.4.1. Hembras

Seguimos el procedimiento de Melo y cols. (2008). Se extrajo a la hembra de su jaula y se llevó a la arena redonda (1 m de diámetro) donde permaneció durante 10 min. A continuación se introdujo en la arena un macho (sexualmente activo). Se midió la receptividad de la hembra, calculando el cociente de lordosis (se divide el número de veces que la hembra hizo lordosis, entre 3 montas bien orientadas del macho y el resultado se multiplica por cien). La prueba terminó cuando la hembra recibió 3 eyaculaciones ó después de 10 minutos de interacción con el macho. Al finalizar la prueba, se regresó a ambos animales a su jaula.

6.4.4.2.Machos

Se utilizó el procedimiento descrito por Melo y cols. (2012). Se extrajo al macho de su jaula y se colocó en una arena redonda (1 m de diámetro) durante diez minutos. A continuación se introdujo una hembra sexualmente receptiva (ovariectomizada (ovx), tratada con benzoato de estradiol, 5µg/día). Durante la prueba se midieron: la latencia a la primera monta, la latencia a la primera eyaculación y la tasa de error o “*miss rate*” la cual se calcula dividiendo el número de montas entre el número de montas más el número de eyaculaciones y el resultado se multiplica por cien. La prueba terminó cuando el macho realizó 3 eyaculaciones o después de diez minutos de interacción con la hembra, momento en el que la hembra ovx se retiró de la arena. Al terminar la prueba se devolvía al macho a su jaula.

Todos los espacios y materiales (madriguera, arenas, mesas, etc.) fueron limpiados entre cada prueba con una solución compuesta, 20% alcohol, 30% pinol y 50% agua.

6.5.Análisis estadísticos

Los datos del peso corporal (PC) y ganancia de peso corporal (GPC), fueron sometidos a un análisis de varianza como un diseño completamente aleatorizado, usando los procedimientos de Modelos Lineales Generales de SAS (SAS Institute 2002). Las diferencias significativas entre las medias se determinaron utilizando la prueba de rango múltiple de Duncan $p < 0.05$.

Los datos de glucocorticoides, fueron analizados con una prueba de ANOVA, usando los procedimientos de modelo mixto, incluyendo el tratamiento, el horario y la interacción entre tratamiento y horario, así como los minutos a los que fueron tomadas las muestras de sangre, el tratamiento y la interacción entre minutos y tratamiento.

Los datos de cada uno de los indicadores obtenidos en las pruebas conductuales se analizó con la prueba (no paramétrica) U de Mann-Whitney, realizando las siguientes comparaciones: horario (am vs pm), tratamiento (controles vs experimentales) y sexo (hembras vs machos). Los valores de “P” menores a 0.05 indican diferencias significativas.

7. Resultados

En total se trabajó con 94 animales: a) 45 pertenecieron al grupo control: 14 hembras y 9 machos evaluados en la mañana y 14 hembras y 8 machos evaluados en la tarde; b) 49 se asignaron al grupo experimental: 12 hembras y 13 machos evaluados en la mañana y 12 hembras y 12 machos evaluados en la tarde

7.1. Pruebas fisiológicas

7.1.1. Medición del peso corporal

Los datos del peso (g) de los animales el día del parto (DPN0), la identificación de las madres, el tamaño de camada y la mediana del peso (g) por camada (controles y experimentales) se pueden observar en la tabla 2. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el número de nacidos vivos entre las camadas controles y las experimentales. Por otro lado, el valor de mediana del peso por gazapo del grupo control (57.7g) fue significativamente menor ($P=0.027$) que en el grupo experimental (58.3g)

Tabla 2. Peso (g) de las camadas controles y experimentales en el DPN 0 y No. de nacidos vivos.

Camadas Controles			Camadas Experimentales		
ID Madre	No. Nacidos vivos	Mediana Peso (g)	ID Madre	No. Nacidos vivos	Mediana Peso (g)
2529	8	48.5	2528	8	54
2511	9	53.7	2526	5	85.6
2520	8	57.7	2527	3	64.4
2514	8	59.4	2518	10	58.1
S3	8	46	2524	8	67.7
S1	10	65.7	2516	9	66.4
G521	9	64.9	R111	13	41.3
			N411	9	55.2
			N212	9	58.3
Mediana	8	57.7	Mediana	9	58.3
Total	60		Total	74	

ID Madre= Identificación de la madre.

El número de nacidos vivos no fue estadísticamente diferente entre los grupos control y experimental ($P=0.35$). La mediana del peso (g), fue significativamente mayor ($P=0.027$) en las camadas experimentales en comparación con las camadas controles.

En la figura 8 podemos observar el valor de mediana del peso en gramos (DPN 0) de los animales pertenecientes a los grupos: hembras controles, hembras experimentales, machos controles y machos experimentales. El peso de los grupos HC y HE fue similar entre sí, mientras, el peso de los machos controles fue significativamente menor que el de los machos experimentales.

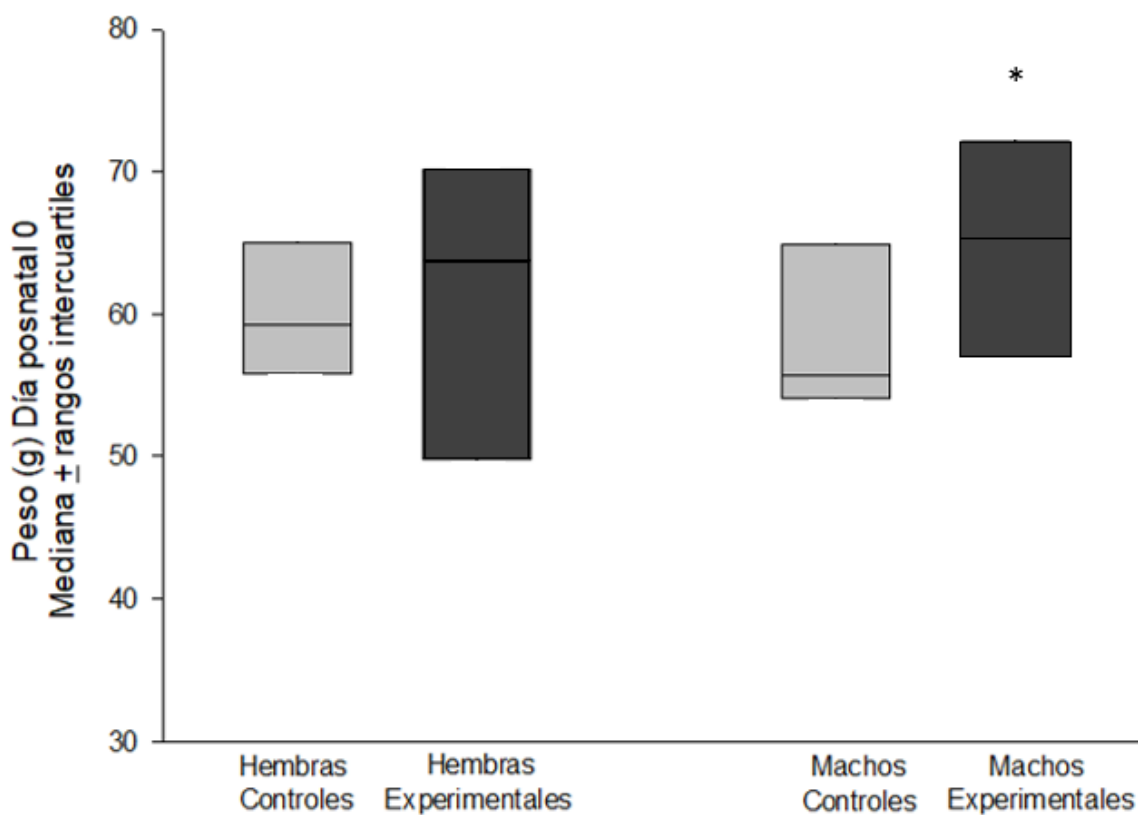


Figura 8. Peso de los gazapos al nacimiento.

Los valores del peso corporal (g) del día de nacimiento (DPN0) se expresan en mediana \pm rangos intercuartiles para los grupos hembras controles (N= 28), hembras experimentales (N=24), machos controles (N=17) y machos experimentales (N=25). No se encontraron diferencias entre el peso de las hembras del grupo control y experimental ($P=0.767$). Por otro lado, el peso de los machos experimentales (67.28 ± 2.32) fue significativamente mayor ($P=0.005$) en comparación con el peso de los machos controles (58.13 ± 1.46).

La tabla 3. Muestra los valores promedio \pm error estándar del peso por gazapo, para los animales de los grupos hembras controles, hembras experimentales, machos controles y machos experimentales, en los días posnatales (DPN) 0, 16, 30, 45 y 120. El peso promedio por gazapo (DPN 0) fue similar entre hembras controles y experimentales, por otro lado, el peso de los machos controles (58.13 ± 1.46) fue estadísticamente menor ($P= 0.005$) comparado con los machos experimentales (67.28 ± 2.32). Después del tratamiento (cancelación de un episodio de succión en el DPN 10), las hembras del grupo control, tuvieron un peso promedio mayor (311.45 ± 9.66) que las hembras experimentales (276.56 ± 7.97) ($P= 0.008$). El peso de los animales en los DPN 30, 45 y 120 no fue diferente entre los animales controles y experimentales (ver tabla 3).

Tabla 3. Peso corporal (g) determinado en días específicos en los grupos, hembras controles, hembras experimentales, machos controles y machos experimentales.

Día	Hembras Controles	Hembras Experimentales	P	Machos Controles	Machos Experimentales	P
0	58.98 ± 1.71	59.80 ± 2.23	0.767	58.13 ± 1.46^b	67.28 ± 2.32^a	0.005
16	311.45 ± 9.66^a	276.56 ± 7.97^b	0.008	307.25 ± 11.55	300.41 ± 10.59	0.671
30	688.29 ± 0.29	649.02 ± 17.17	0.146	679.18 ± 22.36	684.73 ± 22.33	0.866
45	1278.05 ± 37.66	1271.27 ± 44.81	0.907	1271.81 ± 41.58	1306.33 ± 48.84	0.617
120	3199.3 ± 83.17	3388.1 ± 61.33	0.082	3077.62 ± 59.17	3248.91 ± 60.54	0.059

Hembras controles (N=28), hembras experimentales (N=24), machos controles (N=17), machos experimentales (N=25)

Los datos se expresan en media \pm error estándar

^{a-b} superíndices diferentes entre filas indican diferencias estadísticamente significativas ($P<0.05$)

Con los datos de los pesos de cada animal, se obtuvieron los valores de la ganancia de peso entre los días 0-16, 16-30, 30-45, 45-120 y 0-120. Las hembras controles tuvieron una ganancia de peso (252.46 ± 9.16) significativamente mayor ($P=0.003$) entre los días 0-16 comparado con las hembras experimentales (216.75 ± 6.84). En el caso de los machos, no se observaron diferencias significativas ($P= 0.28$) en la ganancia de peso total, entre controles y experimentales entre los días 0-16. Posteriormente, la ganancia de peso entre los días 16-30 y 30-45 fue similar para hembras controles y experimentales, y entre machos controles y experimentales. La ganancia de peso entre los días 45-120 fue significativamente menor ($P=$

0.04) en las hembras controles (1921.26±69.01) comparado con las hembras experimentales (2116.78±59.85). Finalmente, la ganancia de peso del día 0 al 120 no fue diferente (P= 0.07) entre hembras controles y experimentales, ni entre machos controles y experimentales (ver tabla 4).

Tabla 4. Ganancia de peso total determinada entre días específicos en los grupos, hembras controles, hembras experimentales, machos controles y machos experimentales.

Días	Hembras Controles	Hembras Experimentales	P	Machos Controles	Machos Experimentales	P
0-16	252.46±9.16 ^a	216.75±6.84 ^b	0.003	249.11±11.49	233.13±9.18	0.28
16-30	376.84±12.95	372.46±11	0.8	371.93±12.25	384.32±17.50	0.6
30-45	589.76±23.64	622.25±11	0.41	592.64±34.40	621.60±30.07	0.53
45-120	1921.26±69.01 ^b	2116.78±59.85 ^a	0.04	1805.8±64.31	1942.6±77.31	0.21
0-120	3140.3±82.55	3328.2±59.96	0.07	3019.48±58.70	3181.63±61.23	0.07

Hembras controles (N=28), hembras experimentales (N=24), machos controles (N=17), machos experimentales (N=25)

Los datos se expresan en media ± error estándar

^{a-b} superíndices diferentes entre filas indican diferencias estadísticamente significativas (P<0.05).

7.1.2. Medición de glucocorticoides en plasma

Se analizaron las muestras de sangre de ocho hembras controles y ocho experimentales, de las cuales, la mitad fueron muestreadas en la mañana y la otra mitad en la tarde. De cada muestra, se obtuvieron los niveles de cortisol y de corticosterona. Se analizaron de forma independiente los datos de cortisol y corticosterona, comparando entre las muestras tomadas en la mañana o en la tarde.

7.1.2.1. Medición de cortisol

En las hembras controles, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras de cortisol de la mañana (am) y de la tarde (pm) T0 (P=0.12), T30 (P=0.72), T90 (P=0.13) y T120 (P=0.74). En las muestras de corticosterona, tampoco se encontraron diferencias significativas en el grupo de hembras controles, al comparar las muestras de la mañana contra las de la tarde, en todos los tiempos, T0 (P=0.21), T30 (P=0.71), T90 (P=0.42), T120 (P=0.94).

En las hembras experimentales, no se encontraron diferencias entre muestras am y pm en el T0 (P=0.21) ni en el T30 (P=0.17), pero en las muestras T90 y T120 sí hubo diferencias estadísticamente significativas (P=0.02 y P=0.006 respectivamente) (ver figura 9). Con base en estos hallazgos se realizó la comparación entre tratamientos (controles vs experimentales) considerando el horario en que se tomaron las muestras (ver figuras 10 y 11).

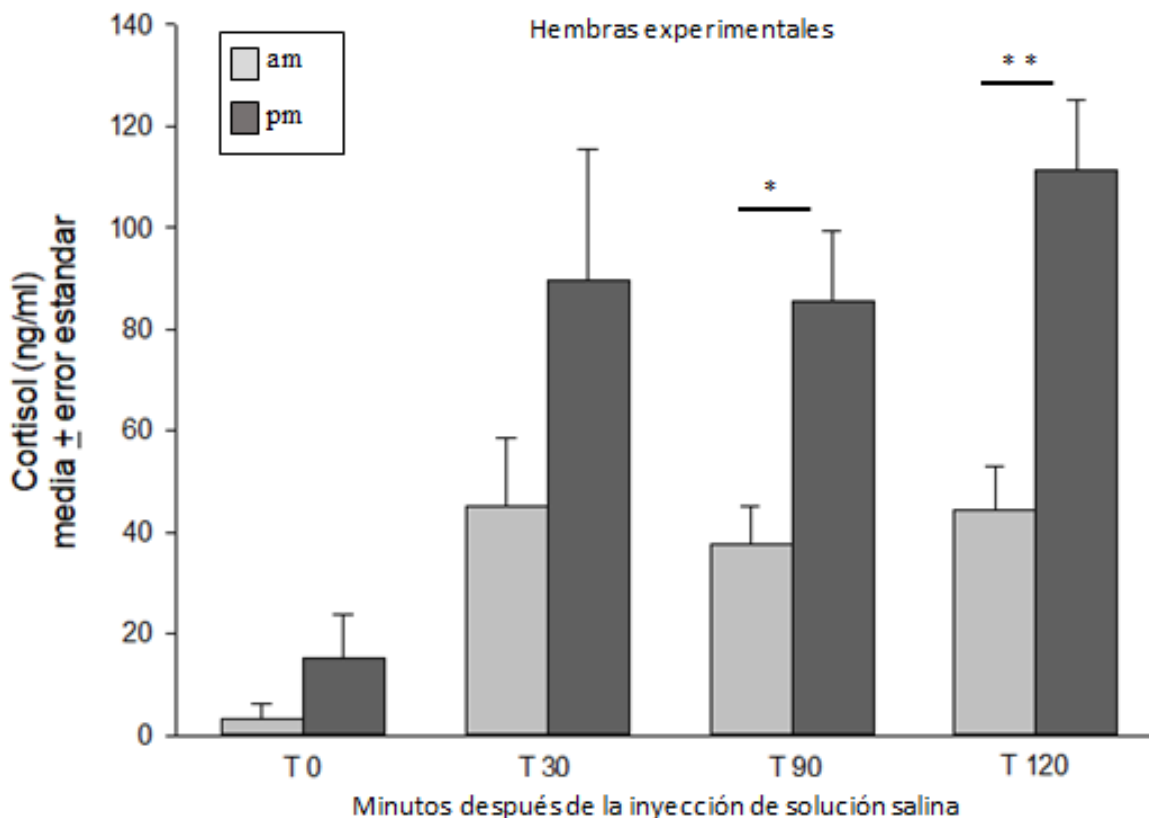


Figura 9. Niveles de cortisol en plasma (ng/ml) en hembras experimentales. Muestras de la mañana (N=4) y de la tarde (N=4). La secreción de cortisol en respuesta a la inyección de solución salina en el T90 (P=0.02) y T120 (P=0.006) fue significativamente mayor en las muestras de la tarde con respecto a las muestras de la mañana.

En la figura 10 podemos observar los niveles de cortisol en plasma comparando entre hembras controles y experimentales muestreadas en la mañana. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre controles y experimentales en el T0 (P=0.45), T30 (P=0.67), T90 (P=0.47) y T120 (P=0.35).

En las hembras controles, con respecto al T0 (0.59 ± 0.56) se observó un incremento significativo ($P < 0.05$) en la secreción de cortisol a partir del T30 (34.79 ± 18.99), T90 (54.02 ± 20.30) y T120 (69.05 ± 23.17). En las hembras experimentales, también observamos diferencias ($P < 0.05$) entre la muestra del T0 (3.06 ± 3.04), y las muestras T30 (44.93 ± 13.55) T90 (37.48 ± 7.74) y T120 (44.18 ± 8.60).

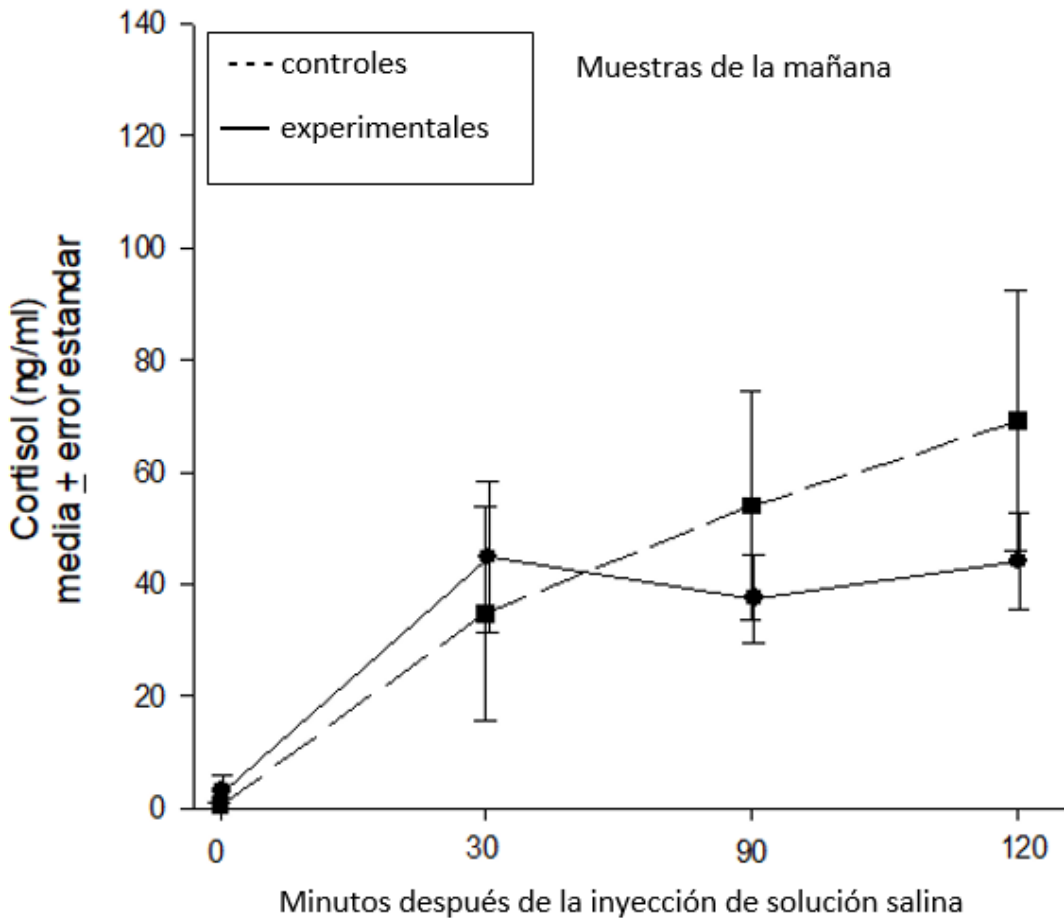


Figura 10. Niveles de cortisol en plasma (ng/ml) muestras de la mañana

Se muestra la comparación entre hembras controles (N=4) y experimentales (N=4). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre controles y experimentales en las muestras T0 ($P=0.45$), T30 ($P=0.67$), T90 ($P=0.47$) T120 ($P=0.35$).

En la figura 11 podemos observar los niveles de cortisol en plasma, comparando entre las hembras controles y experimentales (N=4) muestreadas en la tarde. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre controles y experimentales en T0 ($P=0.89$) ni

en el T30 (P=0.13) pero en el T90 (P=0.003) y T120 (P=0.03) sí encontramos diferencias estadísticamente significativas.

En el grupo control, sólo se observaron diferencias (P<0.05) entre el T0 (16.98±9.20) y las muestras T30 (42.45±9.34) y T120 (59.73±13.55). En el grupo experimental, los niveles de cortisol en plasma, en relación al T0 (15.30±8.37), incrementaron (P<0.05) en respuesta a la inyección de solución salina en las muestras, T30 (89.65±25.9), T90 (85.43±13.90) y T120 (111.28±13.86).

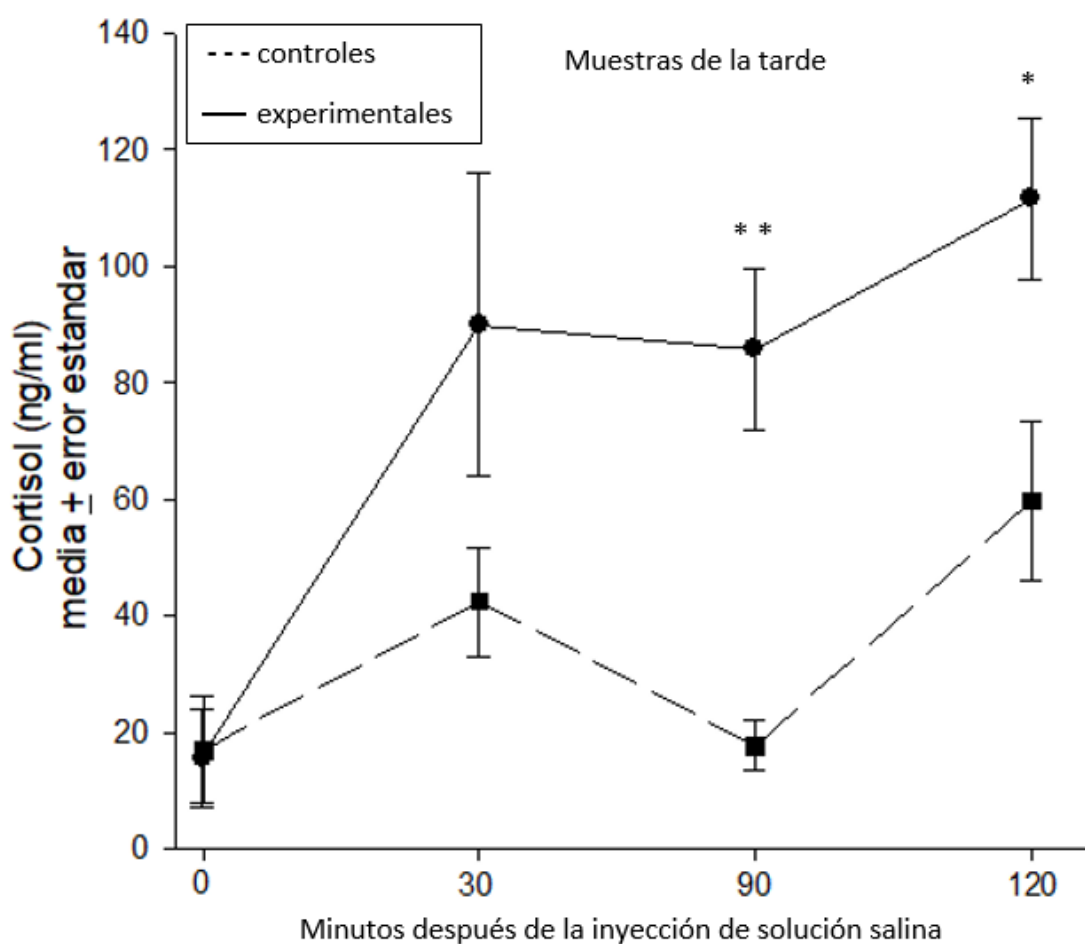


Figura 11. Niveles de cortisol en plasma (ng/ml) muestras de la tarde

Se muestra la comparación entre hembras controles (N=4) y hembras experimentales (N=4). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre controles y experimentales en las muestras T0 (P=0.89), T30 (P=0.13). Por otro lado, en las muestras T90 y T120 la secreción de cortisol fue significativamente mayor (P=0.003 y P=0.03 respectivamente) en las hembras experimentales con respecto a las hembras controles.

