



Universidad Autónoma de Tlaxcala

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

Características del comportamiento pseudomaternidad
desplegado por conejas vírgenes anósmicas

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Biól. Ana Celia Lemus Hernández

Directora
Dra. Gabriela González-Mariscal Muriel

Tlaxcala, Tlax.

Febrero 2014



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta
Posgrado en Ciencias Biológicas

Características del comportamiento pseudomaternal
desplegado por conejas vírgenes anósmicas

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTROA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Nombre del Alumno

Biól. Ana Celia Lemus Hernández

Comité Tutorial

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

Tlaxcala, Tlax.

Febrero 2014

AGRADECIMIENTOS

Al Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta. Gracias por todo.

Al CONACyT, por la beca otorgada para la realización de este proyecto. El número de becario 248126. Gracias.

A cada uno de los miembros de mi comité: Dra. Gabriela González-Mariscal M., Dr. Angel I. Melo S., Dr. Raúl A. Aguilar R., Dr. Mario S. Caba V. y Dr. Kurt Hoffman, por la paciencia. Muchas gracias.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A la Dra. Gaby, por seguir impulsándome a continuar mi desarrollo en este gran mundo de la ciencia. Por brindarme su apoyo desde hace ya más de 7 años que ingrese al C.I.R.A. Muchas gracias por todo.

Al Dr. Carlos Beyer (q.e.p.d), por esos grandes conocimientos y enseñanzas. Y por abrir las puertas de su centro de investigación. Muchas gracias.

A la M. en C. Rosario Chirino, por toda la paciencia que me tuvo en cada una de las técnicas que me enseñó y por brindarme su apoyo. Gracias por todo lo aprendido.

A todos mis compañeros del laboratorio que me apoyaron y me alentaron a continuar con este proyecto. Muchas gracias.

DEDICATORIAS

A mi abuelito Rodolfo L.T. (q.e.p.d), va un logro más dedicado a ti, a mi gran guía. A ti que continúas a mi lado, guiando cada paso, a pesar de que hace casi seis años se apago tu luz. Gracias una vez más por cada enseñanza y por esa sonrisa que me regalas todos los días, aunque sea sólo a través de una foto, que para mí es grande. Te echo de menos. Te amo.

A mis papás Roberto L.P. y Ana A. H.Z. por apoyarme en cada una de las decisiones que tomo. Por jugársela conmigo en cada pequeño proyecto que inicio. Por impulsarme a continuar superándome y por estar siempre presentes. Por darme la oportunidad de compartir cada paso y cada logro en familia, en esa pequeña familia que formaron. Gracias por todo. Los amo.

A mi hermano Roberto L.H., por estar conmigo y apoyarme. Por ser para mí un gran ejemplo de que las metas se pueden lograr. Espero continuar con tu ejemplo. Gracias. Te quiero.

A mis amigas Lucia, Irene y Dulce, por todo el apoyo que me han brindado. Por cada momento compartido. Por estar siempre presentes. Por ser parte de mi familia. Las quiero!.

A mis sobrinos Tais L.B. y Sebastián L.B., por cada sonrisa que me regalan. Por cada nueva experiencia que me permiten vivir junto a ustedes. Vamos por más travesuras. Los amo.

A César R. por impulsarme a buscar nuevos retos.

A todas las personas que no he nombrado pero que se están presentes. Los quiero.

ÍNDICE

	Páginas
1. Introducción	
1.1 Conducta Maternal.	1
1.1.1 CM pre-parto en la coneja	1
1.1.2 CM al parto en la coneja	3
1.1.3 CM post-parto en la coneja	4
1.1.1.1 Amamantamientos	4
1.2 Lactancia	
1.2.1 Descripción de la lactancia	5
1.2.2 Endocrinología de la lactancia.	8
1.2.3 Regulación neuroendócrina de la lactancia	10
1.3 Ritmos Biológicos.	
1.3.1 Historia de los ritmos biológicos	11
1.3.2 Descripción de los ritmos biológicos	14
1.3.3 Definición y descripción de los ritmos circadianos	17
1.3.4 Regulación de los ritmos circadianos	19
1.3.5 Ritmos circadianos del conejo	22
1.3.6 Frecuencia de amamantamiento en el conejo	28
1.4 Sistema olfatorio	
1.4.1 Epitelio olfatorio principal y accesorio	33
1.4.2 Relación del olfato con el despliegue de comportamientos	36
1.4.2.1 Conducta sexual femenina en machos	36
1.4.2.2. Conducta maternal en la rata	37
1.4.2.4 Conducta maternal en la coneja	44
2. Justificación	47
3. Hipótesis	48
4. Objetivos	49
4.1 Objetivo general	49
4.2 Objetivo específicos	49
5. Material y métodos	50
5.1 Animales y alojamiento	50
5.1.1 Generales	50
5.1.2 Conejas experimentales	50
5.1.3 Conejas nodrizas	50
5.2 Procedimiento experimental	51
5.2.1 Infusión con ZnSO ₄ y solución salina	51
5.2.2 Determinación de la percepción olfativa	52
5.2.2.1 Evaluación del estado de salud	53
5.2.1.1.1 Consumo de alimento	53
5.2.1.1.2 Prueba de Ambulación en campo al	54
5.2.1.1.3 Prueba de Marcaje por Frotamiento	54
5.2.3 Observación de la conducta pseudomaternal	54
5.3 Esquema general de la metodología	56
6. Análisis estadístico	57
6.1 Wilcoxon	57
6.2 Método de Rayleigh	57
6.3 Chi Cuadrada	57

7. Resultados	58
7.1 Efectos de la anosmia sobre percepción olfativa y conducta:	58
7.1.1 Percepción olfativa	58
7.1.2 Consumo de alimento	59
7.1.3 Ambulación en campo abierto	60
7.1.4. Conducta de marcaje por frotamiento del mentón	62
7.2 Efectos de la anosmia sobre: la conducta pseudomaternal.	63
8. Discusión	72
9. Conclusiones	74
10. Bibliografía	75

INTRODUCCIÓN

1.1 CONDUCTA MATERNAL

El cuidado que brinda la madre a su progenie es determinante para el buen desarrollo y supervivencia de las crías. A este cuidado se le define como conducta maternal (CM). Muchos factores, entre ellos, la motivación, los endócrinos y los neurales, intervienen para que la CM se exprese o por el contrario se reprima. (Melo, 2002; González-Mariscal y Poindron, 2002; González-Mariscal y Melo, 2013).

En los mamíferos inferiores (ratas, conejos) existe una motivación que los induce a desplegar CM. La motivación de la madre para cuidar de sus crías, es relevante para el desarrollo de éstas. Pryce (1992) define la motivación maternal como “la preferencia de una hembra para hacer del infante el objetivo de su conducta, y dicha conducta se describe como promotora del bienestar del infante”. Gran parte de esta motivación se desarrolla durante la gestación. Los animales inferiores comienzan por ejemplo a construir un nido para el resguardo y sobrevivencia de su progenie (Melo, 2002).

1.1.1 CONDUCTA MATERNAL PRE-PARTO EN LA CONEJA

En la coneja, el despliegue de la CM inicia con la construcción del nido maternal, el cual servirá para mantener seguras y térmicamente estables a las crías (las crías de los conejos son altriciales nacen con los conductos de los oídos y los ojos cerrados y no controlan su temperatura corporal por sí mismas). En condiciones naturales, las conejas cavan nidos subterráneos que después cubren con pasto seco y con pelo de su vientre (Sorensen, et al., 1972; Verga, et al., 1978).

En condiciones de laboratorio se utiliza una caja-nido a la cual se le coloca un pedazo de cartón, que utilizarán las hembras para emular la conducta de excavación (Figura 1A). Esta actividad comienza en los días 25-27 de gestación cuando los niveles circulantes de Estradiol (E) están bajos, mientras que los de Progesterona (P) están altos (Figura 2). Posterior a la excavación, en los días tres a uno preparto comienza el acarreo de paja (Figura 1B), cuando la concentración de P disminuye y la de E aumenta (Figura 2).

Finalmente la coneja se arranca pelo de su vientre y flancos, que coloca dentro del nido para cubrir a las crías (Figura 1C), etapa con la que se culmina la construcción del nido, esto ocurre entre los días uno postparto hasta los días tres o cuatro postparto. En esta etapa los niveles de Progesterona (P) son prácticamente nulos y los de Testosterona (T) y Prolactina (PRL) son altos (Figura 2) (González-Mariscal *et al.*, 1994).



Figura. 1. A) Conducta de excavación.



B) Conducta de acarreo de paja



C) Conducta de arrancado de pelo del vientre.

Figura 1. A) Se muestra como se mide la conducta de excavación, en el laboratorio. Se les coloca dentro de la caja-nido un pedazo de cartón, sobre el que las conejas rascan, emulando así la conducta de excavación en la tierra. **B)** Se observa el acarreo de paja, material con el que la hembra recubre el nido. **C)** Conducta de arrancado de pelo, que se observa al final de la gestación cuando la hembra recubre la paja con el pelo de su vientre y de los flancos; con esta conducta finaliza la construcción del nido maternal.

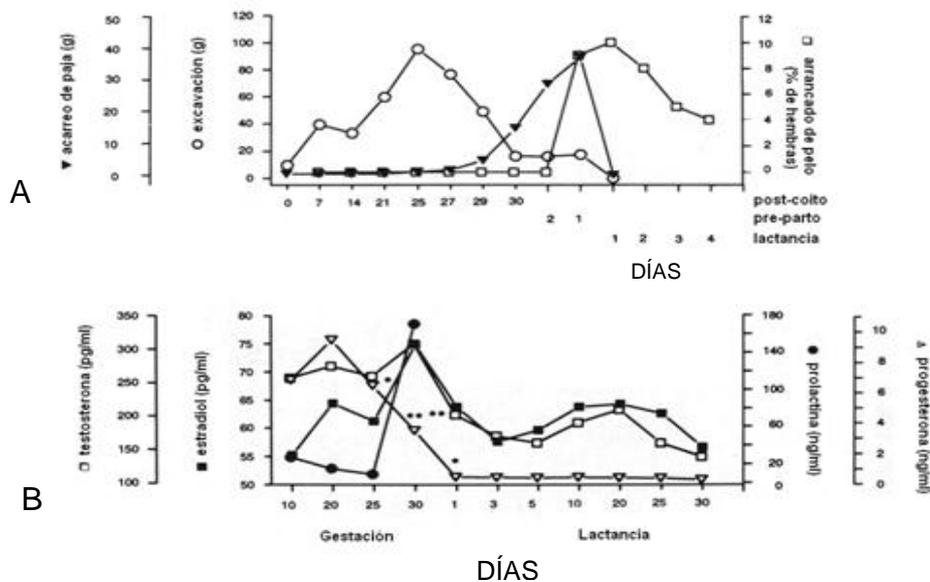


Figura 2: A) Gráfica que nos muestra la cuantificación de las conductas de excavación, acarreo de paja y arrancado de pelo de la coneja, en la gestación e inicio de la lactancia. B) Se muestran las mediciones de las hormonas implicadas en la construcción de nido de la coneja: estradiol (E), progesterona (P), prolactina (PRL) y testosterona (T) en la sangre durante el período de gestación y el inicio de la lactancia (Tomado de González-Mariscal *et al.*, 1994).

1.1.2 CONDUCTA MATERNAL AL PARTO EN LA CONEJA

La gestación de la coneja dura entre 30 y 31 días. El parto en la coneja es muy rápido, tarda alrededor de 10 minutos y está regido básicamente por la liberación masiva de oxitocina (OXT) (Hudson *et al.*, 1998; Fuchs y Dawood, 1980; McNeilly y Friessen, 1978; González-Mariscal *et al.*, 2000). Durante el parto y conforme las crías salen del canal vaginal, la hembra ingiere todas las placentas (Melo *et al.*, 1998; Melo y González-Mariscal, 2003). Mientras la hembra finaliza esta etapa, sólo las crías que han sido lamidas y limpiadas por la madre, logran llegar hasta los pezones y succionan por primera vez el pezón, aunque en este primer acercamiento sólo algunas crías logran succionar leche. Una vez finalizado el parto, la hembra sale rápidamente del nido y regresa al siguiente día para amamantar a sus crías (Zarrow, *et al* 1965; Jilge, 1993; Hudson *et al.*, 1999, Martínez-Gómez *et al.*, 2002).

1.1.3 CONDUCTA MATERNAL POST-PARTO EN LA CONEJA

La conducta maternal post-parto varía de acuerdo a cada especie. En la coneja es muy limitada, pero no por ella menos interesante. Esto se debe principalmente a que la coneja destina poca parte de su tiempo para el cuidado de sus crías. Se restringe al único encuentro diario que tiene la madre con sus crías para que estas sean amamantadas de 3 a 5 minutos durante toda la lactancia (c.a. 30 días) (Zarrow, *et al.*, 1965, Hoy y Selzer, 2002; González-Mariscal, 2007).

1.1.3.1 AMAMANTAMIENTO

La conducta de amamantamiento es importante para el crecimiento de las crías, debido a que los primeros días de vida dependen únicamente de la leche que la madre les provea. Previo a la llegada de la madre al nido (1 – 2 h), las crías comienzan a mostrar Actividad Anticipatoria (AA), es decir, aumentan su temperatura, comienzan a incrementar su actividad, como sus movimientos corporales y se descubren del material del nido (Hudson *et al.*, 1999; Caba, *et al.*, 2008). Para que las crías puedan succionar los pezones de la madre, la coneja adopta una posición conocida como “cifosis”. Esta posición consiste en una ventroflexión de la columna vertebral, acompañada por una inmovilización parcial corporal, además de la separación de las extremidades traseras y una depresión de la cabeza, creando así una cavidad bajo su vientre que permite que las crías se acomoden bajo su vientre y comiencen a succionar los pezones (Rosenblatt y Lerhman, 1963; Stern, 1989; Stern *et al.*, 1992; Cross, 1952; Drewett *et al.*, 1982).

Los amamantamientos de la coneja son eventos muy cortos, debido a que despliegan sólo un episodio de succión al día de manera circadiana (Zarrow, *et al.*, 1965; Jilge, 1993, 1995; Lemus, 2010). Cada episodio de amamantamiento dura de 3 a 5 minutos, tiempo suficiente para que las crías ingieran la cantidad necesaria de leche (aproximadamente el equivalente al 20-35% de su peso corporal). Al finalizar el amamantamiento, las crías se desprenden de los pezones, orinan simultáneamente y se sumergen en el material del nido, quedando dispersas dentro de él. Después de 5 a 10 minutos

aproximadamente, las crías se reagrupan nuevamente y permanecen cubiertas y agrupadas para esperar la llegada de su madre, hasta el siguiente día (Figura 3) (Vengue, 1963; Zarrow *et al.*, 1965; Lincoln, 1974; Drewett *et al.*, 1982; Hudson y Distel, 1982; Gonzalez-Mariscal *et al.*, 1994; Hoy y Seltzer, 2002; González-Mariscal, 2007; Hull y Hull, 1982).

A pesar de que los amamantamientos son eventos poco frecuentes y de corta duración, los gazapos son capaces de anticiparse a la llegada de la madre y ubicar y dirigirse a los pezones para comenzar a succionar, debido a que se guían por la llamada feromona del pezón, caracterizada como 2-metil-2-butenal (Schaal *et al.*, 2003; Hudson y Distel, 1983).

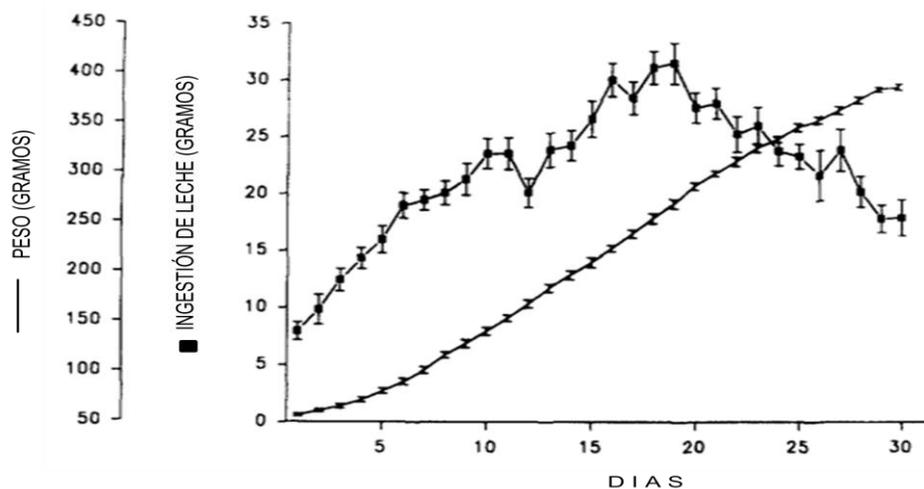


Figura 3. Grafica que muestra la ingestión de leche (cuadros negros) y el peso (línea) de los gazapos a lo largo de la lactancia (30 días). El consumo de leche varía a través de toda la lactancia, siendo el día 20 cuando se observa el pico máximo del consumo. Por otro lado se observa el crecimiento lineal de los gazapos. (Modificado de González-Mariscal *et al.*, 1994).

1.2 LACTANCIA

1.2.1 DESCRIPCIÓN DE LA LACTANCIA

La lactancia se define como el periodo durante el cual las crías son alimentadas únicamente por la leche secretada por las glándulas mamarias de la madre, debido a que este es el único alimento asimilado por los críos. Este es el paso final del ciclo reproductivo de los mamíferos. Esta fase es relevante debido a que las crías dependen en su totalidad del alimento que la hembra les provee para su sobrevivencia durante los primeros días de vida. Este alimento

cubrirá los requerimientos que cada especie demanda (Clapp *et al.*, 1987; Delouis y Richard, 1993). En esta etapa es necesaria la presencia de glándulas mamarias, debido a que es justamente aquí el lugar especializado en el que se lleve a cabo tanto la síntesis como la evacuación láctea (Cowie *et al.*, 1980; Clapp *et al.*, 1987; Delouis y Richard, 1993).

Las glándulas mamarias de la coneja están distribuidas de manera uniforme en dos líneas sagitales en la parte ventral del cuerpo. Estas se comienzan a desarrollar desde la gestación. La P ayuda al desarrollo de los alveolos y los estrógenos facilitan el desarrollo de los túbulos (Delouis y Richard, 1993; Clapp *et al.*, 1987).

La estructura de la glándula mamaria varía de acuerdo a cada especie. Por ejemplo, especies como las vacas poseen cisternas donde se almacena gran cantidad de leche. En la rata se encuentran alvéolos y túbulos que desembocan al final en un sólo galactóforo, mientras que, en la coneja los alvéolos y túbulos forman al final de 6 a 8 galactóforos (Wakerley *et al.*, 1988). Los alveolos se agrupan en forma de racimos que desembocan en pequeños conductos y estos a su vez convergen en conductos mayores que llegan hasta la punta del pezón. (Cowie, 1982) (Figura 4). En los alveolos se lleva a cabo el almacenamiento de la leche, donde posteriormente es forzada a salir (Clapp *et al.*, 1987).

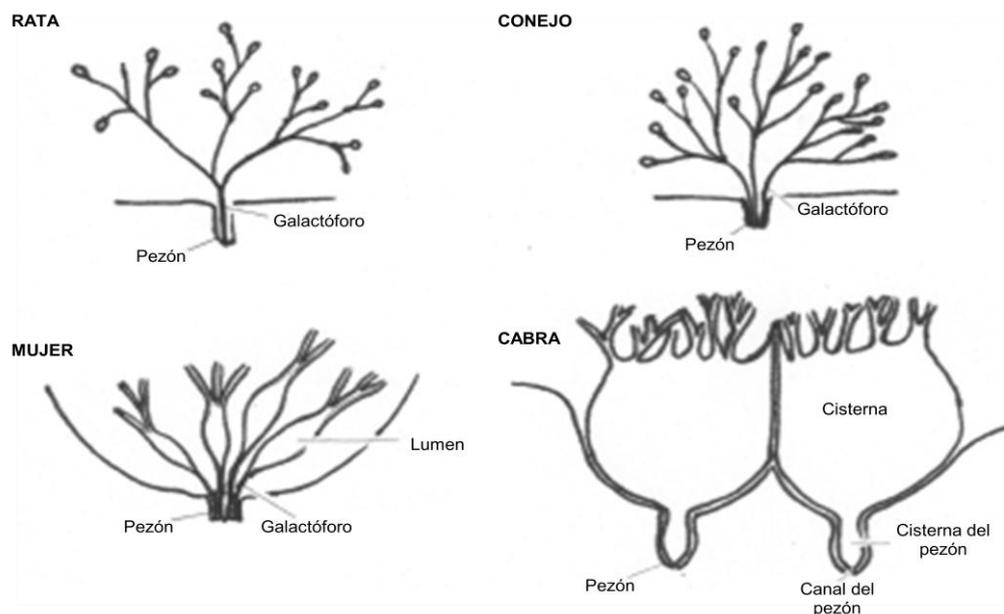


Figura 4. Se muestran cuatro ejemplos de la estructura de la glándula mamaria en diferentes especies. En la rata se observa que los ductos se unen para formar un solo galactóforo,

mientras que en la coneja se observa que los ductos son individuales y todos convergen en el pezón desembocando en 6 a 8 galactóforos. En el caso de la mujer se observa la presencia de más galactóforos (10 a 20); además se observa que el lumen se ha alargado y se va cerrando, cuando el conducto se acerca más al pezón. Finalmente se observa el arreglo de la glándula mamaria de la cabra; en esta especie así como en otros rumiantes, se observa una especialización del sistema de ductos, que sirve para incrementar la capacidad de almacenamiento. Los ductos de la leche se abren hacia una gran cisterna (Modificado de Wakerley, et al., 1988).

La lactancia en la coneja se puede dividir en tres fases. Durante los primeros días la fase llamada “lactancia temprana”, se caracteriza por un incremento progresivo de la cantidad de leche evacuada. Posteriormente, existe una “fase intermedia” caracterizada por la estabilización de los niveles de producción láctea y finalmente se presenta la “fase de declinación”, en donde la producción de leche disminuye drásticamente (Cowie, 1969; González-Mariscal *et al.*, 1998; Mena, *et al.*, 1982). En cada una de estas fases, los niveles de PRL, la duración y la frecuencia de la succión, determinarán la variabilidad de la producción láctea. Así en la fase temprana, el incremento en la producción láctea se origina en respuesta a una succión intensa y a una secreción alta de PRL. En cambio, en la fase de declinación, la disminución de leche se debe a una disminución en la secreción de PRL y a la activación de un tono inhibitorio beta-adrenérgico por parte de las crías de mayor edad (Mena *et al.*, 1990 a, b). La secreción de la leche en la coneja se puede mantener durante ocho semanas, siendo los primeros 30 días esenciales para las crías, debido a que la leche es el único alimento a través del cual los gazapos obtienen los nutrientes necesarios para su desarrollo (Mena *et al.*, 1982).

1.2.2 ENDOCRINOLOGÍA DE LA LACTANCIA

La lactogénesis o iniciación de la lactancia comprende dos procesos. El primero conocido como galactogénesis, ocurre en el último tercio de la gestación, donde las células alveolares se vuelven funcionales para adquirir la capacidad de secretar leche. La galactopoiesis o segunda etapa corresponde a la secreción de leche que usualmente comienza en los días 1-4 antes del parto manteniéndose así hasta el destete (Clapp *et al.*, 1987).

La lactancia está regida por hormonas, básicamente por la PRL y la OXT. Además, existen otras hormonas como: el lactógeno placentario, hormona de crecimiento (GH), hormona adrenocorticotrófica (ACTH) y hormona estimulante de la tiroides (TRH), que también cooperan para la producción de la leche y que junto con la PRL, forman el complejo hormonal galactopoiético (Clapp *et al.*, 1987; Tucker, 1988).

En animales hipofisectomizados (aquellos a los que se les remueve quirúrgicamente la hipófisis, fuente principal de la PRL) como en la cabra, la rata y la coneja, ocurre una caída total en la secreción de la leche (Cowie *et al.*, 1969). Para restablecer la secreción láctea, dependiendo de la especie, es necesaria la aplicación de los diversos componentes del complejo galactopoiético. Por ejemplo, en cabras es necesaria la administración de PRL, GH, ACTH y triyodotironina para restablecer la producción de leche, mientras que en la rata sólo es necesaria la PRL, la ACTH y la GH. Por otra parte la coneja se ha vuelto un modelo interesante para el estudio de la restitución de producción láctea debido a que una vez que son hipofisectomizadas, sólo se necesita de la PRL para restituir la secreción láctea (Cowie, 1982; Clapp *et al.*, 1987).

Los componentes de la leche, tales como lactosa, grasa y proteína, que son creados a partir de sus precursores glucosa, ácidos grasos y aminoácidos, además del agua, permanecerán en el lumen de los alvéolos hasta ser removidos por la succión (Clapp *et al.*, 1987).

La PRL y OXT son hormonas que están relacionadas de manera directa tanto para la producción como para la liberación de la leche y son secretadas cuando ocurre un evento de succión. Los niveles de cada hormona varían y cada una tiene su propio tiempo de vida en el plasma. Es así que, en la coneja las concentraciones de PRL antes de la succión se encuentran muy bajas, apenas 2.5 ng/ml (Fuchs *et al.*, 1984). Una vez que la succión comienza, las concentraciones de PRL se incrementan rápidamente desde el primer minuto. Además los niveles de PRL en plasma continúan elevados aunque la succión se haya detenido. Los niveles máximos de la PRL son alcanzados más o menos a los 10 minutos y se mantienen altos por alrededor de una hora. Conforme la lactancia avanza, los niveles de PRL que se liberan con cada episodio de succión disminuyen. Aproximadamente en los días 26-28 los

niveles plasmáticos de PRL comienzan a disminuir cuando la succión cesa y son casi indetectables a los 30 y 60 minutos (Fuchs *et al.*, 1984) (Figura 5).