7.1.2.2. Medición de corticosterona

En las hembras controles, no se encontraron diferencias en los niveles de corticosterona entre las muestras de la mañana y las de la tarde en todos los tiempos T0 (P=0.21), T30 (P=0.71), T90 (P=0.42) y T120 (P=0.94). Sin embargo, en las hembras experimentales (ver figura 12), los niveles de corticosterona en plasma, fueron significativamente más altos en las muestras de la tarde, comparado con las de la mañana en los tiempos, T0 (P=0.01), T90 (P=0.03) y T120 (P=0.002).

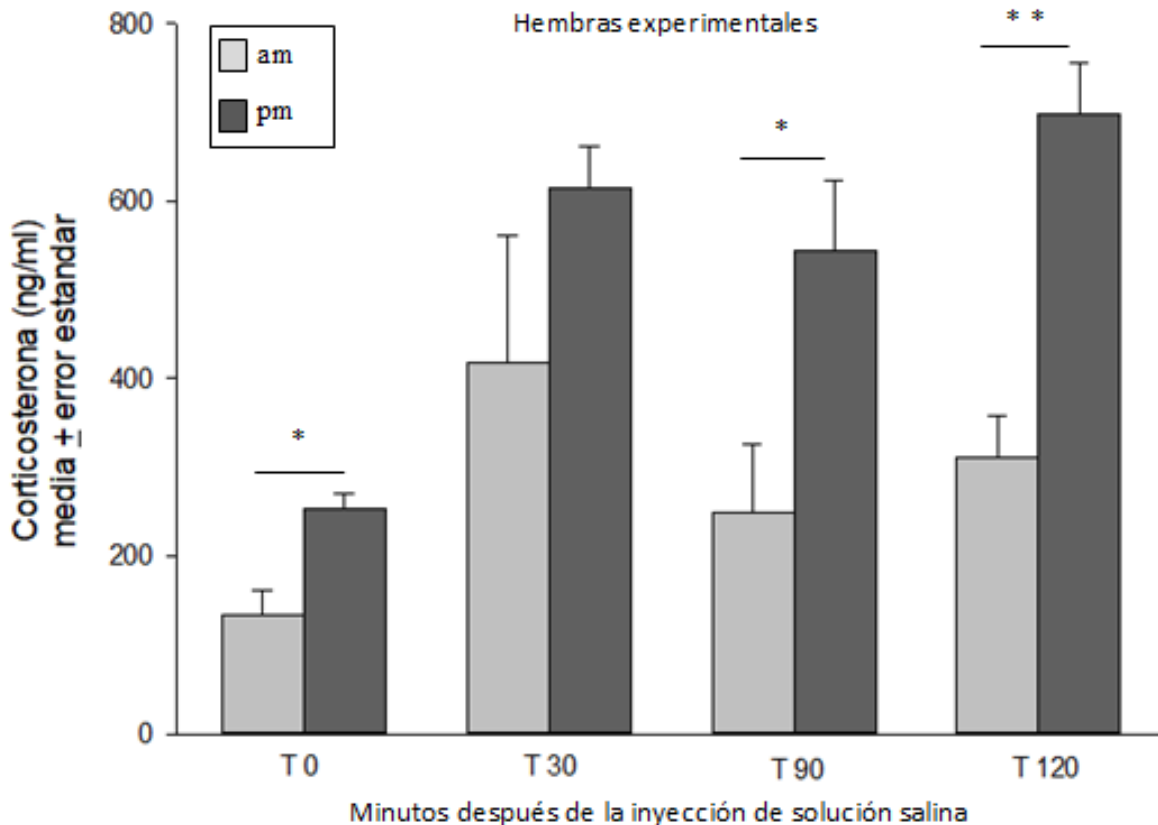


Figura 12. Niveles de corticosterona en plasma (ng/ml) en hembras experimentales. Muestras de la mañana (N=4) y de la tarde (N=4). La secreción de corticosterona en el T0 (P=0.01), T90 (P=0.03) y T120 (P=0.002) fue significativamente mayor en las muestras de la tarde con respecto a las muestras de la mañana.

En la figura 13 podemos observar los niveles de corticosterona en respuesta a la inyección de solución salina en hembras controles y experimentales muestreadas en la mañana. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar entre controles y

experimentales en ninguno de los cuatro tiempos T0 (P=0.45), T30 (P=0.37), T90 (P=0.71) y T120 (P=0.57).

En las hembras controles, en relación al T0 (106.1±23.33), observamos un incremento lineal (P<0.05) en la cantidad de corticosterona secretada en respuesta a la inyección de solución salina en el T30 (261.6±79.85), T90 (309.3±139.83) y T120 (364.7±76.56). En las hembras experimentales, en relación al T0 (134.5±27.36), la máxima secreción de corticosterona (P<0.05) en respuesta a la inyección de solución salina se observó en el T30 (418.5±142.60), posteriormente disminuyó ligeramente en el T90 (249.5±75.55) y T12 (311.7±46.72).

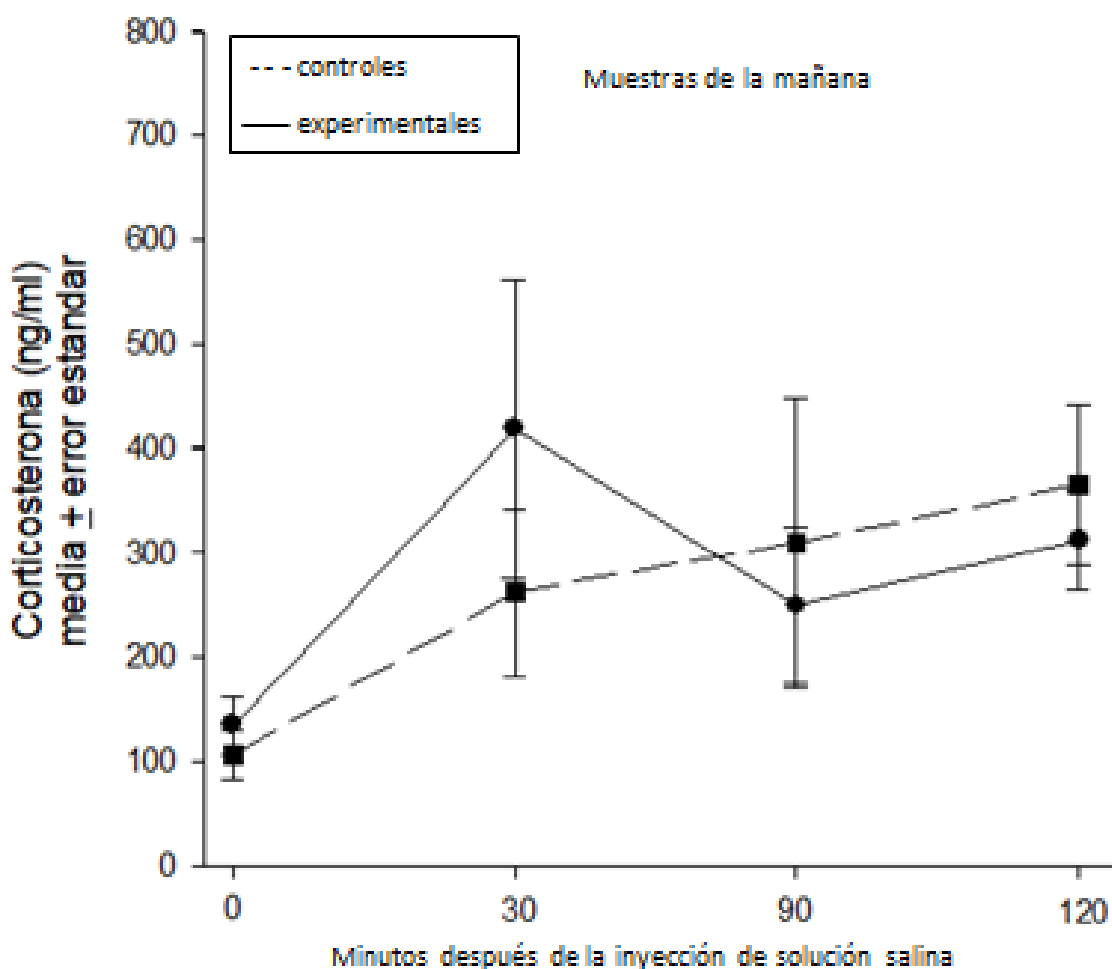


Figura 13. Niveles de corticosterona en plasma (ng/ml) muestras de la mañana

Se observa la comparación entre hembras controles (N=4) y hembras experimentales (N=4). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre hembras controles y experimentales en todas las muestras, T0 (P=0.45), T30 (P=0.37), T90 (P=0.71) y T120 (P=0.57).

En la figura 14 podemos observar los niveles de corticosterona en respuesta a la inyección de solución salina en hembras controles y experimentales muestreadas en la tarde. En el T0 los niveles de corticosterona no fueron estadísticamente diferentes ($P=0.58$) entre controles y experimentales. En respuesta a la inyección de solución salina, los niveles de corticosterona en plasma, fueron significativamente más altos en el T30 ($P=0.007$), T90 ($P=0.009$) y T120 ($P=0.02$) en las hembras experimentales comparado con las hembras controles.

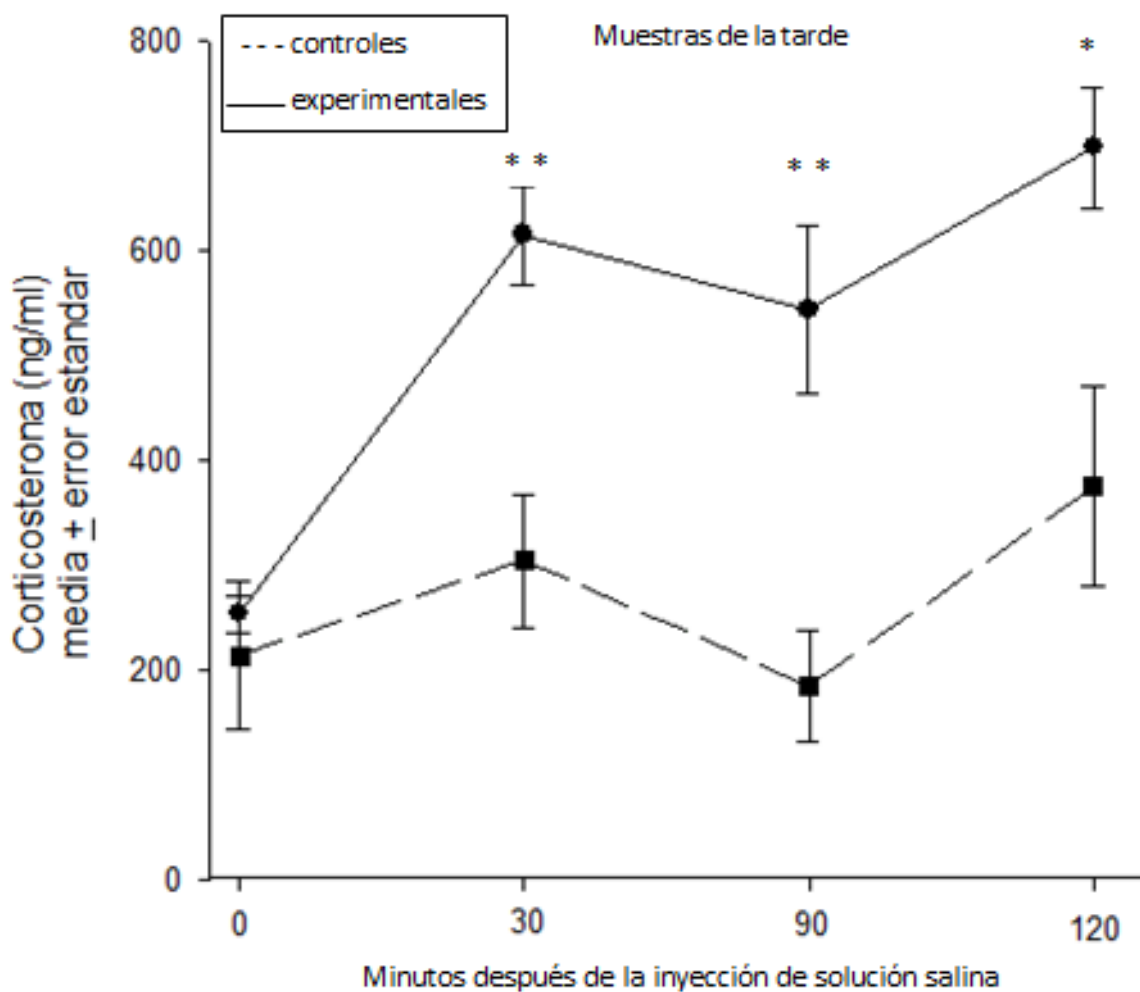


Figura 14. Niveles de corticosterona en plasma (ng/ml) muestras de la tarde

Se observa la comparación entre hembras controles (N=4) y hembras experimentales (N=4). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre hembras controles y experimentales en el T0 ($P=0.58$). Posteriormente, en el T30, T90 y T120 las hembras experimentales tuvieron una secreción de corticosterona significativamente mayor ($P=0.007$, $P=0.009$, $P=0.02$ respectivamente) a la de las hembras controles.

7.2. Pruebas conductuales

Todos los animales fueron evaluados individualmente, mediante la siguiente batería de pruebas conductuales:

- a) Reflejo de enderezamiento. Se midió la latencia a enderezarse (LE)
- b) Aproximación al humano. Se midieron la latencia a la primera aproximación (LA) y el número de contactos (NC)
- c) Campo abierto. Se midieron: la latencia a la salida de la madriguera (LSM), el marcaje por frotamiento del mentón (M) y el recorrido (R), entendido como el número de líneas cruzadas dentro del campo abierto.
- d) Conducta sexual. En las hembras se midió el cociente de lordosis (CL). En los machos se determinaron: la tasa de error (“*miss rate*”; MR%), la latencia a la primera monta (LM), la latencia a la primera eyaculación (LE), el número de montas (NM) y el número de eyaculaciones (NE).

Se utilizó la prueba de U de Mann-Whitney, para hacer las siguientes comparaciones para cada indicador: horario (am vs pm), tratamiento (controles vs experimentales) y sexo (hembras vs machos).

En todos los indicadores que se analizaron, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) al comparar entre los animales de un mismo grupo evaluados en la mañana o en la tarde (ver tablas 5-15). Por ello, en las figuras sólo se consideran 4 grupos: hembras controles (HC), hembras experimentales (HE), machos controles (MC) y machos experimentales (ME), sumando para cada grupo los animales evaluados en la mañana y en la tarde.

Para cada indicador las comparaciones se realizaron:

- i) considerando a todos los animales de un mismo grupo (ver tablas 5, 6 y 7)
- ii) considerando los grupos sin los valores extremos (eliminando el valor más bajo y el más alto) (ver tablas 8, 9 y 10)
- iii) considerando por grupo, animales sin parentesco (ver tablas 11, 12 y 13).

7.2.1. Reflejo de enderezamiento

7.2.1.1. Considerando todos los animales

En la figura 15 podemos observar los valores de mediana del tiempo (en segundos) que tardaron en enderezarse los animales. Este valor fue similar entre hembras controles y experimentales y entre machos controles y experimentales.

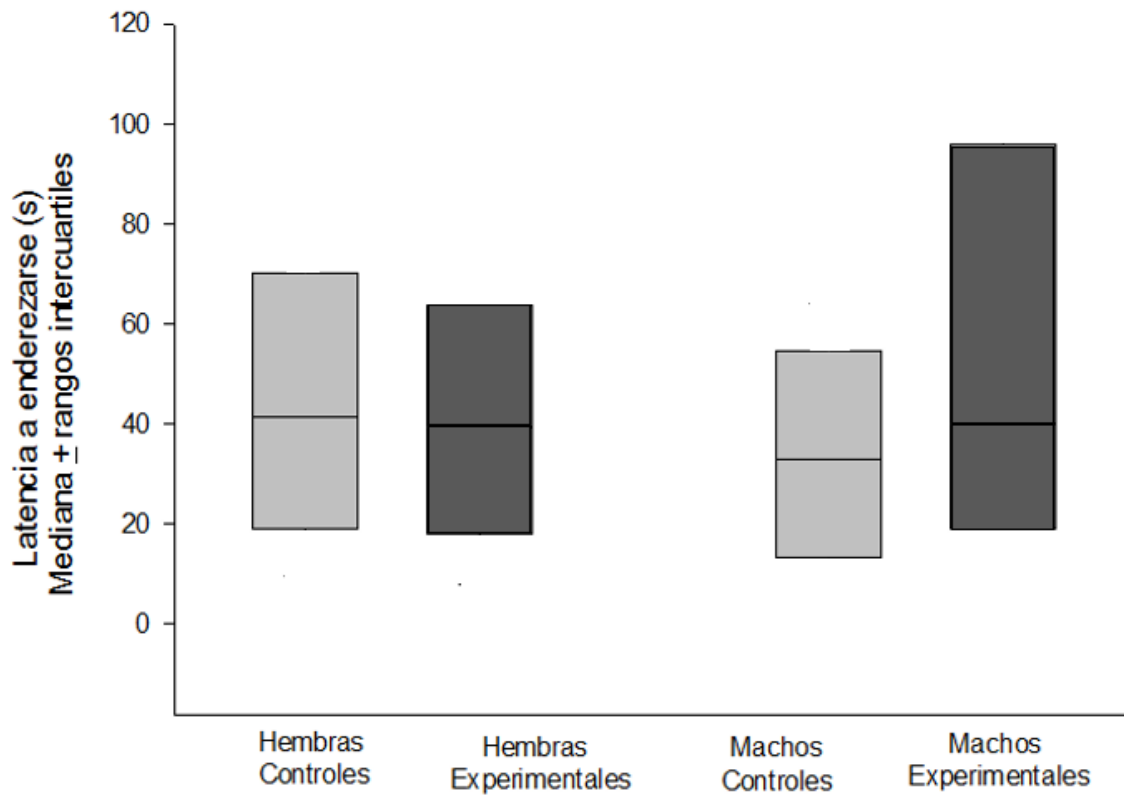


Figura 15. Latencia a enderezarse

No se encontraron diferencias significativas entre los grupos controles y experimentales, ni en las hembras ($P= 0.755$) ni en los machos ($P= 0.249$).

7.2.1.2. Considerando animales sin parentesco

En la figura 16 observamos que la mediana del tiempo (en segundos) que tardaron en enderezarse los animales de los grupos HC y HE, y entre MC y ME, no fue estadísticamente diferente.

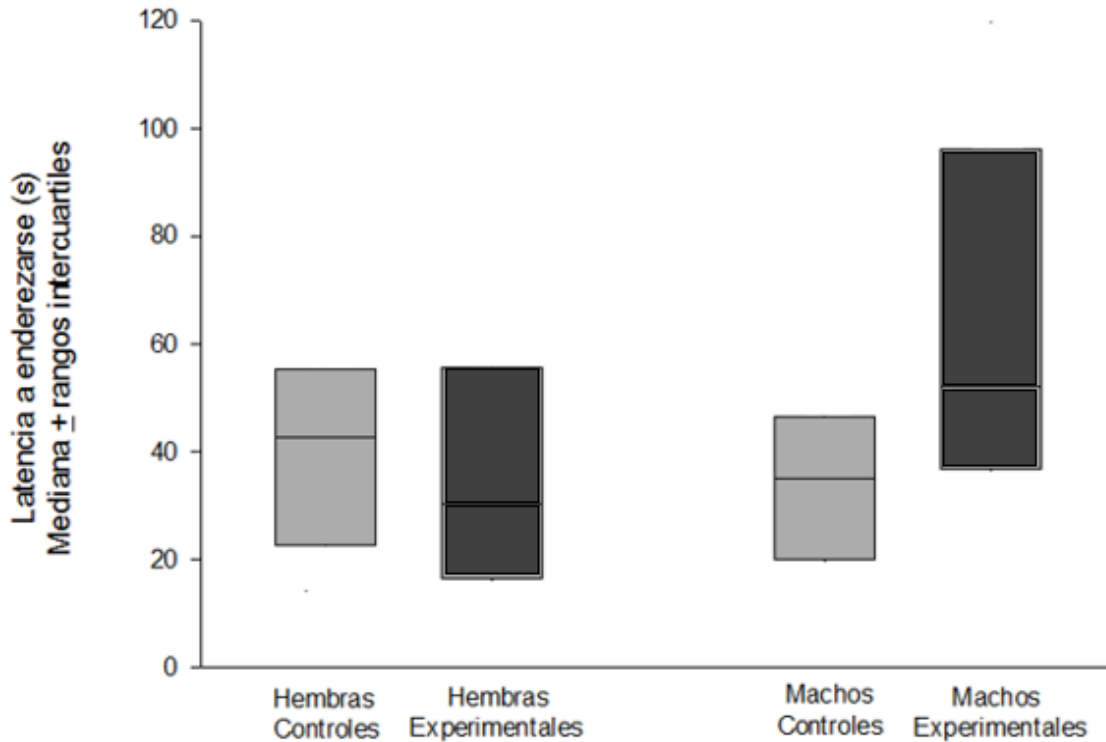


Figura 16. Latencia a enderezarse (sin parentesco).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre HC y HE ($P= 0.356$) ni entre MC y ME ($P= 0.077$).

7.2.2. Aproximación al humano

7.2.2.1. Considerando todos los animales

En la figura 17 podemos observar que el valor de mediana del tiempo que tardaron los animales en aproximarse por primera vez a la mano del humano fue similar entre los grupos HC y HE y entre MC y ME.

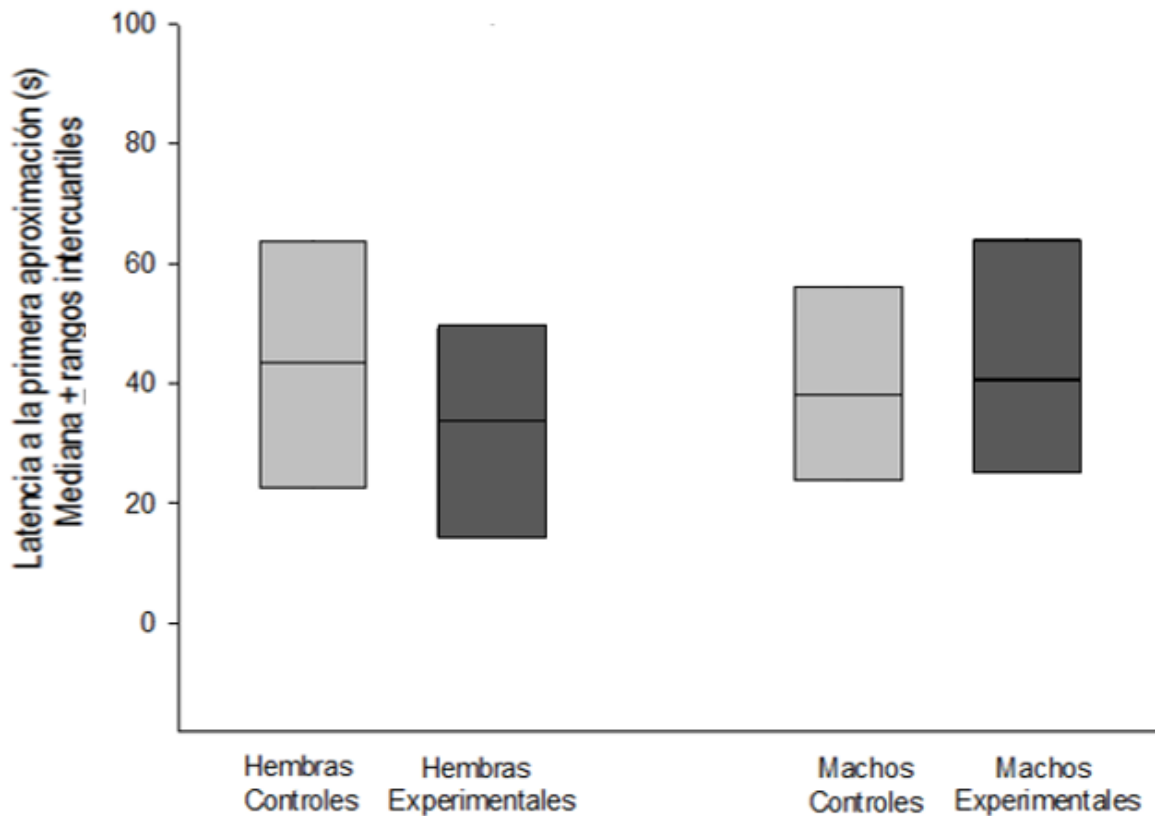


Figura 17. Latencia a la primera aproximación

Los valores del tiempo en segundos que tardaron los animales en aproximarse por primera vez a la mano del humano se expresan en mediana \pm rangos intercuartiles. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre HC y HE ($P=0.1$). Tampoco hubo diferencias entre MC y ME ($P=0.53$).