El pico máximo de OXT en plasma se observa a los 3 minutos (223 pg/ml), a los 5 minutos se cuantificaron 166 pg/ml. Los niveles máximos encontrados a los 1, 3 y 5 minutos en la lactancia temprana son en promedio de 119.7 pg/ml, en la lactancia media fueron de 267.3 pg/ml y en la lactancia tardía son de 488 pg/ml. Por otro lado, las concentraciones de OXT antes de la succión son de 23.6 pg/ml. Después de que la succión empieza, los niveles de OXT en plasma se incrementan rápidamente y llegan a ser significativamente altos después de un minuto. A diferencia de la PRL, los niveles de OXT disminuyen rápidamente, escasamente a los 20 minutos después de que la succión ha cesado (Figura 6) (Fuchs, *et al.*, 1984).

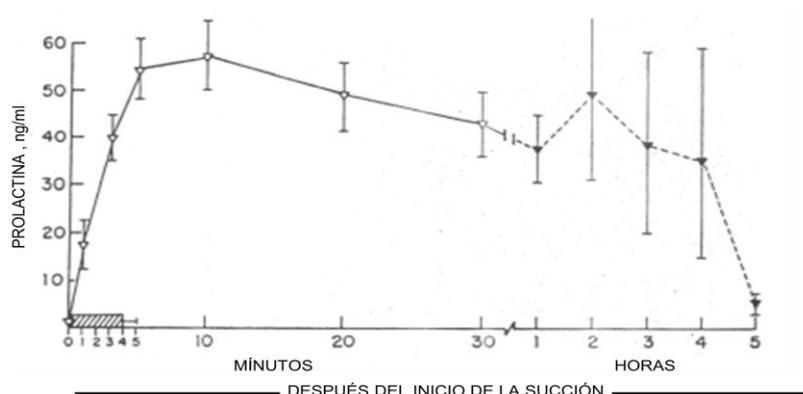


Figura 5. Los niveles de PRL en plasma en conejas lactantes antes, durante y después de un episodio diario de succión. En la barra horizontal se observa la media de la duración \pm EE de los episodios de succión. Los valores de los primeros 30 minutos son la media \pm EE de los 35 experimentos realizados en los días 5-32 de lactancia. Los valores de 1 a 5 h son la media \pm EE de 10 experimentos en los días 5 a 30 de lactancia (Modificado de Fuchs, *et al.*, 1984).

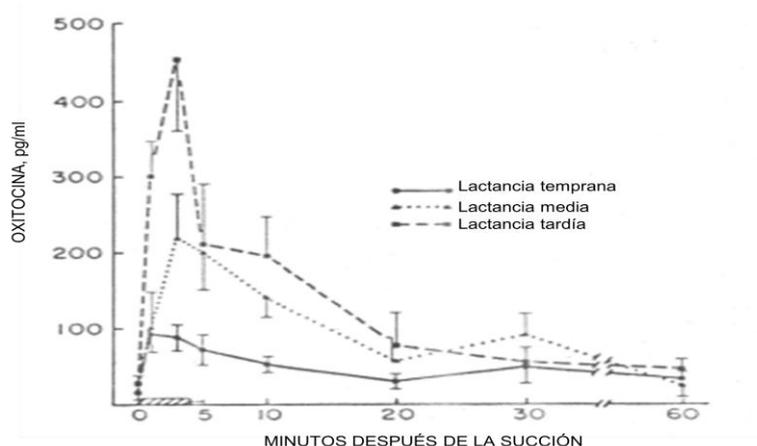


Figura 6. Los niveles de OXT en plasma en conejas lactantes, antes, durante y después de un episodio de succión diario. En la barra horizontal se observa la media de la duración \pm EE de un episodio de succión diario. Los valores de los días 2 a 9 (lactancia temprana) son la media \pm EE de los 12 experimentos realizados. En los días 10 -20 (lactancia media) se observan los valores de la media \pm EE de los 15 experimentos. Finalmente se observa la media \pm EE de 9 experimentos realizados en la lactancia tardía <20 días (Modificado de Fuchs, *et al.*, 1984)

1.2.3 REGULACIÓN NEUROENDÓCRINA DE LA LACTANCIA

Una vez que la coneja se encuentra con las crías, ésta adopta la postura de amamantamiento, una posición que facilita la exposición de los pezones y por ende la succión. Ese estímulo es importante debido a que gracias a él se ejerce una mayor presión sobre los pezones. Es justamente con este estímulo con el que se inicia la evacuación láctea, que activa los mecanorreceptores presentes en los pezones. Estos, a su vez, envían a través de los nervios mamarios una señal eléctrica que viaja a través de la médula espinal hasta llegar al hipotálamo. Como se había mencionado, la PRL que es una de las hormonas adenohipofisarias sintetizada en los lactótrofos, que participa en la producción láctea. Existen diversos factores que favorecen la secreción de la PRL, entre ellos el estímulo de la succión. La regulación de su secreción está regida por mecanismos de inhibición, siendo el principal factor de inhibición de la PRL, la Dopamina. Esta viene de las neuronas tuberoinfundibulares (TIDA). La succión inhibe a dichas neuronas TIDA, lo que permite la secreción de PRL. Por el contrario, la secreción de la PRL, esta favorecida por la liberación de la hormona liberadora de tirotrópina (TRH). (Cowie, 1982, Mena *et al.*, 1982, MacLeod, 1976).

Por otra parte la succión, también induce la liberación de la OXT. Esta hormona es sintetizada en tres regiones, en el Núcleo Paraventricular (NPV) y en el núcleo supraóptico (NSO). Se transporta por medio de los axones hacia la neurohipofisis (lugar donde se encuentran las terminales nerviosas) donde se almacena y es liberada por el parto y la succión hacia el torrente sanguíneo (Sharrer y Sharrer, 1954 citado en Insel, 1990). La oxitocina induce la contracción de las células mioepiteliales que recubren a los alvéolos y a los conductos mamarios y como consecuencia de esta contracción se genera la salida de la leche hacia el exterior (Cowie, 1982).

1.3. RITMOS BIOLÓGICOS

1.3.1 HISTORIA DE LOS RITMOS BIOLÓGICOS

Para definir qué son los ritmos biológicos, debemos hablar del tiempo y de cómo se mide. Aunque no se ha llegado a una definición precisa existen numerosos conceptos del tiempo como el de San Agustín, que dice “He estado hablando del tiempo por mucho tiempo: este mucho tiempo no sería tal si no fuera por el hecho de que el tiempo ha transcurrido mientras tanto ¿Cómo puedo saber esto, si aún no sé lo que es el tiempo?... ¡No sé lo que he medido!”. Aristóteles por su parte decía que el tiempo, aunque no es movimiento, no es posible concebirlo en forma independiente de éste, ya que el tiempo no existe sin cambio (Gruart *et al.*, 2002).

Para medir el tiempo es necesario hacer uso de un fenómeno recurrente a intervalos regulares, un oscilador cuyos intervalos de variación, sirvan como referencia temporal. Desde épocas antiguas ha sido importante medir el tiempo. Ejemplo de ello es la herramienta que se utilizó hace más de 5 mil años, que consistía en observar la sombra que proyectaba el sol al desplazarse. Otra manera eran los relojes de las antiguas civilizaciones, con los que se medían los cambios de estación, la sucesión del día y la noche. También existen estructuras como la pirámide de Kukulcán que fueron diseñados para indicar los solsticios (verano e invierno) y los equinoccios (primavera y otoño). Unos de los primeros relojes en el siglo XVIII fueron los de aceite, que medían el tiempo en la noche. En este tipo de relojes se observaba el volumen consumido del combustible al arder. Fue hasta el renacimiento con el invento del péndulo por Galileo, que fue posible hacer mediciones más exactas debido a que las oscilaciones de dicho artefacto eran regulares (Gruart *et al.*, 2002).

Además del tiempo geofísico que se ha descrito en los párrafos anteriores, también existe el tiempo biológico, que permite la coordinación de diversos procesos funcionales en un individuo, como la generación de un nicho ecológico temporal, de acuerdo a la especie. Este concepto de tiempo biológico se ha desarrollado a partir del estudio de los ritmos biológicos (Gruart *et al.*, 2002).

Los ritmos biológicos se definen como aquellas variaciones en la conducta y funciones del individuo que se repiten a intervalos regulares. La ritmicidad que presentan los organismos en sus diversas actividades o funciones son el resultado de los llamados “relojes biológicos”. Estos son propios del organismo, es decir, son endógenos y responden a los variados ciclos ambientales provocados por los movimientos de la tierra. Debido a esto se sabe que los ritmos biológicos están sincronizados generalmente con la luz del día (Aschoff, 1981; Gruart *et al.*, 2002; Corona y Fernández, 2008).

Diversos estudios han mostrado la existencia de relojes internos que ayudan a la regulación de ciertas actividades biológicas para que sean desplegadas de manera rítmica (Corona y Fernández, 2008). Algunos ejemplos de estos ritmos son la actividad de las neuronas o el batir de las alas de un insecto, los cuales son fenómenos que se realizan en milésimas de segundos. Otros se repiten a intervalos más grandes como la reproducción de ciertas especies. Otro ejemplo de ritmo biológico puede ser cuando las mariposas monarcas dejan México después de su reproducción. Estas mediciones de tiempo en el individuo se deben a un oscilador primario, es decir, aquel que es endógeno y que no necesita de otros osciladores para que generen un ritmo biológico (Figura 7) (Gruart *et al.*, 2002).

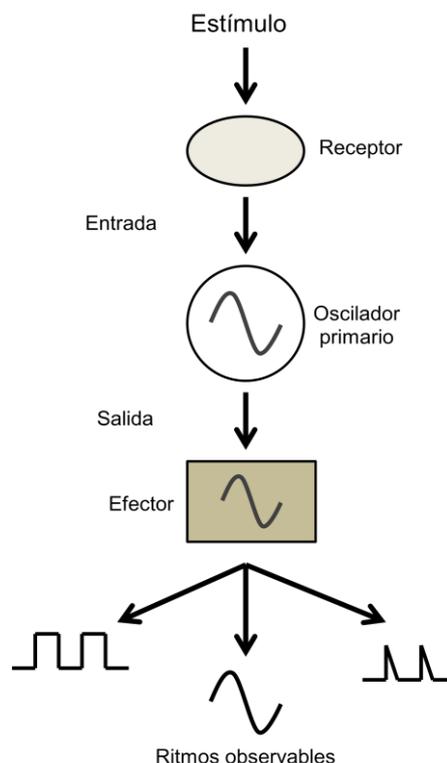


Figura 7. Esquema de un oscilador primario, que genera diversos ritmos biológicos observables. (Modificado de Gruart *et al.*, 2002).

El primer experimento relacionado con los ritmos biológicos data de hace más de 250 años. El astrónomo francés Jean Jaques de Mairan en el siglo XVI, observó que una planta (mimosa), abría sus hojas en el día (cuando había luz) y cerraba sus hojas en la noche (cuando había oscuridad). Después de mantener en oscuridad total a la planta se dio cuenta de que esta respondía de la misma manera, es decir, las hojas se abrían y se cerraban casi a la misma hora del día en que lo hacían cuando había luz y oscuridad (Corona y Fernández, 2008; Gruart *et al.*, 2002).

Fue hasta 1936 cuando Bünning propuso la hipótesis de que los organismos poseen un reloj biológico. Basado en la apertura de las hojas y la floración de las plantas, que ocurrían en la fase de luz y en la inhibición de las dos fases anteriores durante la fase de oscuridad (Citado por Gruart *et al.*, 2002).

Después comenzó el estudio de los ritmos biológicos en insectos y fue cuando el psiquiatra August Forel (1910) observó que unas abejas se acercaban a la terraza a la hora del desayuno durante algunos días. Días después comenzaron a llegar antes de la hora del desayuno, mientras que en aquellos días en que no desayunaban en la terraza, las abejas seguían presentándose a la misma hora (Citado por Gruart *et al.*, 2002).

Posteriormente, Colin Pittendrigh (1950) estudió la eclosión de las moscas de la fruta a diferentes temperaturas (16°C y 26°C). Observó que ambos grupos de moscas sujetas a diferentes temperaturas, eclosionaban con una diferencia de 12 horas entre ambos grupos. Al siguiente día observó que tenían una diferencia en el horario de eclosión de 2 horas, pero al tercer día encontró que no hubo diferencia entre la hora de eclosión de las moscas que se encontraban a 16°C comparada con las que se encontraban a 26°C. Fue con Pittendrigh que se inició el estudio como tal de los ritmos biológicos que hasta la actualidad persiste (citado por Gruart *et al.*, 2002, Corona y Fernández, 2008).

1.3.2 DESCRIPCIÓN DE LOS RITMOS BIOLÓGICOS

Para estudiar los ritmos biológicos en condiciones de laboratorio es necesario mantener constante la luz, el alimento, o algún otro factor que sea capaz de sincronizar al organismo. Como consecuencia de mantener constantes diferentes sincronizadores se obtendrá un ritmo en libre curso o libre corrimiento (*free running*).

De esta manera se obtiene la primera manera de clasificar a los ritmos biológicos (nomenclatura introducida por Franz Halberg, en 1969. Existen ritmos que se encuentran cercanos a diversos ciclos, por ejemplo, al ciclo de las mareas, al ciclo lunar ó al ciclo de un día, entre otros. Por lo tanto se les llamarán circamareales, circalunares ó circadianos, respectivamente. A cada uno de los diferentes ciclos se les antepone el prefijo “*circa*”, del latín “alrededor de” o “próximo a” (Corona y Fernández, 2008).

La segunda manera de clasificar a los ritmos biológicos se basa en la frecuencia con que se presenten y se toma como referencia a los ritmos circadianos, los cuales se presentan sólo una vez al día. Tomando como referencia a dichos ritmos, se derivan en ritmos ultradianos e infradianos (Gruart *et al.*, 2002; Corona y Fernández, 2008). Los ritmos ultradianos son aquéllos que se presentan más de una vez al día, es decir, completan varios ciclos en un solo día. Ejemplo de estos ritmos pueden ser la ingestión de agua y alimento, la frecuencia cardiaca y la frecuencia respiratoria. Los ritmos infradianos son aquéllos que tardan en completar un ciclo en más de un día, es decir, el periodo con el que se presentan es mayor a un día, ejemplo de esto puede ser el ciclo menstrual de algunos primates y de la mujer y la hibernación de algunos mamíferos. Dentro de este tipo de ciclos se superponen los ciclos circalunares y circanuales (Figura 8) (Aguilar-Roblero y Escobar, 2002).

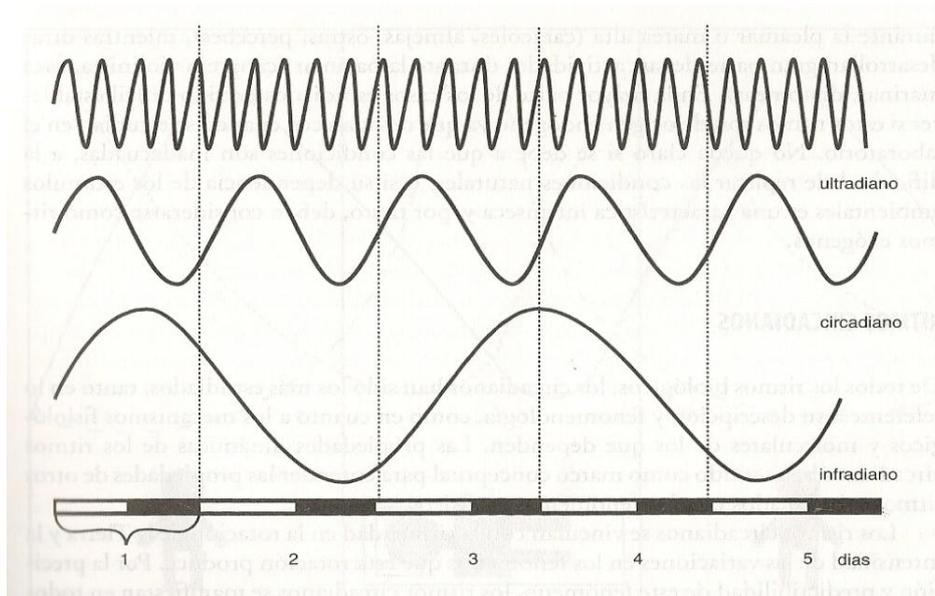


Figura 8. Se observa los diferentes tipos de ritmos biológicos que existen, de acuerdo a la frecuencia con que estos se presentan en un día. Las barras blancas indican el día y las barras oscuras indican la noche. Se observa que el ritmo ultradiano completa 5 ciclos en un día. El ritmo infradiano completa un ciclo en dos días. El ritmo circadiano completa un ciclo por día (Aguilar-Roblero y Escobar, 2002. Tomado de: Ritmos biológicos y mecanismos generales de regulación. En: Motivación y Conducta: sus bases biológicas).

Para medir los ritmos biológicos, se deben tomar en cuenta todas las características que los constituyen, que son: a) periodo (τ), definido como el tiempo que se tarda cada ciclo entre dos eventos. b) frecuencia, que es el número de veces que ocurre algún fenómeno en un intervalo de tiempo, c) amplitud, que es la magnitud de la oscilación de un ciclo y tiene 2 componentes: 1) cresta, definida como el punto máximo del ciclo, 2) valle, que es el punto mínimo de la oscilación. Por medio de la cresta y del valle se estima la amplitud, mientras que, el mesor se define como el promedio de todos los valores observados de un ciclo, d) la fase se define como un punto de referencia durante el ciclo de un ritmo, por ejemplo: la transición de luz a oscuridad en un ciclo ambiental, el comienzo de actividad locomotora o el inicio de ingestión de alimento. La fase permite describir algunas características de los ritmos tales como: 1) retraso de fase, cuando el evento ocurre después de lo esperado. Por ejemplo, se espera que una coneja amamante a las 2 de la mañana y el evento ocurre hasta las 3:00 de la mañana y 2) adelanto de fase, cuando el evento ocurre antes de lo esperado. Por ejemplo, si el amamantamiento ocurre a la 1:00 de la mañana, en lugar de a la hora

esperada, que son las 2 de la mañana (Figura 9) (Gruart *et al.*, 2002, Corona y Fernández, 2008).

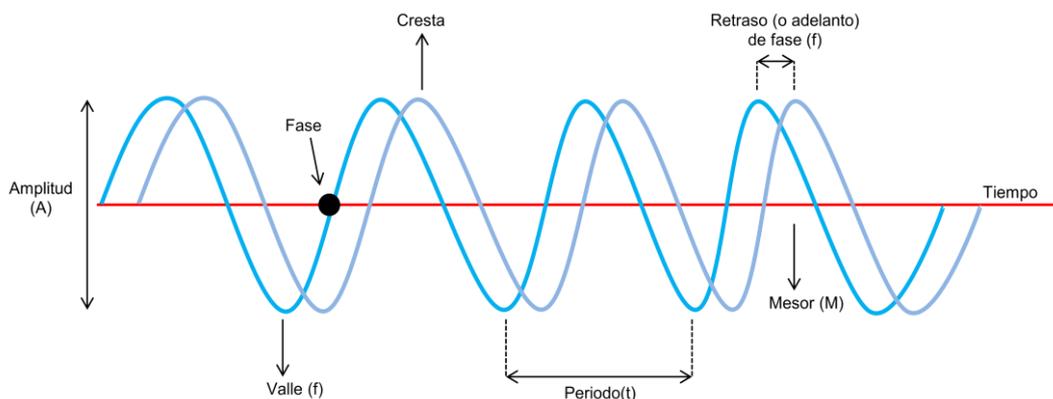


Figura 9. Grafica de los componentes de los ritmos biológicos: Período, Amplitud, Fase, Cresta, Valle, Mesor, Retraso o adelanto de fase. (Modificado de Gruart *et al.*, 2002).

En el laboratorio se utilizan diferentes fotoperíodos de luz:oscuridad o bien, de disponibilidad de alimento para saber si estos factores pueden o no sincronizar a los animales.

1.3.3 DEFINICIÓN Y DESCRIPCIÓN DE LOS RITMOS CIRCADIANOS

Los ritmos circadianos están estrechamente relacionados con la rotación de la tierra y están presentes en casi todos los seres vivos. Por ejemplo: la reproducción celular, la temperatura corporal, la liberación de algunas hormonas o el ciclo actividad-reposo (Aguilar-Roblero y Escobar, 2002). Además de las características anteriormente mencionadas, estos ritmos también poseen sus propias características, que son: 1) están sincronizados al ciclo de luz–oscuridad y 2) en ausencia de señales fóticas se despliegan libremente bajo un período de aproximadamente 24 h (Aguilar-Roblero y Escobar, 2002).

El estudio de los ritmos biológicos en vertebrados comenzó con Michael Menaker, en 1968 quien observó que la extirpación de la glándula pineal (glándula presente en el diencéfalo), en el canario, eliminaba el ritmo circadiano de la locomoción y está se recuperaba cuando se reimplantaba la glándula. La glándula pineal, libera la hormona melatonina en ausencia de luz. Además, tiene conexiones con el Núcleo Supraquiasmático (NSQ) y está estrechamente

relacionada con la función fotosensorial. Así, la glándula pineal fue la primera estructura cerebral asociada a la ritmicidad en vertebrados (Zimmerman y Menaker, 1975). A principios de la década de los setenta se realizaron experimentos en mamíferos, a los que les lesionaron la región ventral y medial del hipotálamo y, como consecuencia de la lesión, se observó la interrupción de la ritmicidad circadiana en la locomoción, indicando que existen más regiones cerebrales involucradas en la ritmicidad circadiana (Moore y Eichler, 1972; Stephan y Zucker, 1972; Klein *et al.*, 1991).

Por otra parte, Moore y colaboradores en 1972, publicaron la primera evidencia sobre la existencia de una vía neuronal asociada con un reloj biológico. Ellos inyectaron aminoácidos marcados radiactivamente en el humor vítreo de ratas adultas. Al analizar algunas secciones de tejido, observaron que los axones de las células ganglionares que provenían del ojo habían incorporado los aminoácidos a lo largo de su proyección en el cerebro. A nivel del quiasma óptico una gran cantidad de axones dejan su trayecto de la ruta visual y penetran al NSQ.

El NSQ es una estructura bilateral localizada en la porción ventral (dorsal al quiasma óptico) del cerebro y compuesta de miles de neuronas y células gliales. En el conejo adulto el NSQ mide aproximadamente 1500 μm en dirección antero-caudal y 400 μm en su parte más ancha y 1000 μm en su parte más alta (Figura 10) (Toledo, *et al.*, 2008). Existen en el NSQ dos divisiones anatómicas y funcionales: 1) una región ventrolateral (dorsal al quiasma óptico) el cual posee neuronas que expresan, péptido vasoactivo intestinal (VIP) o péptido liberador de gastrina (GRP), además de tener abundantes terminales con neuropeptido-Y provenientes de la hojuela intergeniculada (HIG) y 2) una región dorsomedial que rodea a la región ventrolateral y posee neuronas que contienen vasopresina (VP). Además el NSQ mantiene de manera endógena oscilaciones circadianas en la expresión de genes reloj (Corona *et al.*, 2008). En los mamíferos diversas actividades tales como sueño, actividad, presión sanguínea, entre otros están controlados por relojes biológicos, localizados en el sistema nervioso central. El mecanismo autónomo de estas oscilaciones es un reloj molecular interno compuesto por muchos genes reloj, que interactúan como un *loop* de retroalimentación positivo y negativo (Reppert y Weaver, 2001). Las proteínas CLOCK y BMAL brindan retroalimentación positiva,

mientras que las proteínas PERIOD (PER1, 2 y 3) y CRY1 y 2 brindan una retroalimentación negativa. Se sabe que PER1 tiene expresión circadiana en el NSQ en muchas especies tales como el ratón, la rata, el conejo, entre otros (Reppert y Weaver, 2001, Sládek, et al., 2004, Meza, et al., 2008).

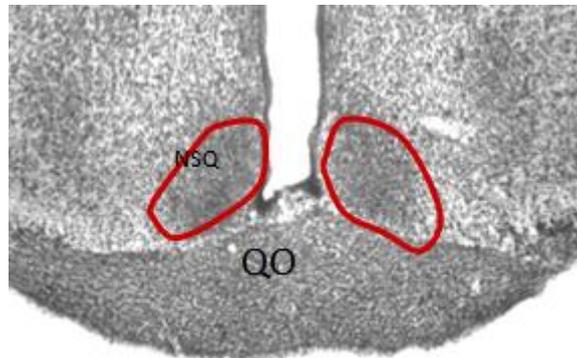


Figura 10. Núcleo supraquiasmático del conejo. Está situado en la porción ventral del cerebro. Está compuesto de una región ventrolateral rica en VIP y GRP, y una región dorsomedial rica en Vasopresina (Tomado de Corona *et al.*, 2008. En: Bases celulares y moleculares de los ritmos biológicos).

1.3.4. REGULACIÓN DE LOS RITMOS CIRCADIANOS

La principal vía aferente de información nerviosa al NSQ es la del tracto retinohipotalámico. Este, parte desde la retina, donde se encuentran dos tipos de células fotorreceptoras, conos y bastones. Los bastones por su parte codifican la cantidad de luz presente en el ambiente. Estos bastones se comunican con las células ganglionares tipo W (un tipo especial de neuronas que se localizan en la capa más interna de la retina). En esta capa interna se encuentran las neuronas ganglionares que con sus axones, forman el nervio óptico y que a su vez son las encargadas de transmitir la información visual detectada en la retina al cerebro. Es así que los axones de las neuronas ganglionares tipo W se conectan con las neuronas del NSQ y así forman la vía retinohipotalámica. (Moore y Eichler, 1972).