En la figura 18 podemos observar que no existen diferencias estadísticamente significativas entre la cantidad de contactos que realizaron con el humano el total de los conejos de los 4 grupos.

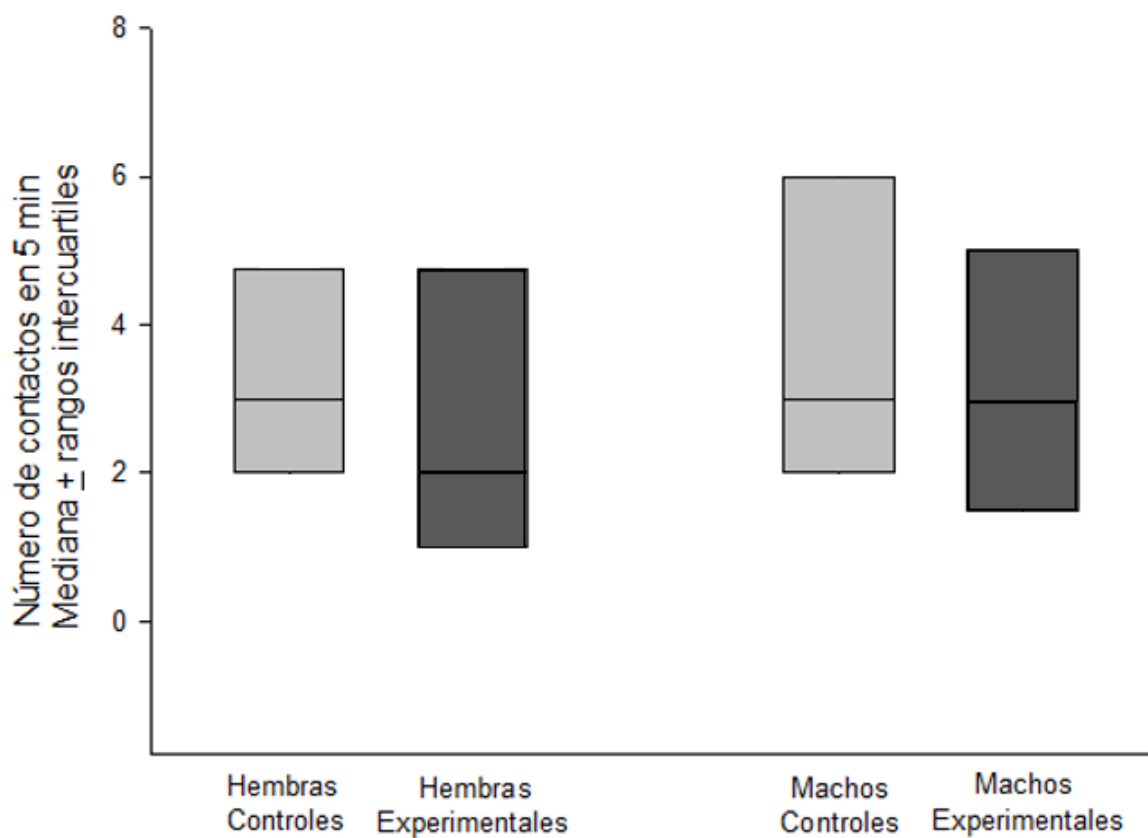


Figura 18. Número contactos

El número de veces que el animal tocó con su nariz, la mano del humano (durante los cinco minutos que duró la prueba). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre HC y HE ($P= 0.281$) ni entre MC y ME ($P=0.342$).

7.2.2.2. Considerando animales sin parentesco

En la figura 19 podemos observar que el tiempo en segundos que se tardaron los animales en aproximarse por primera vez a la mano del humano fue similar entre los animales de los grupos HC, HE, MC y ME.

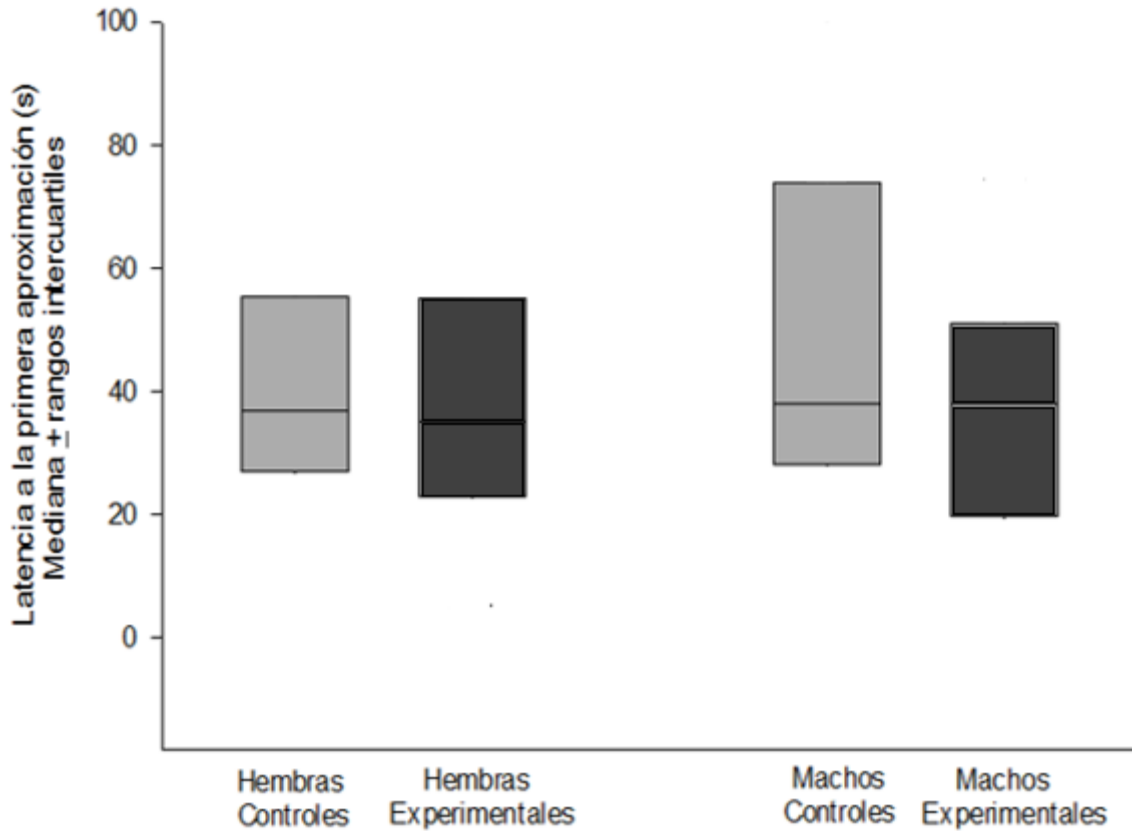


Figura 19. Latencia a la primera aproximación (sin parentesco)

Tiempo en segundos que el animal tardó en aproximarse por primera vez a la mano del humano (considerando sólo a los animales sin parentesco). No se encontraron diferencias entre HC y HE ($P=0.661$) ni entre MC y ME ($P=0.546$).

Al considerar sólo a los animales sin relación de parentesco para la prueba de número de contactos con el humano en 5 min no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las hembras controles y las experimentales ni entre los machos controles y experimentales (ver fig. 20).

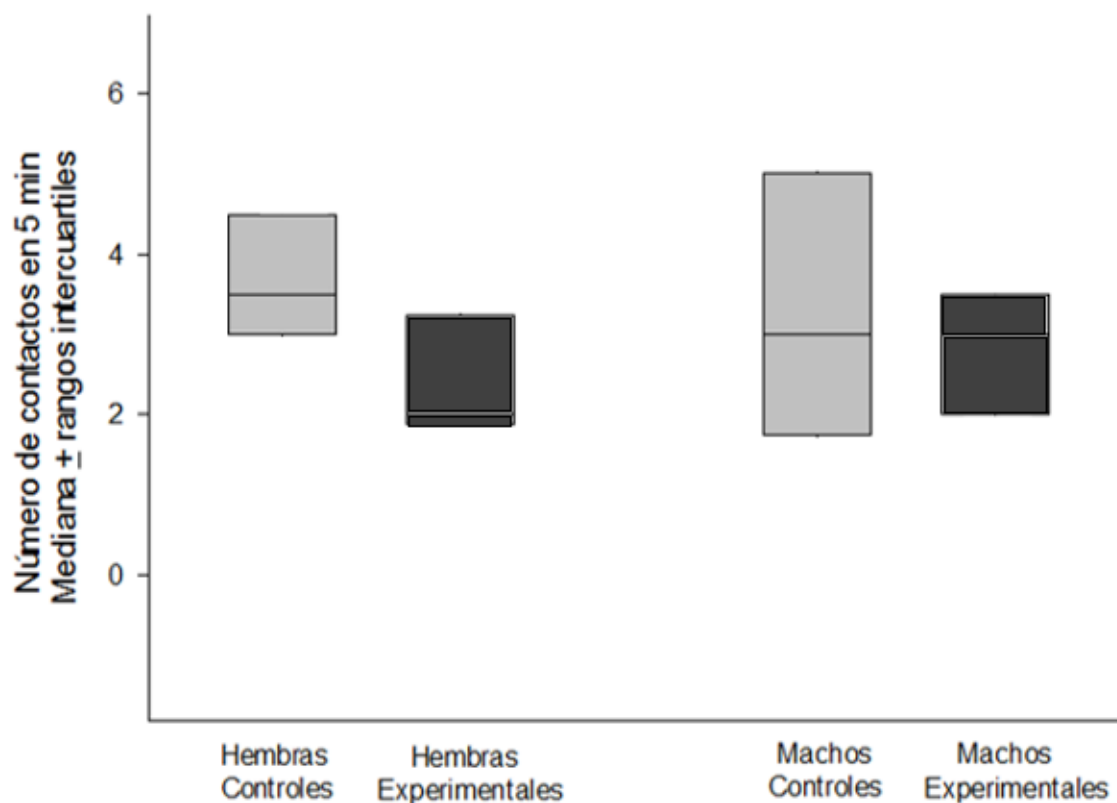


Figura 20. Número de contactos (sin parentesco)
El número de veces que el animal tocó con su nariz, la mano del humano (durante los cinco minutos que duró la prueba) No se encontraron diferencias significativas entre HC y HE ($P= 0.065$) ni entre MC y ME ($P= 0.863$).

7.2.3. Campo abierto

7.2.3.1. Considerando todos los animales

En la figura 21 podemos observar que no existen diferencias estadísticamente significativas en la latencia (s) a salida de la madriguera, entre los grupos HC y HE, tampoco se encontraron diferencias entre MC y ME.

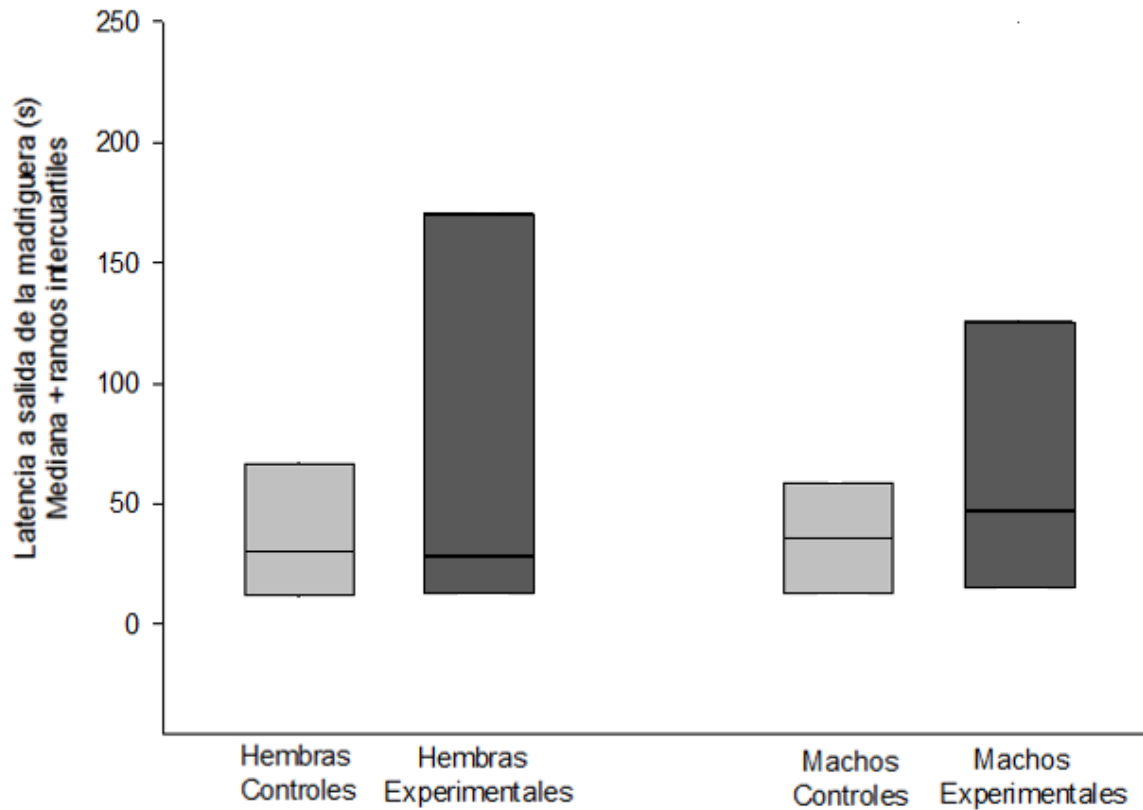


Figura 21. Latencia a salida de la madriguera

Tiempo en segundos que tardaron en salir de la madriguera, los animales de los grupos: hembras controles (HC), hembras experimentales (HE), machos controles (MC) y machos experimentales (ME). No se encontraron diferencias entre HC y HE ($P=0.4$).

En la figura 22 se observa que el número de marcas por minuto, fue similar entre los grupos HC y HE, y entre MC y ME. Por otro lado, se observó una clara diferenciación sexual, al comparar el número de marcas por minuto, entre hembras y machos controles y entre hembras y machos experimentales, ambas diferencias fueron estadísticamente significativas.

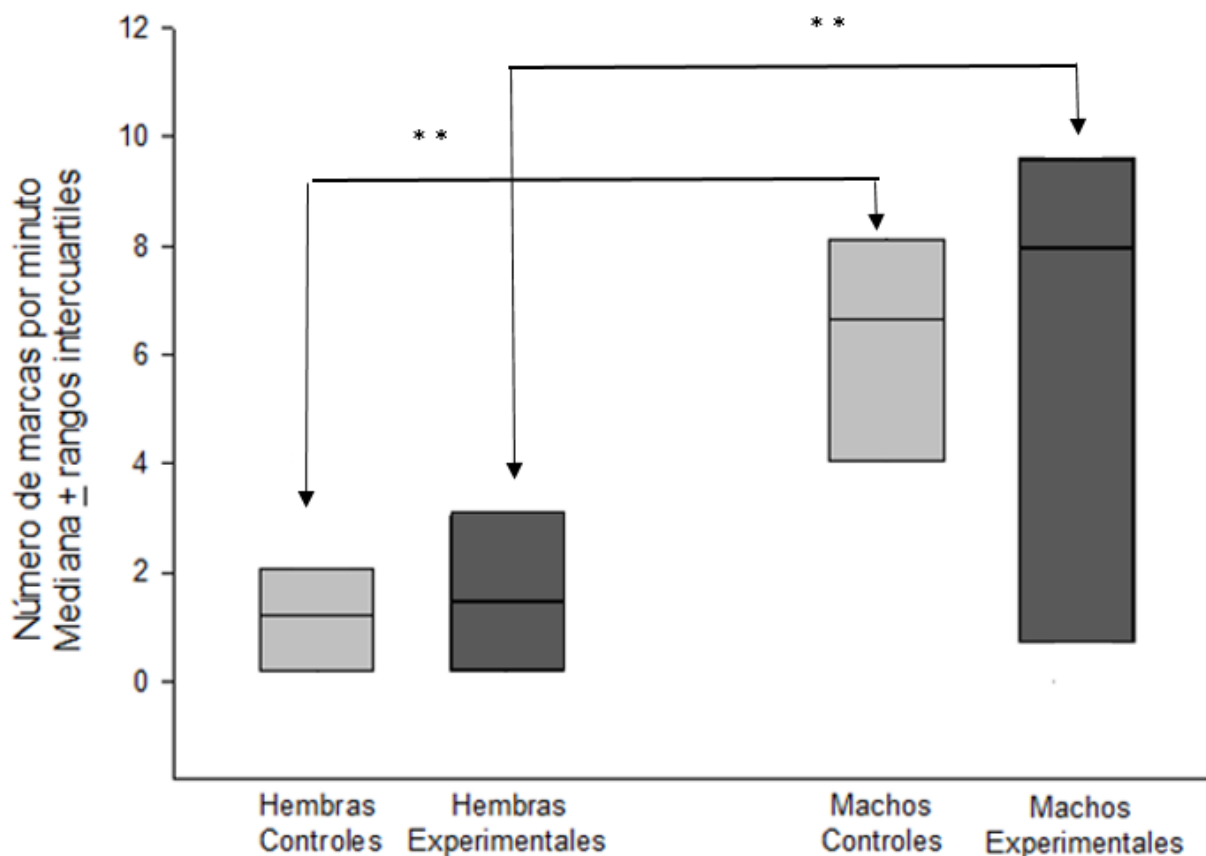


Figura 22. Número de marcas por minuto

Número de veces que el animal frotó el mentón contra cualquier superficie dentro del campo abierto. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos HC y HE ($P= 0.747$) ni entre MC y ME ($P= 0.663$) pero sí se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar entre sexos, tanto en los animales controles HC y MC ($P= 0.001$) como en los animales experimentales HE y ME ($P= 0.002$).

En la figura 23 podemos observar que no existen diferencias estadísticamente significativas en el número de líneas cruzadas por minuto, entre los grupos HC y HE, tampoco se encontraron diferencias entre MC y ME.

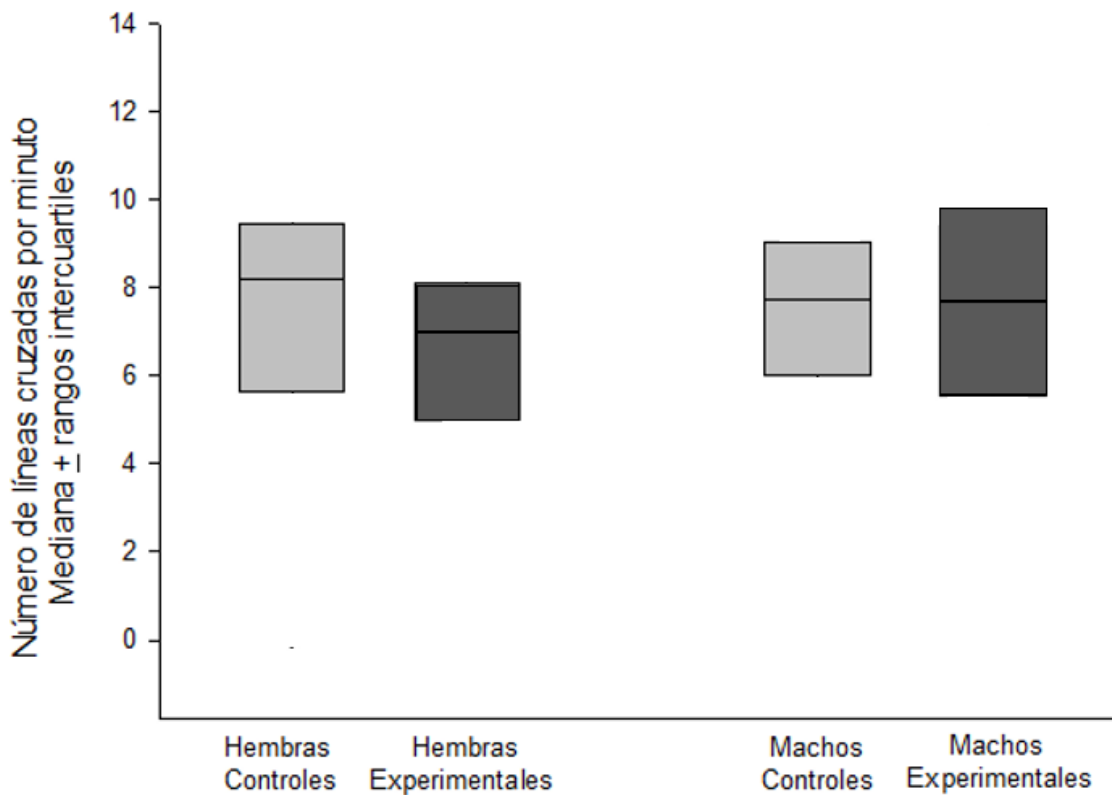


Figura 23. Número de líneas cruzadas por minuto

El recorrido del animal dentro de la arena se encuentra expresado en el número de líneas cruzadas por minuto. No se encontraron diferencias entre HC y HE ($P=0.199$) ni entre MC y ME ($P= 0.969$).

7.2.3.2. Considerando animales sin parentesco

En la figura 24 podemos observar que no existen diferencias estadísticamente significativas en la latencia (s) a salida de la madriguera, entre los grupos de hembras controles y hembras experimentales. Tampoco fueron diferentes entre sí los grupos de machos controles y machos experimentales.

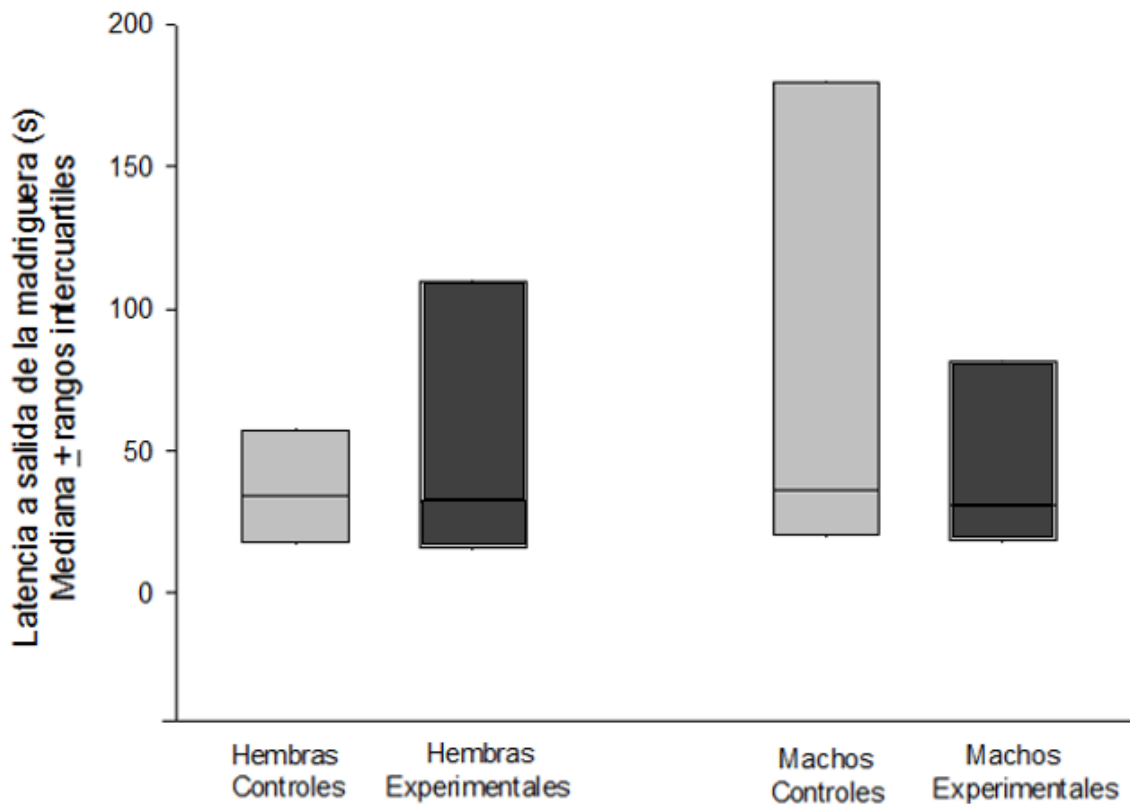


Figura 24. Latencia a salida de la madriguera (sin parentesco)

Tiempo en segundos que tardaron en salir de la madriguera, para iniciar actividad en el campo abierto (considerando animales sin parentesco) los animales de los grupos: HC, HE, MC y ME. No se encontraron diferencias entre HC y HE ($P=0.842$) ni entre MC y ME ($P=0.863$).