Por otro lado, los axones de las células ganglionares tipo W, se bifurcan antes de entrar al núcleo supraquiasmático. De manera que, una de las ramas del axón se conecta con las neuronas de otra área cerebral llamada la hojuela intergeniculada (HIG). Las neuronas de la HIG envían sus axones al NSQ, de esta manera el NSQ recibe información sobre la intensidad de luz en el

ambiente. Lo que permite un ajuste fino de la fase del reloj circadiano respecto al ciclo luz-oscuridad. Además, la HIG participa en la sincronización del reloj a estímulos no fóticos (Moore y Eichler, 1989).

Además otras áreas cerebrales envían también sus axones hacia el NSQ, como son el núcleo del rafe mediano (localizado en tallo cerebral, región que comunica al cerebro con la médula espinal, donde se controlan funciones vegetativas tales como la frecuencia cardíaca, la respiración y el sueño) y el núcleo talámico paraventricular (ubicado en el tálamo y participa en la actividad de la corteza cerebral durante la vigilia).

Es así que la información fótica de la retina puede seguir dos vías: 1) la vía directa a la región ventrolateral del NSQ y 2) la vía indirecta, retina-HIG-NSQ (Corona *et al.*, 2008).

Así como hay aferencias al NSQ, también existen eferencias del mismo. Fue en 1987 cuando Watts y Swanson, investigaron, por medio del uso de un marcador anterogrado de *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin (PHA-L) las proyecciones eferentes del NSQ en la rata. Encontraron que las proyecciones del NSQ están divididas en 6 vías. La primera proyección y la más densa de células que comienza en el NSQ termina por un lado en una zona en forma de coma entre el NSQ y el núcleo paraventricular y por otro lado, en el núcleo periventricular y el área hipotalámica anterior. Algunas axones continúan dorsalmente desde la zona subparaventricular y pasan a través de partes parvicelulares del núcleo paraventricular y sobre la línea media del núcleo talámico y termina en la parte midrostrocaudal del núcleo paraventricular del tálamo, mientras que otro axones continúan caudalmente al final del núcleo dorsomedial, a partes dorsales de la zona de escasas células que rodea al núcleo ventromedial y al área hipotalámica posterior. La segunda vía consiste en fibras dirigidas rostralmente que terminan en partes ventrales del área preóptica media y en el núcleo periventricular anteroventral. La tercera proyección consiste en fibras orientadas anterodorsalmente que pasan a través del núcleo preóptico media y regiones adyacentes y terminan ventralmente en el núcleo septal lateral intermedio. La cuarta vía consiste en fibras caudales del tercer grupo que terminan en la continuación preoptica de la base de núcleo de la Stria terminalis, así como en el núcleo paratenial y en la parte rostral del núcleo paraventricular del tálamo. La quinta vía consiste en fibras dirigidas

lateralmente que pasan sobre el tracto óptico y terminan en el núcleo geniculado lateral ventral. La sexta y última vía consiste en fibras que pasan posteriormente a través de las áreas hipotálamicas y retroquiasmáticas y finalizan en la zona de pocas células entre el núcleo arcuato y partes ventrales del núcleo ventromedial, así como en partes adyacentes del área hipotalámica lateral (Watts *et al.*, 1987a) (Figura 11).

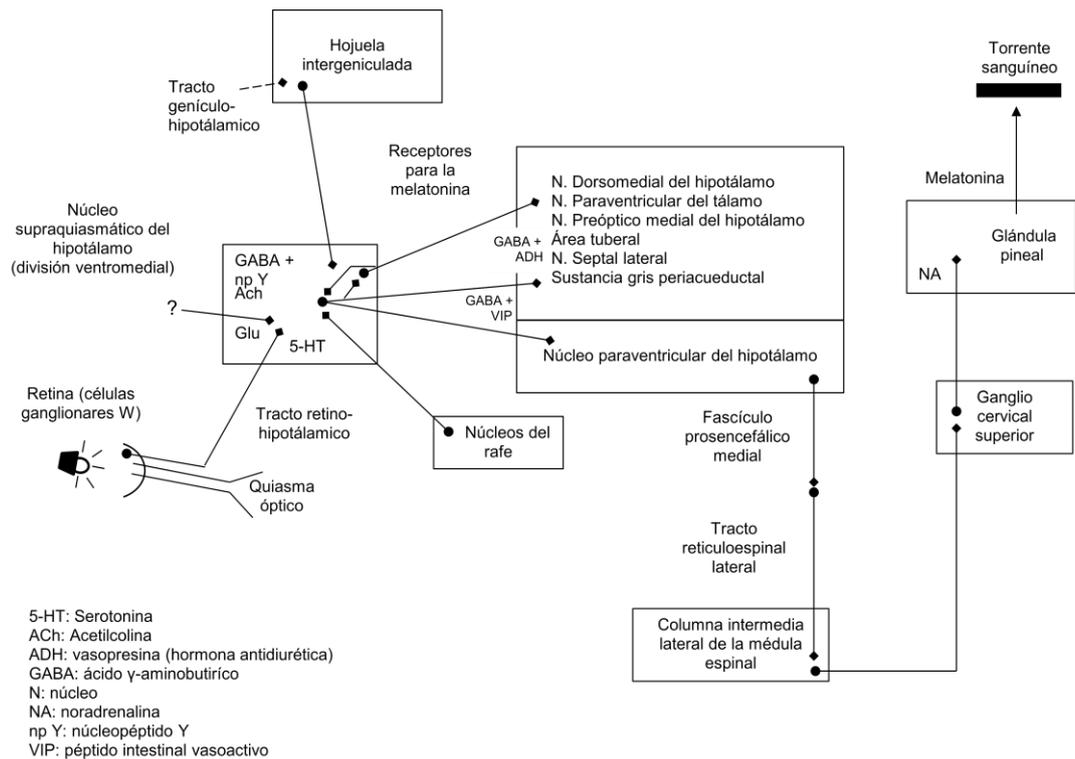


Figura 11. Se muestra las conexiones del NSQ con diferentes estructuras cerebrales. Además se observan algunos neurotransmisores implicados (Modificado de Gruart *et al.*, 2002).

1.3.5. RITMOS CIRCADIANOS DEL CONEJO

Se sabe que el principal generador de los ritmos circadianos es el NSQ y si éste se destruye, se pierde la ritmicidad de algunas actividades. Por otro lado, estudios en ratas, reportan que el alimento es capaz de sincronizar y restablecer la ritmicidad de la actividad locomotora (Stephan *et al.*, 1979a, Stepahn *et al.*, 1979b). Por otro lado, cuando el NSQ es lesionado, se ha encontrado otro sincronizador potente capaz de restablecer la ritmicidad de la actividad locomotora: el alimento. Por otro parte, en el conejo se ha experimentado también que ocurre cuando la disponibilidad de alimento se

restringe sólo a unas horas al día (Jilge *et al.*, 1987; Jilge 1991; Jilge y Stähle, 1993; Escobar *et al.*, 2001; Gruart *et al.*, 2002).

El alimento ha sido un sincronizador empleado para estudiar ritmos circadianos en el conejo. Se ha tomado como modelo experimental al conejo en la cronobiología, debido a que presentan actividad circadiana en las funciones gastrointestinales, específicamente en la deposición de heces fecales. Dentro de las 24 h, ellos producen heces duras y suaves de manera alternada. A éste tipo de conducta se le conoce como cecotrofía, es decir, se refiere a la producción de heces suaves matutinas que son reingeridas y posteriormente producen heces duras que indican que las heces suaves ya han sido producidas y reingeridas (Jilge *et al.*, 1987; Jilge 1991; Jilge y Stähle, 1993).

Debido a los antecedentes antes mencionados, Jilge realizó experimentos, donde exploró si, en efecto, el alimento es un potente sincronizador o sólo enmascara la actividad locomotora del conejo (Aschoff, *et al.*, 1982, Boulos y Terman, 1980; Jilge *et al.*, 1987; Jilge 1991; Jilge y Stähle, 1993).

En los trabajos de Jilge (1987, 1991 y 1998) se utilizaron machos de la raza Himalaya de 2.5-2.8 kg, alojados a temperatura ambiente. Las actividades registradas fueron: actividad locomotora, excreción de orina, excreción de heces duras, visitas a la caja del alimento y las veces que el conejo tenía contacto con el tubo de agua. Estuvieron alojados en jaulas individuales, las cuales se encontraban suspendidas por 4 resortes, de manera que estos resortes registraban los movimientos que realizaba el conejo dentro de la jaula. Los animales estuvieron inicialmente bajo un ciclo luz:oscuridad (LO) 12:12 , para su habituación y con alimento *ad libitum*.

En 1987, Jilge, Hörnicke y Stähle, utilizaron sólo 5 machos, que presentaran actividad bimodal. Estuvieron sujetos inicialmente a un fotoperiodo de Luz-oscuridad 12:12, L(9h-21h):O(21h-9h), durante 46 días, con agua y alimento *ad libitum*. Posteriormente del día 47 al día 380 estuvieron mantenidos en condiciones de luz constante. Mientras que durante los día 381-443, regresaron a condiciones de luz-oscuridad. En dos machos, tomaban en cuenta la excreción de heces fecales duras (fase de referencia) para iniciar la restricción de alimento (RA) por 4 h. Esta comenzaba cuando cerraban la caja

del alimento 2 h después de que finalizara la excreción de heces fecales duras. En otro individuo, se cerraba 12 horas antes y/o después de la fase de referencia. Mientras que en otro de los machos se cerraba 4 horas antes de la fase de referencia. En el quinto macho que utilizaron, la caja del alimento se cerró 10.5 h antes de que la luz se encendiera. Inicialmente obtuvieron retraso de 6 h y un cambio en el ritmo en dos machos (401 y 533), en el otro macho (511) hubo un adelanto de 6 h. Respecto al macho 529 se mantuvo en su fase y el macho 219, hubo un ajuste de fase entre ambos componentes. Posteriormente en los días 60-70 el acceso al alimento en los machos 533 y 401 se retrasó 6 h. En el macho 511, la disponibilidad de alimento se adelantó por 6 h. En el macho 529 se mantuvo sin cambios. Finalmente encontraron que el régimen de restricción de alimento si tuvo influencia sobre las 5 actividades de los conejos. Aunque este zeitgeber no fue lo suficientemente fuerte para entrenar los ritmos circadianos totalmente en todos los conejos. A pesar de ello, las actividades que realizaron algunos conejos fueron reorganizadas de acuerdo a la disponibilidad de alimento. Esto sugirió que es posible que la periodicidad circadiana sea generado al menos por dos sistemas de sincronización, en el conejo. El primero es el oscilador de sincronización por alimento y el segundo es el oscilador de sincronización por luz-oscuridad (Figura 12).

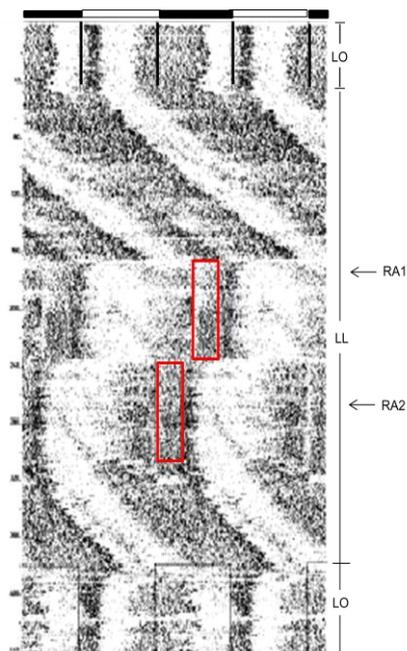


Figura 12. Actograma en donde se muestra la deposición de heces fecales duras por un conejo macho. Primero estuvo bajo condiciones de LO y alimento *ad libitum*. Posteriormente fue sujeto a condiciones de Luz continua (LL) y con alimento restringido (RA) a sólo 4 horas. Se observa que la mayor actividad la presenta al final de la fase de luz y principio de la fase de oscuridad (Modificado de Jilge et al., 1987).

Posteriormente, Jilge (1991). Experimento nuevamente el efecto de la restricción del alimento sobre las conductas de los conejos machos. En esta ocasión. Esto lo hizo nuevamente debido a que en experimentos iniciales con Restricción de alimento (RA), no fueron suficientes para discriminar entre entrenamiento y enmascaramiento. Para este experimento utilizó conejos machos ($n=20$). Inicialmente registraron cinco conductas (actividad locomotora, actividad en la caja del alimento, excreción de heces fecales duras, acercamientos al tubo de agua y excreción de orina), estas fueron registradas primero en condiciones de luz-oscuridad (días 23-40). Posteriormente se registraron a los animales en condiciones de luz continua (LL) por 120 días. Permanecieron los animales con LL hasta el final del experimento. 10 machos estuvieron expuestos a un horario de Restricción de Alimento (RA) por 4 h, con una $T_{RA}=23$ h 50 min, seguido por 92 días en LL sin ningún *zeitgeber*. De acuerdo a la fase de referencia (inicio de cecotofía), en 5 de esos individuos, la caja de alimento se abrió por 540 min, mientras que en los otros cinco sólo se abrió por 240 min. En otros cinco individuos, fueron expuestos a dos diferentes horarios de RA, el primero fue $T_{RA}=24$ h, por 70 días. Después el segundo horario de RA por 100 fue $T_{RA}=23$ h 50 min. Ambos precedidos por 120 días de LL. Cinco individuos más estuvieron expuestos a un horario de RA de $T_{RA}=24$ h, por 70 días y después estuvieron por 120 días más bajo LL. Encontrar que durante los días en que estuvieron expuestos al fotoperiodo de LO, los animales estuvieron en fase con ese *zeitgeber* en las cinco conductas que se registraron, presentando mayor actividad en la noche. Quince conejos presentaron un ritmo bimodal y sólo 5 presentaron un ritmo unimodal. Posteriormente en los días de exposición a LL, durante los días 20-30, siete de los animales que tenían comportamiento bimodal cambiaron transitoriamente al comportamiento unimodal, aunque después volvieron nuevamente a su comportamiento bimodal. El periodo cicádico durante los primeros días de condiciones de LL fue cercano a 24 h en todos los animales, aunque después

alcanzó una longitud constante de 24.33 ± 0.12 h dentro de los 40 ± 20 días de LL. Además la restricción de alimento si causó efecto en las cinco conductas que se registraron durante todo el experimento. Además durante los días 10 a 67 en que estuvieron sujetos a RA, se estableció Actividad Anticipatoria en los animales. Jilge concluyó que en este experimento la RA logró entrenar los ritmos circadianos del conejo. Finalmente, sugieren que el sistema este siendo entrenado por dos diferentes *zeitgebers*, uno de LO y el otro de RA (Figuras 13 y 14).

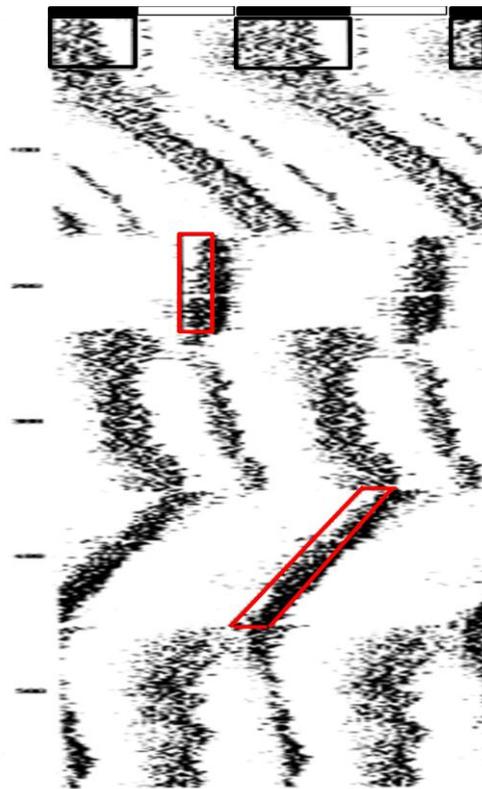


Figura 13. Se observa la conducta de excreción de heces fecales de un macho que al inicio mostró comportamiento bimodal de las cinco conductas. Los rectángulos negros indican cuando estuvo sujeto a LO, y se observa que presentaba la mayoría de su actividad durante las primeras horas de la noche hasta la mitad de ella y poca actividad durante las primeras horas de luz. Los rectángulos rojos indican cuando el animal estuvo con RA y se observa como la mayor parte de la actividad se presentaba durante las últimas horas de disposición de alimento y algunas horas después de retirado el alimento. El segundo rectángulo rojo muestra también la disposición de alimento a diferente hora y se observa como la conducta es desplegado antes, durante y después de la RA.

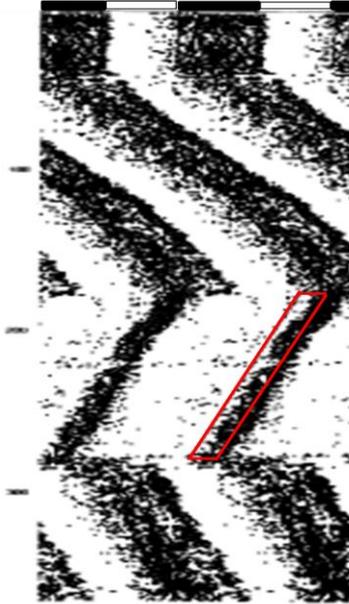


Figura 14. Se muestra la excreción de heces fecales de otro macho. Este individuo presentó actividad unimodal desde que estaba bajo LO. Continuo así durante la fase en LL. Sólo cuando se mantuvo con RA toda su actividad era modulada por la presencia del alimento y se observa que la mayoría de su actividad la desplegaba alrededor de la primera hora de disponibilidad de alimento y durante algunas hora después de que se retiraba el alimento. Después continuó con comportamiento bimodal después de que ya no estuvo sujeto a RA.

Años más tarde, Jilge y Stähle (1993), experimentaron si un solo oscilador del sistema circadiano, es entrenado por LO y el zeitgeber de RA o si los ciclos de LO y los ciclos de ayuno entrenan dos sistemas osciladores. Utilizaron 10 adultos. Primero estuvieron expuestos a LO con agua y alimento *ad libitum*. Registraron conductas tales como: excreción de orina, excreción de heces fecales duras, ambulación, acercamientos a la caja de alimento y acercamiento al tubo de agua. Posteriormente, se les cambio el ciclo de LO a LL y registraron las mismas conductas durante 91 días. Pasados los días en que estuvieron bajo un fotoperiodo de LL, cambiaron a un ciclo de LO de 23:50 h, es decir, 11:55 L: 11:55 O, durante 226 días. En el día 108 del ciclo LO, la disponibilidad de alimento fue restringida a 4 h. En cinco conejos el periodo de RA fue el mismo que el *zeitgeber* de LO (23:50 h). Mientras que en los otros cinco individuos, el periodo de RA fue de 24:10 h, es decir, 20 minutos más largo que el ciclo de LO. El experimento finalizó con 120 días de LL y con agua y alimento *ad libitum*. Encontraron que, al inicio del ciclo de LL, todos los animales exhibieron ritmos circadianos en libre corrimiento. Por otro lado, cuatro animales mostraron un retraso en el despliegue del ritmo, mientras que

tres individuos mostraron adelanto en el despliegue del ritmo. Dos animales más estuvieron en fase con el *zeitgeber*. Durante los primeros cinco días en que inicio la restricción de alimento, a sólo 4 h, las actividades de los animales se reorganizó y fue desplegada alrededor de la presencia del alimento durante la fase de luz. En cuatro de cinco individuos que estuvieron bajo un periodo de 23:50, la actividad locomotora y la ingestión de agua se presentó de manera anticipada, al inicio y al final del acceso al alimento. Respecto a excreción de orina y heces fecales estuvo restringida al final de la disponibilidad de alimento. Mientras que en aquellos individuos que estuvieron bajo un periodo de 24:10 h, la actividad locomotora fue entrenada por la disponibilidad de alimento, aunque el fotoperiodo de LO también tuvo un impacto significativo. Cuando el alimento estaba disponible en Luz, la mayoría de las conductas fue desplegada durante esta fase comparada con la actividad que desplegaban en oscuridad. Con este experimento concluyeron que existen dos sistemas de osciladores circadianos en el conejo, uno que es entrenado por la RA y otro por LO

1.3.6 FRECUENCIA DE AMAMANTAMIENTO EN EL CONEJO

Hoy y Selzer (2002) exploraron la frecuencia del amamantamiento, tanto en conejos silvestres como en domésticos, con camadas de seis y ocho crías, respectivamente. Ellos realizaron video-grabaciones durante 24 h, mediante cámaras infrarrojas y encontraron que: el 86.8% de los conejos domésticos amamantaron una vez al día, un 11.2% lo hacía dos veces al día, y solo un 0.8% amamantó hasta tres veces al día. Con respecto a los conejos silvestres, encontraron que: el 68.3% amamantaron una vez al día, el 26.9% dos veces al día y el 1.9% amamantó hasta tres veces por día. Además, reportaron que el 50% de los eventos de amamantamientos ocurrieron durante la noche.

Por otro lado, Jilge (1993) determinó en conejos Himalaya (*Oryctolagus cuniculus*), la frecuencia de amamantamiento en condiciones de laboratorio bajo un ciclo de LO 12:12 (la luz se encendió a las 06:00h) y totalmente aislados de ruido. Utilizó un sistema de registro electrónico automatizado que permitió determinar la entrada diaria al nido en 14 hembras. Encontró que el amamantamiento se realizaba una vez por día con una duración de 3' 42" ± 25" por período. Esto ocurrió durante la fase de oscuridad.

Debido a que los ritmos pueden ser sincronizados por factores como el ciclo de luz-oscuridad, en un estudio posterior Jilge (1995) utilizó luz continua, con la finalidad de no proveer a las hembras información de señales fóticas. Utilizó 28 hembras con una camada de 5 – 8 crías/camada/hembra. Las hembras tuvieron acceso continuo al nido. Encontró que el parto ocurre en cualquier momento del día y que las hembras amamantaron sólo una vez al día con, una duración de cada episodio de 3' 58" \pm 42", y en promedio se observaron pequeños adelantos los primeros 10 días de lactancia, es decir, el segundo día de lactancia la coneja entró al nido poco antes de la hora en que había entrado el primer día.

En el Centro de Investigación en Reproducción Animal (C.I.R.A.) nuestro grupo de investigación realizó un experimento con conejas primíparas de la raza Nueva Zelanda blanca (n=15), mantenidas bajo condiciones de bioterio. Hubo ruido de la entrada y salida de investigadores y personal de limpieza. Los animales permanecieron bajo un fotoperiodo de LO 14:10. Se utilizó un sistema de videograbación (GEOVISION SYSTEM) con el que se grabaron a lo largo de 24 h, durante los primeros 15 días de lactancia. Se registró la hora y duración de cada periodo de amamantamiento y se determinó su frecuencia en 24 h. Se encontró que aquellas hembras a las que se les proporcionaron camadas de 5 a 8 crías, mostraron amamantamiento circadiano, es decir, sólo lo presentaron una vez al día, aproximadamente cada 24 h. Se realizó un análisis de estadística circular (Análisis de Rayleigh), con el que se obtuvo un vector principal que indicó la hora más probable a la que la población de hembras realiza el amamantamiento, que es a las 3:52 a.m (Figura 15).

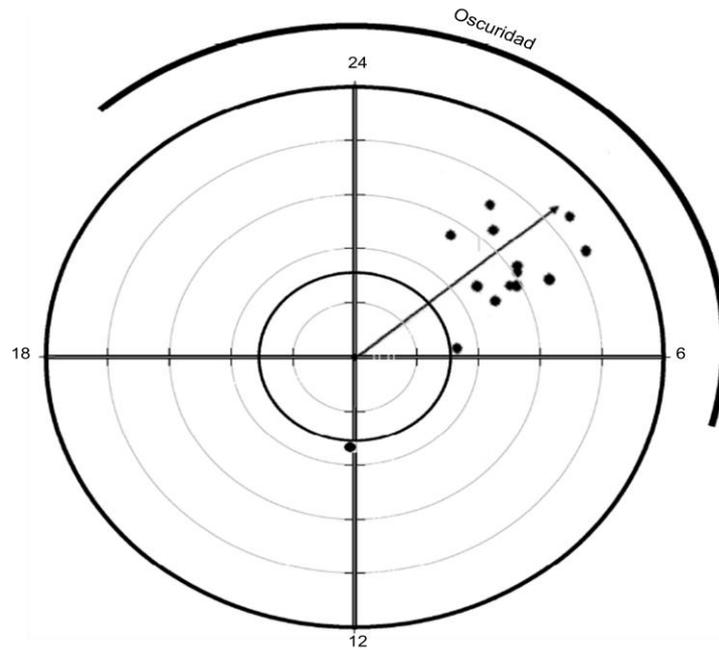


Figura 15. Analisis de Rayleigh. Se muestra la hora en que la población de hembras amamanta. La flecha es el vector que describe a la población y que a su vez indica la hora a la que se llevan a cabo los amamantamientos: 3:52. Sus características son: α de 58° , $\rho = 0.78$ y $p < 0.0001$. Los círculos negros indican los vectores individuales de cada una de las hembras (Tomado de González-Mariscal *et al.*, 2013).

Por otro lado existe evidencia de que el tamaño de la camada juega un papel importante en tres aspectos fisiológicos de la hembra. Estos aspectos son: a) inducción del anestro lactacional, b) la cantidad de OXT liberada durante la succión y c) el tiempo que pasa la madre dentro del nido. De manera específica, al menos tres crías son necesarias para inhibir la conducta de marcaje por frotamiento del mentón (conducta característica de una hembra en estro), mientras que son necesarios diez crías para reducir la receptividad sexual (García-Dalmán y González-Mariscal, 2012). Las contracciones del útero -indicador de liberación de OXT-, se inducen por la succión de al menos 4 crías (pero no por 2 o 1) (Fuchs y Warger, 1963) y amamantar al menos a 4 crías, son necesarios para que la hembra permanezca dentro del nido por alrededor de 3 minutos (González-Mariscal *et al.*, 2013). En base a los antecedentes anteriores, se planteó la hipótesis de que el tamaño de la camada ejerce también un efecto en la periodicidad circadiana de amamantamiento en la coneja. Hubo cuatro grupos independientes, que tuvieron 4, 2 ó 1 cría (s). Las hembras estuvieron bajo un sistema de circuito

cerrado (GEOVISION SYSTEM), durante los primeros 15 días de lactancia. Se encontró que el tamaño de la camada causó un gran impacto respecto al mantenimiento de la conducta maternal (la CM consistió en que la hembra entrara al nido y se dejara succionar por los críos durante 3 a 5 minutos), debido a que la proporción de las hembras maternas disminuyó conforme avanzaron los días de observación. Sólo el 15% de las hembras que amamantó a 1 cría (n=8) completaron los quince días de lactancia. Mientras el 50% de las hembras que amamantaron a 2 crías (n=8), fueron maternas durante los 15 días de observación, respecto a las hembras con 4 crías (n=9) y camada completa (n=15), (6-8 crías), el 82% y 81% respectivamente, desplegaron conducta maternal durante los 15 días de lactancia (Figura 15).

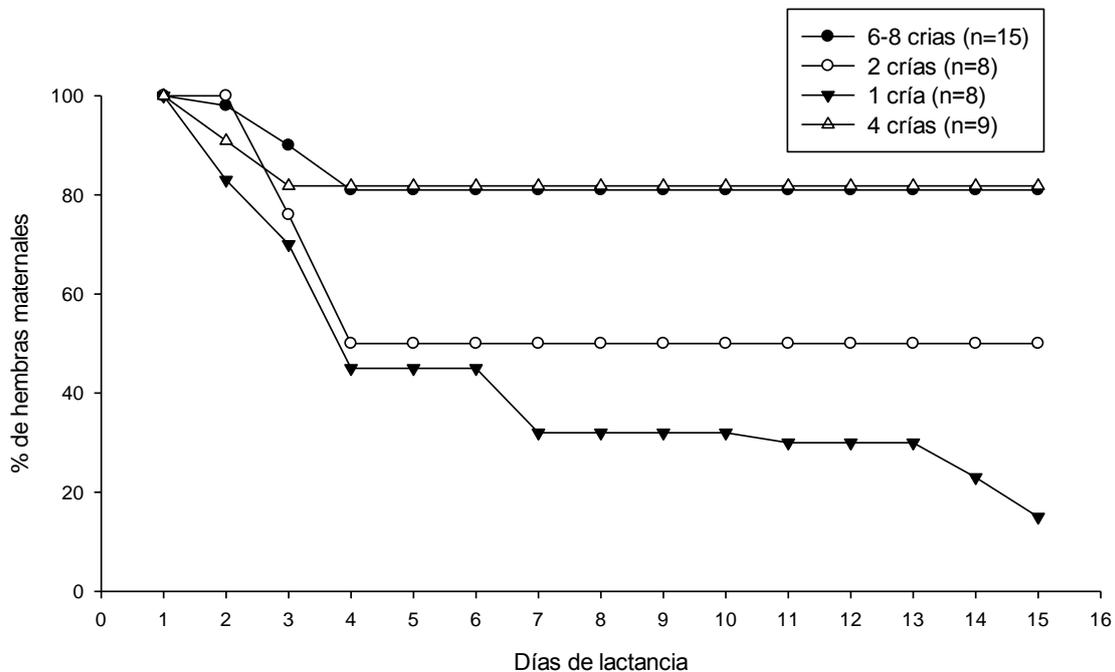


Figura 15. Gráfica en la que se observa que la proporción de hembras maternas durante 15 días de lactancia disminuyó de acuerdo al tamaño de la camada (6-8, 4, 2 ó 1 cría(s)). Cuando la camada fue más grande, la mayoría de las hembras fueron maternas hasta el día 15, mientras que cuando fue más pequeña la camada, sólo el 15% de las hembras fueron maternas (Tomado de Lemus, 2010).

Por otro lado, las hembras que tuvieron menos de 5 crías, es decir, 1, 2 ó 4 crías, presentaron numerosos amamantamientos. Para determinar la existencia de un equilibrio múltiple y de múltiples intervalos estables que expresen periodicidad dentro de una conducta aparentemente arrítmica. Se utilizó un

análisis de racimos (cluster analysis) de intervalos para entradas sucesivas al nido. Los intervalos entre las entradas al nido, se agruparon en cuatro puntos particulares de equilibrio o centroides, de acuerdo al número de críos amamantados. La gráfica de Poincaré muestra el valor exacto de los centroides de cada grupo experimental. Se encontró que las hembras que amamantaron a una camada de 6 a 8 crías, presentan un punto de equilibrio de 24 h en su intervalo de amamantamiento. Este punto de equilibrio disminuye conforme lo hace el tamaño de la camada. Es así que aquellas hembras a las que se les dieron 4, 2 o 1 cría, mostraron centroides de entre 6 ó 18 horas (Figura 16). En este trabajo se concluyó que el tamaño de la camada es un factor fundamental para mantener la ritmicidad circadiana de los amamantamientos.

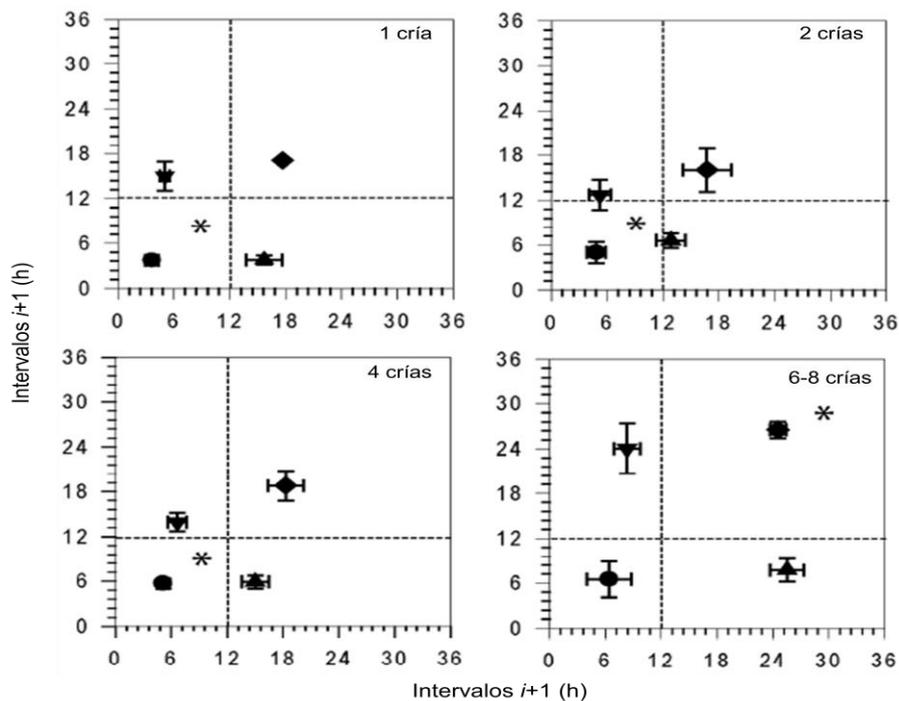


Figura 16. Gráfica que muestran los centroides de Poincaré. Se observa los puntos de equilibrio de los intervalos de aquellas hembras que amamantaron 6-8 crías, su punto de equilibrio es de 24 h. Para las hembras que amamantaron 4 crías, mostraron un punto de equilibrio de 6 h, al igual que las hembras de que amamantaron a 2 y 1 cría. Los asteriscos muestra el intervalo de amamantamiento más frecuente de cada grupo. (Tomado de González-Mariscal et al. 2013).

1.4 SISTEMA OLFATORIO

1.4.1 EPITELIO OLFATORIO PRINCIPAL Y ACCESORIO.

En los mamíferos, el olfato favorece el despliegue de respuestas tanto fisiológicas como conductuales hacia conoespecíficos. Ejemplo de estas últimas son: la conducta maternal y la conducta sexual (Kandel *et al.*, 2000; González-Mariscal y Poindron, 2002).

El epitelio olfativo se encuentra situado en la parte posterior de la cavidad nasal. Está constituido por millones de neuronas sensitivas olfatorias, además de células de sostén (Figura 17). A diferencia de otros tipos de neuronas, las neuronas olfativas tienen un tiempo de vida corto (30-60 días aproximadamente) (Kandel *et al.*, 2000).

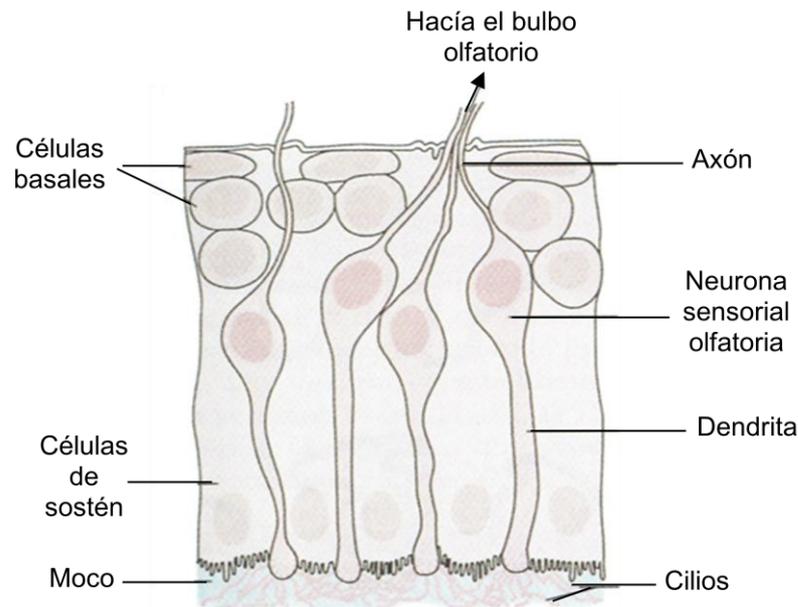


Fig. 17. Esquema donde se muestran los componentes del epitelio olfatorio (Tomado de Kandel *et al.*, 2000)

Las neuronas sensitivas olfatorias son neuronas bipolares. Del polo apical, cada neurona emite sólo una dendrita de la que emergen de 5-20 cilios dirigidos hacia la capa de moco. Esta capa procede de las células de sostén del epitelio olfatorio y de las glándulas de Bowman, que cubren el epitelio. La respuesta de la neurona odorante, consiste en la despolarización seguida de múltiples potenciales de acción. Los olores volátiles que penetran en la cavidad nasal y se disuelven en el moco, son detectados por los receptores de olores presentes en los cilios de las neuronas sensitivas olfatorias. Del polo basal

surge un axón, que atraviesa la lámina cribosa ósea, situada sobre la cavidad nasal. De allí llega a los bulbos olfatorios (situados por encima y por detrás de las cavidades nasales). Posteriormente, los axones sensitivos aferentes, que se encuentran en el bulbo olfatorio, establecen sinapsis con las dendritas de las neuronas del bulbo, en unidades sinápticas, llamadas glomérulos. En el glomérulo, el axón sensitivo, establece conexiones sinápticas con neuronas: mitrales y en oville, neuronas repetidoras que proyectan sus axones a la corteza olfatoria e interneuronas periglomerulares que rodean al glomérulo (Kandel *et al.*, 2000).

Los axones de las células mitrales y en oville del bulbo olfatorio, se proyectan por el haz olfatorio lateral hasta la corteza olfatoria (porción de la corteza que recibe una proyección directa del bulbo olfatorio). La corteza olfatoria se divide en cuatro áreas, 1) núcleo olfatorio anterior: éste conecta los bulbos olfatorios a través de una porción de la comisura anterior, 2) la corteza periforme, 3) partes de la amígdala y 4) tubérculo olfatorio, además de parte de la corteza entorrinal. Desde las cuatro áreas antes mencionadas, la información pasa hacia la corteza orbitofrontal a través del tálamo. Además de que también se transmite la información olfatoria desde el núcleo amigdalino y el área entorrinal al hipocampo (Figura 18) (Kandel *et al.*, 2000).

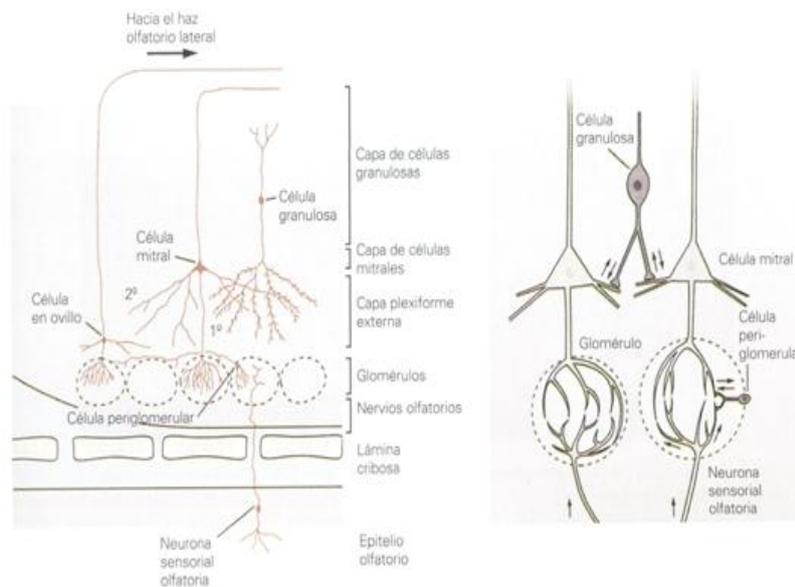


Figura 18. Esquema en el que se muestran las conexiones sinápticas de los gomérulos con las neuronas mitrales y de oville (Tomado de Kandel *et al.*, 2000)

Por otro lado, también está presente el sistema olfatorio accesorio o vomeronasal. Este órgano está involucrado en conductas tales como reconocimiento de conespecíficos y en procesos reproductivos de muchas especies de vertebrados

Se encuentra formado por dos órganos vomeronasales pares (localizados en la superficie dorsoposterior del bulbo olfatorio principal), por nervios vomeronasales y por bulbos olfatorios accesorios. El órgano vomeronasal es una estructura ovalada. Se encuentra revestido por un epitelio sensitivo similar al epitelio olfatorio de la cavidad nasal (Kandel *et al.*, 2000; Miranda *et al.*, 2000). Los axones de las neuronas del órgano vomeronasal forman un haz en el nervio vomeronasal y se proyectan al bulbo olfatorio accesorio. Las neuronas mitrales del bulbo olfatorio accesorio se dirigen casi exclusivamente a la región del núcleo amigdalino, desde donde son proyectadas al hipotálamo (Figura 19) (Kandel *et al.*, 2000).

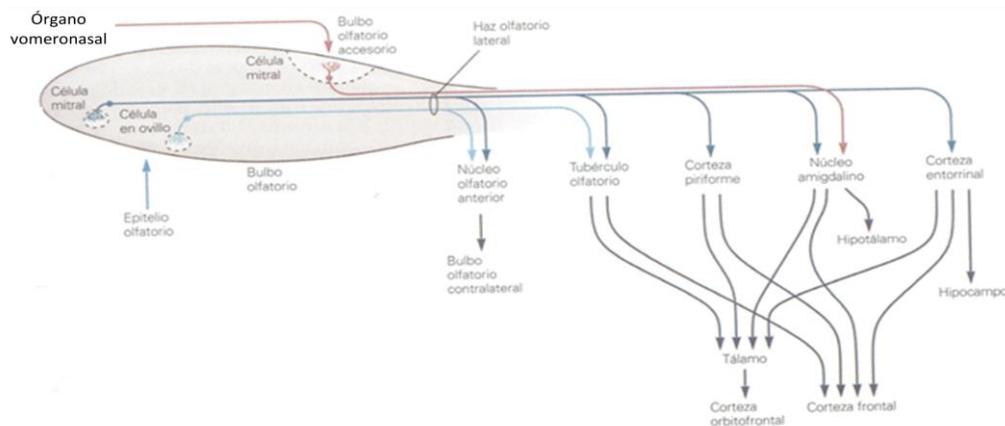


Figura 19. Esquema donde se muestran las conexiones del sistema olfatorio hacia diferentes área cerebrales (Tomado de Kandel et al., 2000).

1.4.2 RELACIÓN DEL OLFATO CON EL DESPLIEGUE DE CONDUCTAS SEXUAL Y MATERNAL

1.4.2.1. CONDUCTA SEXUAL FEMENINA EN MACHOS

Como ya se había mencionado, el olfato juega un papel importante para el despliegue de respuestas fisiológicas y conductas específicas. Dentro de estas conductas se encuentra tanto el despliegue de la conducta sexual como de la

conducta maternal. Respecto a la conducta sexual, se han realizado experimentos los cuales muestran que los machos son capaces de desplegar conducta de lordosis (conducta que realizan las hembras cuando se aparean), cuando éstos son privados del olfato. Se sabe que en la rata macho adulto castrado, tratado con dosis repetidas de estrógeno, éste es capaz de desplegar un patrón femenino completo incluido el reflejo de lordosis, al ser montado por otro macho.

En base a lo anterior, Schaeffer *et al.*, (1986) investigaron los efectos de remover el bulbo olfatorio accesorio en ratas orquidectomizadas (machos a los que se les extirparon quirúrgicamente los testículos) y tratadas con estrógeno-progesterona para evaluar el papel del bulbo olfatorio accesorio en el control de la conducta de lordosis en el macho. Utilizaron machos de 4 meses de edad. Tuvieron tres grupos experimentales. Estos grupos fueron: los controles, experimentales (a los cuales les extirparon los bulbos olfatorios accesorios) y el grupo de simulación (sham). Todos los animales recibieron 75 µg de benzoato de estradiol (BE) subcutáneamente y 1 mg de progesterona (P). Posteriormente se les realizó la prueba de conducta de lordosis durante 10 minutos. Encontraron que una proporción similar de machos controles (54%) y del grupo de machos orquidectomizados sham (59%), desplegaron conducta de lordosis. Posterior a la bulbectomía, aumentó el número de animales que desplegaron conducta de lordosis (88%). Ellos concluyeron que el Bulbo Olfatorio Accesorio, localizado en la parte caudal del bulbo olfatorio, quizá constituya por sí mismo el mecanismo capaz de inhibir el despliegue de la conducta de lordosis en la rata macho.

Posteriormente, el grupo de Aron (1990) investigó si la conducta de lordosis espontánea, que presentan las ratas WI está influida por el sistema olfatorio. Ellos concluyeron que un pequeño número de machos inexpertos sexualmente desplegaron conducta de lordosis de manera espontánea. Además en ratas orquidectomizadas tratadas con BE y P, la lesión del bulbo olfatorio accesorio incrementó el número de animales que desplegaron lordosis y las señales olfatorias provenientes de la orina de machos ejercieron el mismo efecto.

1.4.2.2 CONDUCTA MATERNAL EN LA RATA

Otra de las conductas que se encuentra relacionada con el olfato es la conducta maternal. Se sabe que esta conducta, es desplegada normalmente sólo por hembras lactantes. Sin embargo existen especies en las que la maternalidad no es una respuesta exclusiva de las hembras lactantes, sino que también es desplegada por hembras vírgenes, como es el caso de la rata. Rosenblatt (1967), experimentó con hembras vírgenes (intactas y ovariectomizadas) que expuso a la presencia de crías de entre 5 -10 días de edad durante 10 a 15 días. Las conductas que registró fueron: acarreo de crías, “crouching” (posición de arqueamiento sobre las crías que permite la exposición de los pezones) acicalamiento y construcción de nido. Encontró que el 100% de las hembras vírgenes (intactas y ovariectomizadas), acarrearón a las crías, aproximadamente en el séptimo día de exposición a ellas. Respecto a la posición de amamantamiento, ésta fue desplegada aproximadamente en el quinto día en ambos grupos de hembras. La construcción de nido fue desplegada en el tercer día por las hembras ovariectomizadas, mientras que las hembras intactas construyeron nido hasta el séptimo día de exposición. Rosenblatt concluyó que en el caso de las ratas (tanto ovariectomizadas como intactas), el despliegue de la conducta maternal, no se encuentra regido únicamente por factores hormonales. Además, es necesario que las hembras vírgenes tengan la presencia constante de las crías por al menos 6 días, a diferencia de las hembras gestantes, las cuales inmediatamente después del parto son capaces de desplegar conducta maternal y cuidar de sus crías. Por otro lado se sabe que la administración en las fosas nasales de sulfato de Zinc ($ZnSO_4$) a las ratas hembras, causa anosmia porque provoca necrosis en el epitelio olfatorio. Este efecto es transitorio y la percepción olfativa se recupera conforme pasa el tiempo (Alberts, 1974).

Fleming y Rosenblatt (1974a) realizaron un experimento donde investigaron el efecto de la remoción del bulbo olfatorio en hembras vírgenes y lactantes con y sin experiencia maternal. Su objetivo fue determinar qué papel tiene el bulbo olfatorio en el inicio y organización de la conducta maternal tanto en ratas vírgenes expertas e inexpertas como en ratas lactantes. Se colocó a las hembras en cajas individuales, en las que se pusieron a crías de entre 5 a

10 días de edad diariamente. Observaron a las hembras hasta que estas desplegaran conducta maternal al menos durante dos días continuos. Las conductas que observaron fueron: acarreo de crías, postura de amamantamiento, construcción de nido, cuadrante de la caja en donde construyeron el nido y acicalamiento de crías. Las hembras fueron consideradas maternas cuando ellas acarrearon al menos 4 de 5 crías a un cuadrante particular de la caja y cuando adoptaron la posición de amamantamiento sobre ellas. Tuvieron 10 grupos experimentales, que fueron divididos de la siguiente manera:

Experimento 1: Efecto de la bulbectomía olfatoria bilateral (BOB-V) y unilateral (UOB-V) en ratas vírgenes inexpertas

Conducta maternal

		% maternales			Conducta maternal		Promedio de despliegue maternal (días)
		n	% canibalismo	%	n	% ♀	
1	BOB-V [#] (s/exp)	12	58.3	58.3	7	71.4	2.67 ± 1.86
2	UOB-V [#] (s/exp)	11	18.1	90.9	10	40	5.3 ± 4.48
3	Intactas-V (s/exp)	12	0	100	12	0	7 ± 2.83

Experimento 2: Efectos de la bulbectomía olfatoria en 1 (UOB-BOB-V) ó 2 fases (BOB-V-2S)

4	UOB-BOB-V* (c/exp)	7	0	100	7	100	1 ± 0
5	BOB-V-2S (s/exp)	7	0	100	7	85.7	1.83 ± 0.4

Experimento 3: Efecto de bulbectomía olfatoria bilateral en una fase (BOB-L-1S) sobre la conducta maternal al parto

6	BOB-L-1S ⁺ (s/exp)	7	14.2	100	7	100	1 ± 0
7	Intactas-L-s/xp	8	0	100	8	100	1 ± 0
8	BOB-L-1S ^o (c/exp)	7					
	Canibales	3	100	0	0		
	Maternal	3	0	100	3	100	1 ± 0
	Ambos	1	0	100	1	100	1 ± 0

Experimento 4: Efecto de la experiencia maternal, sobre la re-inducción de la conducta maternal en hembras bulbectomizadas

9	BOB-L-R [#]	5	0	100	5	100	1 ± 0
10	Intactas-L-R ^{&}	8	0	100	8	50	4.6 ± 2.50

Tabla 1: Se muestran el porcentaje de hembras maternales y que canibalizaron a crías en todos los grupos (Modificado de Fleming y Rosenblatt, 1974a).

s/exp.: sin experiencia maternal

c/exp.: con experiencia maternal

[#]UOB-V: hembras vírgenes bulbectomizadas unilateralmente: [%]BOB-V: hembras vírgenes bulbectomizadas bilateralmente.

*UOB-BOB-V: Hembras que pertenecieron al grupo 2. Después de haber sido inducidas a desplegar conducta maternal, les quitaron el remanente del bulbo olfatorio. ⁺BOB-L-1S: Hembras vírgenes a las que bulbectomizaron bilateralmente. Posterior a la bulbectomía fueron apareadas y se esperó el parto. ^oBOB-L-1S: Hembras del primer grupo bulbectomizadas bilateralmente. Seleccionaron sólo a las hembras que canibalizaron y las aparearon por segunda vez. En los resultados tuvieron tres alternativas: 1) que las hembra volvieran a canibalizar, 2) que fueran maternales y 3) que presentaran ambas conductas. [#]BOB-L-R: Hembras del grupo 6 bulbectomizadas bilateralmente. Estuvieron sólo 2 días con sus crías. Después las aislaron por dos semanas y las volvieron a

exponer con sus crías pasadas las dos semanas. **intactas-L-R**: Hembras que permanecieron con sus crías 2 días y después fueron aisladas por dos semanas. Posteriormente las volvieron a exponer a crías.

De estos experimentos, Fleming y Rosenblatt concluyeron que la bulbectomía tiene dos efectos el primero es que induce canibalismo y el segundo es que induce facilitación para el despliegue de la conducta materna. Además de que el olor que emiten los críos puede ser un factor que contribuya a que las hembras vírgenes intactas desplieguen conducta materna. El olor novedoso que perciben las hembras vírgenes, provoca que eviten a los críos pero esta tendencia de evasión se ve favorecida con la presencia continua de ellas. Esto genera la disminución de la evasión de las crías para que las hembras vírgenes comiencen a cuidar de ellas. Probablemente el inicio precipitado del despliegue de la conducta materna es asociado a una condición de animales anósmicos, mientras que el canibalismo está asociado no sólo a aspectos sensoriales, sino también a una alteración del sistema límbico.