En la figura 25 se observa el valor de mediana del número de marcas por minuto, para los grupos: hembras controles, hembras experimentales, machos controles y machos experimentales. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos controles y experimentales, ni en las hembras ($P= 0.842$) ni en los machos ($P=0.888$).

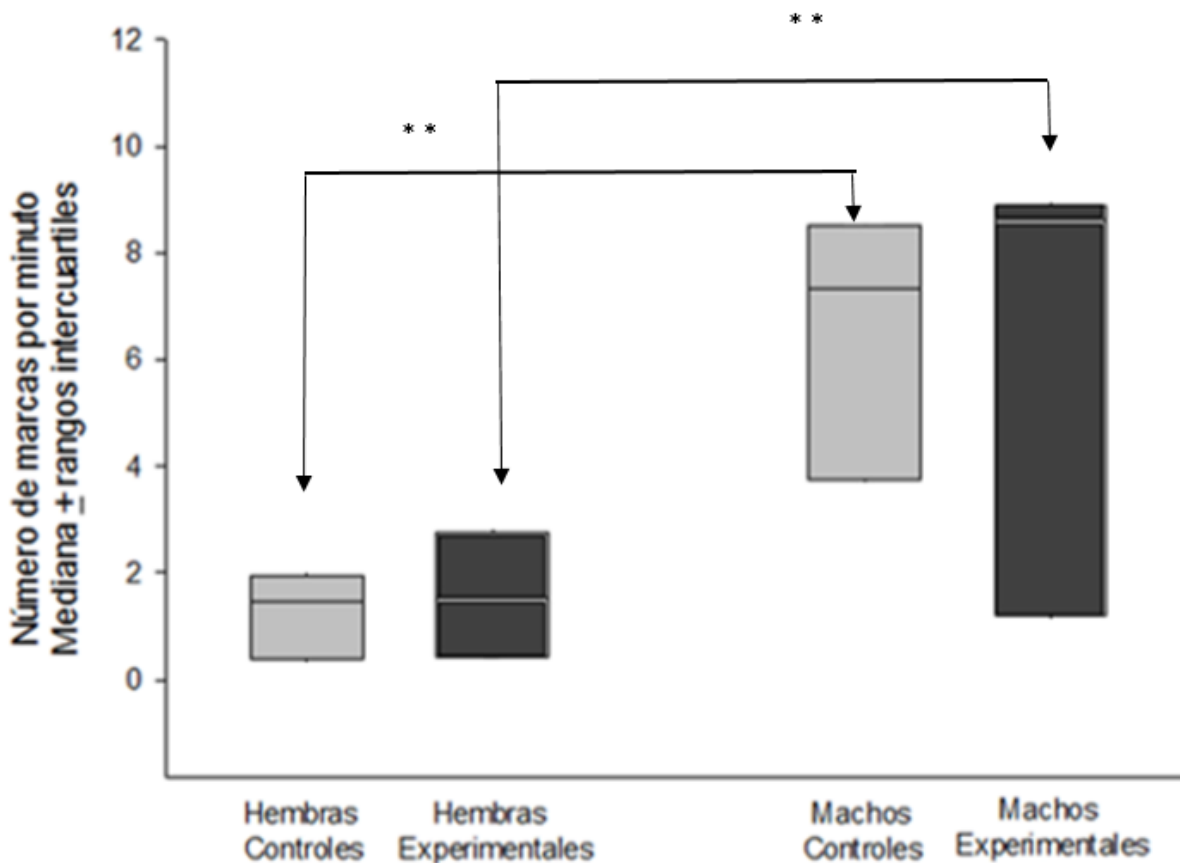


Figura 25. Número de marcas por minuto (sin parentesco)

Número de veces que el animal frotó el mentón, contra cualquier superficie dentro del campo abierto, se consideró sólo a los animales sin parentesco de los grupos: hembras controles, hembras experimentales, machos controles y machos experimentales. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar entre los grupos HC vs HE ($P= 0.842$); MC vs ME ($P= 0.888$) ni entre HE vs ME ($P=0.065$). Solo se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar entre HC y MC ($P=0.001$).

En la figura 26 podemos observar el valor de mediana del número de líneas cruzadas en un minuto. No hubo diferencias estadísticamente significativas al comparar entre hembras controles y experimentales, ni entre machos controles y experimentales.

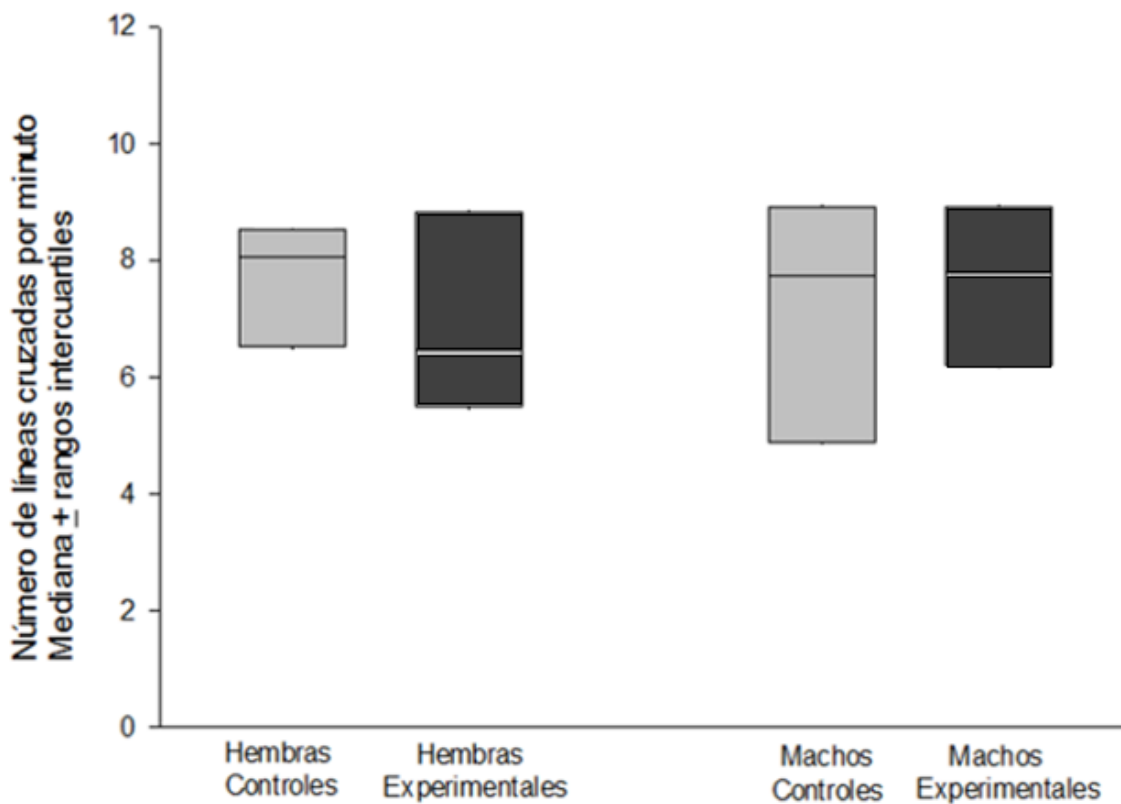


Figura 26. Número de líneas cruzadas por minuto (sin parentesco)

El recorrido del animal dentro de la arena se encuentra expresado en el número de líneas cruzadas por minuto. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre HC y HE ($P=0.356$), ni entre MC y ME ($P=0.796$).

7.2.4. Conducta sexual

7.2.4.1. Hembras

7.2.4.1.1. Considerando todos los animales

En la figura 27 podemos observar que el cociente de lordosis fue significativamente mayor en las hembras controles vs hembras experimentales.

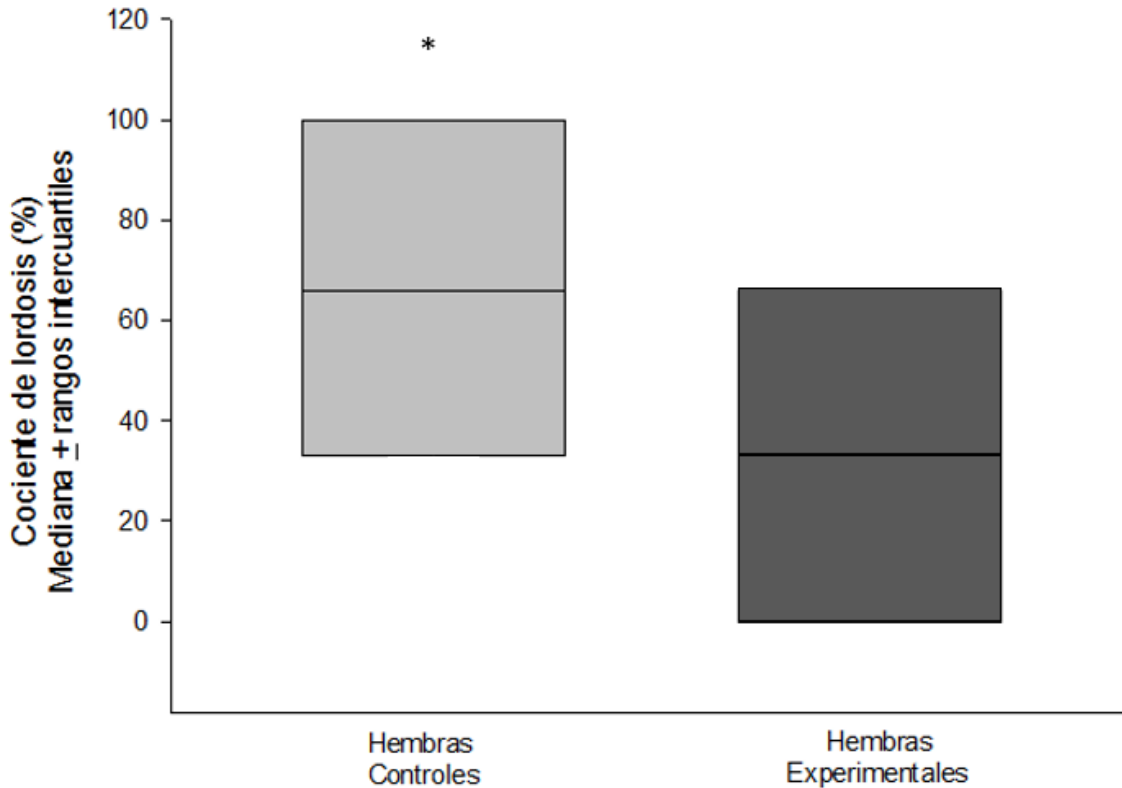


Figura 27. Cociente de lordosis

Número de veces que la hembra hizo lordosis, en respuesta a 3 montas bien orientadas del macho, el resultado se multiplica por cien para obtener un porcentaje). El cociente de lordosis, fue significativamente mayor ($P=0.048$) en las hembras controles (66%), que en las hembras experimentales (33%).

A consecuencia de la prueba de conducta sexual, poco más del 50% de los animales quedaron gestantes, sin que hubiera diferencias significativas entre hembras controles y experimentales (ver fig. 28).

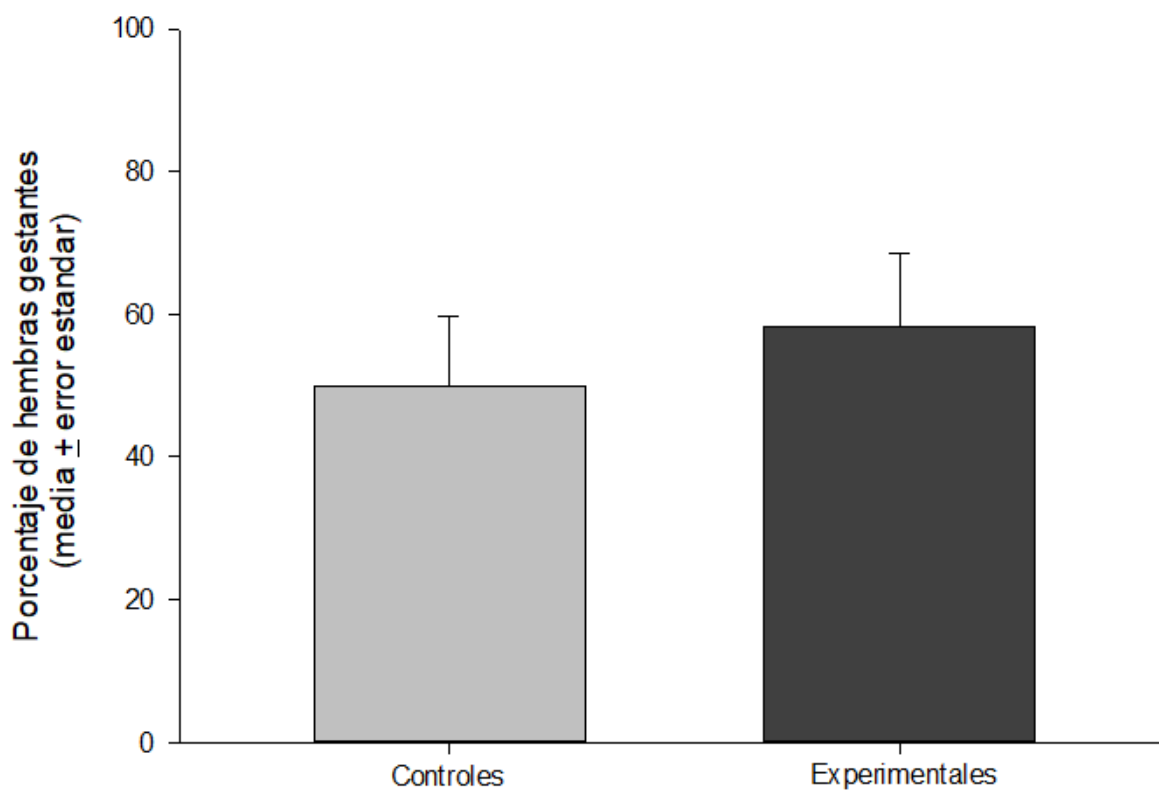


Figura 28. Porcentaje de hembras gestantes.

No se encontraron diferencias ($P=0.58$) entre el porcentaje de hembras gestantes controles (50%) y experimentales (58.8%).

7.2.4.1.2. Considerando animales sin parentesco

En la figura 29 podemos observar que el valor de mediana del cociente de lordosis (%) fue similar entre las hembras del grupo control y las del grupo experimental.

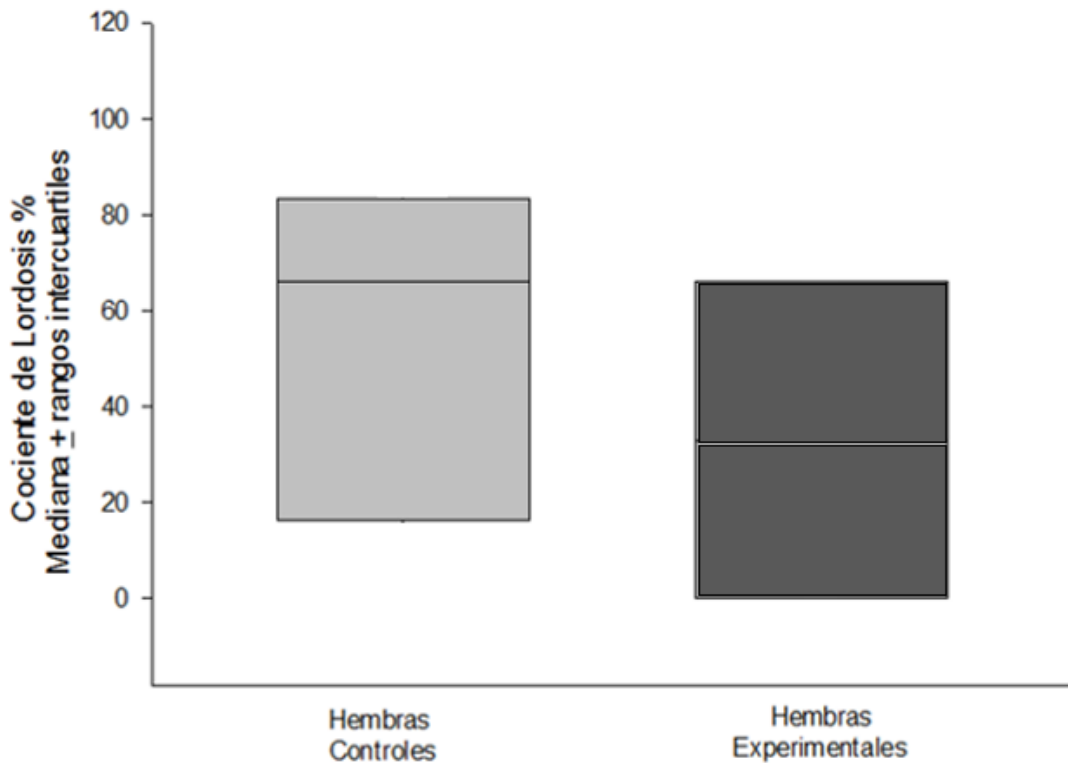


Figura 29. Cociente de lordosis (sin parentesco)

Número de veces que la hembra hizo lordosis, en respuesta a 3 montas bien orientadas del macho, el resultado se multiplica por cien para obtener un porcentaje), para los animales sin parentesco de los grupos: hembras control y hembras experimentales. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre HC y HE ($P= 0.211$).

En la figura 30 podemos observar que no hubo diferencias en el porcentaje de hembras gestantes al comparar entre los grupos controles y experimentales, considerando solamente animales sin parentesco.

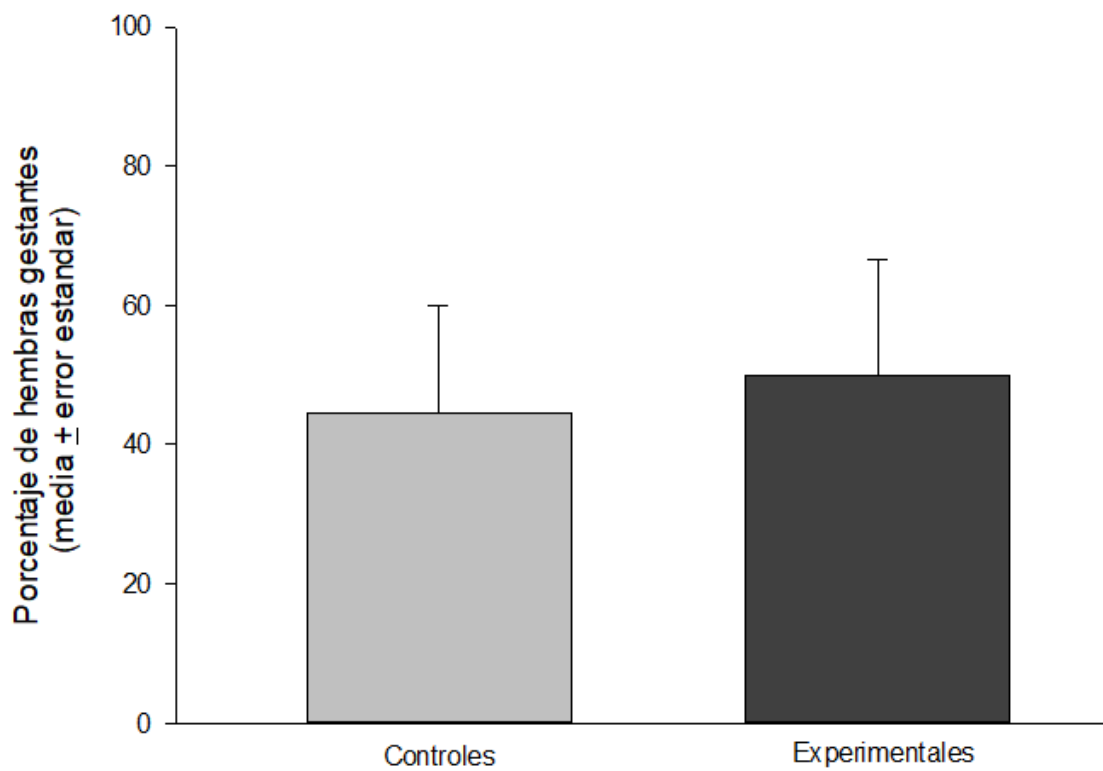


Figura 30. Porcentaje de hembras gestantes (sin parentesco)

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P=0.70$) entre controles (44.4%) y experimentales (50%).

7.2.4.2. Machos

7.2.4.2.1. Considerando todos los animales

En la figura 31 podemos observar la tasa de error (*miss rate*), el cual fue significativamente mayor en los machos experimentales, respecto a los machos controles.

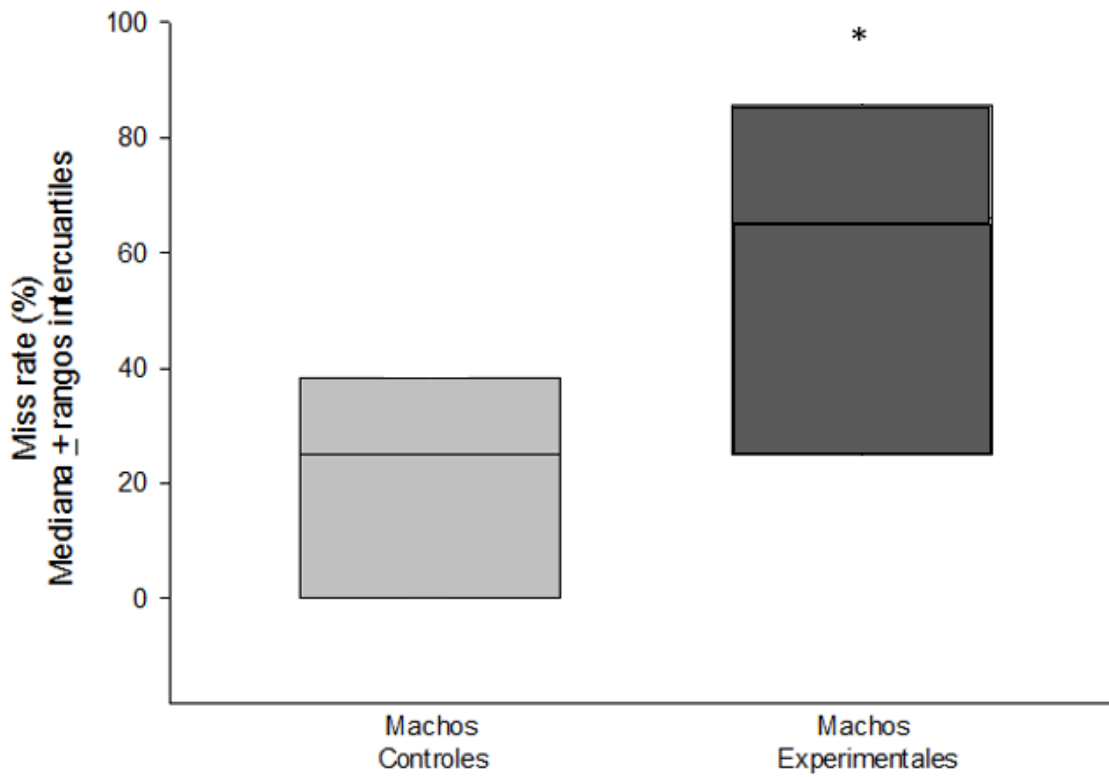


Figura 31. El *miss rate*

El *miss rate* (tasa de error) fue significativamente menor ($P=0.002$) en los machos controles (25%) en comparación con los machos experimentales (66%).

Durante la prueba de conducta sexual de los machos se obtuvieron otros indicadores, como el tiempo en segundos que tardaron los machos, en ejecutar la primera monta (Fig. 32, lado izquierdo). No se encontraron diferencias entre los grupos controles y experimentales. También podemos observar (lado derecho) que el tiempo en segundos que tardaron los machos controles en ejecutar la primera eyaculación, fue significativamente menor en comparación con los machos experimentales.

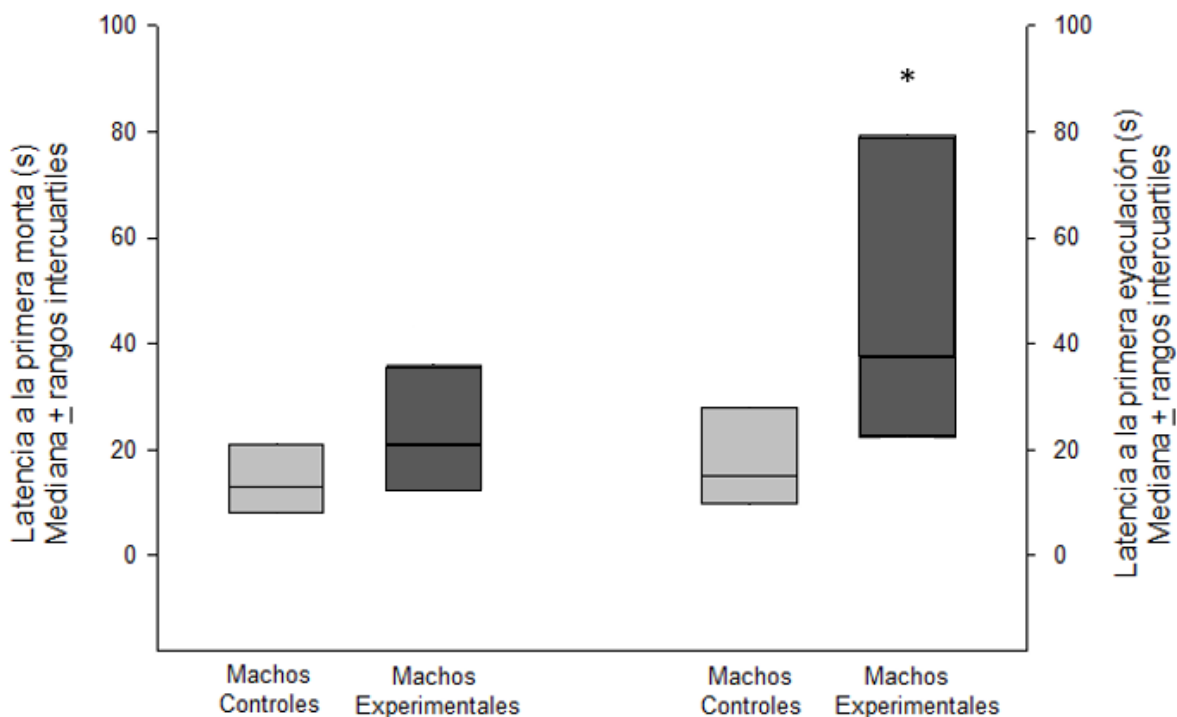


Figura 32. Latencia a la primera monta y a la primera eyaculación

Tiempo en segundos que tardaron los machos de los grupos controles y experimentales en ejecutar la primera monta (lado izquierdo). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P=0.131$). El tiempo en segundos que tardaron los machos en ejecutar la primera eyaculación (lado derecho) fue significativamente menor en los machos controles comparado con los experimentales ($P=0.002$).

En la figura 33 podemos observar (lado izquierdo) que los machos controles tuvieron un menor número de montas que no culminaron en eyaculación comparado con los machos experimentales. También podemos observar (lado derecho) el número de eyaculaciones, el cual fue similar entre machos controles y experimentales.

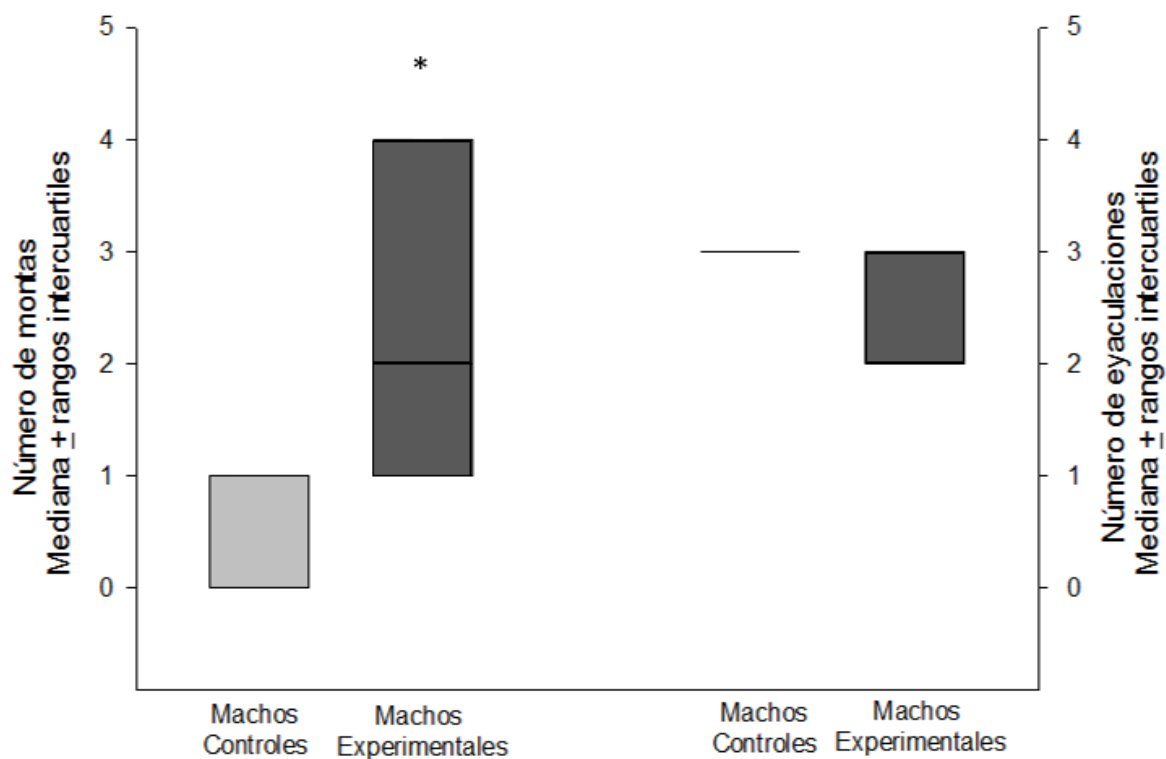


Figura 33. Número de montas y de eyaculaciones

El número de montas no acompañadas de eyaculación (lado izquierdo) que ejecutaron los machos experimentales fue estadísticamente mayor ($P= 0.005$) en comparación con los machos controles. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P=0.139$) en el número de eyaculaciones (lado derecho) que ejecutaron los machos controles y los experimentales.

7.4.2.2. Considerando animales sin parentesco

En la figura 34 se muestra la tasa de error (*miss rate* %) determinada durante la prueba de conducta sexual. Este parámetro fue significativamente mayor en el grupo de machos experimentales vs machos controles.

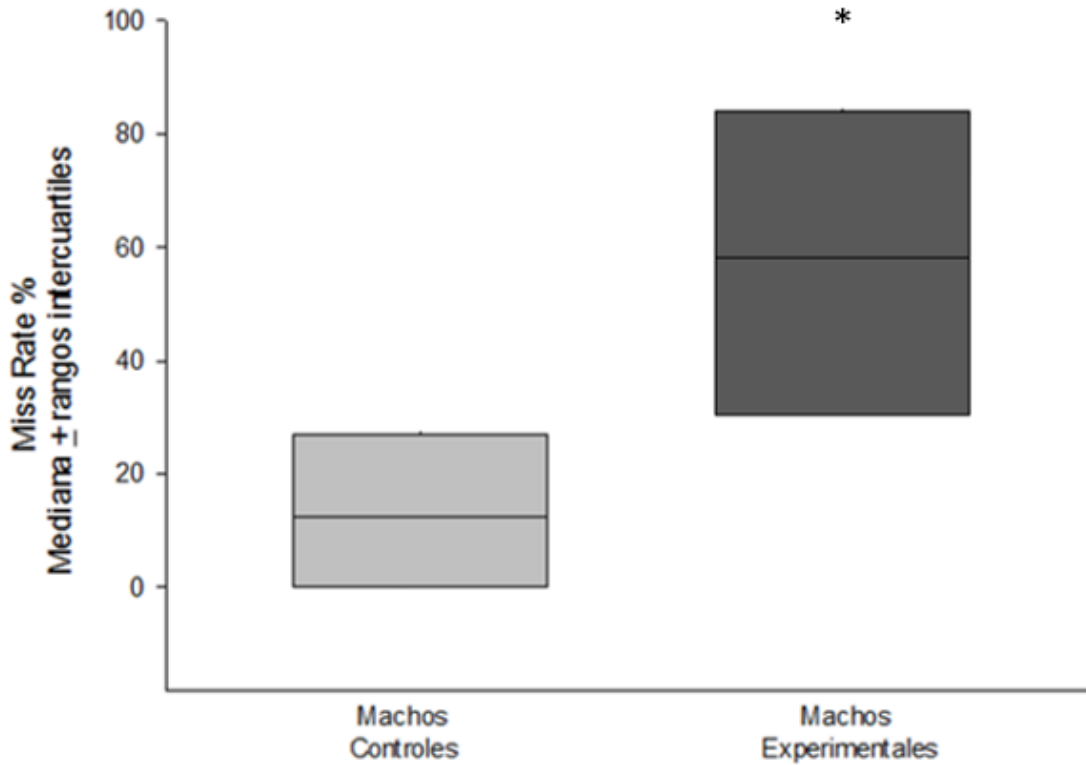


Figura 34. *Miss rate* (sin parentesco)

El *miss rate* (tasa de error) considerando solo animales sin parentesco, fue significativamente mayor ($P=0.002$) en los machos experimentales (58.3%) en comparación con los machos controles (12.5%).

En la figura 35 se puede observar (lado izquierdo) que no hubo diferencias en el indicador de latencia a la primera monta (tiempo en segundos que tardaron los animales en ejecutar la primera monta) entre los machos controles y experimentales. También se observa (lado derecho) la latencia a la primera eyaculación (tiempo en segundos que tardaron los machos en ejecutar la primera eyaculación), que fue significativamente menor en los machos controles comparado con los experimentales.

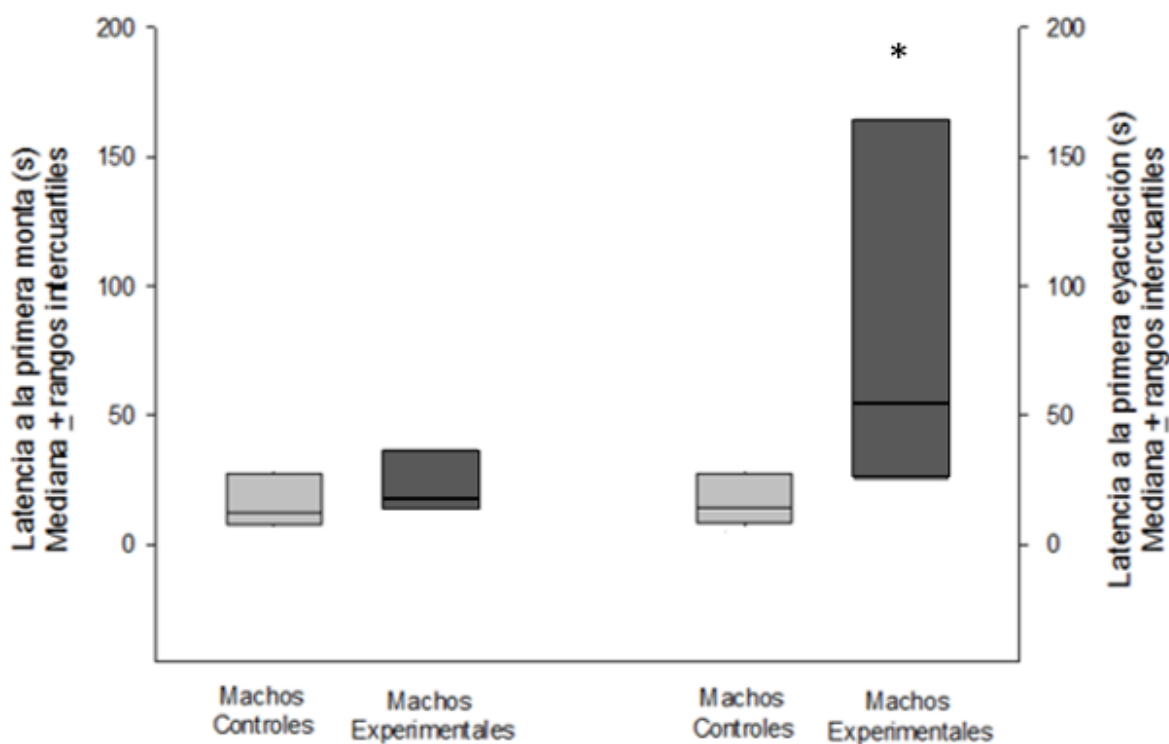


Figura 35. Latencia a la primera monta y a la primera eyaculación (sin parentesco)

Tiempo en segundos que tardaron en ejecutar la primera monta (lado izquierdo) considerando sólo animales sin parentesco de los grupos machos controles y machos experimentales. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre MC y ME ($P= 0.167$). También se observa (lado derecho) el tiempo en segundos que los animales de los grupos MC y ME tardaron en ejecutar la primera eyaculación. En este parámetro, los machos controles fueron significativamente más rápidos que los machos experimentales ($P=0.011$).

En la figura 36 se encuentran representados el número de montas (lado izquierdo) y el número eyaculaciones (lado derecho) que ejecutaron los animales de los grupos, machos controles y machos experimentales, durante la prueba de conducta sexual. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el número de montas de los grupos MC y ME ($P=0.005$). Por otro lado no hubo diferencias en el número de eyaculaciones ($P=0.139$).

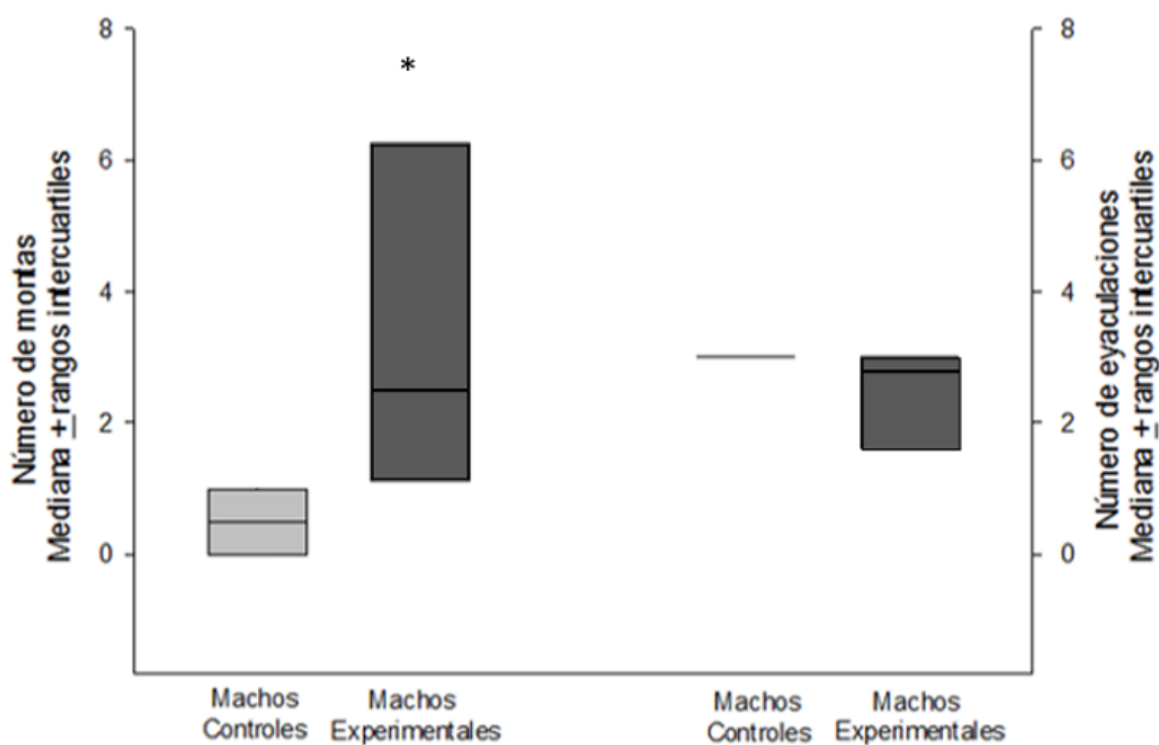


Figura 36. Número de montas y de eyaculaciones (sin parentesco)

Número de montas (lado izquierdo) que ejecutaron los animales de los grupos machos controles y machos experimentales. El número de montas fue estadísticamente menor en los machos controles que en los machos experimentales ($P=0.011$). Del lado derecho se puede observar el número de eyaculaciones. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre MC y ME ($P=0.2$).

A continuación se encuentran las tablas con los niveles de probabilidad, para cada uno de los indicadores medidos, de acuerdo a las siguientes comparaciones; a) considerando a todos los animales de un mismo grupo (ver tablas 5, 6 y 7). b) eliminando el valor más bajo y el más alto de cada grupo (ver tablas 8, 9 y 10). c) considerando dentro de cada grupo, únicamente a los animales sin parentesco (ver tablas 11, 12 y 13).

Tabla 5. Niveles de probabilidad (U de Mann-Whitney) considerando a todos los animales (am y pm) de los grupos: hembras controles, hembras experimentales, machos controles y machos experimentales.

Grupo	LE	LA	NC	LSM	M	R	TCA
Hembras Controles (Am vs Pm)	0.48	0.04	0.70	0.83	0.91	0.12	0.83
Hembras Experimentales (Am vs Pm)	0.07	0.67	0.6	0.41	0.44	0.75	0.41
Machos Controles (Am vs Pm)	0.09	0.67	0.60	0.32	0.81	0.27	0.32
Machos Experimentales (Am vs Pm)	0.57	0.65	0.93	0.53	1	0.85	0.53
Hembras (Controles vs Experimentales)	0.75	0.1	0.28	0.49	0.74	0.19	0.49
Machos (Controles vs Experimentales)	0.24	0.53	0.34	0.26	0.66	0.96	0.26
Controles (Hembras vs Machos)	0.32	0.59	0.80	0.88	0.001	0.71	0.88
Experimentales (Hembras vs Machos)	0.71	0.16	0.60	0.47	0.002	0.42	0.47

Indicadores conductuales: latencia a enderezarse (LE), latencia a aproximarse (LA), número de contactos (NC), latencia a salida de la madriguera (LSM), número de marcas por minuto (M), número de líneas cruzadas por minuto o recorrido (R) y tiempo total en campo abierto (TCA).

Los niveles de probabilidad se expresan en valores de P. Valores menores a 0.05 son estadísticamente significativos

Tabla 6. Niveles de probabilidad (U de Mann-Whitney) de la conducta sexual de las hembras considerando a todos los animales.

Grupo	CL	M	G
Hembras Controles (Am vs Pm)	0.91	0.91	0.704
Hembras Experimentales (Am vs Pm)	0.97	0.443	0.678
Hembras (Controles vs Experimentales)	0.048	0.747	0.588

Indicadores de conducta sexual: cociente de lordosis (CL), marcas por minuto (M) y porcentaje de gestación (G).

Los niveles de probabilidad se expresan en valores de P. Valores menores a 0.05 son estadísticamente significativos

Tabla 7. Niveles de probabilidad (U de Mann-Whitney) de la conducta sexual de los machos, considerando a todos los animales.

Grupo	MR	M	LM	LE	NM	NE
Machos Controles (Am vs Pm)	0.49	0.81	0.68	0.60	0.38	1
Machos Experimentales (Am vs Pm)	0.79	1	1	0.44	0.06	0.93
Machos (Controles vs Experimentales)	0.002	0.663	0.13	0.002	0.005	0.13

Indicadores conducta sexual: *miss rate* (MR), marcas (M), latencia a la primera monta (LM), latencia a la primera eyaculación (LE), número de montas (NM), y número de eyaculaciones (NE).

Los niveles de probabilidad se expresan en valores de P. Valores menores a 0.05 son estadísticamente significativos.

Además, se realizó el análisis de los datos sin considerar el valor más bajo y el más alto para cada grupo (HC, HE, MC y ME) (ver tabla 8, 9 y 10) y se realizó el análisis de los datos promediando los valores de cada camada, considerando solo los animales sin parentesco (ver tabla 11, 12 y 13). En la tabla 8 podemos observar los niveles de probabilidad (U de Mann-Whitney) sin considerar el valor más alto y el más bajo para los grupos HC, HE, MC y ME. Se analizaron los datos comparando entre horario, tratamiento y sexo, para los indicadores: LE, LA, NC, LSM, M, R y TCA.

Tabla 8. Niveles de probabilidad (U de Mann-Whitney) para los indicadores conductuales sin considerar el valor más alto y el más bajo

Grupo	LE	LA	NC	LSM	M	R	TCA
Hembras Controles (Am vs Pm)	0.46	0.12	0.66	0.82	0.61	0.31	0.82
Hembras Experimentales (Am vs Pm)	0.21	0.84	0.04	0.70	0.13	0.65	0.70
Machos Controles (Am vs Pm)	0.28	0.61	0.52	0.32	0.23	0.38	0.32
Machos Experimentales (Am vs Pm)	0.16	0.60	0.92	0.15	0.52	0.34	0.15
Hembras (Controles vs Experimentales)	0.73	0.06	0.22	0.99	0.001	0.53	0.99
Machos (Controles vs Experimentales)	0.3	0.46	0.37	0.68	0.002	0.37	0.68
Controles (Hembras vs Machos)	0.34	0.52	0.86	0.39	0.79	0.14	0.39
Experimentales (Hembras vs Machos)	0.73	0.12	0.54	0.16	0.27	0.81	0.16

Indicadores conductuales: latencia a enderezarse (LE), latencia a aproximarse (LA), número de contactos (NC), latencia a salida de la madriguera (LSM), número de marcas por minuto (M), número de líneas cruzadas por minuto o recorrido (R) y tiempo total en campo abierto (TCA).

Los niveles de probabilidad se expresan en valores de P. Valores menores a 0.05 son estadísticamente significativos.

Tabla 9. Niveles de probabilidad (U de Mann-Whitney) de la conducta sexual de las hembras, sin considerar el valor más alto y el más bajo.

Grupo	CL	M	G
Hembras Controles (Am vs Pm)	0.98	0.614	0.695
Hembras Experimentales (Am vs Pm)	1	0.132	0.66
Hembras (Controles vs Experimentales)	0.038	0.001	0.573

Indicadores de conducta sexual: cociente de lordosis (CL), marcas por minuto (M) y porcentaje de gestación (G).

Los niveles de probabilidad se expresan en valores de P. Valores menores a 0.05 son estadísticamente significativos

Tabla 10. Niveles de probabilidad (U de Mann-Whitney) de la conducta sexual de los machos, sin considerar el valor más alto y el más bajo.

Grupo	MR	M	LM	LE	NM	NE
Machos Controles (Am vs Pm)	0.34	0.234	0.62	0.53	0.29	1
Machos Experimentales (Am vs Pm)	0.77	0.525	0.38	1	0.046	0.92
Machos (Controles vs Experimentales)	0.001	0.002	0.075	0.001	0.004	0.12

Indicadores de conducta sexual: *miss rate* (MR), número de marcas por minuto (M), latencia a la primera monta (LM), latencia a la primera eyaculación (LE), número de montas (NM) y número de eyaculaciones (NE).

Los niveles de probabilidad se expresan en valores de P. Valores menores a 0.05 son estadísticamente significativos.

En la tabla 11 observamos los niveles de probabilidad (U de Mann-Whitney) para los indicadores conductuales considerando solo animales sin parentesco para los grupos HC, HE, MC y ME. Se analizaron los datos comparando entre horario, tratamiento y sexo, para los indicadores: LE, LA, NC, LSM, M, R y TCA.