Fleming y Rosenblatt (1974b) también investigaron los efectos de la anosmia y lesiones del tracto olfatorio lateral en hembras vírgenes inducidas a desplegar conducta materna. Sus grupos experimentales fueron:

Experimento 1: Efecto de la anosmia periférica sobre la conducta materna

Grupo	n	% canibalismo	% ♀ maternales	Conducta materna		
				n	% ♀ maternales dentro de las 24 h	promedio despliegue maternal (días)
Sulfato de zinc (5%)	12	0	100	12	88.3	1.83 ± 1.53
Aire	8	0	100	8	11.1	5.25 ± 2.91
Solución salina	9	12.5	77.8	7	50	5.25 ± 6.07

Experimento 2: Efecto de las lesiones centrales en el sistema olfatorio sobre la conducta materna

Lesionadas-TOL⁺	11	36.3	90	10	80	2.1 ± 0.49
Control*	15	6.6	0	0	13.3	> 4.06

* Control: hembras que fueron lesionadas en otras partes del cerebro.

⁺Lesionadas-TOL: Hembras que fueron lesionadas bilateralmente en el tracto olfatorio lateral.

Tabla 2: Se muestra la proporción de hembras infundidas con sulfato de zinc y lesionadas bilateramente en el tracto olfatorio lateral, que canibalizaron y que desplegaron conducta maternal (Modificado de Fleming y Rosenblatt, 1974b).

Posteriormente, Fleming y Rosenblatt (1974c), investigaron la conducta maternal en las hembras vírgenes y lactantes. Encontraron que todas las hembras vírgenes desplegaron conducta maternal aunque varió el día en que desplegaro dicha conducta (Figura 20). Respecto a las hembras lactantes, estas desplegaron conducta maternal de manera inmediata.

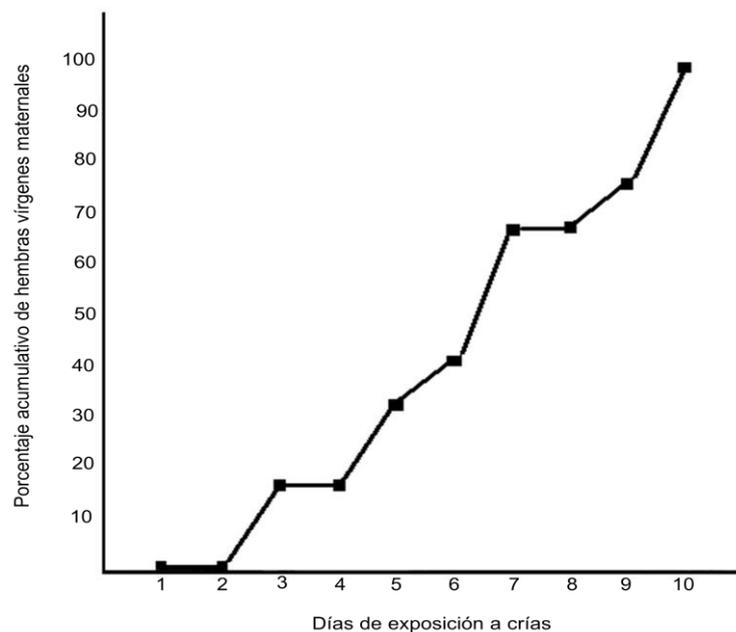


Figura 20. Se observa el porcentaje acumulativo de hembras que desplegaron conducta maternal. En el tercer día es cuando empiezan a ser maternales y en el décimo día de exposición a crías el 100% de las hembras fueron maternales (Modificado de Fleming y Rosenblatt, 1974c).

Ellos concluyen que hay un desarrollo gradual de la responsividad maternal. Probablemente, el estímulo novedoso del crío y la evasión provoque que la hembra no presente el patrón maternal rápidamente. Quizá los sonidos ultrasónicos que emiten los críos favorezcan el proceso de sensibilización pero, las señales olfatorias quizá sean las principales señales para que la hembra virgen evite a los críos. Este “miedo” que le provocan las crías disminuye con la exposición continua a ellas.

Posteriormente, Mayer y Rosenblatt (1977), reportaron que las hembras vírgenes a las que se les administró ZnSO₄ al 5% de manera intranasal y 2.5% de manera intranasal e intraperitoneal, aire o solución salina, acarrear a sus crías y fueron maternas. En la siguiente tabla (tabla 3) se resumen los grupos con cada uno de los tratamientos y los días en que comenzaron a acarrear a las crías y fueron maternas.

Tratamientos por grupo	Post-tratamiento (h)	N	Latencia acarreo (días)	Latencia maternal (días)
ZnSO4 IN				
5%	24	9	0.89	1
5%	48	18	1.22	2.17
2.50%	24	9	2.67	2.89
2.50%	28	9	1.44	2.33
ZnSO4 IP				
2.50%	24	9	4.44	4.44
2.50%	48	9	2.64	3.11
Aire				
Aire	24	7	4.86	4.85
Aire	48	18	3.28	3.67
NaCl	48	9	3.44	3.44

Tabla 3. Se observan las latencias para acarrear a crías y las latencias para ser maternas en los diferentes grupos tratados con ZnSO₄ al 5% infundido de manera intranasal y al 2.5% infundido de manera intranasal e intraperitoneal, con aire o con solución salina. El post-tratamiento 24 o 48 h.

Fleming y Rosenblat sugirieron (1979) que la indecisión inicial para que la hembra cuidara de los crías, es una respuesta aversiva transitoria ocasionada probablemente por las señales olfatorias que la cría emite. Sin embargo, con la eliminación del olor de la cría, por medio de la anosmia provocada por infusión de sulfato de zinc o por bulbectomía o transección del tracto olfatorio lateral, la señal odorífera que emiten las crías es eliminada y de esta manera las hembras vírgenes responden de manera favorable hacia las crías. Por lo anterior mencionado, Fleming et al., investigaron la importancia de los dos sistemas olfatorios, en la mediación de la inhibición transitoria de la conducta maternal. Utilizaron hembras vírgenes a las cuales les realizaron a) completa desaferentación vomeronasal, b) desaferentación parcial olfatoria y c)

realizaron ambos procesos. Una vez realizadas las cirugías, observaron la respuesta de las hembras hacia las crías. Utilizaron 45 ratas hembras, divididas en 6 grupos.

En la figura 21 se muestran los resultados obtenidos en el experimento antes mencionado. Se observan las latencias (días) que cada uno de los grupos de hembras fueran maternas. Las hembras del grupo Sham B, fueron las que tardaron más días en ser maternas mientras que aquellas hembras a las que se les realizó la desaferentación de ambos sistemas olfatorios, tardaron menos días en desplegar conducta maternal.

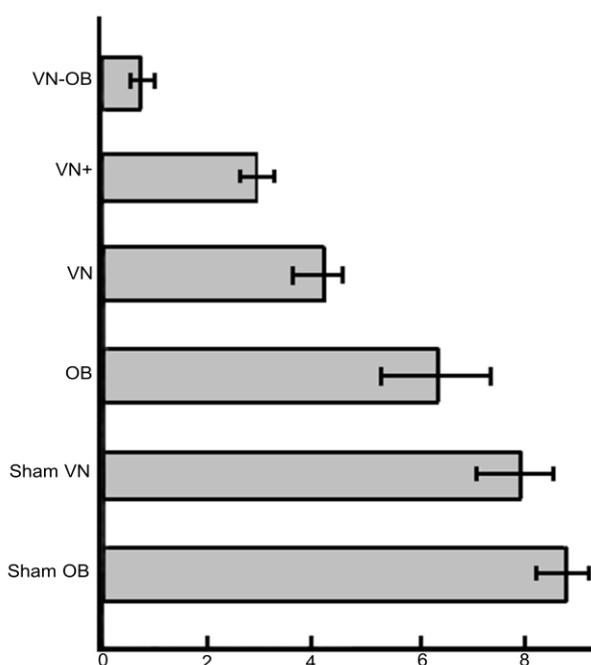


Figura 21. Se observan las latencias en días de las hembras que fueron maternas. OB: grupo donde se les extirpo el bulbo olfatorio. VN: grupo de hembras a los que se les realizó una desaferentación de los nervios del órgano vomeronasal. VN+ y VN-OB: grupos en donde cortaron ambos sistemas (desaferentación del órgano vomeronasal y el bulbo olfatorio). Sham OB y Sham VN: grupos control.

Ellos concluyen que cuando ambos sistemas son lesionados se facilita el despliegue de conducta maternal. Sugieren que los sistemas vomeronasal y olfatorio principal inhiben tónicamente la expresión de la conducta maternal en la hembra virgen.

1.4.2.4 CONDUCTA MATERNAL EN LA CONEJA

González-Mariscal *et al*, (2004) estudiaron en conejas Nueva Zelanda blancas, vírgenes intactas y ovariectomizadas, el efecto de remover el bulbo olfatorio accesorio (BOA), sobre la responsividad maternal hacia crías presentadas diariamente por 1 h. Encontraron que el 37% de las hembras vírgenes intactas lesionadas comenzaron a desplegaron conducta maternal (adoptar la posición de amamantamiento sobre las crías y se dejaron succionar) a partir del tercer día de exposición a ellas (Figura 22). La latencia para entrar al nido y desplegar la postura de amamantamiento fue: el primer día tardaron en entrar 26 ± 6 min (media \pm ee), el segundo día 16 ± 7 minutos (media \pm ee), el tercer día 3 ± 2 min y a partir del cuarto día sólo tardaban 1.2 min (media \pm ee) en entrar al nido. El tiempo que pasaron las hembras dentro del nido con las crías fue de 4.3 min (media). Por el contrario, ni las hembras vírgenes intactas ni las hembras ovariectomizadas a las que se les removió quirúrgicamente el BOA presentaron conducta maternal durante los 14 días de exposición a crías.

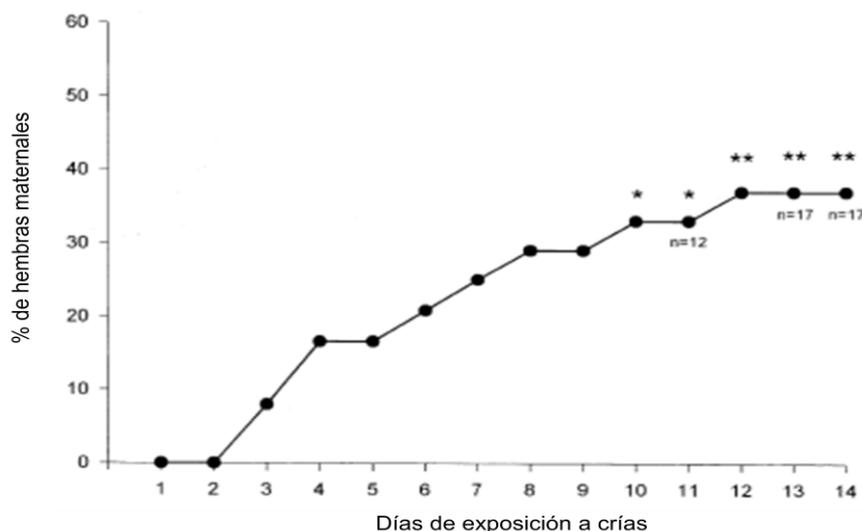


Figura 22. Porcentaje de hembras vírgenes a las se les removió quirúrgicamente el BOA y que fueron maternas, es decir, entraron al nido, adoptaron la posición de crouching y se dejaron succionar. * $p < 0.01$; ** $p < 0.007$ (Modificado de González-Mariscal *et al.*, 2004)

Posteriormente Chirino, *et al*, (2007) determinaron en hembras vírgenes intactas y ovariectomizadas el efecto de lesionar químicamente el epitelio olfatorio principal con la infusión de Sulfato de Zinc ($ZnSO_4$) sobre la conducta

maternal desplegada hacia crías por 1 h diaria, durante 14 días. Las hembras infundidas con $ZnSO_4$, recuperaron el olfato aproximadamente una semana después de la lesión, mientras que las infundidas con $NaCl$, diferenciaron siempre la orina del agua. Encontraron que las hembras intactas, infundidas con $ZnSO_4$ comenzaron a desplegar conducta maternal a partir del segundo día de estar ante la presencia de las crías (10%). En el cuarto día el 40% de las hembras fue maternal y al final del experimento (días 13 y 14), el 70% de las hembras fueron maternales (Figura 23). Dichas hembras se colocaron sobre las crías y dejaron que éstas las succionaran durante 3.02 ± 0.81 min (media). Las hembras que fueron infundidas con $NaCl$ o aquéllas que fueron ovariectomizadas e infundidas con $ZnSO_4$ no desplegaron conducta maternal en ninguno de los 14 días de observación.

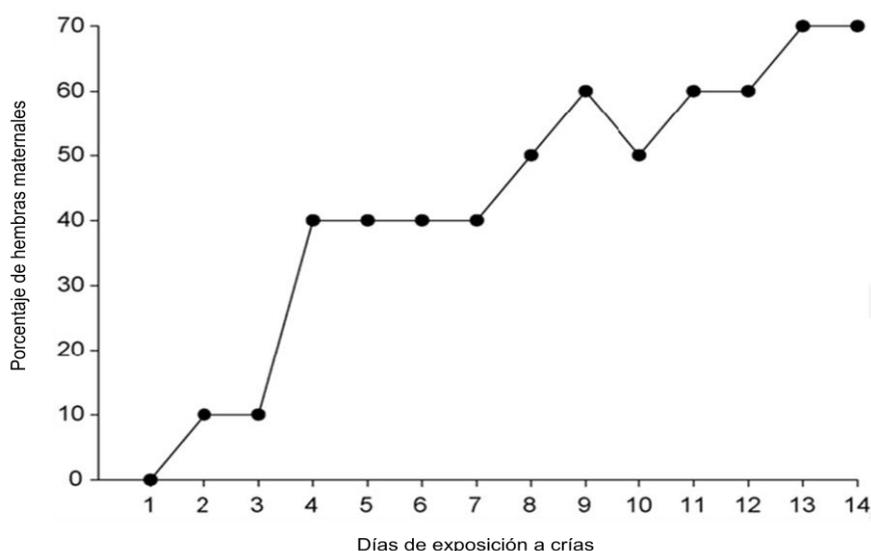


Figura 23. Gráfica donde se muestra el porcentaje de responsividad maternal de las hembras intactas que fueron infundidas con $ZnSO_4$ y que estuvieron expuestas por 14 días a crías durante 1 h diaria (Modificado de Chirino et al., 2007).

Con los experimentos de González-Mariscal *et al.* (2004) y Chirino *et al.* (2007), se concluye que: a) el olfato ejerce una fuerte acción inhibitoria sobre el despliegue de la conducta maternal en hembras vírgenes, b) la presencia de hormonas ováricas es esencial para el despliegue de conducta maternal en conejas vírgenes anósmicas. Un factor importante es que las hembras vírgenes en estro poseen la llamada feromona del pezón (Hudson y Distel, 1983) que las crías detectan y, como consecuencia, comienzan a succionar. Incluso aunque

las hembras que desplegaron conducta maternal no evacuaron leche, se mantuvieron dentro del nido siendo succionadas por las crías durante 3 minutos en promedio, tiempo que coincide con el de las madres lactantes.

2. JUSTIFICACION

Los experimentos antes descritos consistieron en la observación, durante sólo 60 minutos, de hembras lesionadas en los sistemas olfatorios accesorio ó principal. Los críos se colocaron dentro de los nidos de las hembras a una hora fija, cada 24 h. Bajo esas condiciones las hembras entraron al nido y desplegaron conducta maternal, es decir, adoptaron posición de crouching y “pseudoamamantaron” a las crías por alrededor de 3 a 5 minutos. Las condiciones experimentales utilizadas no permitieron saber si las hembras presentaban o no una ritmicidad circadiana en el amamantamiento, es decir, de manera espontánea cada 24 h. Debido a que las hembras lactantes, al ser succionadas, evacúan leche no podemos saber cuál de estos dos factores, es decir, la succión *per se* o la evacuación láctea, contribuye a la periodicidad circadiana del amamantamiento. Para distinguir entre estos dos factores, en el presente experimento se utilizaron conejas vírgenes anósmicas, que muestran comportamiento maternal y se dejan succionar por crías ajenas pero no producen ni evacúan leche.

3. HIPÓTESIS

Las conejas vírgenes lesionadas en el sistema olfatorio principal desplegarán conducta pseudomaternal de manera circadiana, a pesar de no producir ni evacuar leche.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

4.1.1 Determinar si las hembras vírgenes con lesiones en el sistema olfatorio principal presentan un ritmo circadiano en la conducta de pseudoamamantamiento.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.2.1 Determinar la percepción olfativa de las hembras vírgenes bajo tres condiciones:

- a. Antes de la lesión.
- b. A los dos primeros días post-lesión.
- c. Al final del experimento.

4.2.2 Determinar durante 15 días consecutivos:

- a. La hora del día a la que ocurre el pseudoamamantamiento.
- b. La duración de cada episodio de pseudoamamantamiento.
- c. La frecuencia de entradas al nido en 24 h
- d. Otras conductas que realice la hembra.

5. MATERIAL Y METODOS

5.1 ANIMALES Y ALOJAMIENTO

5.1.1 GENERALES

Se utilizaron conejas de la raza Nueva Zelanda blanca (*Oryctolagus cuniculus*), de 6 a 8 meses de edad, con un peso de entre 3-4 kg mantenidas en el bioterio del Centro de Investigación en Reproducción Animal, Ixtacuixtla, Tlaxcala.

Se les proveyó de agua y alimento balanceado *ad libitum* (Alimento Purina-Línea conejos, Conejina Mater). Se alojaron bajo un fotoperiodo 14:10; a las 7 hrs se encendían las luces y a las 21 hrs se apagaban.

Veinte días previos al experimento, las hembras fueron alojadas en jaulas maternales (90cm largo x 60cm ancho x 40cm alto). Se colocaron dentro una caja-nido de acrílico transparente (50cm largo x 30cm ancho x 32cm alto; hembras experimentales) o en el caso de las hembras nodrizas en una caja-nido de madera (50cm de largo x 30 cm de ancho x 32 cm de alto;).

5.1.2 CONEJAS EXPERIMENTALES

Se usaron 38 conejas vírgenes de 6-8 meses de edad. Treinta de ellas fueron infundidas con $ZnSO_4$ al 5% y 8 fueron infundidas con solución salina al 4%. En el piso de la caja-nido de acrílico se colocó un cartón (50 cm x 30 cm) y dentro de la caja-nido se colocaron tiras de papel periódico, para la construcción del nido donde se alojaron las crías.

5.1.3 CONEJAS NODRIZAS

Debido a que las hembras experimentales eran vírgenes, para proveerlas de crías se utilizaron conejas nodrizas. Por cada grupo experimental, se aparearon 3 grupos de 12 nodrizas cada uno (n=36) y cada grupo de hembras se apareó con cinco días de diferencia. Los apareamientos se realizaron de esta manera debido a que las hembras experimentales sólo fueron provistas de crías de uno a cinco días de edad y al quinto día las crías fueron reemplazadas por crías recién nacidas del siguiente grupo de hembras. Los apareamientos, se llevaron a cabo en arenas circulares (1m. de diámetro x 43cm de altura), donde se

colocó a una hembra con un macho sexualmente activo. Ambos permanecieron en la arena hasta que la hembra recibiera 1 eyaculación del macho. Quince días después (día 15 de gestación), las hembras se alojaron en las jaulas maternas antes descritas.

5.2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

5.2.1 INFUSION DE SULFATO DE ZINC ($ZnSO_4$) Y SOLUCIÓN SALINA

Se utilizó el método descrito por Chirino *et al.*, (2007), que consistió en utilizar una jeringa cargada con 1ml de $ZnSO_4$ al 5% o 1 ml de solución salina, conectada a un catéter de polietileno (Clay Adams PE 60; O.D. 1.22 mm; I.D. 0.76 mm). Las hembras fueron anestesiadas con Xilacina (1mg/kg) y Ketamina (25mg/kg) y colocadas en posición decúbito dorsal, lo que permitió la exposición de las fosas nasales. Se introdujo el catéter dentro de cada fosa nasal y se comenzó a bañar el epitelio con el $ZnSO_4$ o con la solución salina, administrando cada 30 segundos 0.5 ml de solución. El mismo procedimiento se llevó a cabo en ambas fosas nasales (Ver esquema 4).

Al finalizar la infusión, se colocó a la hembra en posición decúbito ventral por alrededor de 2 min, para que el líquido extra contenido dentro de las fosas nasales fuera expulsado y evitar así, que llegara a los pulmones y provocara la muerte del animal. Finalmente las hembras fueron colocadas bajo una fuente de luz hasta su recuperación y posteriormente se regresaron a sus jaulas.



Una vez anestesiada la coneja se coloca en posición de cúbito dorsal



Se le introduce el catéter con $ZnSO_4$ o NaCl en cada una de las fosas nasales

Esquema 4. Se muestra como se realizó la infusión de $ZnSO_4$ o $NaCl$ a las hembras vírgenes.

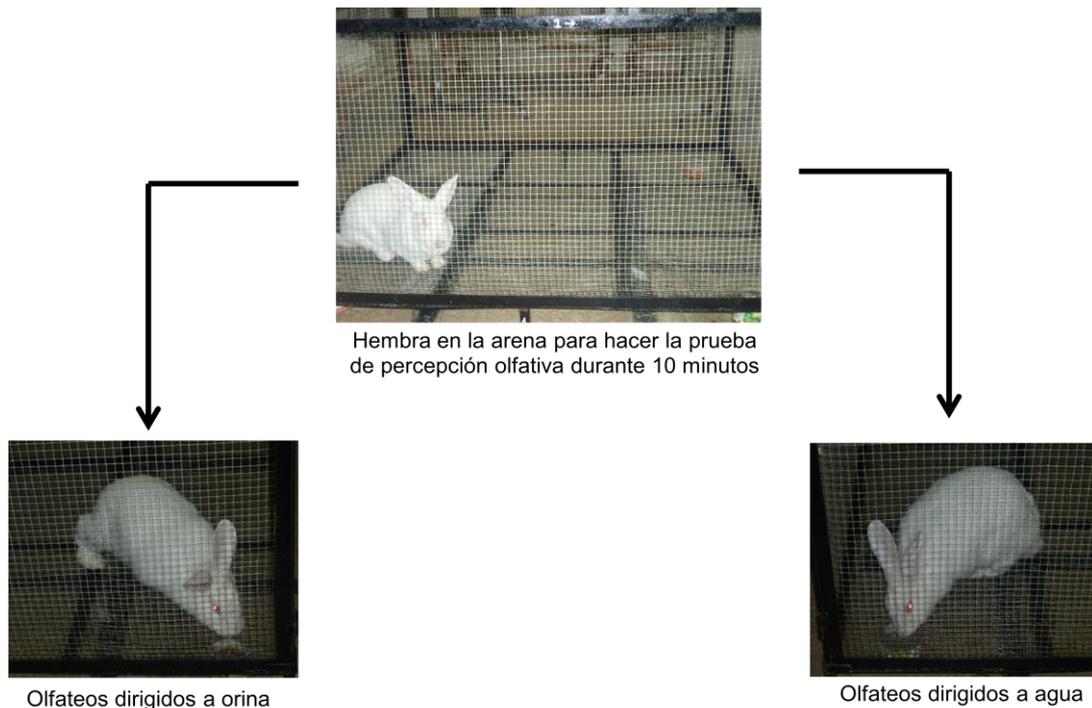
5.2.2 DETERMINACIÓN DE LA PERCEPCIÓN OLFATORIA

Se utilizó el procedimiento descrito por Chirino et al., 2007 que, brevemente consiste en lo siguiente. Se colectó orina de macho adulto (sexualmente maduro) durante las veinticuatro horas previas a la prueba. Bajo la jaula de los machos se instaló una charola forrada de plástico. Para evitar la contaminación de la orina con las heces fecales sobre la charola se colocó una malla de alambre, que filtró las heces. Se colocó la orina colectada en la charola en dos recipientes de 100 ml cada uno (Ver esquema 1).



Esquema 1. Se muestra como se realizó la colecta de orina. Se colocó una charola forrada con plástico y malla de alambre para que permitiera que se filtrara únicamente la orina. Posteriormente se colocó 100 ml de orina en frascos.

En una arena cuadrada (1.2 m de ancho x 1.2 m de largo) dividida en nueve cuadrantes iguales, se colocaron dos recipientes de agua y dos de orina, por debajo de la arena, de manera alternada. La arena estaba separada del piso por 10 cm, lo que permitió la ubicación de los frascos bajo cada esquina. Para realizar la prueba se colocó a la hembra dentro de la arena y se contaron el número de olfateos que la hembra realizó en cada uno de los cuatro frascos (orina o agua) durante 10 minutos. Al finalizar la prueba la hembra se regresó a su jaula. Ésta prueba se realizó durante dos días anteriores y dos días posteriores a la infusión de $ZnSO_4$ o de solución salina con el objetivo de evaluar el grado de anosmia del animal (Ver esquema 2).

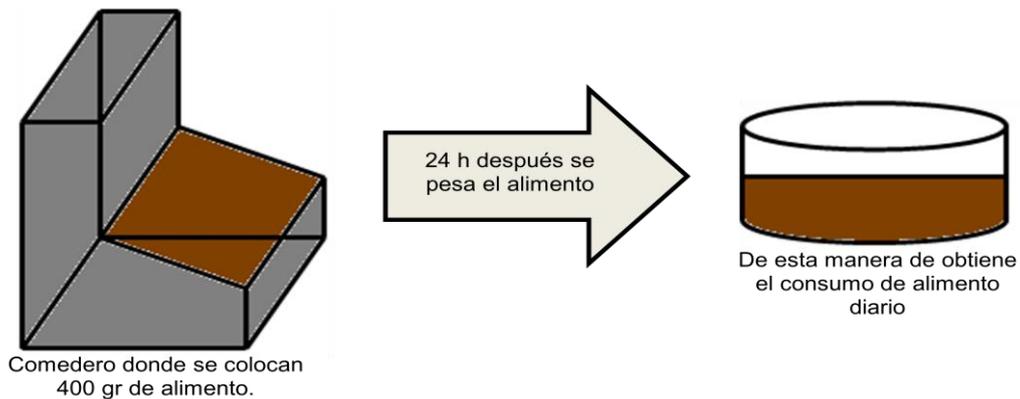


Esquema 2. Se muestra la arena donde se colocó a la hembra para realizar la prueba de olfacción. En la esquina derecha se observa como la hembra olfatea el frasco con agua mientras que de lado izquierdo se observa el frasco cuando la hembra olfateo el frasco de orina.

5.2.2.1 EVALUACIÓN DEL ESTADO DE SALUD

5.2.2.1.1 CONSUMO DE ALIMENTO

Cuantificar el consumo de alimento nos permitió conocer si el animal se encontraba en buen de estado de salud, debido a que un animal enfermo disminuye el consumo de alimento. Se colocaron 400 gr de alimento por cada día de prueba (Ver esquema 3) 24 h después se pesó el alimento restante en el comedero. El consumo de alimento diario se determinó restando la cantidad que se encontraba en el comedero a las 24 h menos los 400 gr suministrados al inicio. Al finalizar los días de prueba se les proveyó de alimento *ad libitum*.



Esquema 3: Se muestra como se cuantificó el consumo de alimento diario. Se les colocó a las hembras 400 gr diariamente y al siguiente día se pesó el alimento.

5.2.2.1.2 PRUEBA DE AMBULACIÓN EN CAMPO ABIERTO

Se realizó simultáneamente a la prueba de olfacción. Se siguió la trayectoria que realizó la hembra durante 10 minutos a lo largo y ancho de la arena, conforme se describe en Chirino *et al.*, (2007). Al finalizar la prueba se contaron los cruzamientos que realizó la hembra sobre cada línea y se sumaron para obtener el total.

5.2.2.1.3 PRUEBA DE MARCAJE POR FROTAMIENTO DEL MENTÓN (CHINNING)

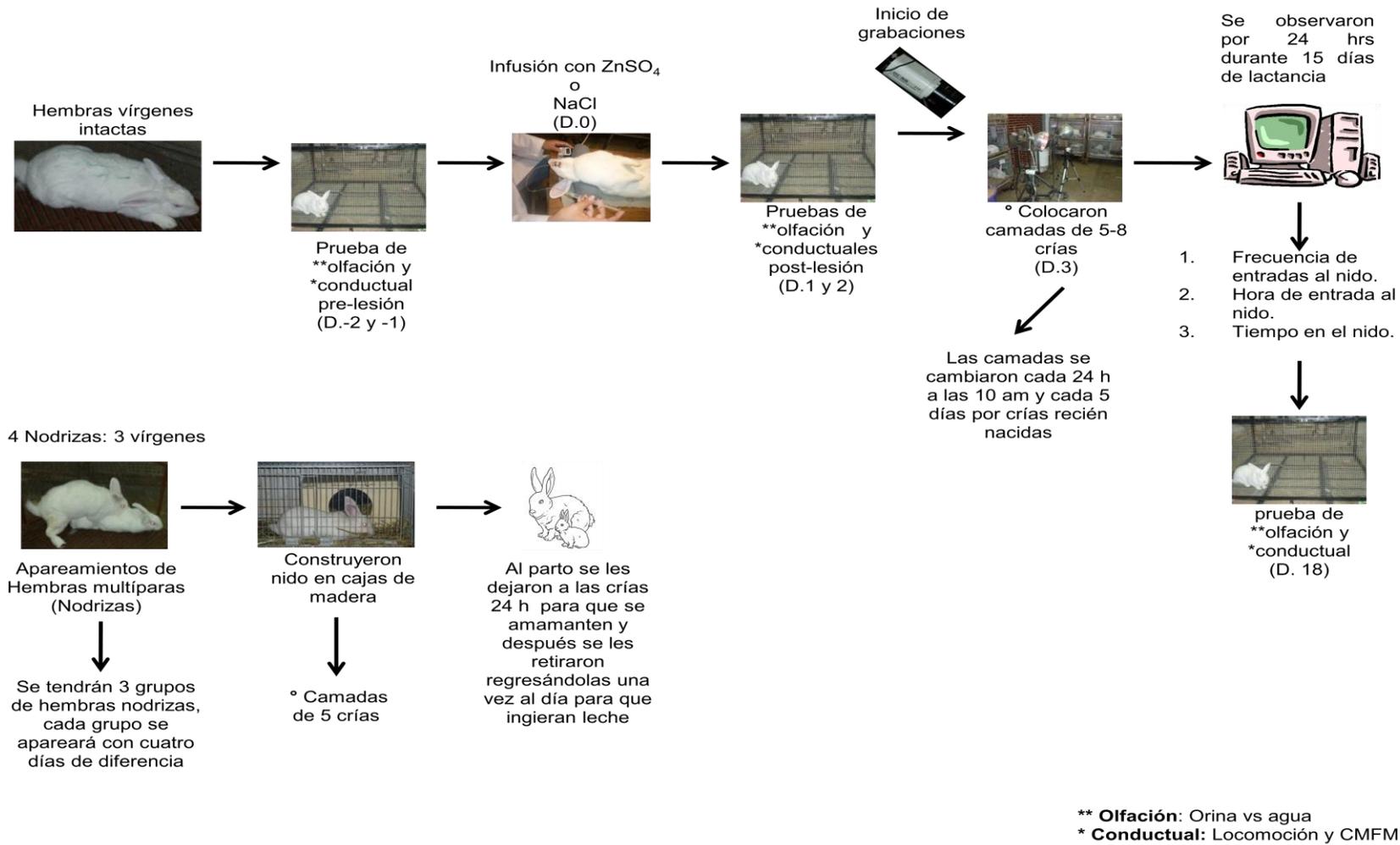
La prueba de Marcaje por Frotamiento del Mentón (descrita por Hudson *et al.*, 1990, González-Mariscal *et al.*, 1990) consiste, brevemente, en colocar a la hembra en el corral cuadrangular. Para este experimento no se introdujeron pilas de ladrillo como normalmente se hace, por lo que sólo se contaron el número de veces que la hembra frotó su mentón sobre cualquier superficie de la arena durante 10 minutos.

5.2.3 OBSERVACION DE LA CONDUCTA PSUEDOMATERNAL

Dos días posteriores a la infusión de $ZnSO_4$ o $NaCl$ se colocó el sistema de circuito cerrado de video, que consistió en ubicar dos cámaras de vigilancia, enfocando con cada una de ellas a 4 jaulas. Las cámaras se conectaron a una

computadora que posee un *software* (GEOVISION SYSTEM) para registrar la conducta de las hembras en tiempo real durante 24 horas. Las crías que se le proveyeron a cada hembra diariamente fueron estandarizadas en camadas de 6 gazapos. Las crías fueron reemplazadas diariamente por otras a las 10 de la mañana. Al quinto día los gazapos que se encontraban con las hembras experimentales, fueron reemplazados por crías recién nacidas, debido a que sólo se utilizaron crías de 1 a 5 días de edad. Se mantuvo grabando por 15 días para obtener el registro diario de las actividades que la hembra realizó. Las grabaciones se revisaban cada día para determinar la hora a la que ocurrían las entradas al nido, la frecuencia en 24 h (una entrada al nido o más) y la duración de los episodios de succión, la ingestión de agua y de alimento y el acicalamiento ventral. Se consideraron maternas a aquellas hembras que entraron al nido, se colocaron en posición de “crouching” (posición que permite que las crías succionen los pezones) y permanecieron siendo succionadas durante 3-5 minutos. (Ver esquema 5).

Al finalizar los 15 días de exposición a crías el sistema de grabación se desconectó y los videos se almacenaron en discos compactos (Office Depot 4.7Gb), para revisiones posteriores.



Esquema 5. Se muestra el esquema de la metodología general. Se puede observar de manera general cada uno de las pruebas que se hizo hasta finalizar el experimento.

6. ANALISIS ESTADÍSTICO

6.1 Wilcoxon

Se utilizó la prueba de Wilcoxon, para comparar en el mismo individuo, si existen diferencias significativas en las pruebas de olfacción, ambulación en campo abierto y marcaje por frotamiento del mentón y consumo de alimento, antes y después de la infusión con $ZnSO_4$ o solución salina.

6.2 Análisis de Rayleigh

El análisis de Rayleigh. Se realizó en aquellas hembras que realizaron al menos 5 episodios de succión. Ello nos permitió determinar las características de un vector (grados y longitud) que a su vez, representa la hora del día en que la hembra amamanta. Además se puede conocer también el nivel de confiabilidad (*i.e.*, el valor de p) de las características de dicho vector.

6.3 Análisis de chi cuadrada

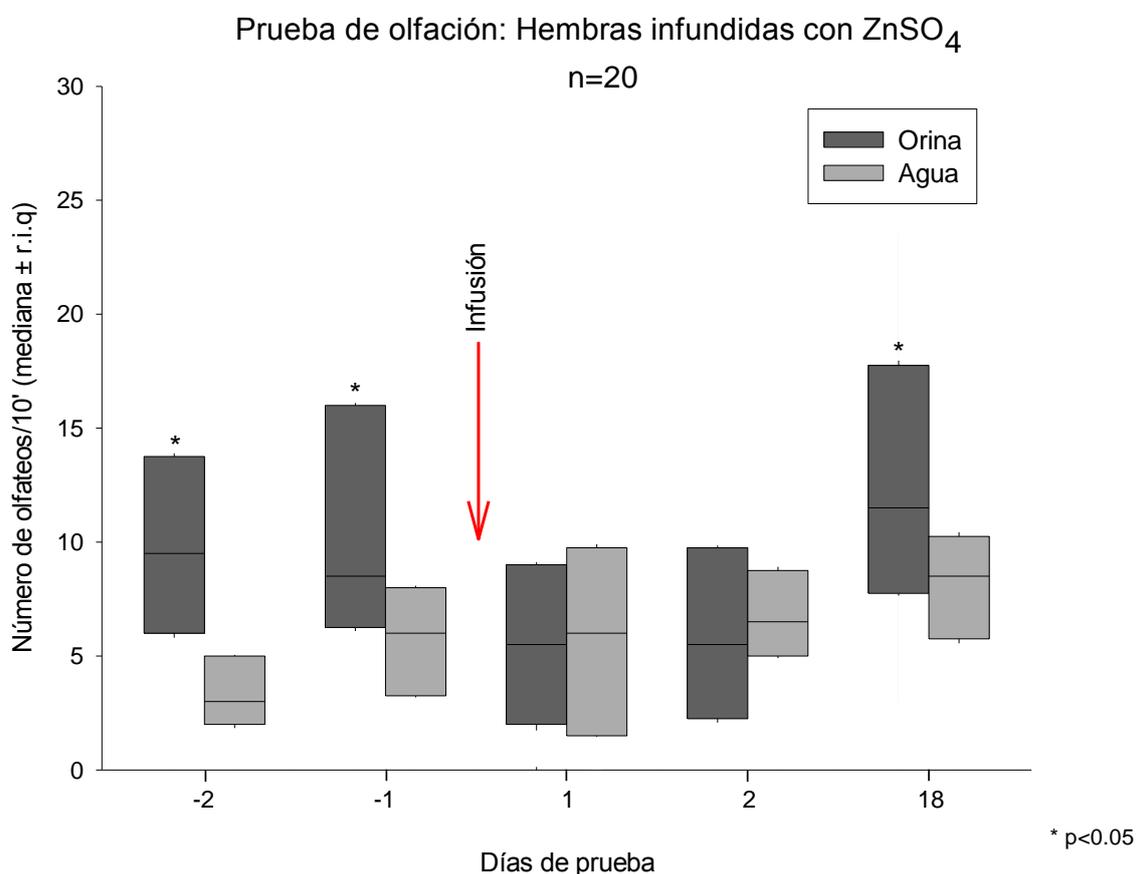
El análisis de chi cuadrada se hizo para comparar el día 1 pre-infusión vs el día 1 post-infusión y saber si las hembras estaban anósmicas en el día 1 post-infusión respecto al día 1 pre-infusión. Además para determinar si las hembras continuaban siendo o no anósmicas en el día 18 post-infusión en comparación con el día 1 pre-infusión.

7. RESULTADOS

7.1 EFECTOS DE LA ANOSMIA SOBRE: PERCEPCIÓN OLFATIVA Y CONDUCTAS PARA LA EVALUACIÓN DEL ESTADO DE SALUD

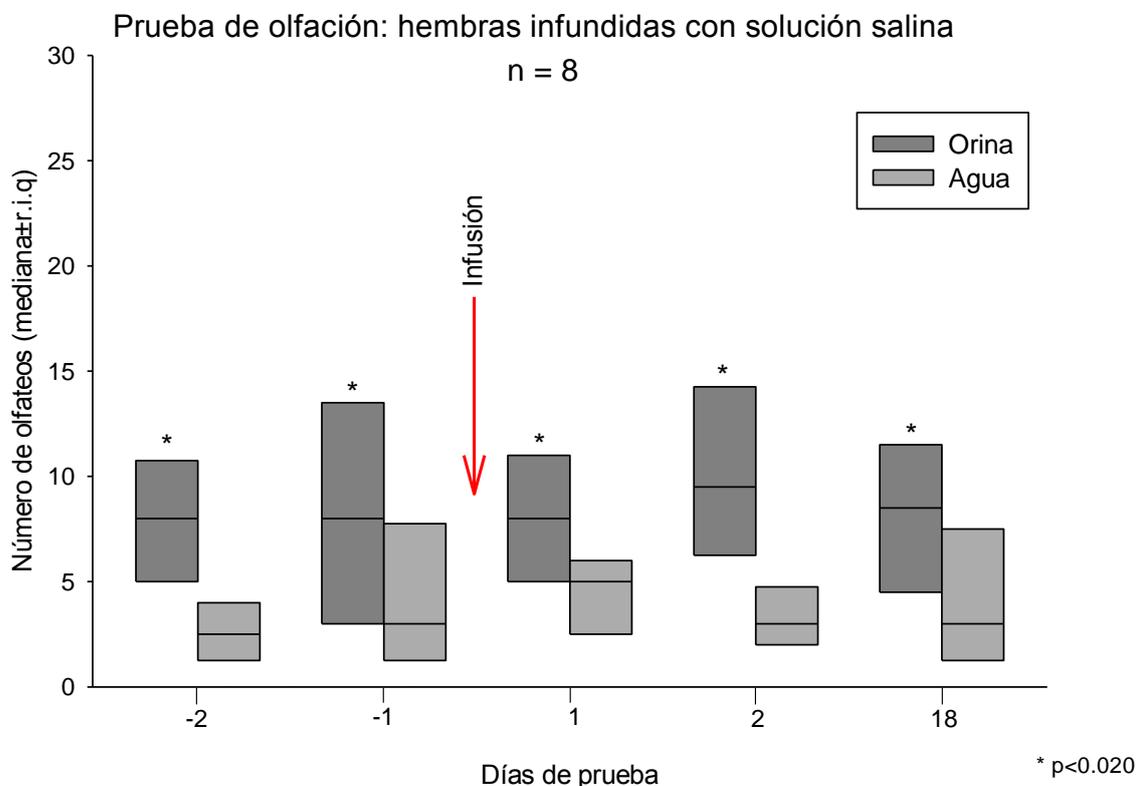
7.1.1 PERCEPCIÓN OLFATIVA

En las pruebas previas a la infusión, las hembras fueron capaces de discriminar entre la orina y el agua ($p < 0.05$). Posterior a la infusión de $ZnSO_4$, se observó que el número de olfateos fue similar hacia la orina y el agua. Esto nos indicó que la infusión del $ZnSO_4$ provocó hiposmia. En la última prueba de olfacción, realizada el día 18, se observó que las hembras volvieron a discriminar entre la orina y de agua, olfateando más a los primeros ($p < 0.05$) (Ver Gráfica 1).



Gráfica 1. En las dos pruebas iniciales de discriminación olfatoria (-2 y -1), se observó que los animales diferenciaron entre la orina y el agua pues realizaron más olfateos sobre los frascos de orina. En el primer y segundo día de prueba post-infusión (1 y 2) no hubo diferencias significativas entre los olfateos a orina o agua. En el último día de prueba (18) discriminaron nuevamente entre la orina y el agua. Se encontraron diferencias significativas $*p < 0.05$ entre los días -2, -1 y 18, al comparar agua vs orina.

Por el contrario, en las hembras infundidas con solución salina en todos los días de prueba, el número de olfateos dirigidos a la orina fue siempre mayor en comparación con los realizados sobre el agua ($p < 0.020$) (Ver gráfica 2).

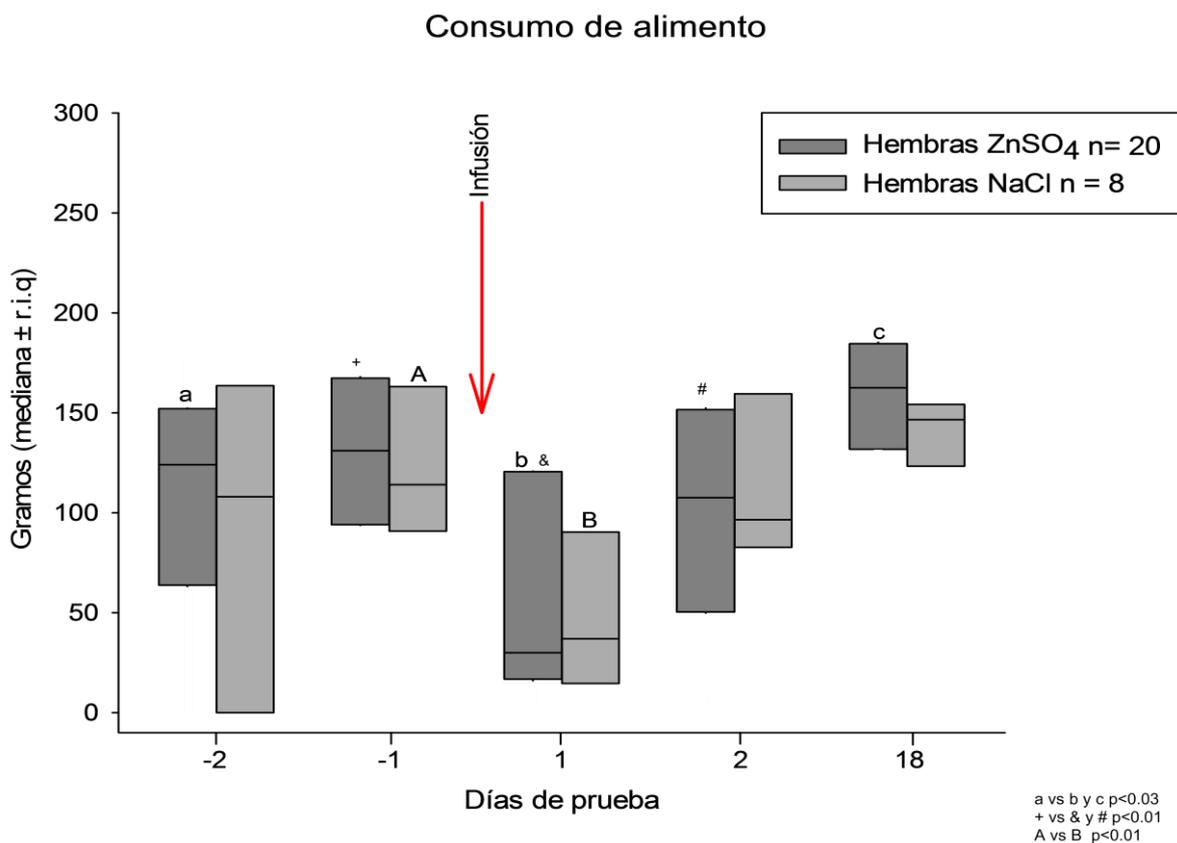


Gráfica 2. Esta gráfica corresponde a las hembras infundidas con solución salina. Se observó que en todos los días de prueba hubo discriminación olfatoria entre la orina y el agua. Se encontraron diferencias significativas ($*p < 0.020$) entre los olfateos dirigidos a orina y agua, en todos los días de prueba.

7.1.2 CONSUMO DE ALIMENTO

Respecto al consumo de alimento se observó que el consumo basal de las hembras infundidas con $ZnSO_4$ estuvo por arriba de los 100 g, previo a la infusión (-2 y -1) (Gráfica 3). En el primer día posterior a la infusión (1) se observa que, el consumo de alimento disminuyó; sin embargo, éste se restableció en los días consecutivos (2 y 18). Se comparó el día -2 vs el día 1 y 2 y el día -1 vs el día 1 y 2, se encontraron diferencias significativas en casi todos los días de pruebas (a vs b y c $p < 0.03$ y + vs & y # $p < 0.01$, respectivamente). Por otro lado en las hembras infundidas con solución salina,

el consumo de alimento fue en promedio de poco más de 100 g en los primeros dos días de prueba (-2 y -1) y posterior a la infusión (1), el consumo disminuyó. Nuevamente, en los días consecutivos (2 y 18) se incrementó el consumo. Se encontraron diferencias significativas entre el primer día pre-infusión (-2) y el día 1 post-infusión (A vs B $p < 0.01$). Esto indica que a pesar de que después de la infusión tanto del $ZnSO_4$ como del NaCl, disminuyó el consumo de alimento, el efecto es transitorio, debido muy probablemente a la administración de la anestesia y a la manipulación, lo que permitió continuar con el experimento.

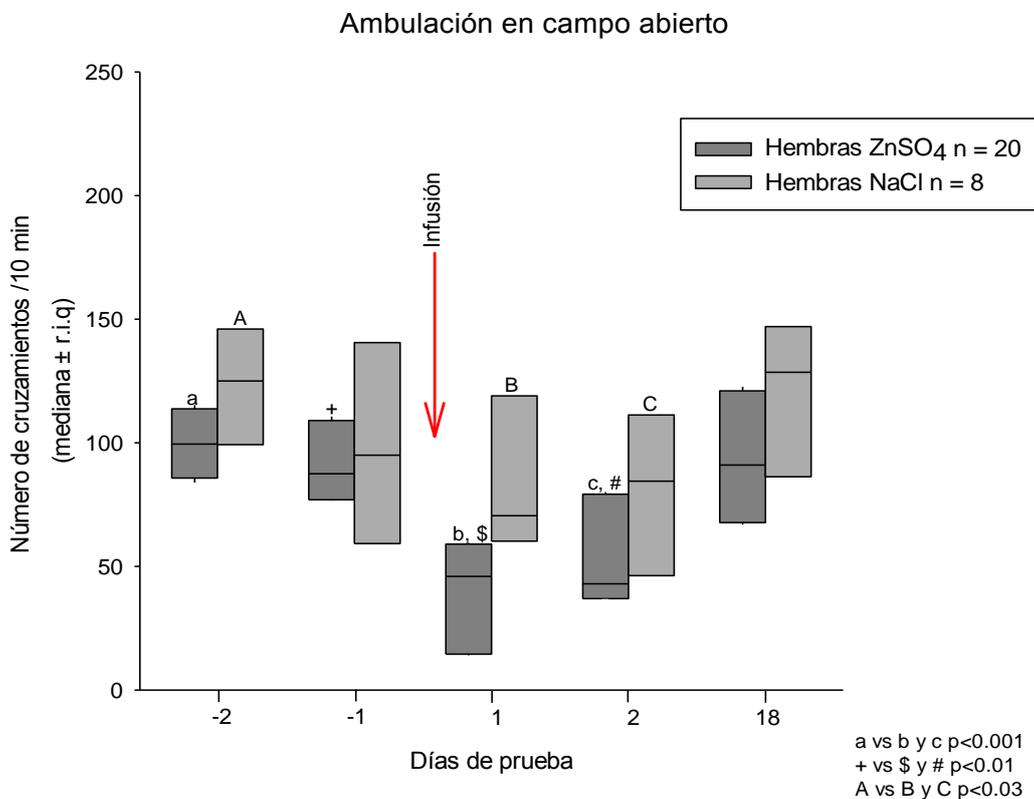


Gráfica 3. Se muestra el consumo de alimento de las hembras infundidas con $ZnSO_4$ o solución salina. En ambos grupos el consumo de alimento en el día 1 post-infusión fue menor que en los días anteriores, pero se recuperó en el día 2 y se mantuvo así en el día 18. (a vs b y c $p < 0.03$; + vs & # $p < 0.01$ y A vs B $p < 0.01$)

7.1.3 AMBULACIÓN EN CAMPO ABIERTO

En la prueba de ambulación en campo abierto, se observó que las hembras realizaron un gran número de cruzamientos en los días previos a la infusión

con $ZnSO_4$ (-2 y -1) (Gráfica 4). En el primer día post-lesión disminuyó el número de cruzamientos. Mientras que en los últimos dos días de prueba (2 y 18), se observa que el número de cruzamientos aumentó, respecto al primer día post-infusión. Al comparar el día -2 vs los días 1 y 2, se encontraron diferencias significativas (a vs b y c $p < 0.001$). Lo mismo ocurre, al comparar el día -1 vs los días 1 y 2, se encontraron diferencias significativas (+ vs \$ y # $p < 0.01$). Por otro lado, en las hembras infundidas con solución salina, se observó que realizaron un alto número de cruzamientos en los días pre-lesión. Hubo una ligera disminución en el día 1 post-lesión, aunque no se alteró de manera significativa el número de cruces. En los días 2 y 18 se restableció el número de cruzamientos. Al comparar el día -2 vs los días 1 y 2, se encontraron diferencias significativas (A vs B y C $p < 0.03$) (Ver gráfica 4). Nuevamente se puede observar que los animales infundidos tanto con $ZnSO_4$ como con NaCl, se recuperan conforme pasa el tiempo. El efecto de la anestesia y de la manipulación que se realizó al animal, probablemente sean los causantes de la ligera disminución en el número de cruces que realizaron los todos animales en el primer día post-infusión.