Tabla 11. Niveles de probabilidad (U de Mann-Whitney) para los indicadores conductuales (sin parentesco).

Grupo	LE	LA	NC	LSM	M	R	TCA
Hembras Controles (Am vs Pm)	0.88	0.5	0.90	0.66	1	0.73	0.90
Hembras Experimentales (Am vs Pm)	1	0.35	0.35	0.71	1	0.26	0.71
Machos Controles (Am vs Pm)	1	0.71	0.33	0.33	0.5	0.22	0.16
Machos Experimentales (Am vs Pm)	0.22	0.88	0.22	0.66	0.88	0.88	0.22
Hembras (Controles vs Experimentales)	0.35	0.66	0.06	0.84	0.84	0.35	0.84
Machos (Controles vs Experimentales)	0.07	0.54	0.86	0.86	0.88	0.79	0.86
Controles (Hembras vs Machos)	0.54	1	0.38	0.86	0.001	0.86	0.86
Experimentales (Hembras vs Machos)	0.06	0.96	0.49	0.84	0.06	0.4	0.84

Indicadores conductuales: latencia a enderezarse (LE), latencia a aproximarse (LA), número de contactos (NC), latencia a salida de la madriguera (LSM), número de marcas por minuto (M), número de líneas cruzadas por minuto o recorrido (R) y tiempo total en campo abierto (TCA).

Los niveles de probabilidad se expresan en valores de P. Valores menores a 0.05 son estadísticamente significativos.

Tabla 12. Niveles de probabilidad (U de Mann-Whitney) de la conducta sexual de las hembras (sin parentesco)

Grupo	CL	M	G
Hembras Controles (Am vs Pm)	0.90	1	0.495
Hembras Experimentales (Am vs Pm)	0.4	1	1
Hembras (Controles vs Experimentales)	0.21	0.842	0.277

Indicadores de conducta sexual: cociente de lordosis (CL), número de marcas por minuto (M) y porcentaje de gestación (G).

Los niveles de probabilidad se expresan en valores de P. Valores menores a 0.05 son estadísticamente significativos.

En la tabla 13 se encuentran representados los niveles de probabilidad (U de Mann-Whitney) para la conducta sexual de los machos: *miss rate* (MR), número de marcas por minuto (M), latencia a la primera monta (LM), latencia a la primera eyaculación (LE), número de montas (NM) y número de eyaculaciones (NE), considerando solo animales sin parentesco.

Tabla 13. Niveles de probabilidad (U de Mann-Whitney) de la conducta sexual de los machos (sin parentesco)

Grupo	MR	M	LM	LE	NM	NE
Machos Controles (Am vs Pm)	0.22	0.5	0.71	0.73	0.22	1
Machos Experimentales (Am vs Pm)	0.22	0.889	1	1	0.57	0.57
Machos (Controles vs Experimentales)	0.004	0.888	0.16	0.011	0.011	0.2

Indicadores de conducta sexual: *miss rate* (MR), número de marcas por minuto (M), latencia a la primera monta (LM), latencia a la primera eyaculación (LE), número de montas (NM) y número de eyaculaciones (NE).

Los niveles de probabilidad se expresan en valores de P. Valores menores a 0.05 son estadísticamente significativos.

En la tabla 14 se registraron los valores de mediana y niveles de probabilidad (U de Mann-Whitney) considerando a todos los animales de los grupos HC, HE, MC y ME. Se analizaron los datos comparando entre horario, tratamiento y sexo, para los indicadores:

Tabla 14. Niveles de probabilidad (U de Mann-Whitney) y valores de mediana para los indicadores conductuales

Grupo	LE		LA		NC		LSM		Marcas (1min)		Recorrido (1min)	
	me	P	me	P	me	P	me	P	me	P	me	P
Hembras Controles Am	40.5		38		3		30		0.81		8.43	
Hembras Controles Pm	43		61.5		3		30		1.56		6.88	
Hembras Controles Am vs Pm	41.5	0.482	43.5	0.044	3	0.701	30	0.839	1.22	0.91	8.2	0.125
Hembras Experimentales Am	26		34		2.5		18.5		1.73		6.49	
Hembras Experimentales Pm	48		31.5		2		45		1.31		7.05	
Hembras Experimentales Am vs Pm	39.5	0.078	34	0.671	2	0.266	27.5	0.41	1.45	0.443	6.98	0.755
Hembras Controles vs Experimentales		0.755		0.1		0.281		0.491		0.747		0.199
Machos Controles Am	14		38		3		33		6.67		8.38	
Machos Controles Pm	46		34		2.5		44		6.9		7.39	
Machos Controles Am vs Pm	33	0.093	38	0.673	3	0.606	36	0.321	6.67	0.815	7.72	0.277
Machos Experimentales Am	26		41		3		30		8.44		7.8	
Machos Experimentales Pm	48		42		2.5		56		7.26		7.2	
Machos Experimentales Am vs Pm	40	0.574	41	0.65	3	0.936	48	0.538	7.94	1	7.68	0.852
Machos Controles vs Experimentales		0.249		0.53		0.342		0.265		0.663		0.969
Controles Hembras vs Machos		0.325		0.59		0.803		0.888		0.001		0.717
Experimentales Hembras vs Machos		0.719		0.161		0.604		0.47		0.002		0.424

Indicadores conductuales: latencia a enderezarse (LE), latencia a aproximarse (LA), número de contactos (NC), latencia a salida de la madriguera (LSM), número de marcas por minuto (M) y número de líneas cruzadas por minuto o recorrido (R).

Los niveles de probabilidad se expresan en valores de P. Valores menores a 0.05 son estadísticamente significativos.

En la tabla 15 se registran los valores de mediana y niveles de probabilidad (U de Mann-Whitney) considerando todos los animales de los grupos HC, HE, MC y ME. Se analizaron los datos comparando entre horario, tratamiento y sexo, para los indicadores de conducta sexual:

Tabla 15. Niveles de probabilidad (U de Mann-Whitney) y valores de mediana de la conducta sexual de hembras y machos.

Grupo	CL %		Marcas (1min)		MR %		LM		LE		NM		NE	
	me	P	me	P	me	P	me	P	me	P	me	P	me	P
Hembras Controles Am	49.5		0.81											
Hembras Controles Pm	66		1.56											
Hembras Controles Am vs Pm	66	0.91	1.22	0.91										
Hembras Experimentales Am	49.5		1.73											
Hembras Experimentales Pm	33		1.31											
Hembras Experimentales Am vs Pm	33	0.977	1.45	0.443										
Hembras Controles vs Experimentales		0.048		0.747										
Machos Controles Am			6.67		12.5		12		14		0		3	
Machos Controles Pm			6.98		29.16		16.5		19		1		3	
Machos Controles Am vs Pm			6.67	0.815	25	0.492	13	0.689	15	0.607	1	0.388	3	1
Machos Experimentales Am			8.44		66.66		21		39		2		3	
Machos Experimentales Pm			7.26		49.66		20		36		1		3	
Machos Experimentales Am vs Pm			7.94	1	66	0.798	20.5	1	37.5	0.445	2	0.066	3	0.933
Machos Controles vs Experimentales				0.663		0.002		0.131		0.002		0.005		0.139
Controles Hembras vs Machos				0.001										
Experimentales Hembras vs Machos				0.002										

Indicadores de la conducta sexual de hembras: cociente de lordosis (CL), número de marcas por minuto. Indicadores de la conducta sexual de los machos: (M), *miss rate* (MR), latencia a la primera monta (LM), latencia a la primera eyaculación (LE), número de montas (NM) y número de eyaculaciones (NE). Los niveles de probabilidad se expresan en valores de P. Valores menores a 0.05 son estadísticamente significativos.

8. Discusión

8.1. Medición del peso

En el presente trabajo el número de nacidos vivos fue similar tanto en camadas controles como en experimentales. No obstante todas las camadas se ajustaron a 6 gazapos (los más pesados) el día del parto, sin que pudiéramos saber el sexo de los animales. Dado que en el DPN 0 es imposible distinguir el sexo de los gazapos por simple observación del área genital (Bautista y cols. 2005, Reyes-Meza y cols. 2011). También se sabe que al conformar camadas por lo menos con 6 crías, la hembra recibe la estimulación necesaria para que su comportamiento materno sea normal, manteniendo una ritmicidad circadiana del amamantamiento (el estímulo de la succión podría funcionar como un sincronizador no fótico para la hembra) (González-Mariscal y cols. 2013).

Usualmente las camadas de conejos domésticos varían entre 6 y 8 gazapos, aunque camadas de más de 10 gazapos no son inusuales (Bautista y cols. 2005). Sin embargo, se ha visto que el ajuste de camada a 6 gazapos, disminuye la competencia durante el amamantamiento, permitiéndoles obtener más leche (hasta el 30% de su peso corporal Bautista y cols. 2005). Lo que a su vez, mejora su probabilidad de supervivencia (Bautista y cols. 2003, Castellini y cols. 2003). Por otro lado, el ajuste de camada, seleccionando a los seis animales más pesados, también representa ventajas térmicas para los gazapos, quienes ocupan posiciones centrales dentro del nido, lo que se traduce en una menor variación en la temperatura corporal (Bautista y cols. 2017) y una mayor temperatura corporal en comparación con gazapos ligeros (Bautista y cols. 2005, Rödel y cols. 2008, 2017). En el experimento de Brecchia y cols. (2009), observamos camadas de 7 a 9 gazapos, lo que implica un aumento en la competencia por el alimento y probablemente una mayor demanda energética por las fluctuaciones en la temperatura corporal, en comparación con los animales del presente trabajo (6 gazapos por camada).

En el presente trabajo pudimos observar que el peso de las hembras controles y experimentales no fue diferente en el DPN 0. Sin embargo, en el DPN 16 las hembras controles fueron más pesadas en comparación con las hembras experimentales (a las que se les canceló un episodio de succión en el DPN 10). Por el contrario, el peso de los machos controles fue significativamente menor en comparación con los machos experimentales en el DPN 0. No obstante, en el DPN 16 no se observaron diferencias entre machos controles y experimentales. Estos resultados nos indican que tanto las hembras como los machos experimentales perdieron peso después de la separación madre-crías durante 48 h. Nuestros resultados son consistentes con los de Brecchia y cols. (2009) quienes observaron una pérdida de peso corporal en los gazapos después de la separación madre-crías, lo cual tuvo un fuerte impacto sobre la tasa de crecimiento y la ganancia de peso. En el presente trabajo el peso de los animales (controles y experimentales) no mostró diferencias significativas a partir del DPN 30 (ver tabla 3).

Por otro lado, Verwer y cols. (2009), indican que la manipulación de los gazapos (pesarlos antes del amamantamiento durante las primeras 4 semanas de vida), no tiene ningún efecto sobre el peso corporal. De hecho, pesar a los gazapos antes y después del amamantamiento, es un manejo comúnmente utilizado para determinar el consumo de leche y esto no interfiere con el amamantamiento (Bautista y cols. 2003, 2005, 2015, 2017). Sin embargo, en el presente trabajo se pesó a cada animal en los DPN 0, 16, 30, 45 y 120, después de la una de la tarde en todos los casos. Aunque la manipulación de los animales no afecta su consumo de leche y ganancia de peso, sí puede modificar la conducta de los animales a largo plazo, entendida como una disminución del miedo del conejo hacia el manipulador (Pongrácz y Altbäcker 1999). Sin embargo, la manipulación de gazapos se hizo por igual en los animales controles y en los experimentales, por lo tanto, aunque dicho procedimiento hubiera afectado el comportamiento de los conejos cuando adultos, habría afectado por igual a los grupos controles y experimentales.

La separación madre-crías durante 48 h y la consecuente cancelación de un episodio de succión durante el periodo posnatal temprano, afecta la ganancia de peso de los animales (Brecchia y cols. 2009), lo que a su vez, puede modificar el fenotipo conductual y la capacidad del eje HHA para responder a estímulos estresantes cuando adultos (Mc Elreath y cols. 2007, Rödel y Monclús 2011). Por ejemplo, los conejos con un peso corporal bajo durante el periodo pre-destete, cuando adultos, mostraron altos signos de ansiedad, mientras que los conejos con mayor peso en el periodo pre-destete fueron más dominantes cuando adultos en los encuentros agonistas o en las peleas con conespecíficos y mostraron más conductas exploratorias y menos ansiedad, sin importar el sexo, el tamaño de camada o el peso al nacimiento (Rödel y von Holst 2009, Rödel y Monclús 2011).

Sin embargo, en el presente experimento, el peso de los animales en el DPN 30 (día en que se realizó el destete) fue similar en todos los grupos (hembras controles, hembras experimentales, machos controles y machos experimentales), lo que podría explicar la falta de diferencias en la mayoría de los indicadores conductuales entre animales controles y experimentales. Posteriormente (DPN 45 y 120) no se encontraron diferencias significativas en el peso promedio de los animales de cada grupo. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Reyes-Meza y cols. (2011) quienes reportan que después del destete y gracias al consumo

de alimento sólido, no se encontraron diferencias (ambos sexos) entre conejos centrales, intermedios y periféricos cuando adultos (DPN 100), a pesar de que los animales periféricos fueron significativamente más ligeros durante el periodo pre-destete.

8.2. Medición de glucocorticoides en plasma

De acuerdo con Brecchia y cols. (2009) la separación madre-crías y su consecuente cancelación de un episodio de succión, modifica a corto y largo plazo la respuesta del eje HHA, disminuyendo al mínimo la secreción de corticosterona en respuesta a la inyección de solución salina. Sin embargo, en el presente experimento observamos que la cancelación de un episodio de succión, no disminuyó la respuesta del eje HHA a la inyección de solución salina en hembras adultas. Es decir no se observaron diferencias entre los grupos control y experimental, cuando las muestras se tomaron en la mañana. De hecho, en todos los animales se observó un incremento en los niveles de cortisol y corticosterona en plasma, a partir del minuto 30 post-inyección. Sin embargo, estas diferencias en la respuesta del eje HHA podrían deberse en parte a las diferencias en el tamaño de camada, en el tipo de nido y en el tiempo que los animales permanecieron sin succionar leche.

En el presente experimento ajustamos la camada a 6 crías, lo que representa menor competencia durante el amamantamiento (Bautista y cols. 2003), un mayor consumo de leche (Bautista y cols. 2005) y menos fluctuaciones en la temperatura corporal (Castellini y cols. 2003 Rödel y cols. 2008). En el experimento de Brecchia y cols. (2009), las camadas variaban entre 7 y 9 crías, lo que representa una mayor competencia entre los gazapos. También sabemos (comunicación personal) que el nido que se utilizó en el experimento de Brecchia y cols. (2009) era un nido de canastilla (plástico) que cuelga a lado de la jaula de la madre. Este tipo de nidos conservan menos el calor y se encuentran más vulnerables ante los cambios de temperatura ambiental. En el presente experimento utilizamos nidos de madera, completamente cerrados, por lo que el microclima del nido fue más cálido y estable ante los cambios ambientales.

En el presente trabajo se realizó una lactancia controlada durante los primeros 14 días de vida, tanto en animales controles como en experimentales, permitiendo que la hembra amamantara a sus gazapos todos los días a las once horas. En el DPN 10 no se abrió la puerta del nido de los animales experimentales, por lo que permanecieron separados de sus madres y sin succionar leche durante 48 h. En el experimento de Breccia y cols. (2009) se reporta que las hembras tuvieron libre acceso al nido durante los primeros 9 días post-natales, y en las camadas experimentales, se realizó una separación madre-crías entre los DPN 9 y 11, cerrando el nido en el DPN9 a las once horas y abriéndolo nuevamente a las once horas del DPN11. Considerando que las hembras amamantan a sus crías (una vez al día durante 3 minutos aproximadamente) alrededor de las dos horas (González-Mariscal y cols. 2013) y después del amamantamiento no vuelve a establecer ningún contacto con las crías, aun teniendo libre acceso a al nido (Bautista y cols. 2005, González-Mariscal y cols. 2013, Jilge 1993, 1995). Suponemos que en el experimento de Breccia y cols. (2009) las crías permanecieron 57 h sin succionar leche (fueron amamantadas a las dos horas del DPN 9 y el siguiente amamantamiento fue a las once horas del DPN 11).

Debemos enfatizar que el horario de amamantamiento, no modifica la conducta de la hembra ni de los gazapos (Baumann y cols. 2005, Rovirosa y cols. 2005, Caba y González-Mariscal 2009, Morgado y cols. 2008, 2010, 2011, Bautista y cols. 2017). Es decir, éstos siguen presentando la típica actividad anticipatoria al alimento (AA) (Rovirosa y col. 2005), las conductas de búsqueda y succión del pezón, y la competencia entre hermanos durante el amamantamiento tampoco se modifican con el cambio de horario de succión (Bautista y cols. 2005).

Sin embargo, el amamantamiento es un sincronizador para el gazapo, capaz de modificar la ritmicidad circadiana de la corticosterona, debido a la estrecha relación que existe entre los niveles de glucosa y corticosterona en sangre. Doce horas después del amamantamiento, los niveles de glucosa en sangre aumentan hasta alcanzar el cenit, mientras que los niveles de corticosterona alcanzan el nadir, doce horas después del amamantamiento (Morgado y cols. 2008). No obstante, la separación madre-crías por 48 h y la consecuente cancelación de un episodio de succión, prolonga la AA de los gazapos entre 4 y 6 h (Rovirosa 2005, Morgado 2008) sin que esto modifique la ritmicidad circadiana de la corticosterona (DPN 7). Se observan

niveles máximos de corticosterona 48 y 52 h después del amamantamiento y niveles mínimos 60 h después de éste (Morgado y cols. 2008). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Brecchia y cols. (2009), quienes reportan en gazapos (DPN 11) un incremento en los niveles de corticosterona en plasma 48 h después del amamantamiento y un incremento en los receptores a glucocorticoides (GR) en el hipotálamo.

Pensamos que en el presente trabajo, la demanda energética de los gazapos fue menor (gracias a la estimulación proporcionada por los hermanos de cama y las condiciones de nido así como por la diferencia en el tiempo que los gazapos permanecieron sin succionar leche) en comparación con los animales del experimento de Brecchia y cols. (2009).

De acuerdo con lo reportado por Szeto y cols. (2004), la secreción de glucocorticoides en conejos de laboratorio adultos (machos) presenta una ritmicidad circadiana, tanto para cortisol como para corticosterona, con una secreción mínima a las seis horas (0.44 μ g/dl, 14.25ng/ml) y una secreción máxima a las dieciocho horas (0.92 μ g/dl, 30.01ng/ml). Coincidentemente nuestros resultados muestran una tendencia similar en las muestras basales, las cuales fueron numéricamente mayores en la tarde (quince horas) con respecto a las basales tomadas en la mañana (ocho horas). En las hembras experimentales, se observó que la cantidad de cortisol y corticosterona secretados en los minutos 90 y 120 post-inyección fue significativamente más alta en las muestras de la tarde, en comparación con las muestreadas de la mañana.

Por otro lado, en machos, se ha visto que la cantidad de cortisol y corticosterona incrementan de manera similar en respuesta a la conducta sexual (después de una hora de interacción con la hembra) (Szeto y cols. 2004). En el presente experimento también observamos que la cantidad de cortisol y corticosterona incrementan de manera similar en respuesta a la inyección de solución salina en hembras controles y experimentales.

8.3. Pruebas conductuales

8.3.1. Reflejo de enderezamiento

La conducta de inmovilidad tónica (*freezing*) y las respuestas autónomas simpáticas, pueden funcionar como índices de respuestas reactivas ante una amenaza (Moscarello y LeDoux 2013 citado por Gorka y cols. 2016). Por ello, actualmente la prueba de reflejo de enderezamiento o inmovilidad tónica se utiliza para evaluar el nivel de miedo de los conejos hacia los humanos (Kowalska y cols. 2008, Verwer y cols. 2009, Filiou y cols. 2012, Trocino y cols. 2013, 2014). No obstante, la duración de la inmovilidad tónica esta correlacionada positivamente con el nivel de miedo de los conejos hacia cualquier predador (Filiou y cols. 2012).

En el presente trabajo, la separación madre-crías por 48 h no tuvo efecto sobre el tiempo en segundos que los animales permanecieron en inmovilidad tónica. En todos los grupos (hembras controles, hembras experimentales, machos controles y machos experimentales), el tiempo que permanecieron en inmovilidad fue similar (mediana 40 s). La duración de la inmovilidad tónica se pueden modificar, por las condiciones de alojamiento, por ejemplo, Trocino y cols. (2013) observaron que la duración de la inmovilidad fue mayor en los animales que fueron alojados de forma individual (47.8s) comparado con los animales que fueron alojados en jaulas dobles (25 s) o colectivas (25 s). Estos investigadores evaluaron a los conejos a los 42 y 70 días de edad y encontraron que en promedio, la duración total de la inmovilidad disminuyó significativamente (36 s vs 29.2 s) cuando la edad de los conejos aumentó.

Del mismo modo Trocino y cols. (2014) observaron la misma tendencia, en la reducción del tiempo total de inmovilidad (41.5 s vs 28.9 s) cuando la edad de los conejos aumentó de 55 a 72 días. No obstante, Zucca y cols. (2012) no encontraron diferencias entre animales alojados de forma individual o colectiva, sobre el rango de tiempo en segundos que los animales permanecieron en inmovilidad (33.7 a 60.7). Estos resultados coinciden con los del presente trabajo, ya que los animales permanecieron en jaulas colectivas hasta el DPN 45 y posteriormente fueron alojados en jaulas individuales. Además, no se encontraron diferencias entre hembras y machos controles, ni entre hembras y machos experimentales. Con base en estos resultados, podríamos clasificar a los animales como reactivos.

Al respecto Reyes-Meza y cols. (2011) observaron (ambos sexos) que los animales centrales permanecían inmóviles mucho más tiempo que los animales intermedios o periféricos, sin embargo, en todos los casos, el tiempo que permanecieron en inmovilidad disminuyó cuando se repitió la prueba, presumiblemente por la habituación de los animales. Otros autores (Gallup 1974 citado por Verwer y cols. 2009) han observado que diferentes eventos aversivos, inmediatamente antes de la prueba de inmovilidad tónica, pueden incrementar el tiempo que el animal permanece inmóvil. Verwer y cols. (2009) también observaron que la repetida manipulación (pesando a los gazapos 6 veces por semana, durante las primeras 4 semanas de vida) puede disminuir la inmovilidad tónica, también observaron tanto en animales manipulados, como no manipulados, que la inmovilidad tónica (31.75 ± 23.40 vs 112.5 ± 138.7), aumentó después de la castración (84 d de vida) de los machos (57.09 ± 76.92 vs 73.81 ± 95.35) respectivamente.

8.3.2. Aproximación al humano

El nivel de miedo del conejo hacia el humano, también se puede evaluar con la prueba de aproximación al humano (la latencia a la primera aproximación y el número de contactos que el conejo establece con la mano del humano). No obstante, se ha visto que el nivel de miedo del conejo se puede reducir a través de la manipulación (tocando a los animales con la mano durante la primera semana de vida 15 min antes o 15 min después del amamantamiento) (Bilkó y Altbäcker 2000, Pongrácz y Altbäcker 1999, 2003). Entendida como una reducción en la latencia a la primera aproximación (180s no manipulados vs 25s manipulados), así como un incremento en el número de contactos (1 no manipulados vs 6 manipulados) (Bilkó y Altbäcker 2000).

En el presente trabajo, la separación madre-crías por 48 h, no tuvo ningún efecto sobre la latencia a aproximarse al humano (mediana 40 s) ni tampoco sobre el número de contactos (mediana 3 contactos) que realizaron los conejos, en ninguno de los grupos (hembras controles, hembras experimentales, machos controles y machos experimentales). Al respecto Csatádi y cols. (2005) observaron que el mínimo contacto con los gazapos (tocarlos con la mano durante 5 s) fue suficiente para reducir las respuestas de miedo, incluso se ha visto que no es necesario el contacto físico, la simple exposición al olor de humano durante la primera semana de vida,

poco antes del amamantamiento, fue suficiente para reducir cuando adultos, el miedo del conejo hacia el humano (Dúcs y cols. 2009). En contraste, los animales no manipulados siguen mostrando una reducida actividad en presencia del humano.

También se ha observado que la exposición no sólo al olor de humano si no al de diferentes especies (gato y zorro) durante la primera semana de vida un poco antes del amamantamiento, favorece en los conejos el reconocimiento de otra especie como un conoespecífico, lo que a su vez reduce el miedo del conejo, expresado en una latencia corta a la primera aproximación y un mayor número de contactos (Pongrácz y cols. 2001, Csatádi y cols. 2007). Los efectos de la manipulación sobre el nivel de miedo del conejo se pueden observar a corto (un mes de edad) y largo plazo (seis meses de edad) (Bilkó y Altbäcker 2000).