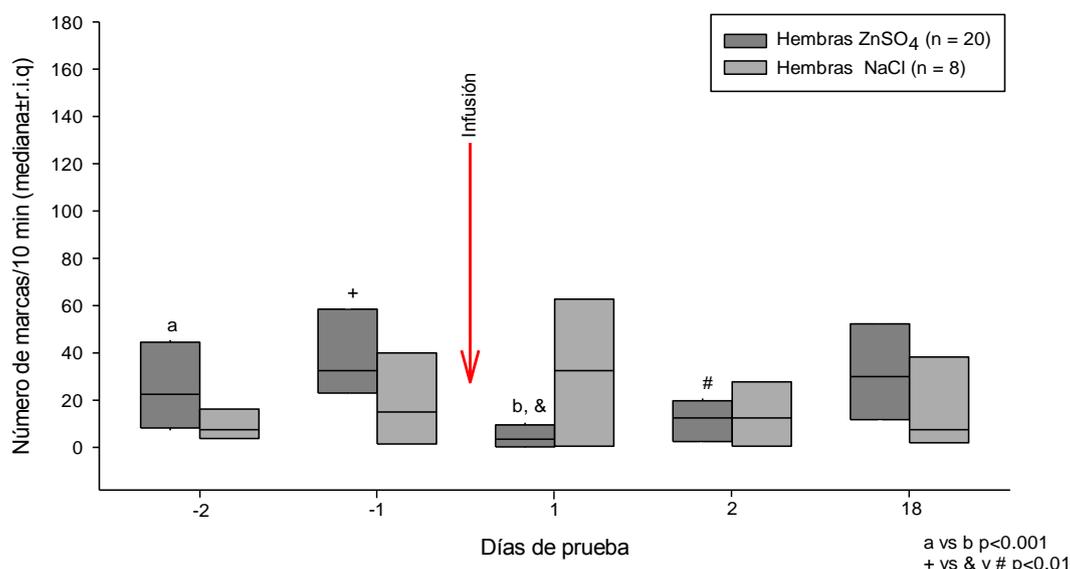
Gráfica 4. En esta gráfica se observa, que en las hembras infundidas con $ZnSO_4$ el número de cruces disminuyó drásticamente en el día 1 pero se restableció en el día 2 y se incrementó al

día 18 (a vs b y c $p < 0.001$ y + vs \$ y # $p < 0.01$). En las hembras infundidas con solución salina, el número de cruzamientos disminuyó ligeramente sólo en el día 1 post-lesión y se encontraron diferencias significativas entre los días -2 vs 1 y 2 (A vs B y C $p < 0.03$).

7.1.4. CONDUCTA DE MARCAJE POR FROTAMIENTO DEL MENTÓN (CMFM)

En la prueba de marcaje por frotamiento del mentón se observó que las hembras desplegaron en promedio 20 marcas en las pruebas pre-infusión (-2 y -1). Posterior a la infusión con $ZnSO_4$, el número de marcas disminuyó. Conforme pasaron los días, se observó que el número de marcas aumentó, alcanzando en el día 18 casi los niveles basales. Se encontraron diferencias significativas al comparar entre el día -2 vs el día 1 ($p < 0.001$). Además también se encontraron diferencias significativas, al comparar el día -1 vs los días 1 y 2 ($p < 0.01$). Por otro lado, el grupo de hembras que fueron infundidas con solución salina, tuvieron un bajo marcaje en el primer día de prueba (-2), mientras que en el segundo día pre-infusión (-1) y en el primer día post-infusión (1) fue cuando realizaron un marcaje mayor. En los días 2 y 18 volvieron a disminuir la cantidad de marcas que realizaron las hembras. No se encontraron diferencias significativas en ninguno de los días de prueba de este grupo (Gráfica 5).

Prueba de Marcaje por Frotamiento del Mentón



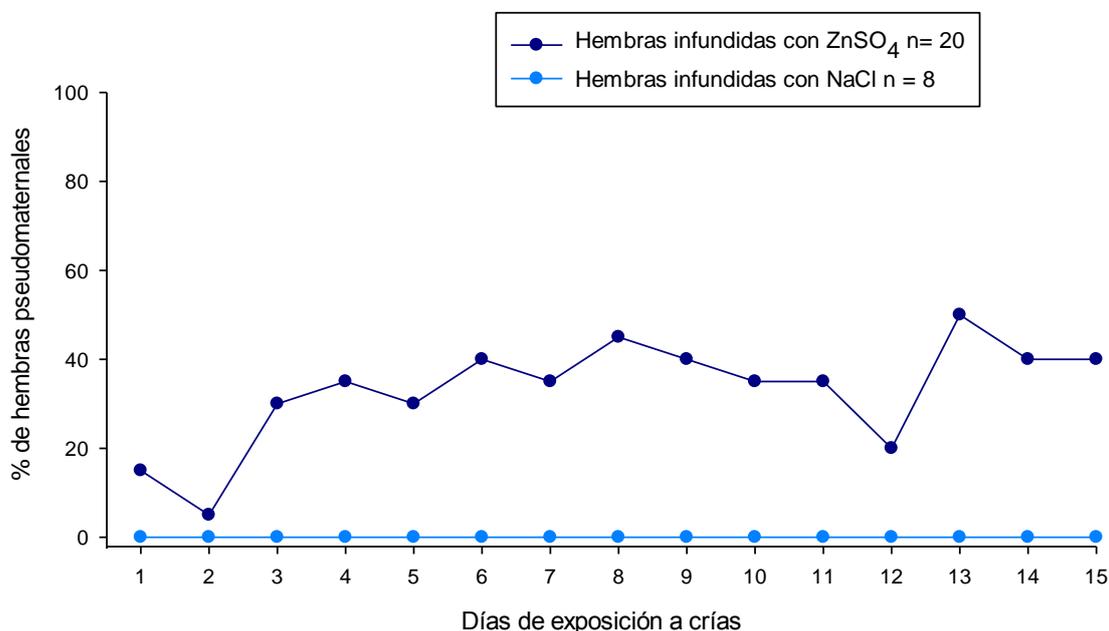
Gráfica 5. En las hembras infundidas con ZnSO₄, el número de marcas fue alto en los días previos a la lesión (-2 y -1), después disminuyeron drásticamente (1) y se restablecieron en los días consecutivos (1, 2 y 18) (a vs b p<0.001 y + vs & y # p<0.01). En las hembras infundidas con solución salina, no se notaron grandes cambios en el número de marcos que realizaron y no se encontraron diferencias significativas.

Estas tres últimas pruebas descritas, fueron tomadas en cuenta como un indicativo de salud, a pesar de que se observó una disminución en el día 1 después de la infusión en las tres pruebas (consumo de alimento, ambulación en campo abierto y marcaje por frotamiento del mentón) en los días consecutivos se restablecen y llegan a alcanzar los niveles basales. Todo esto nos confirma que el estado general de salud de las hembras infundidas, no se vio afectado después de la infusión. Además, indica que en aquellas hembras que fueron infundidas con ZnSO₄, éste aparentemente no afecta el estado físico del animal a corto y ni a largo plazo.

7.2 EFECTOS DE LA ANOSMIA SOBRE LA CONDUCTA PSEUDOMATERNAL

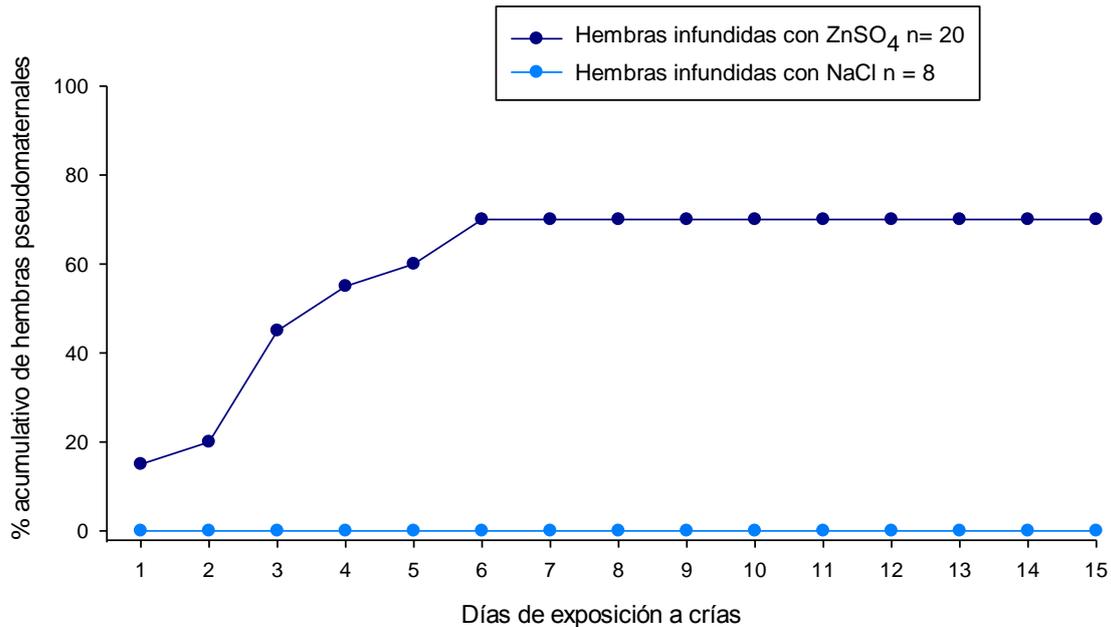
Se observó que las hembras infundidas con ZnSO₄ en su mayoría, desplegaron conducta maternal (14/20), es decir, entraron al nido y se dejaron succionar por las crías, adoptando la posición de “crouching” y pseudoamamantaron, aunque no todas las hembras respondieron de la misma manera hacia los crías ni en el mismo momento. En la gráfica 6 se observa el porcentaje de hembras que fueron pseudomaternales por día. Es así que en el primer día de exposición a crías, el 15% de las hembras fueron maternales. En el segundo disminuyó el porcentaje de hembras que fueron maternales, sólo un 5%. En el tercer día sólo el 30% respondió favorablemente hacia los crías. Desde el tercer día al onceavo día de exposición a crías, entre el 30% y 40% desplegaron maternal. En el día 12 disminuyó hasta el 20% la proporción de hembras que fueron maternales. Sin embargo en el día 13 el 50% de las hembras fueron maternales, siendo esta la mayor proporción de hembras que respondió de manera favorable hacia las crías. Finalmente en los días 14 y 15 de exposición a crías, sólo el 40% de las hembras fueron maternales. Respecto

a las hembras que fueron infundidas con solución salina, no se observó que desplegaran CM durante los 15 días de exposición a crías.



Gráfica 6. Se observa el porcentaje de hembras infundidas con ZnSO₄, que fueron maternales (entraron al nido y adoptaron la postura de amamantamiento y fueron succionadas), 70%. Expuestas a crías durante las 24 h del día por 15 días continuos. Por otro lado, las hembras infundidas con NaCl, no desplegaron CM en ninguno de los días de exposición a crías.

Por otro lado, en la gráfica 7 se observa, el porcentaje acumulativo de hembras que fueron maternales. En el primer día sólo el 15% respondió favorablemente ante la presencia de las crías. En el segundo día incrementó a 20% el porcentaje de hembras pseudomaternales. Mientras que en el tercer día el 45% de las hembras se sumaron a ser pseudomaternales. Para el cuarto día aumentó sólo el 10%, sumando así 55% a las hembras que desplegaron conducta pseudomaterna. A partir del sexto día el 70% de las hembras fueron pseudomaternales manteniéndose esa proporción hasta el final del experimento.

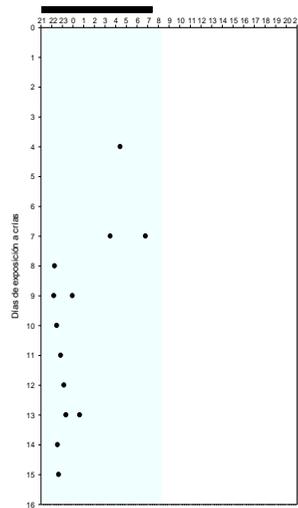


A continuación, se presentan los actogramas de todas las hembras vírgenes que sí desplegaron conducta maternal. De manera general, en los actogramas se observa la fase de oscuridad (barra negra) y la fase de luz (barra blanca). Además las horas (21 h a 20 h, en el eje "X"). Finalmente los días de exposición a crías (1-15, en el eje "Y"). En ellos se pueden apreciar todas las entradas que realizaron cada una de las hembras en todos los días de exposición a crías; además, los días en que comenzaron a ser maternas y en qué fase del día realizaron los pseudoamamantamientos (se considera pseudoamamantamiento, porque la hembra no evacua leche, pero si adopta la posición de crouching y se deja succionar). Dentro de los primeros cinco días las hembras comenzaron a desplegar conducta maternal. En el primer día sólo 3 hembras (♀1951; ♀2130 y ♀2045) fueron maternas. Los pseudoamamantamientos no fueron desplegados de manera continua, es decir, no hubo pseudoamamantamientos todos los días a partir del primer día en que comenzaron a ser maternas. La mayoría de los pseudoamamantamientos se llevaron a cabo en la fase de oscuridad, aunque sólo una hembra desplegó la mayoría de los pseudoamamantamientos en la fase de luz. En el segundo día de exposición a crías, sólo una hembra (♀1940) fue maternal. Esta hembra no se sincronizó hacia alguna de las fases del día, por lo que sus episodios de pseudoamamantamientos estuvieron desplegados en ambas fases, sin preferencia por alguna de las fases. Cabe resaltar que en los días en que entró

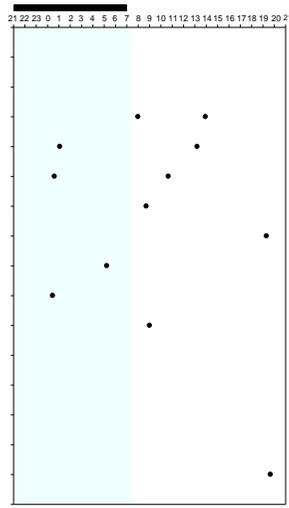
al nido, lo hizo solamente una vez al día. Respecto al tercer día de exposición a crías, tres hembras más comenzaron a ser maternas (♀1996, ♀1944 y ♀1947). Estas hembras desplegaron la mayoría de sus pseudoamamantamientos en la fase de oscuridad, a excepción de una hembra que desplego 8 de 12 episodios de succión en fase de luz. En el cuarto día, dos hembras más se sumaron y fueron maternas (♀1990 y 1985). La mayoría de los pseudoamamantamientos los desplegaron en la fase de oscuridad y muy pocos fueron realizados en fase de luz. En el quinto día sólo una hembra (♀1993) se sumó a ser maternal y no mostró una sincronización hacia alguna de las fases, aunque la mayoría de todos sus episodios de succión fueron desplegados en oscuridad, sólo 3 pseudoamamantamientos fueron realizados en luz. A pesar de que hubo hembras que realizaron más de un pseudoamamantamiento al día, cabe resaltar que la mayoría realizó sólo uno al día y en fase de oscuridad.

Actogramas de pseudoamamantamientos de hembras vírgenes anósmicas

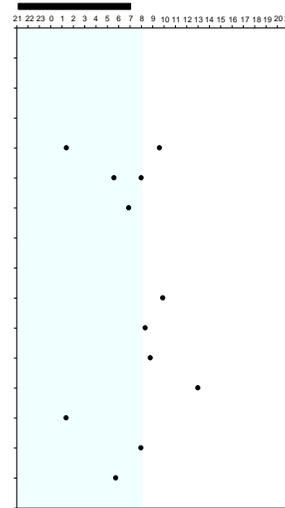
Tiempo (h)



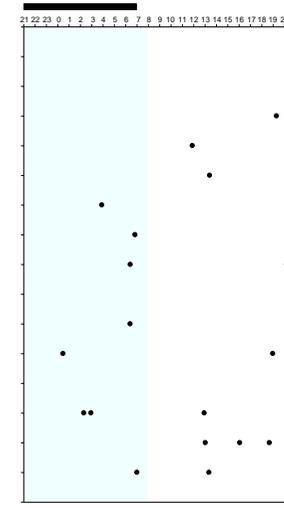
Hembra 1990



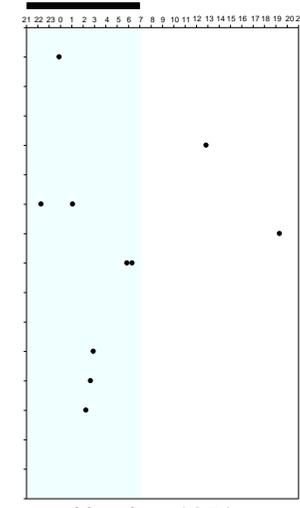
Hembra 1944



Hembra 1985

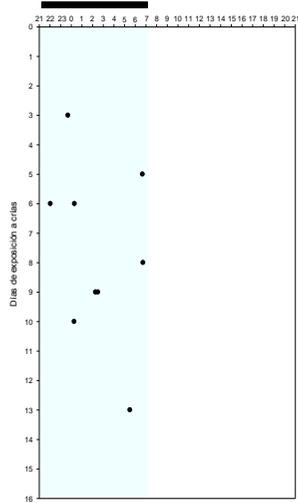


Hembra 1947

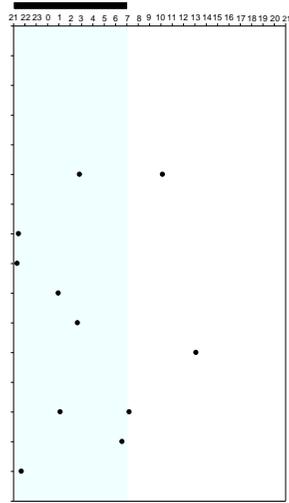


Hembra 1951

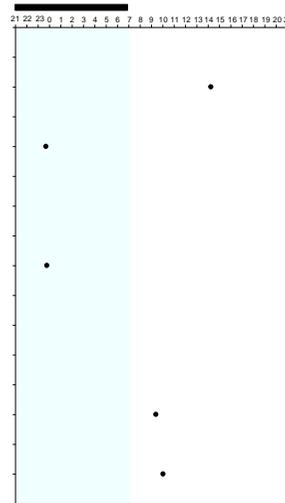
Tiempo (h)



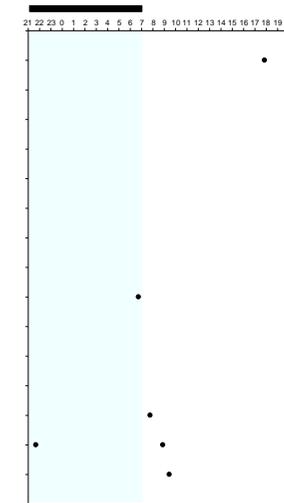
Hembra 1996



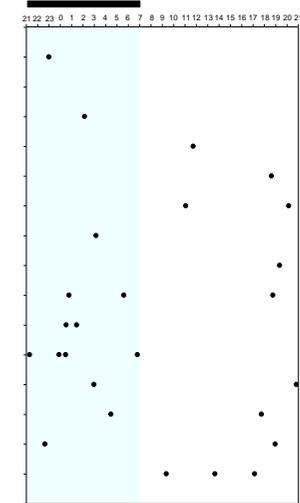
Hembra 1993



Hembra 1940



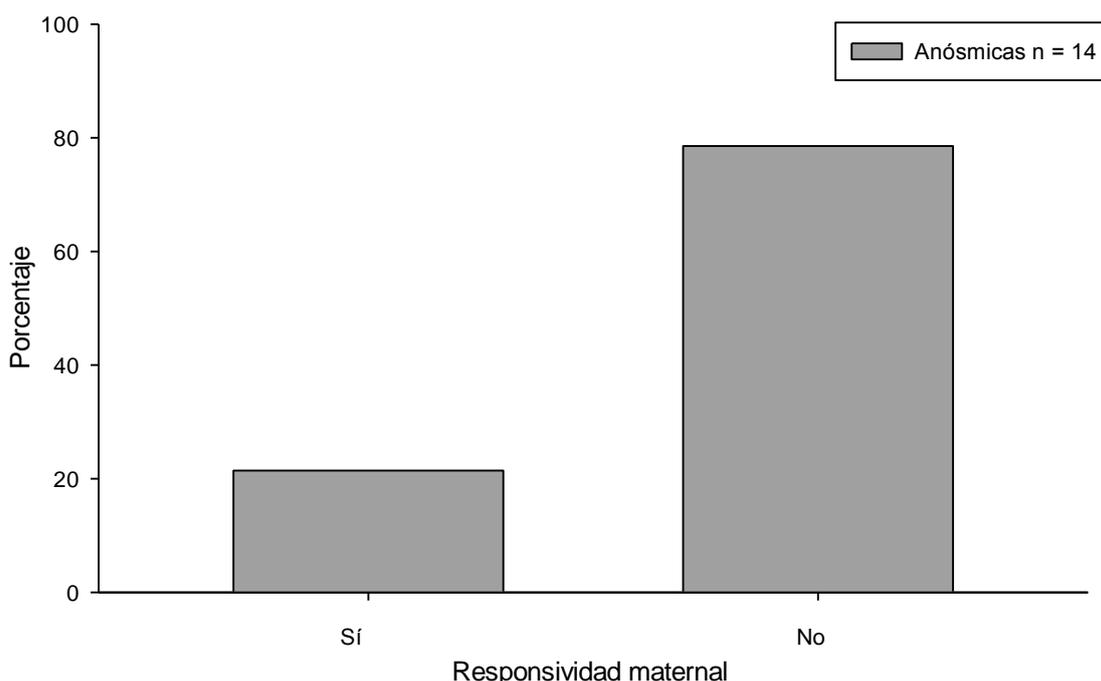
Hembra 2130



Hembra 2045

En la siguiente gráfica (Gráfica 17), se observa la relación entre el estado de olfacción (primer día de prueba de olfacción día -2) y el despliegue de la CM, (en el primer día de exposición a crías). A pesar de que todas las hembras estaban hipósmicas muy pocas desplegaron CM, en el primer día de exposición a crías. Sólo el 21% de las hembras que estaban hipósmicas, fueron maternales desde el primer día de exposición a crías. El 79% restante, a pesar de presentar deficiencia olfatoria, no desplegaron CM en el primer día de exposición a crías. Esto probablemente indique que, aunque las hembras estén en estado hipósmico, es necesario que las hembras entren en contacto directo con las crías para que el “sistema maternal” se encienda. Con la prueba de chi cuadrada, se determinó que todas las hembras estaban anósmicas($p < 0.05$).

Relación entre la percepción olfatoria (post-lesión día 1) y la responsividad maternal en el primer día de exposición a crías (post-lesion día 3) de hembras infundidas con ZnSO₄

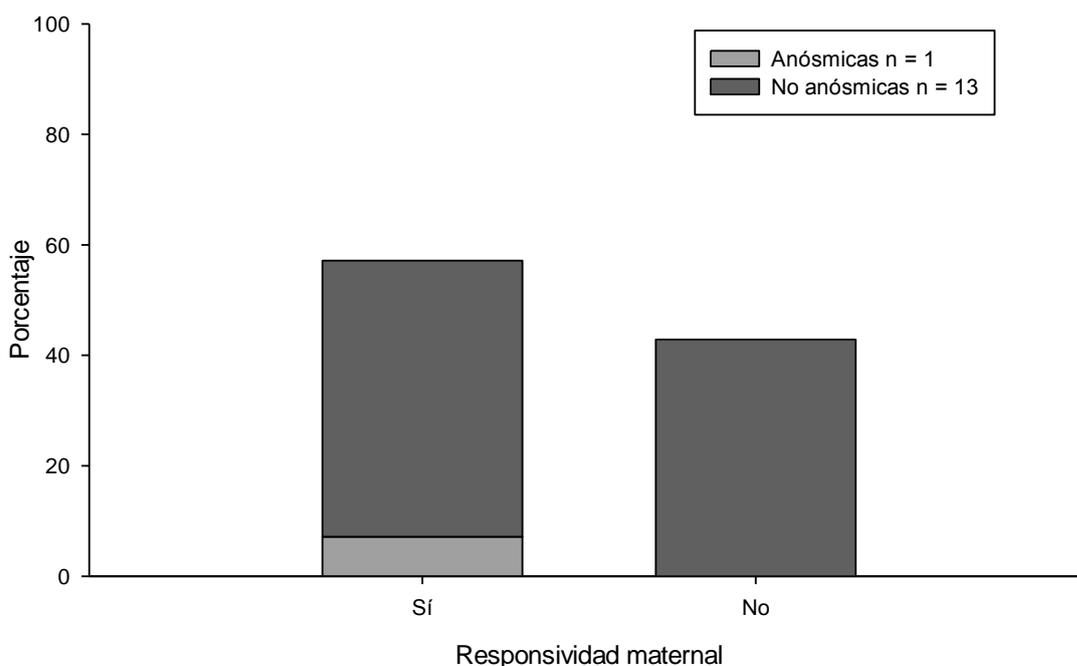


Gráfica 17. Muestra la relación entre el estado de hiposmia y el despliegue de la CM. El 100% de las hembras presentaron deficiencias olfatorias, pero la mayoría de ellas no fueron maternales en el primer día de exposición a crías. Sólo el 21% de hembras anósmicas, fueron maternales desde el primer día.