8.3.3. Campo abierto

La prueba de campo abierto evalúa el nivel de miedo del animal ante un ambiente novedoso (Trocino y cols. 2014). Una reducida actividad locomotora (bajo número de cruces) o la conducta de inmovilidad, indican que los conejos tienen miedo (Daniewski y Jeziersky 2003, Brown 2012). Por otro lado, el aumento en la actividad locomotora (alto número de cruces) y las conductas exploratorias del animal, son un buen índice de adaptación del conejo hacia un ambiente novedoso (Swennes y cols. 2011, García-Dalmán 2013, Trocino y cols. 2014). Algunas de las conductas exploratorias son: levantarse sobre las patas traseras, oler o mirar alrededor y el marcaje por frotamiento del mentón (chinning). El marcaje consiste en frotar el mentón contra diversos objetos o contra otros animales presentes en el entorno, depositando así las secreciones de la glándula submandibular (González-Mariscal y cols. 1990, 1992ab, 1997, Hoffman y cols. 2010, Trocino y cols. 2014).

En el presente trabajo observamos que la separación madre-crías por 48 h no afectó la latencia a salir de la madriguera: no se encontraron diferencias entre hembras y machos de un mismo grupo, entre los grupos de hembras controles y experimentales, ni entre machos controles y machos experimentales. Nuestros resultados coinciden con lo reportado por Rödel y Monclús (2011) quienes no encontraron diferencias en el tamaño de camada, o entre hembras y machos, ni entre animales pesados y ligeros, sobre la latencia para iniciar la actividad en un ambiente novedoso. Por su parte Reyes-Meza y cols. (2011) tampoco encontraron diferencias en la

latencia a salida de la madriguera entre animales centrales, intermedios o periféricos (ambos sexos), a pesar de que los animales centrales e intermedios fueron significativamente más pesados que los animales periféricos durante la primera semana de vida.

Al respecto Trocino y cols. (2012) indican que los conejos alojados en jaulas colectivas (9 animales por jaula) entran de manera espontánea al campo abierto (< 20 s) y que la latencia a salida de la madriguera disminuye conforme aumenta la edad del animal (42 a 70 d). Posteriormente Trocino y cols. (2014) encontraron que la latencia a salida de la madriguera disminuyó conforme la edad del animal aumentó de 56 a 75 d y explican que dichos resultados pueden deberse a la habituación y manipulación de los animales. Como se describió en métodos, en el presente estudio los conejos de una misma camada, permanecieron juntos (jaula colectiva) hasta el DPN 45, posteriormente, los animales fueron alojados individualmente en jaulas dobles. Por lo tanto con nuestros resultados de latencia a salida de la madriguera (mediana 25 s) podríamos inferir que los conejos mostraron bajos niveles de miedo ante un ambiente novedoso.

La separación madre-crías por 48 h, tampoco afectó el número de marcas por minuto (chinning), ya que no se encontraron diferencias entre los grupos de hembras controles y experimentales ni entre machos controles y machos experimentales. Sin embargo, pudimos observar que los machos marcaron mucho más que las hembras. Nuestros resultados son consistentes con lo reportado por Mykytowycz (1965) quienes observaron que la frecuencia del marcaje fue mayor en machos que en hembras. Específicamente estas diferencias se han observado en animales adultos (siete meses de edad) (González-Mariscal y cols. 1992). No obstante, Hoffman y cols. (2010) reportan que la frecuencia en el marcaje no fue diferente entre machos y hembras (seis meses de edad).

La actividad locomotora (número de líneas cruzadas por minuto), tampoco fue diferente entre machos y hembras de un mismo grupo, entre hembras controles y experimentales, ni entre machos controles y experimentales. Nuestros resultados coinciden con lo reportado por Hoffman y cols. (2010) quienes indican que el número de líneas cruzadas fue similar entre machos y hembras. Al respecto Rödel y Monclús (2011) observaron que los conejos con mayor peso corporal en la etapa pre-destete tienen más conductas exploratorias y menor ansiedad durante la prueba de campo abierto. Coincidentemente, nosotros no encontramos diferencias en el peso de los animales en el DPN 30, por lo que resulta congruente que no encontráramos

diferencias en el número de líneas cruzadas por minuto. Además, se sabe que la habituación de los conejos puede provocar una disminución en la ambulación (Kowalska y cols. 2008, Trocino y cols. 2014), no obstante, nosotros minimizamos esta posibilidad al aleatorizar el orden en el que se realizaron las pruebas.

Verwer y cols. (2009) clasificaron a los animales como manipulados (pesando a los gazapos 6 veces por semana, durante las primeras 4 semanas de vida) y no manipulados (pesando a los gazapos una vez por semana, durante las primeras 4 semanas de vida) y observaron que durante la primera evaluación en campo abierto los animales manipulados mostraron más conductas exploratorias y mayor movilidad. Por su parte, Rödel y cols. (2006) observaron que los animales reactivos fueron más cautelosos en sus movimientos, durante la prueba de campo abierto, en tanto que los animales audaces exploraron más y fueron menos temerosos (Trocino y cols. 2012). No obstante, nosotros observamos animales audaces y temerosos en todos los grupos. Y de acuerdo con la clasificación de Verwer y cols. (2009), nuestros animales podrían considerarse como no manipulados. Dado que en el presente experimento pesamos a los animales sólo en los DPN 0, 16, 30, 45 y 120 (dos horas después del amamantamiento). Al respecto, Rödel y Monclús (2011) observaron que los animales que mostraron más conductas exploratorias en un ambiente novedoso, mostraron menos signos de ansiedad durante la prueba de olor de predador.

Por su parte, Kowalska y cols. (2008) clasificaron a los animales de acuerdo a su actividad durante la prueba de campo abierto en: activos (grupo I) y pasivos (grupo II). Y observaron que los machos del grupo I se mostraron más dispuestos y fueron más rápidos durante el apareamiento (aproximadamente el 80% de los machos se apareó durante la primera semana de pruebas), mientras que los machos pasivos (grupo II) fueron más tímidos durante el apareamiento (solamente el 20 % de los animales consiguieron aparearse durante la primera semana de pruebas). En las hembras del grupo I sólo el 45 % se apareó durante la primera semana, comparado con el 70% de las hembras del grupo II. Además, las hembras del grupo I fueron más activas en la prueba de campo abierto, pero fue más difícil aparearlas y después del parto fueron peores madres en comparación con las hembras del grupo II.

8.3.4. Conducta sexual

8.3.4.1. Hembras

Durante el estro, la coneja despliega dos conductas características: el marcaje por frotamiento del mentón (que es una conducta de proceptividad) y la respuesta de lordosis, dorsoflexión de la columna vertebral con levantamiento de la grupa (que indica receptividad sexual) (Hudson y cols. 1990, González-Mariscal 2006). El marcaje está asociado con la maduración sexual, debido a su regulación, activación y mantenimiento, a través de la secreción de estradiol (Hudson y cols. 1990, González-Mariscal y cols. 1990, 1992). En la hembra esta conducta precede al inicio de la actividad sexual, aumentando del DPN 50 al 100 (González-Mariscal y cols. 1992).

En el presente trabajo no se encontraron diferencias en el número de marcas por minuto entre las hembras controles y las experimentales. No obstante el número de marcas registradas en 10 min (mediana 20 marcas), es similar a lo reportado por González-Mariscal y cols. (1990) quienes observaron, que en promedio, las conejas en estro realizan entre 20 y 25 marcas en 10 minutos de prueba. Por otro lado, el cociente de lordosis fue mayor en el grupo de hembras controles que en las experimentales. Sin embargo, el porcentaje de hembras gestantes fue similar para ambos grupos (controles y experimentales). Al respecto, se sabe que gracias a la estimulación vagino-cervical, la hembra puede ovular (Bonanno y cols. 1999). No obstante, el proceso mediante el cual una hembra concreta la gestación, implica otros factores como la calidad espermática del macho (May y Simpson 1975) el estado nutricional de la hembra (González-Mariscal y cols. 2007, Gluckman y cols. 2007, Zambrano y cols. 2015), el proceso de fecundación y la implantación (Pfaff y cols. 1994) entre otros, por lo que resulta difícil conocer el efecto de la cancelación de un episodio de succión sobre el porcentaje de hembras apareadas que resultaron gestantes.

8.3.4.2. Machos

En el presente trabajo se observó que la separación madre-crías por 48 h, posiblemente provocó en los machos alguna alteración sobre su conducta sexual. Los machos experimentales tuvieron un porcentaje de montas que no culminaron en eyaculación (*miss rate*) muy elevado en comparación con los animales del grupo control (66 vs 25 % respectivamente). En los conejos

el apareamiento, es un evento relativamente breve. Durante la cópula, el macho monta a la hembra aferrando su cuerpo con sus patas delanteras en cada flanco y realiza una serie de movimientos pélvicos rítmicos a una frecuencia de 13 movimientos por segundo. Estos movimientos estimulan los flancos y el dorso de la hembra (Beyer y cols. 1980). En respuesta a la monta del macho, la hembra adopta la postura de lordosis, lo cual facilita la intromisión del pene, seguida de la eyaculación (duración aproximada de 200 msec). Tras la eyaculación el macho cae hacia atrás o lateralmente y generalmente emite un chillido característico (Contreras y Beyer 1979).

Sin embargo, no todas las montas que el macho realiza culminan en eyaculación. A partir del número montas inefectivas (que no terminan en eyaculación), se calcula la tasa de error o “*miss rate*” (Jiménez y cols. 2012). No obstante, la tasa de error solamente había sido evaluada en animales con experiencia sexual, mientras que en el presente experimento, los machos nunca habían tenido la oportunidad de interactuar con una hembra sexualmente receptiva (hembra estímulo, ovx, tratada con benzoato de estradiol). Nuestros resultados indican que la latencia a la primera monta fue similar entre machos controles y experimentales, mientras que la latencia a la primera eyaculación fue mayor en los animales experimentales, lo cual coincide con un mayor porcentaje de *miss rate*.

Estos resultados nos indican que en general, los machos experimentales tardaron más tiempo en ejecutar la primera eyaculación y tuvieron que realizar un mayor número de montas para conseguir tres eyaculaciones, a pesar de que las hembras-estímulo estaban receptivas. Algunos autores reportan en machos con experiencia sexual, que los animales audaces consiguen con mayor frecuencia montar y eyacular aún con hembras agresivas, comparados con animales tímidos (Hudson y cols. 1990). Generalmente, los animales agresivos y de alto rango jerárquico, tienen más respuestas proactivas. Mientras que los animales no agresivos o reactivos, son más flexibles y fáciles de adaptar, y responden sólo cuando es necesario (Koolhaas y cols. 1999).

8.4. Discusión general

Recientes evidencias en el conejo sugieren que la separación madre-crías (SMC) durante 48 h en la lactancia temprana disminuye a largo plazo la reactividad del eje HHA. Los conejos SMC, cuando adultos no responden al estímulo de la inyección de solución salina manteniendo sus niveles de glucocorticoides post-inyección, similares a los niveles basales, en comparación con animales controles (no separados), cuya secreción de glucocorticoides se incrementa considerablemente a partir del minuto 30 post-inyección (Brecchia y cols. 2009). En el presente trabajo no encontramos diferencias en la respuesta del eje HHA ante el estímulo de inyección de solución salina, entre hembras controles y experimentales muestreadas en la mañana. Sin embargo, en las hembras muestreadas en la tarde se observó que la secreción tanto de cortisol como de corticosterona fue mayor en el grupo experimental que en el grupo control. No obstante, estas diferencias en cuanto a la reactividad neuroendócrina, no afectaron la reactividad conductual, ya que no encontramos diferencias significativas (ambos sexos) entre animales controles y experimentales, en los indicadores de: reflejo de enderezamiento, latencia a aproximarse al humano, número de contactos establecidos, latencia a salida de la madriguera, locomoción en campo abierto y marcaje por frotamiento del mentón.

A pesar de que la secreción de glucocorticoides es un claro indicador de la reactividad neuroendócrina de los animales, existen muy pocas evidencias de la asociación entre las respuestas conductuales y las respuestas fisiológicas en un mismo individuo. Por ejemplo, Rödel y cols. (2006) observaron que los animales (ambos sexos) con más conductas exploratorias en la prueba de campo abierto, mostraron menos cambios en la secreción de corticosterona en suero, en respuesta a la presencia de olor a heces de zorro. Asimismo, Kowalska y cols. (2008) determinaron que los animales proactivos (ambos sexos) tienen una secreción de cortisol mayor que los animales reactivos.

Por otro lado, Szeto y cols. (2004) encontraron una correlación significativa entre los niveles de glucocorticoides (corticosterona y cortisol) antes y después del apareamiento, y los comportamientos agonísticos defensivos. Interesantemente, también observaron que la secreción de glucocorticoides después del apareamiento, fue máxima, durante los primeros tres días de pruebas, sin embargo, conforme se siguió repitiendo la prueba (días 8 y 10) los niveles de ambos glucocorticoides disminuyeron. Estos resultados nos confirman que la repetida

manipulación de los animales puede habituarlos y por lo tanto disminuir la reactividad tanto fisiológica como conductual (Szeto y cols. 2004, Trocino y cols. 2014).

La reactividad del eje HHA, también está condicionada por la intensidad y novedad del estímulo estresante. Por ejemplo: Keating y cols. (2012), describen que el tatuaje en la oreja sin ningún analgésico local, provoca un incremento en los niveles de corticosterona en suero mucho mayor que el observado en animales que fueron tatuados con la aplicación de analgesia local, o con animales (*sham*) a los que sólo se les realizó la manipulación necesaria para realizar el tatuaje pero que no fueron realmente tatuados.

A pesar de que el fenotipo conductual o la personalidad de los animales, se encuentran dentro de un gradiente entre lo audaz (proactivo) y lo tímido (reactivo) (Wilson 1994, Gosling y John 1999, Rödel y cols. 2006, Stamps y Groothuis 2010, Rödel y Monclús 2011, Vindas y cols. 2017) son las diferencias en la reactividad del eje HHA las que se encargan de caracterizar a los individuos, de acuerdo a la regulación de los receptores a glucocorticoides (GR) y a mineralocorticoides (MR). Los animales proactivos responden al estrés con una menor reactividad del eje HHA y una gran actividad del sistema nervioso simpático (Koolhaas y cols. 1999, Vindas y cols. 2017).

En cerdos se ha observado que los animales que opusieron más resistencia durante la prueba de inmovilidad tónica (proactivos), cuando adultos (11 meses de edad), tuvieron una concentración circadiana de cortisol más baja en comparación con los cerdos que opusieron menos resistencia (reactivos) (Geverink y cols. 2003). En gallinas, se ha visto que tanto el enriquecimiento ambiental como la manipulación, redujeron la latencia a iniciar actividad en un ambiente novedoso, el tiempo que el animal permaneció en inmovilidad tónica y las conductas de ansiedad (Gallup 1974, 1977, Jones y Waddington 1992). Incluso se ha observado que los peces proactivos, muestran niveles menores de cortisol después de un evento estresante comparado con los peces reactivos (Vindas y cols. 2017).

En ratas, los animales que fueron manipulados (separación madre-crías retirando a toda la camada de la caja nido, por quince minutos al día, durante los primeros catorce días de vida) mostraban cuando adultos, menos conductas de ansiedad y depresión lo que refleja una moderada reactividad del eje HAA y un bajo nivel de miedo. Además, estos animales tienen una respuesta cognitiva más eficiente (atención y aprendizaje) y son menos agresivos en

comparación con animales no manipulados (Caldji y cols. 2000, Cirulli y cols. 2003, Macri y cols. 2004, Menard y Hakvoort 2007).

Otros autores han observado que en los animales manipulados los niveles de corticosterona regresan rápidamente a los niveles basales una vez que el estímulo estresante finaliza. Esto podría indicar una mayor eficiencia en la retroalimentación negativa así como un mayor número de receptores a glucocorticoides (Plotsky y Meaney 1993, Anisman y cols. 1998, Caldji y cols. 2000). En el experimento de Brecchia y cols. (2009) el incrementaron los GR en el hipotálamo y disminuyó al mínimo la reactividad del eje HHA, sin que esto afectara los niveles de glucocorticoides basales, los cuales fueron similares entre animales SMC y controles. Sin embargo, es necesario considerar el horario en el que se realizó la prueba y el horario en el que se colectaron las muestras de sangre pues este factor podría enmascarar o amplificar los resultados (Szeto y cols. 2004). En el presente experimento, observamos en hembras experimentales una diferencia significativa entre las muestras tomadas en la mañana y en la tarde. La cantidad de cortisol y corticosterona secretada en respuesta a la inyección de solución salina fue mayor en las muestras de la tarde.

Del mismo modo Reyes-Meza y cols. (2011) no encontraron diferencias en los niveles basales de glucocorticoides en orina (ambos sexos) entre animales centrales, periféricos e intermedios. Trocino y cols. (2014) tampoco observaron diferencias en los niveles basales de glucocorticoides en heces (ambos sexos) entre animales alojados en jaulas individuales o colectivas. En peces tampoco se reportan diferencias entre animales proactivos y reactivos en los niveles basales de glucocorticoides en plasma, ni después de la aplicación de un estrés agudo (Vindas y cols. 2017). En nuestro caso, observamos que las muestras basales de la mañana fueron ligeramente menores que las basales de la tarde.

Al respecto Vindas y cols. (2017) indican que los animales reactivos se caracterizan por: una baja expresión de GR y MR en el hipotálamo, una baja proporción de MR/GR y una alta actividad serotoninérgica. Aunque se sabe que la activación de los receptores a glucocorticoides (GR) está asociada a la consolidación de información adquirida (Lovic y Fleming 2004) la proporción entre GR y MR es el factor clave en la regulación de la reactividad conductual, la memoria y el aprendizaje (Herrero y cols. 2006 citado por Vindas y cols. 2017). En el hipotálamo, las diferencias en la proporción de GR/MR puede contribuir a cambiar la

proporción del transcriptoma del factor liberador de corticotropina (CRF) lo que a su vez regula la producción de glucocorticoides. Los animales proactivos son más robustos y posiblemente más capaces de aprender bajo condiciones de estrés en comparación con los animales reactivos (Vindas y cols. 2017).

En el caso de los animales reactivos, se han encontrado consistentemente altas concentraciones de cortisol post-estrés (Koolhaas y cols. 2007). Por ejemplo en las ratas, la separación madre-crías (retirando a toda la camada de la caja nido por 60 min al día, durante los primeros catorce días de vida), incrementa cuando adultos, la reactividad al estrés y la actividad del eje HHA; además, se observa una disminución en las conductas exploratorias (Anisman y cols. 1998, Liu y cols. 1999). También se ha reportado que la separación madre-crías durante 24 h en el DPN 12, resulta en una disminución de los sitios de unión del CRF en la adenohipófisis, lo que posiblemente está relacionado con el incremento en la liberación de CRF.

Otros cambios que provoca en las ratas la separación materna son: el incremento en la densidad de sitios de unión a CRF en la corteza frontal, la amígdala, el hipotálamo y el hipocampo, pero no se observan cambios en la corteza prefrontal, en el locus coeruleus ni en el núcleo del rafe. Dicha alteración de la densidad de los receptores a CRF podría reflejar un efecto de sensibilización, aumentando así las consecuencias de enfrentar un estresor en la vida adulta (Anisman y cols. 1998). También se ha descrito una reducción en el número de GR en el hipotálamo e hipocampo y en el nivel basal de RNAm de CRF en el hipotálamo y la eminencia media, en animales que fueron separados de sus madres por periodos largos (Plotsky y Meaney 1993, Melo 2015).

En ratas la separación madre-crías (separación por 180-360 min diariamente, durante los DPN 2-21), también provoca: a) un incremento en los niveles de ACTH y de glucocorticoides en plasma en respuesta a un estrés moderado (choque eléctrico en la patita); b) un incremento en la latencia a iniciar actividad en un ambiente novedoso; c) un incremento en la latencia a la monta y la eyaculación; d) una disminución en el porcentaje total de eyaculaciones (Anisman y cols. 1998, Rees y cols. 2001, Francis y cols. 2002, Plotsky y cols. 2005). En concordancia con estos resultados, en el presente trabajo pudimos observar que la separación madre-crías durante 48 h, tuvo efectos selectivos sobre la conducta sexual en machos. Específicamente, la latencia a la primera eyaculación y el porcentaje de montas que no culminaron en eyaculación (tasa de

error) fue mayor en machos experimentales que en machos controles. En las hembras el cociente de lordosis fue significativamente menor en el grupo experimental, comparado con el control aunque este efecto se eliminó cuando se compararon sólo conejas sin relación de parentesco. Kowalska y cols. (2012), observaron que las conejas proactivas, se aparearon en menor proporción, el porcentaje que quedó gestante fue menor (80%) y después del parto tuvieron un comportamiento materno deficiente y un mayor número de gazapos nacidos muertos, en comparación con las hembras reactivas.

En ratas la falta de estímulos maternos y sociales (falta de hermanos) observados en animales criados de manera artificial, provoca en las hembras adultas un déficit de la conducta materna (pasan menos tiempo lamiendo a sus crías), una reducida memoria materna y una reducción en la atención, así como un incremento en la actividad locomotora (Melo y cols. 2006). También se ha reportado en esos animales: hiperactividad y menor nivel de miedo (prueba de laberinto elevado en cruz), déficit en el aprendizaje social, y altos niveles de agresión (González y cols. 2001, Lovic y Flemming 2004, Melo y cols. 2009). Fisiológicamente las ratas criadas artificialmente, presentan un incremento en los niveles de DA basal en el núcleo accumbens y un escaso incremento después del contacto con sus crías, lo cual está estrechamente correlacionado con el déficit en la conducta materna (Alfonso y cols. 2008). Además, se ha reportado una disminución en la inmunoreactividad de c-fos en el área preóptica medial después de la interacción con crías (González y Fleming 2002).

Recientemente se ha visto que los efectos negativos de la crianza artificial en ratas (disminución en la mielinización del nervio sural y una reducción en el potencial de acción compuesto) se pueden revertir por la estimulación táctil o por estimulación social (presencia de dos hermanos durante la crianza artificial) (González y cols. 2001, Fleming y cols. 2002, Lévy y cols. 2003, Segura y cols. 2014, Zempoalteca y cols. 2017). Estos hallazgos evidencian la importancia de la estimulación entre hermanos durante el periodo posnatal temprano. Por esta razón creemos que en los conejos, la estimulación provista por los hermanos de camada pudo haber amortiguado las consecuencias de la separación madre-crías durante 48 h, razón por la cual no se encontraron diferencias en la reactividad conductual entre animales controles y experimentales.

9. Conclusiones

9.1. Considerando a todos los animales

- El horario en el que se aplicaron las pruebas conductuales, no tuvo ningún efecto sobre la reactividad conductual (ambos sexos) en animales controles ni en experimentales
- La reactividad conductual fue similar entre hembras y machos de un mismo tratamiento en casi todos los indicadores medidos
- El marcaje por frotamiento del mentón fue mayor en los machos que en las hembras pero no fue diferente entre los grupos control y experimental de cada sexo
- Las consecuencias de la separación madre-crías durante 48 h fueron selectivos a la conducta sexual: en las hembras experimentales disminuyó el cociente de lordosis y en los machos experimentales aumentaron la latencia a la primera eyaculación y el porcentaje de montas que no culminaron en eyaculación (tasa de error)

9.2. Considerando animales sin parentesco

- En las hembras, la separación madre-crías, no altero la capacidad de respuesta del eje HHA ante un estímulo doloroso
- El horario en el que se aplicó la prueba de inyección de solución salina, no tuvo ningún efecto sobre la capacidad de respuesta del eje HHA de las hembras controles.
- En las hembras experimentales la cantidad de cortisol y corticosterona en plasma, en respuesta a la inyección de solución salina fue significativamente más alta en las muestras de la tarde comparado con las muestras de la mañana
- El horario en el que se aplicaron las pruebas conductuales, no tuvo ningún efecto sobre la reactividad conductual (ambos sexos) en animales controles ni en experimentales
- La reactividad conductual al estrés fue similar entre hembras y machos de un mismo tratamiento en casi todos los indicadores conductuales medidos
- El marcaje por frotamiento del mentón fue mayor en los machos controles que en las hembras controles, pero no fue diferente entre hembras y machos experimentales
- Las consecuencias de la separación madre-crías durante 48 h fueron selectivos a la conducta sexual de los machos experimentales aumentaron la latencia a la primera eyaculación y el porcentaje de montas que no culminaron en eyaculación (tasa de error).