En la siguiente gráfica (Gráfica 18), se observa nuevamente la relación entre la percepción olfatoria (primer día de prueba de olfacción día -2) y la CM del último día de exposición a crías (día 17). En esta gráfica se observa que sólo el

7% de las hembras permanecían anósmicas y el otro 92% de las hembras ya no estaban anósmicas. El 7% de las hembras fueron maternas. Mientras que el 50% a pesar de ya no tener deficiencia olfatoria, continuaron desplegando conducta pseduomaternal. El 42% ya no tuvo deficiencia olfatoria al final del experimento, pero no desplegaron conducta pseudomaternal. Con esto se confirma que una vez que el “sistema maternal” se activa, este se mantiene y por lo tanto las hembras son capaces de desplegar CM a pesar de no estar hipósmicas. Con la prueba de chi cuadrada se determinó que sólo una hembra permaneció en estado de hiposmia ($p < 0.05$) hasta el final del experimento.

Relación entre la percepción olfatoria (pre-lesión día 1) y la responsividad maternal (post-lesión día 17) de las hembras infundidas con $ZnSO_4$



Gráfica 18. Se muestra la relación entre la percepción olfatoria (día 1 pre-lesión) y el despliegue de la conducta pseduomaternal (día 17 post-lesión). Hubo una gran proporción de hembras que a pesar de no ser anósmicas continuaron presentando conducta pseudomaternal al final del experimento. Sólo una pequeña proporción de hembras que presentó deficiencia olfativa y fue maternal.

Finalmente, se realizó el análisis estadístico de Rayleigh, para determinar de manera individual, las características del vector que indica la hora a la que la hembra prefiere amamantar. Se obtuvo el valor de p , es decir, la significancia

de los datos de cada hembra. En la tabla 1, se pueden observar los valores de ρ (longitud del vector) y el valor de p . Respecto a la duración del tiempo en el nido, como se puede observar, la mayoría de las hembras tardaron alrededor de 3-4 minutos. Se muestran también los días en los que cada hembra fue maternal. Por otro lado, los números de las hembras que están en cursiva, indica que a esas hembras no se les realizó el análisis de Rayleigh, debido a que durante los 15 días de exposición a crías realizaron menos de cinco pseudoamamantamientos, razón por la cual no se obtuvo el valor de p sino sólo se muestra el valor de ρ . Además, como se puede observar, no todos los valores de p son significativos, por lo mismo es que en este caso no se realizó un análisis poblacional, sino sólo un análisis individual.

No. ♀	1er. día de CM	# de días que fue maternal	# de pseudoamamantamientos totales	Proporción de pseudoamamantamientos durante la fase de oscuridad (%)	Pseudoamamantamientos por día		Duración x pseudoamamantamiento (minutos)	rho	p	Angulo de fase (α)	Hora
					mínimo	máximo					
1990	4	10	13	100	1	2	3.05	0.856	<0.001	354°	23.6
1944	3	9	12	33	1	2	6.78	0.220	<0.659	87°	
1985	4	10	12	50	1	2	2.67	0.661	<0.009	105°	7
1947	3	11	18	44	1	3	3.8	0.368	<0.245	103°	
1951	1	8	10	80	1	2	3.58	0.522	<0.114	28°	
1996	3	7	9	100	1	2	5.45	0.725	<0.02	45°	3
1993	5	9	11	82	1	2	4.88	0.528	<0.085	9°	
1940	2	5	5	40		1	5.05	0.12	<0.87	139°	
2130	1	5	7	29	1	2	4.15	0.600	0.165	318°	
2045	1	14	26	54	1	4	5.93	0.337/0.575	<0.014	14°/318°	21.2
1986	3	3	3	100		1	3.85	0.985			
1989	3	3	4	33	1	2	3.37	0.767			
1959	6	3	3	67		1	7.05	0.545			
1939	6	2	2	0		1	3.32	0.66			
x±DE	3.21±1.67	7.07±3.65	9.64±6.62				4.50±1.39				

Tabla 1. Las primeras 10 hembras fueron a las que se les realizó el análisis de Rayleigh y se obtuvieron los valores de rho, p y el ángulo de fase. Para las hembras resaltadas en cursiva, no fue posible obtener el valor de p y no se hizo el análisis estadístico porque realizaron menos de cinco amamantamientos. Se muestra también la latencia para que desplegaran conducta maternal, el número de días en que fue maternal, número de pseudoamamantamientos, los pseudoamamantamientos que realizó por día y el tiempo en el nido.

8. DISCUSIÓN

En este experimento se confirma que el sistema olfatorio se encuentra estrechamente relacionado con el despliegue de la conducta maternal en la coneja (González-Mariscal, *et al.*, 2004 y Chirino, *et al.*, 2007). Así, la mayoría de las hembras vírgenes capaces de percibir el olor de las crías, no despliegan conducta maternal. Es decir, a pesar de que las hembras infundidas con NaCl, tuvieron la presencia de las crías por un período de 15 días sin interrupción, no desplegaron conducta maternal. Por otro lado, la mayoría (70%) de las hembras anósmicas (infundidas con ZnSO₄), sí desplegaron conducta maternal.

La latencia de inicio de la CM fue aproximadamente en el 3.21 ± 1.67 días, pues en el primer día, la proporción de hembras que desplegaron CM fue baja (aproximadamente 20%). Fue en el sexto día, cuando el 70% de las hembras mostró conducta maternal, siendo esta la mayor proporción de hembras pseudomaternales. Resultado que coincide con el Chirino *et al.*, donde el 70% de las hembras fue la mayor proporción de hembras que desplegaron conducta maternal.

Al final del experimento, la prueba de olfacción permitió confirmar, que las hembras ya habían recuperado el olfato, aunque no se sabe exactamente en qué momento lo recuperaron. Esto coincide con lo que reporta Alberts J.R., (1954), quien indica que la lesión en el epitelio olfatorio ocasionada por la infusión de ZnSO₄ es temporal y el epitelio olfatorio se regenera conforme pasa el tiempo. Un punto a considerar es que a pesar de que el ZnSO₄, causó un malestar inicial en los animales que se evidenció en las pruebas adicionales que se realizaron (ambulación, consumo de alimento y prueba de marcaje por frotamiento del mentón), éste no causa daños tales que no hayan permitido continuar con el experimento. Así mismo, en las hembras infundidas con NaCl, de igual manera disminuyeron los niveles de cada una de las conductas que se tomaron en cuenta, y también se recuperaron conforme pasaron los días de prueba, lo que indica que si bien el NaCl también causa irritación en la mucosa, éste no logra inducir anosmia en los animales como el ZnSO₄.

Por otro lado, a pesar de que las hembras recuperaron el olfato, éstas son capaces de seguir desplegando CM. Debido probablemente a que una vez

eliminado el papel inhibitorio que sobre la conducta maternal en esta especie tiene el olfato (González-Mariscal, *et al.*, 2004 y Chirino, *et al.*, 2007), las hembras entran en contacto con las crías y el sistema “maternal” se “enciende”. Quizá debido a la estimulación táctil que ejercen las crías sobre el vientre de la coneja al moverse y por la succión, esto a su vez, provoca la liberación de hormonas como la Vasopresina y la OXT. Así, es probable que las hormonas como la Vasopresina o la OXT sean secretadas durante cada episodio de succión, favoreciendo así tanto el despliegue como el mantenimiento de la CM en las conejas vírgenes anósmicas.

En base a los actogramas se observó que las hembras vírgenes anósmicas realizaron en su mayoría una entrada al nido diariamente, aunque también en algunos días desplegaron dos entradas al día (70%), y sólo un pequeño porcentaje, realizaron todos los días más de dos entradas al día y en algunos días una entrada al nido (30%). Esto coincide con lo reportado por Jilge, (1993, 1995), Hoy y Seltzer (2002) y nuestro grupo, González-Mariscal, *et al.*, (2013) de que la coneja entra a amamantar sólo una vez al día. Además, la mayoría de los episodios de succión fueron desplegados durante la fase de oscuridad (3 hembras realizaron todos sus episodios de succión en la fase de oscuridad, dos hembras realizaron el 80% de sus episodios de succión durante la noche. Mientras que las hembras restantes (9) sólo entre el 60% y 30% de sus episodios de succión fueron realizados durante la fase de oscuridad). Hubo sólo dos hembras que realizaron la mayoría de las entradas al nido en la fase de luz.

Dado que las hembras vírgenes de este experimento eran incapaces de producir y evacuar leche los resultados obtenidos indican que la producción y evacuación láctea por sí mismas, no son indispensables para que se exprese de manera circadiana la conducta maternal (al menos en las 4 hembras en las que el análisis de Rayleigh indicó que hay un comportamiento circadiano). Así mismo, dicho patrón conductual es innato y la producción y evacuación láctea probablemente ejerzan un papel modulador sobre la CM.

9. CONCLUSIONES

La anosmia (o hiposmia) promovió la conducta de amamantamiento en el 70% de las hembras vírgenes. Sin embargo, no hay asociación temporal entre estos dos parámetros, poco después de la lesión en el epitelio olfatorio, la mayoría de las conejas estaban anósmicas pero no fueron maternas. De manera contraria, al final del experimento pocas hembras vírgenes estaban anósmicas, pero la mayoría fueron maternas.

La mayoría de las “hembras vírgenes maternas” entraron a la caja-nido sólo una vez al día, se colocaron sobre los críos adoptando posición de “crouching” y se dejaron succionar por alrededor de 3 minutos, a pesar de no ser capaces de evacuar leche. Sin embargo, pocas hembras desplegaron la conducta diariamente, porque muchas no entraron al nido durante varios días, aparentemente de forma aleatoria.

La falta de una periodicidad circadiana “perfecta” en la conducta de amamantamiento, quizá sea una consecuencia de la lesión del epitelio olfatorio como la expresión funcional de osciladores circadianos de las neuronas en el bulbo olfatorio (de ratas). Futuros estudios deberán explorar esta posibilidad.

10. BIBLIOGRAFÍA

Aguilar-Roblero R. y Escobar C. (2002). "Ritmos biológicos y mecanismos generales de regulación". En: Motivación y conducta: sus bases biológicas. Ed. Manual Moderno. México. 4:57-77.

Alberts J. R. (1974). "Producing and interpreting experimental olfactory deficits". *Physiology and Behavior*. 12: 657-670.

Aschoff J. (1981). (comp). "Biological Rhythms". *Handbook of behavioral Neurobiology*. Vol. 4. Plenum Press. New York.

Aschoff J.; Daan S. and Honma K.I. (1982). "Zeitgebers, entrainment, and masking: some unsettled questions". In. *Vertebrate circadian systems: structures and physiology*, edited by. J. Aschoff, S. Daan and G.A. Groos. Berlin: Springer-Verlag. p. 13-24.

Boulos Z. and Terman Z. (1980). "Food availability and daily biological rhythms". *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. Rev. 4:119-131.

Chabli A.; Schaeffer Ch.; Samana B. and Aron Cl. (1985). "Hormonal control of the perception of the olfactory signals which facilitate lordosis behavior in the male rat". *Physiology and Behavior*. 35:729-734.

Chirino R.; Beyer C. and González-Mariscal G. (2007). "Lesion of the main olfactory epithelium facilitates maternal behavior in virgin rabbits". *Behavioural Brain Research*. 180: 127-132.

Clapp C.; Martínez- Escalera G.; Aguayo D. and Mena F. (1987). "Regulación integrativa de la lactancia". *Boletín de Estudios Médicos y Biológicos*. México. 35:63-107.

Corona M. A.; Juárez P.C.J.; Zavaleta A.Y.T. y Caba M. (2008). "Vías de sincronización fótica y fisiología del núcleo supraquiasmático". En: Bases celulares y moleculares de los ritmos biológicos. Ed. Universidad Veracruzana y Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas. México.

Corona M.A.A. y Fernández Ma.S. (2008). "Bases de los ritmos biológicos". En: Bases celulares y moleculares de los ritmos biológicos. Ed. Universidad Veracruzana y Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas. México.

Cowie A. (1982). "La lactancia y su control hormonal". En: Hormonas en la reproducción. Ed. La prensa mexicana. México. 3:105-141.

Cowie A.; Hartmann P.E. and Turvey A. (1969). "The maintenance of lactation in the rabbit after hipophysectomy". Journal Endocrinology. 43:651-662.

Cowie A.T.; Forsyth I.A. and Hart I.C. (1980). "Hormonal control of lactation". New York. UK: Springer Verlag.

Cross B.A. (1952). "Nursing behavior and the milk-ejection reflex in rabbit". J. Endocrinology. 8: 13.

Delouis C. and Richard P. (1993). "Lactation". En: Reproduction in mammals and man. Ed. Ellipses. Editores: Thibault, Levasseur, R.H.F. Hunter. París. 503-530.

Drewet R.F.; Kendrick K.M.; Sanders D.J. and Trew A.M. (1982). "A quantitative analysis of the feeding behavior of suckling rabbits". Developmental Psychobiology. 15:25-32.

Escobar C.; Martínez M.M.T.; Ángeles C.M.; Mendoza J. y Parra L. (2001). "Los otros osciladores circadianos del mamífero". En: Temas selectos de neurociencia II. Editor: Javier Velázquez Moctezuma. Ed. UAM-PLUIS. 17-36.

Fleming A. and Rosenblatt J. (1974a). "Olfactory regulation of maternal behavior in rats: I. Effects of olfactory bulb removal in experienced and inexperienced lactating and cycling females". *Journal of Comparative and Physiological Psychology*. 86(2):221-232.

Fleming A. and Rosenblatt J. (1974b). "Olfactory regulation of maternal behavior in rats: II. Effects of peripherally induced anosmia and lesions of the lateral olfactory tract in pup-induced virgins". *Journal of Comparative Physiological Psychology*. 86(2):233-246.

Fleming A. and Rosenblatt J. (1974c). "Maternal behavior in the virgin and lactating rat". *Journal of Comparative and Physiological Psychology*. 86(5):957-972.

Fleming A.; Vaccarino F.; Tamboso L. and Chee P. (1979). "Vomeroneasal and olfactory system modulation of maternal behavior in the rat". *Science*. 203:372-374.

Fuchs A.R. and Dawood M.Y. (1980). "Oxytocin release and uterine activation during parturition in rabbits". *Endocrinology*. 107:1117-1126.

Fuchs A.R. and Wagner G. (1963). "Quantitative aspects of the release of oxytocin by suckling in unanaesthetized rabbits". *Acta Endocrinology*. 44:581-592.

Fuchs A.R.; Cubile L.; Dawood Y.M. and Jorgensen F.S. (1984). "Release of oxytocin and prolactin by suckling in rabbits throughout lactation". *Endocrinology*. 114:462-469.

García-Dalmán C. and González-Mariscal G. (2012). "Major role of suckling stimulation for inhibition of estrous behaviors in lactating rabbits: acute and chronic effects". *Hormones and Behavior*. 61:108-113.

González-Mariscal G. and Melo A.I. (2013). "Parental Care". En: Neuroscience in 21st. Century. Cap. 68. Pp. 2069-2100. Ed. Donald W. Pfaff. Springer Science+business Media. Berlín.

González-Mariscal G. and Poindron P. (2002). "Parental care in mammals: immediate internal and sensory factors of control". En: Hormones, Brain and Behavior. Edit. Pfaff D.A.; Arnold A.P.; Etgen A.M; Fahrbach S.E. and Rubin. R.T. Academic Prees. Pp.215-298.

González-Mariscal G.; Chirino R.; Beyer C. and Rosenblatt J.S. (2004). "Removal of the accesory olfactory bulbs promotes maternal behavior in virgin rabbits". Behavioural Brain Research. 152: 89-95.

González-Mariscal G.; Díaz-Sánchez V.; Melo A.I.; Beyer C. and Rosenblatt J.S. (1994). "Maternal behavior in New Zealand White rabbits quantification of somatic events, motor patterns and steroid plasma levels". Physiology and Behavior. 55:1081-1089.

González-Mariscal G.; Lemus A.; Vega-González A. and Aguilar-Roblero R. (2013). "Litter size determines circadian periodicity of nursing in rabbits". Chronobiology International. 30(5):711-718.

González-Mariscal G.; McNitt J.I. and Lukefahr S.D. (2007). "Maternal care of rabbits in the lab and on the farm; endocrine regulation of behaviour and productivity". Hormones and behavior. 52:86-91.

González-Mariscal G.; Melo A.I.; Chirino R.; Jiménez P.; Beyer C. and Rosenblatt J.S. (1998). "Importance of mother / young contact at parturition and across lactation for the expression of maternal behavior in rabbits". Developmental Psychobiology. 32:101-111.

González-Mariscal G.; Melo A.I.; Parlow A.F.; Beyer C. and Rosenblatt J.S. (2000). "Pharmacological evidence that prolactin acts from late gestation to promote maternal behavior in rabbits". Journal of Neuroendocrinology. 12:983-992.

González-Mariscal G.; Melo A.I.; Zavala A. and Beyer C. (1990). "Variations in chin-marking behavior of New Zealand female rabbits throughout the whole reproductive cycle". *Physiology and Behavior*. 48:361-365.

González-Mariscal G.; Toribio A.; Gallegos J.A. and Serrano-Meneses M.A. (2013). "The characteristics of suckling stimulation determine the daily duration of mother-young contact and milk output in rabbits". *Developmental Psychobiology*.55(8): 809-817.

Gruart A.; Delgado J.M.; Escobar C. y Aguilar-Roblero R.A. (2002). "Los relojes que gobiernan la vida". Ed. Fondo de cultura económica, Secretaria de Educación Pública y CINVESTAV.

Halberg F. (1969). "Chronobiology". *Annual Review of Physiology*. 31:675-725.

Hoy S.T. and Selzer D. (2002). "Frequency and time of nursing in wild and domestic rabbits housed outdoors in free range". *World Rabbit Science*. 10:77-83.

Hudson R. and Distel H. (1982). "The pattern of behavior of rabbit pups in the nest". *Behaviour*. 79:255-271.

Hudson R. and Distel H. (1983). "Nipple location by newborn rabbits: behavioral evidence for pheromonal guidance". *Behaviour*. 85:260-275.

Hudson R.; Cruz Y.; Carrilo P. and Martínez-Gómez M. (1998). "Conducta maternal en el conejo europeo: un recordatorio de la diversidad de mamíferos". En: *Biología de la Reproducción*. Ed. Javier Velázquez Moctezuma. México. 419-440.

Hudson R.; Cruz Y.; Lucio R.A.; Nimoniya J. and Martínez-Gómez M. (1999). "Temporal and behavioral patterning of parturition in rabbits and rats". *Physiology and Behavior*. 66:599-604.

Hudson R.; González-Mariscal G. and Beyer C. (1990). "Chin marking behavior, sexual receptivity and pheromone emission in steroid-treated, ovariectomized rabbits". *Hormones and Behavior*. 24:1-13.

Jilge B. (1991). "Restricted feeding: a nonphotic zeitgeber in the rabbit". *Physiology and Behavior*. 51:157-166.

Jilge B. (1993). "The ontogeny of circadian rhythms in the rabbits". *Journal of Biological Rhythms* 8:247-260.

Jilge B. (1995). "Ontogeny of the rabbit's circadian rhythms without an external zeitgeber". *Physiology and Behavior*. 58:131-140.

Jilge B. and Stähle H. (1993). "Restricted food Access and light-dark: impact of conflicting zeitgebers on circadian rhythms of the rabbit". *American Journal of Physiology*. 264:R708-R715.

Jilge B.; Hörnicke H. and Stähle H. (1987). "Circadian rhythms of rabbits during restrictive feeding". *American Journal of Physiology*. 253:R46-R54.

Kandell E.R.; Schwartz J.H. and Jessel T.M. (2001). "Principios de neurociencias". Capítulo 32. Olfato y gusto: los sentidos químicos. Ed. McGraw-Hill-Interamericana de España. 4ta. Edición. Pp.1200.

Klein D.C.; Moore R.Y. and Reppert S.M. (1991). "Suprachiasmatic nucleus: The mind's clock". New York. Oxford University Press. 16-188.

Lemus A.C. (2010). "Participación del estímulo de la succión en la regulación de la expresión circadiana de la conducta maternal de la coneja". Tesis de licenciatura.

Lincoln D.W. (1974). "Suckling: a time-constant in the nursing behavior in the rabbit". *Physiology and behavior*. 13:711-713.

MacLeod, R.M. (1976). "Regulation of prolactin secretion". En: *Frontiers of neuroendocrinology*. Eds. L. Martini and W.F. Ganong. Vol. 4. Pp. 169-194. Raven Press. New York.

Martínez-Gómez M.; Cruz G.Y.; Lucio L.R.A. y Hudson T.R. (2002). "Conducta Maternal". En: *Motivación y conducta. Manual Moderno*. 299-317.

Mayer A.D. and Rosenblatt J.S. (1977). "Effects of intranasal zinc sulfate on open field and maternal behavior in females rats". *Physiology and Behavior*. 18:101-109.

McNeilly A.S. and Friessen H.G. (1978). "Prolactin during pregnancy and lactation in the rabbit". *Endocrinology (Baltimore)*. 102:1548-1554.

Melo A.I.; Rosenblatt J.S. and González-Mariscal G. (1998). "Placentophagia in New Zealand white rabbits". *Developmental Psychobiology*. 32:155.

Melo I. Salazar. (2002). "Motivación maternal en mamíferos inferiores y en el humano". En: *Motivación animal y humana*. 153-180.

Melo S.A.I. and González-Mariscal G. (2003). "Placentophagia in rabbits: incidence across the reproductive cycle". *Developmental Psychobiology*. 43:37-43.

Mena F.; Clapp C. and Martínez de la Escalera G. (1990a). "Age related stimulatory and inhibitory effects of suckling regulate lactation in rabbits". *Physiology and Behavior*. 48:307-310.

Mena F.; Clapp C.; Aguayo D. and Martínez de la Escalera G. (1990b). "Prolactin and propranolol prevent the suckling-induced inhibition of lactation in rabbits". *Physiology and Behavior*. 48:311-315.

Mena F.; Martínez-Escalera G.; Aguayo D.; Clapp C. and Grosvenor C.E. (1982). "Latency and duration of the effects of bromocriptine and prolactin on milk secretion in lactating rabbits". *Journal of Endocrinology*. 94:389-395.

Menaker M. (1968). "Extraretinal light reception in the sparrow". I. Entrainment of the biological clock. *Proc Natl Acad Sci USA* 59: 414-20.

Miranda R.; Begega A.; Santín L.J.; Rubio S.; Cuesta M.; Segovia S.; Guillamón A. and Arias J.L. (2000). "Functional sex differences in the accessory olfactory bulb of the rat". *Neuroendocrinology*. 11:3175-3179.

Moore R.Y. and Eichler V.B. (1972). "Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat". *Brain Research*. 42:201-206.

Pryce C.R. (1992). "A comparative systems model of the regulation of maternal motivation in mammals". *Animal Behavior*. 43:417-441.

Rosenblatt J.S. (1967). "Non-hormonal basis of maternal behavior in the rat". *Science*. 156:1512-1514.

Rosenblatt J.S. and Lherman D.S. (1963). "Maternal behavior in the laboratory rat." En: *Maternal behavior in mammals*". Rheingold H.L. (ed) John Wiley & Sons NY. 8-57.

Schaal B.; Coureaud G.; Langlois D.; Ginies C.; Spemón E. and Perrier G. (2003). "The mammary pheromone of the rabbit: chemical and behavioural characterization". *Nature*. 424:68-72.

Schaeffer Ch.; Roos J. and Aron C. (1986). "Accessory olfactory bulb lesions and lordosis behavior in the male rat feminized with ovarian hormones". *Hormones and Behavior*. 20:118-127.

Schaeffer Ch.; Roos J. and Aron Cl. (1990). "Lordosis behavior in intact male rats: effects of hormonal treatment and/or manipulation of the olfactory system". *Hormones and behavior*. 24:50-61.

Sharrer E. and Sharrer B. (1954). "Hormones produced by neurosecretory cells". *Recent Progress in Hormones Research*. 10:183-240.

Sorensen M.F.; Rogers G.P. and Baskett T.S. (1972). "Parental behavior in swamp rabbits". *Journal of Mammalogy*. 53:840-849.

Stern J.M. (1989). "Maternal behavior: sensory, hormonal and neural determinants". En: F.R. Brush and S. Levine (eds). *Psychoendocrinology*. Academic Press, New York. 105-226.

Stern J.M.; Dix L.; Bellomo C. and Thramann C. (1992). "Ventral trunk somatosensory determinants of nursing behavior in Norway rats: 2. Role of nipple and surrounding sensations". *Psychobiology*. 20:71-80.

Tucker H.A. (1988). "Lactation and its hormonal control. En: The physiology of reproduction". Ed. Raven Press, Ltd. Editores: Knobil E et al. New York. 2235-2263.

Vengue O. (1963). "The influence of nursing behavior and milk production on early growth rabbit". *Animal behavior*. 11:500-506.

Verga M.; Dell'Orto V. and Carenzi C. (1978). "A general review and survey of maternal behaviour in the rabbit". *Applied Animal Ethology*. 4:235-252.

Wakerley, J.B.; Clarke G. and Summerlee J.S. (1988). "Milk ejection and its control". En *The physiology of reproduction*. Editores. Knobil E. et al. Ed. Raven Press Ltd. New York. 2283-2321.

Watts G.A. and Swanson W.L. (1987b). "Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus:II. Studies using retrograde transport of fluorescent

dyes and simultaneous peptide immunohistochemistry in the rat". *The journal of comparative neurology*. 258:230-252.

Watts G.A., Swanson W. L. and Sánchez-Watts G. (1987a). "Efferent projections of the suprachiasmatic nucleus: I. Studies using anterograde transport of phaseolus vulgaris lurcoagglutinin in the rat". *The Journal of Comparative Neurology*. 258:204-229.

Zarrow M.X.; Denenberg H.V. and Anderson O.C. (1965). "Frequency of suckling in the pup". *Science*. 150: 1835-1836.

Zimmerman N.H. and Menaker M. (1975). "Neural connections of sparrow pineal: Role in circadian control of activity". *Science*. 190:1-16.