10. Perspectivas

Corroborar si los estímulos que proveen los hermanos de camada fueron el factor que amortiguó el efecto de la separación madre-crías sobre la reactividad conductual al estrés. Para esto sería necesario mantener a los gazapos aislados de sus hermanos durante todo el día, juntándolos únicamente en el momento del amamantamiento, realizando la separación madre-crías por 48 h en el periodo posnatal temprano (DPN 10) y realizando nuevamente las pruebas que miden la reactividad conductual al estrés.

Evaluar la conducta sexual de los machos (controles y experimentales) después de un periodo de entrenamiento y no en ausencia de experiencia sexual, como se hizo en nuestro caso. Esto es importante dado que los efectos de la separación madre-crías durante 48 h en el periodo posnatal temprano fueron selectivos a la conducta sexual. Para el caso de las hembras sería interesante evaluar, su conducta materna dado que en este sexo el único parámetro que nosotros vimos afectado por la separación madre-crías fue la conducta de lordosis.

Determinar si las consecuencias fisiológicas de la separación madre-crías se mantienen a largo plazo. Para ello se tendría que medir el número de receptores a glucocorticoides y a mineralocorticoides en el Hipotálamo y en el Hipocampo de conejos (ambos sexos) a los catorce días de vida, y cuando adultos (120 días).

11. Referencias

- Alvariño JMR, Del Arco JA y Bueno A. 1998. Effect of mother-litter separation on reproductive performance of lacting rabbit females inseminated on day 4 or 11 post- partum. *World Rabbit Science* 6: 191-194.
- Anisman H, Zaharia MD, Meaney MJ, Merali Z. 1998. Do early life events permanently alter behavioral and hormonal responses to stressors? *Int J Develop Neurosci* 16: 149-164.
- Bautista A, Drummond H, Martínez-Gómez M, Hudson R. 2003. Thermal benefit of sibling presence in the newborn rabbit. *Dev Psychobiol* 43: 208-215.
- Bautista A, Mendoza-Degante M, Coureaud G, Martínez-Gómez M, Hudson R. 2005. Scramble competition in newborn domestic rabbits for an unusually restricted milk supply. *Association for the study of animal behavior. Published by Elsevier* 70: 1011-1021.
- Bautista A, Zepeda JA, Reyes-Meza V, Martínez-Gómez M, Rodel HG y Hudson R. 2015. Contribution of within-litter interactions to individual differences in early postnatal growth in the domestic rabbit. *Anim Behav* 108: 145-153.
- Bautista A, Zepeda JA, Reyes-Meza V, Féron C, Rödel HG, Hudson R. 2017. Body mass modulates huddling dynamics and body temperature profiles in rabbit pups. *Physiology & Behav* 179: 184-190.
- Benus RF, Bohus B, Koolhaas JM, Van Oortmerssen GA. 1991. Heritable variation for aggression as a reflection of individual coping strategies. *Experientia* 47(10): 1008-1019.
- Beyer C, Hoffman KL, González-Flores O. 2007. Neuroendocrine regulation of estrous behavior in the rabbit: similarities and differences with the rat. *Horm & Behav* 52: 2-11.
- Beyer C, Velasquez J, Larsson K, Contreras JL. 1980. Androgen regulation of the motor copulatory pattern in the male New Zealand White rabbit. *Horm. Behav* 14:179-190.
- Bilkó A y Altbäcker V. 2000. Regular handling early in nursing period eliminates fear response toward human beings in wild and domestic rabbits. *Dev Psychobiol* 36: 78-88.
- Bilkó A, Altbäcker V y Hudson R. 1994. Transmission of food preference in the rabbit: the meand of information transfer. *Physiology Behavior* 56: 907-912.

- Boissy A, Bouissou MF. 1988. Effects of early handling on heifers subsequent reactivity to humans and to unfamiliar situations. *Appl. Anim. Behav. Sci* 20: 259-273.
- Bonanno A, Alabiso M, Di Grigoli A, Alicata ML y Leto G. 1999. Effect of a 48h delayed insemination with or without a 48h doe-litter separation on performance of non-receptive lactating does. *World Rabbit Science* 7: 171-175.
- Bonanno A, Di Grigoli A, Alabiso M y Boiti C. 2002. Parity and number of repeated doe-litter-separation treatments affect differently the reproductive performances of lactating does. *World Rabbit Science*. 10(2): 63-70.
- Bonanno A, Mazza F, Di Grigoli A y Alabiso M. 2004. Effects of a split48-h doe-litter separation on productivity of free-nursing rabbit does and their litters. *Livestock Production Science* 89: 287-295.
- Brecchia G, Bonanno A, Dall'Aglio C, Mercati F, Zerani M, Di Grigoli A y Boiti C. 2009. Neuroendocrine responses in neonatal mother-deprived rabbits. *Brain Research* 1304: 105-112.
- Brown SA 2012. Small mammal training in the Veterinary Practice. *Veterinary Clinic Exotic Animal* 15: 469-485.
- Bryan Jones R. 1986. The tonic immobility reaction of the domestic fowl: a review. *World Poultry Sci J* 42: 82-96.
- Caba M y González-Mariscal G. 2009. The rabbit pup, a natural model of nursing anticipatory activity. *Eur. J Neurosci* 30(9): 1697-1706.
- Caldji C, Francis D, Sharma S, Plotsky PM, Meaney MJ. 2000. The effects of early rearing environment on the development of GABA_A and central benzodiazepine receptor levels and novelty-induced fearfulness in the rat. *Neuropsychopharmacology* 22:219-229.
- Caldji C, Tannenbaum B, Sharma S, Francis D, Plotsky PM y Meaney MJ. 1998. Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 5335-5340.
- Cannon WB. 1929. Bodily changes in pain, hunger, fear and rage. Branford, Boston.
- Cirulli F, Berry A, Alleva E. 2003. Early disruption of the mother-infant relationship: effects on brain plasticity and implications for psychopathology. *Neurosci Biobehav Rev* 27:73–82.

- Contreras JL, Beyer C. 1979. A polygraphic analysis of mounting and ejaculation in the New Zealand white rabbit. *Physiol Behav* 23:939-943.
- Csatádi K, Bilkó A, Vilmos A. 2007. Specificity of early handling: Are rabbit pups able to distinguish between people?. *Appl Anim Behav Sci* 107:322-327.
- Csatádi K, Eiben Cs, Kustos K, Bilkó Á, Altbäcker V. 2005. Even minimal human contact linked to nursing reduces fear responses toward humans in rabbits. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 95: 123-128.
- Daniewski W, Jezierski T. Effectiveness of divergent selection for open-field activity in rabbits and correlated response for body weigh and fertility. *Behav Gen* 33: 337-345.
- De la Fuente VJ 2003. Bienestar Animal en el Transporte de Conejos a Matadero. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Veterinaria. Madrid España. pp. 51-81.
- Denenberg VH, Wyly MV, Burns JK, Zarrow MX. 1973. Behavioral effects of handling rabbits in infancy. *Physiology & Behavior* 10: 1001-1004.
- Dorrington J, Gore-Langton RE. 1981. Prolactin inhibits oestrogen síntesis in the ovary. *Nature* 290: 600-602.
- Dúcs A, Bilkó A y Altbäcker V. 2009. Physical contact while handling is not necessary to reduce fearfulness in the rabbit. *Appl Anim Behav Sci* 121: 51-54.
- Duval F, González F, Rabia H. 2010. Neurobiology of stress. *Rev Chil Neuro-Psiquiat.* 48(4): 307-318.
- Eiben Cs, Gódor-Surmann K y Kustos K. 2013. Effect of a transitory controlled nursing on days 9-11 or a 24-h fast on the production of free-nursing rabbits. *Livestock Science* 155: 148-156.
- Filiou E, Trocino A, Tazzoli M y Xiccanto G. 2012. Fear level and behavior of growing rabbits housed in individual, bicellular and collective cages. *World Rabbit Science* 1107-1111.
- Fontani G, Aloisi AM, Lodi L, Maffei D, Ulivieri F, Lopo C. 1999. Emotional behavior in female rabbits: hippocampal EEG and neuroendocrine aspects. *Arch Ital Biol* 137: 263-278.
- Francis DD, Diorio J, Liu D, Meaney MJ. 1999. Nongenomic transmission across generations of maternal behavior and stress responses in the rat. *Science* 286:1155-1158.

- Gallup GG. 1974. Animal hypnosis: factual status of a fictional concept. *Psychol Bull* 81: 836-853.
- García-Dalmán C y González-Mariscal G. 2012. Major role of suckling stimulation for inhibition of estrous behaviors in lacting rabbits: Acute and chronic effects. *Hormones and Behavior* 61: 108-113.
- Gluckman PD, Lillycrop KA, Vickers MH, Pleasants AB, Phillips ES, Beedle AS, Burdge AC, y Hanson MA. 2007. Metabolic plasticity during mammalian development is directionally depend on early nutritional status. *Develop Biol* 104(31): 12796-12800.
- González-Mariscal G, Caba M, Martínez-Gómez M, Bautista A y Hudson R. 2016. Mothers and offspring: the rabbits as a model system in the study of mammalian maternal behavior and sibling interactions. *Hormones and Behavior* 77: 30-41.
- González-Mariscal G, Díaz-Sánchez V, Melo AI, Beyer C y Rosenblatt JS. 1994. Maternal behavior in New Zealand white rabbits: quantification of somatic events, motor patterns, and steroid plasma levels. *Physiology & Behavior* 55(6): 1081-1089.
- González-Mariscal G, Lemus AC, Vega-Gonzalez A y Aguilar-Roblero R. 2013. Litter size determines circadian periodicity of nursing in rabbits. *Chronobiology International* 30(5): 711-718.
- González-Mariscal G. 2006. Mother rabbits and their offspring: timing is everything. *Dev Psychobiol* 49: 71-76.
- Gonzalez-Mariscal, Melo. 2013. Parental Behavior. In: Pfaff DW (ed). *Neuroscience in the 21st Century*, Springer Science. Business Media, p 2069-2080.
- Gorka AX, LaBar KS, Hariri AR. 2016. Variability in emotional responsiveness and coping style during active avoidance as a window onto psychological vulnerability to stress. *Physiology & Behavior* 158: 90-99.
- Gosling SD, John OP. 1999. Personality dimensions in nonhuman animals: a cross-species review. *Curr Dir Psychol Sci* 8: 69-75.
- Griffiths BB y Hunter RG. 2014. Neuroscience forefront review neuroepigenetics of stress. *Neuroscience* 275: 420-435.
- Hamada Y, Schlaff S, Kobayashi Y, Santulli R, Wright KH, Wallach EE. 1980. Inhibitory effect of prolactin on ovulation in the in vitro perfused rabbit ovary. *Nature* 285: 161-163.

- Hoffman KL, Hernández Decasa DM, Beyer Ruiz ME y González-Mariscal G. 2010. Scent marking by the male domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) is stimulated by an object's novelty and its specific visual or tactile characteristics. *Behavioural Brain Research* 207: 360-367.
- Hudson R, González-Mariscal G, y Beyer C. 1990. Chin marking behavior, sexual receptivity, and pheromone emission in steroid-treated, ovariectomized rabbits. *Horm Behav.* 24: 1-13.
- Huot RL, Ladd CO, Plotsky PM. 2000. Maternal deprivation. En *Encyclopedia of stress*. Vol 2.
- Jilge B. 1993. The ontogeny of circadian rhythms in the rabbit. *J Biol Rhythms* 8: 246-260.
- Jilge B. 1995. Ontogeny of the rabbit's circadian rhythms without an external zeitgeber. *Physiol. Behav* 58: 131-140.
- Jiménez P, Serrano-Meneses MA, Cuamatzi E, González-Mariscal G. 2012. Analysis of sexual behavior in male rabbits across successive tests leading to sexual exhaustion. *World Rabbit Science.* 20: 13-23.
- Jones BR, Faure JM. 1981. The effects of regular handling increases in the domestic chick. *Behav Proc* 6: 135-143.
- Keating SCJ, Thomas AA, Flecknell PA y Leach MC. 2012. Evaluation of EMLA cream for preventing pain during tattooing of rabbits: Changes in physiological, behavioural and facial expression responses. *PLOS one* 9(7): 1-11.
- Kember RL, Dempster EL, Lee TH, Schalkwyk LC, Mill J, Fernandes C. 2012. Maternal separation is associated with strain-specific responses to stress and epigenetic alterations to Nr3c1, Avp, and Nr4a1 in mouse. *Brain Behav* 2: 455-67.
- Kersten AMP, Meijsser FM y Metz JHM 1989. Effects of early handling on later open-field behaviour in rabbits. *Appl Anim Behav Sci.* 24: 157-167.
- Koolhaas JM, Korte SM, De Boer SF, Van der Vegt BJ, Van Reenen CG, Hopster H. 1999. Coping styles in animal current status in behavior and stress-physiology. *Neurosci Biobehav Rev* 23: 925-935.
- Kowalska D, Bielanski P y Pietras M. 2008. Suitability of behavioural tests for determining the ways rabbits function in the environment and their relationship with some productive traits. *Ethology and Welfare* 1195-1200.

- Liu D, Caldji C, Sharma S, Plotsky PM, Meaney MJ. 1999. Influence of neonatal rearing conditions on stress-induced adrenocorticotropin responses and norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Journal of Neuroendocrinology* 12: 5-12.
- Liu D, Diorio J, Day JC, Francis DD, Meaney MJ. 2000. Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats. *Nat Neurosci* 3 (8): 799-806.
- Liu D, Diorio J, Tannenbaum B, Caldji C, Francis D, Feedman A, Sharma S, Pearson D, Plotsky PM y Meaney MJ. 1997. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Sci* 277: 1659-1662.
- Lopez-Aumatell R, Guitart-Masip M, Vicens-Costa E, Gimenez-Llort L, Valdar W, Johannesson M, Fernandez-Turel A. 2008. Fearfulness in a large N/Nih genetically heterogeneous rat stock: differential profiles of timidity and defensive flight in males and females. *Behav Brain Res* 188(1): 41-55.
- Macri S, Mason GJ, Wurbel H. 2004. Dissociation in the neonatal maternal separations on maternal care and the offspring's HPA and fear responses in rats. *Eur J Neurosci* 20:1017-1024.
- May D, Simpson KB. 1975. Reproduction in the rabbit. *Animal breeding abstracts* 43(6): 253-261.
- Melo AI. 2015. Role of sensory, social, and hormonal signals from the mother on the development of offspring. *Perinatal Programming of Neurodevelopment. Advances in Neurobiology* ©Springer Science +Business Media New York 2015: 219-248.
- Menard JL, Hakvoort RM. 2007. Variations of maternal care alter offspring levels of behavioural defensiveness in adulthood: evidence for a threshold model. *Behav Brain Res* 176: 302-313.
- Morgado E, Gordon MK, Miñana-Solis MC, Meza E, Levine S, Escobar C y Caba M. 2008. Hormonal and metabolic rhythms associated with the daily scheduled nursing in rabbit pups. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295: R690-R695.
- Morgado E, Juárez C, Melo AI, Domínguez B, Lehman MN, Escobar C, Meza E y Caba M. 2011. Artificial feeding synchronizes behavioral, hormonal, metabolic and neural parameters in mother-deprived neonatal rabbit pups. *European Journal of Neuroscience* 34: 1807-1816.

- Morgado E, Meza E, Gordon MK, Pau FKY, Juárez C y Caba M. 2010. Persistence of hormonal and metabolic rhythms during fasting in 7 to 9 day-old rabbits entrained by nursing during the night. *Hormones & Behavior* 58(3): 465-472.
- Nicol L, McNeilly JR, Stridserg M, McNeilly AS. 2004. Differential release of gonadotropins: the role of secretogranin II in the regulated and constructive release of LH and FSH. *J Mol Endocrinol* 32: 467-480.
- Numan M 2015. *Neurobiology of social behavior. Toward and understanding of the prosocial and antisocial brain.* Elsevier pp:43-62.
- OsteenKG, Mills TM. 1980. Changes in the size, distribution and steroid content of rabbit ovarian follicles during early pseudopregnancy. *Biol Reprod* 22: 1040-1046.
- Padnabhan V, McNeilly AS. 2001. Is there an FSH-releasing factor? *Reprod* 121: 21-30.
- Padoin MJ, Barros HMT, Cadore LP, Gomes CM y Lucion AB. 2001. Long-lasting effects of neonatal stimulation on the behavior of rats. *Behav Neurosci* 115(6): 1332-1340.
- Pfaff DW, Schwartz-Giblin S, McCarthy MM, Kow LM. 1994. Cellular and molecular mechanisms of female reproductive behaviors. En: *The physiology of reproduction.* Knobil E, Neill JD (eds). Ed Raven Press, Ltd, New York 36: 107-195.
- Plotsky PM, Meaney MJ. 1993. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotrophin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Mol Brain Res* 18:195–200.
- Pongrácz P y Altbäcker V. 1999. The effect of early handling is dependent upon the state of the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) pups around nursing. *Dev Psychobiol* 241-251.
- Pongrácz P y Altbäcker V. 2000. Ontogeny of the responses of european rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) to aerial and ground predators. *Canadian Journal Zoology* 78: 655-665.
- Pongrácz P y Altbäcker V. 2003. Arousal, but not nursing is necessary to elicit a decreased fear reaction toward humans in rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) pups. *Dev Psychobiol* 43: 192-199.
- Pongrácz P, Altbäcker V y Fenes D. 2001. Human handling might interfere with conspecific recognition in the european rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) *Dev Psychobiol* 53-62.

- Rebollar PG, Pereda N, Villarroel M, Millán P y Lorenzo PL. 2006. Oestus synchronization of rabbit does at early post-partum by dam-liter separation or eCG injection: Effect on kit mortality and growth. *Livestock Science* 103: 13-22.
- Rice D, Barone S Jr. 2000. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: Evidence from human and animal. *Environ Health Perspect* 108: 511-533.
- Rödel HG y Moncus R. 2011. Long-term consequences of early development on personality traits: a study in European rabbits. *Behavioral Ecology* 22: 1123-1130.
- Rödel HG y Von Holst D. 2009. Features of the ealy juvenile development predict competitice performance in male European rabbits. *Physiology & Behavior* 97: 495-502.
- Rödel HG, Bautista A, García-Torres E, Martínez-Gómez M, Hodson R. 2008. Why do heavy littermates grow better than lighter ones? A study in wild and domestic European rabbits. *Physiology & Behavior* 95: 441-448.
- Rödel HG, Monclús R, Von Holst D. 2006. Behavioral styles in European rabbits: Social interactions and responses to experimental stressors. *Physiology & Behavior* 89: 180-188.
- Rovirosa MJ, Levine S, Gordon MK, Caba M. 2005. Circadian rhythm of corticosterone secretion in the neonatal rabbit. *Dev Brain Res* 158: 92-96.
- Sapolsky RM. 1992. 10 Neuroendocrinology of the stress-response. En: *Behavioral endocrinology*. Becker JB, Breedlove SM y Crews D (eds.) Editorial Bradford book. United States of America. pp. 287-324.
- Segura B, Melo A, Fleming AS, Mendoza-Garrido ME, González del Pliego M, Aguirre-Benitez EL, Hernández-Falcón J, Jiménez-Estrada I. 2014. Early social isolation provokes electrophysiological and structural changes in cutaneous sensory nerves of adult male rats. *Develop Neurobiol* 74:1184-1193.
- Selye H. 1936. A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature (London)* 138: 32-34.
- Soares MJ, Diamond M. 1982. Pregnancy and chin-marking in the rabbit *Oryctolagus cuniculus*. *Anim Behav* 30: 941-943.
- Suarez SD, Galluo GG. 1981. An ethological analysis of open-field behavior in rats and mice. *Learn Motiv* 12: 342-363.

- Swennes AG, Alworth LC, Harvey SB, Jones CA, King C, Crowell-Davis SL. 2011. Human handling promotes compliant behavior in adult laboratory rabbits. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 50: 41-45.
- Szeto A, Gonzales JA, Spitzer SB, Levine JE, Zaias J, Saab PG, Schneiderman N y McCabe PM. 2004. Circulating levels of glucocorticoid hormones in WHHL and NZW rabbits: circadian cycle and response to repeated social encounter. *Psychoneuroendocrinology* 29: 861-866.
- Trocino A, Filiou E, Tazzoli M, Bertotto D, Negrato E, Xiccato G. 2014. Behaviour and welfare of growing rabbits housed in cages and pens. *Livestock Science* 167: 305-314.
- Trocino A, Majolini D, Tazzoli M, Filiou E, Xiccato G. 2012. Housing of growing rabbits in individual, bicellular and collective cages: fear level and behavioural patterns. *The Animal Consortium* 7(4): 633-639.
- Ubilla E y Rebollar PG. 1995. Influence of the postpartum day on plasma estradiol-17 β levels, sexual behavior and conception rate in artificially inseminated lactating rabbits. *Anim Reprod Sci* 38:337-344.
- Vázquez DM. 1998. Stress and the developing limbic-hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Psychoneuroendocrinol* 23: 663-700.
- Verwer CM, Amerongen G, Bos R y Hendriksen CFM. 2009. Handling effects on body weight and behavior of group-housed male rabbits in a laboratory setting. *Appl Anim Behav Sci* 117: 93-102.
- Vindas MA, Magnhagen C, Brännäs E, Overli O, Winberg S, Nilsson J, Backström T. 2017. Brain cortisol receptor expression differs in Arctic charr displaying opposite coping styles. *Physiology & Behavior* 177: 161-168.
- Whyly MV, Denenberg VH, DeSantis D, Burns JK, Zarrow MX. 1975. Handling rabbits in infancy: In search of a critical period. *Develop Psychobiol* 8: 1835-1837.
- Wilson DS, Clark AB, Coleman K, Dearstyne T. 1994. Shyness and boldness in humans and other animals. *Tree* 9(11): 442-446.
- Wilson DS. 1998. Adaptive individual difference within single populations. *Philos Trans R Soc Lond B*.353: 199-205.

- Wishaw IQ, Flannigan KP, Barnsley RH. 1979. Development of tonic immobility in the rabbit: Relation to body temperature. *Develop Psychobiol* 12: 595-605.
- Zambrano E, Reyes-Castro LA y Nathanielsz PW. 2015. Aging glucocorticoids and developmental programming. *AGE* 37(52): DOI 10.1007/s11357-015-9774-0.
- Zempoalteca R, Porras MG, Moreno-Pérez S, Ramirez-Funez G, Aguirre-Benítez EL, González del Pliego M, Mariscal-Tovar S, Mendoza-Garrido ME, Hoffman KL, Jiménez-Estrada I, Melo AI. 2017. Early postnatal development of electrophysiological and histological properties of sensory sural nerves in male rats that were maternally deprived and artificially reared: role of tactile stimulation. *Develop Neurobiol* 77(11): 1-12. doi: 10.1002/dneu.22561.
- Zucca D, Marelli SP, Redaelli V, Heinzl E, Cardile H, Ricci C, Verga M y Luzi F. 2012. Effect of environmental enrichment and group size on behavior and live weight in growing rabbits. *World Rabbit Science* 20: 89-95.
- Zyablisteva y Pavlova 2008. Effects of the GABA receptor agonist phenibut on behavior and respiration in rabbits in emotionally negative situations. *Neuroscience and Behavioral Physiology* 38(6): 555-562.

12. Glosario

AA	actividad anticipatoria
ACTH	hormona liberadora de corticotropina
AVP	arginina-vasopresina
CA1	cuerno de amón 1 (área CA1 del hipocampo)
CIRA	Centro de Investigación en Reproducción Animal
CL	cociente de lordosis
CRF	factor liberador de corticotropina
G	gestación
GABA	ácido aminobutírico γ
GR	receptor a glucocorticoides
HC	hembra control
HE	hembra experimental
HHA	hipotálamo-hipófisis-adrenal
IM	intra-muscular
LA	latencia a la primera aproximación
LC	latencia al primer contacto
LE	la latencia a la primera eyaculación
LE	latencia a enderezarse
LM	la latencia a la primera monta
LSM	latencia a salida de la madriguera
M	marcaje por frotamiento del mentón
MC	macho control
ME	macho experimental
MR	“ <i>miss rate</i> ” (la tasa de error)
NC	número de contactos
NE	número de eyaculaciones
NM	número de montas
NPV	núcleo paraventricular
OVX	ovariectomizada

R	recorrido (número de líneas cruzadas)
RM	receptor a mineralocorticoides
RNAm	ácido ribonucleico mensajero
SMC	separación madre-crías por 48 h
TC	tiempo caminando
TCA	tiempo total en campo abierto
TE	tiempo explorando

13. Anexos

14. Publicaciones