

## RESPUESTA NEURAL DEL RITMO CIRCÁDICO DE LACTANCIA EN CONEJOS

Mario Caba (mcaba@uv.mx)  
 María de Jesús Rovirosa  
 Lab. Biología de la Reproducción, IIB  
 Universidad Veracruzana  
 A.P. 114, Xalapa 91000, Ver.  
 Tel y Fax. (228) 8 12 57 57

Artículo recibido: 10 de abril 2002  
 Artículo aceptado: 14 de junio 2002

### RESUMEN

Los conejos presentan un ritmo de lactancia completamente diferente al resto de los mamíferos, ya que la hembra amamanta a sus críos una sola vez cada 24 horas. En el presente trabajo se exploró por técnicas de inmunocitoquímica la respuesta neural a la ingestión de leche en críos (gazapos) de siete días de edad, en relación con las neuronas productoras de oxitocina (OT). Para determinar su participación utilizamos la presencia del marcador neuronal Fos. Se estudiaron tres grupos, antes de succionar, después de succionar y manipulación (sin succionar). Las neuronas de OT se encontraron en los núcleos supraóptico (NSO) y paraventricular (NPV) y no se detectaron diferencias en el número de neuronas entre los grupos. La succión provocó un aumento significativo en la expresión de Fos en ambos núcleos ( $p < 0.01$ ), mientras que la manipulación ejerció un mayor efecto sobre el NPV ( $p < 0.05$ ). Los efectos en el NSO pueden estar asociados con una posible liberación plasmática de OT mientras que los del NPV pueden relacionarse a un control autonómico de la ingestión de alimento, estrés ó reforzamiento de la relación madre-cría para el desarrollo óptimo del individuo.

**Palabras clave:** Conejo, Oxitocina, Lactancia, Fos, Hipotálamo, Inmunocitoquímica

### ABSTRACT

Rabbits have an unusual pattern of lactation completely different from that of other mammals, because it follows a circadian rhythm once every 24 hours. In the present study the neural response to milk intake in seven day old rabbit pups was explored by immunocytochemistry, particularly in relation to the oxytocinergic (OT) system. Neural activation was determined by Fos protein as a marker in three groups: before suckling, after suckling, and handling (unsuckling). OT neurons were distributed in the supraoptic (SON) and paraventricular (PVN) nucleus and there was no difference in their number across groups. Suckling induced a remarkable Fos expression in both nuclei ( $p < 0.01$ ) whereas handling had greater effects on PVN ( $p < 0.05$ ). The Fos increases in SON may be related to a possible OT release through the neurohypophysis, while those in the NPV can be associated to the autonomic control of food intake, stress or health benefits associated to the social-bonds between the mother and her pups.

**Key words:** Rabbit, Oxytocin, Lactation, Fos, Hypothalamus, Immunocytochemistry

### INTRODUCCIÓN

La lactancia es la característica más importante de los mamíferos y es esencial para la sobrevivencia de las especies, incluida la nuestra. Para entender sus bases biológicas se han realizado numerosos estudios tanto a nivel fisiológico periférico como a nivel central en el sistema nervioso utilizando modelos animales, particularmente la rata blanca de laboratorio. En estos roedores la madre provee un intenso cuidado

hacia las crías y los amamanta frecuentemente (Rosenblatt *et al.*, 1985). La lactancia en el conejo es un fenómeno drásticamente diferente al resto de los mamíferos ya que presenta un ritmo circádico de amamantamiento de solamente unos minutos cada 24 horas como se ha demostrado en base a estudios cronobiológicos (Jilge, 1993). Por otro lado, los conejitos (gazapos) duermen ó están inactivos en el nido la mayor parte del tiempo, sin embargo alrededor de tres horas

antes de la llegada de la madre, se activan, muestran intensa actividad locomotora y en general están muy alertas (Hudson y Distel, 1989., Jilge, 1995). Esto es, tanto la madre como las crías tienen un ritmo sincronizado al mismo horario de amamantamiento. Este fenómeno en el conejo presenta una oportunidad extraordinaria de estudiar la participación de estructuras neurales, neurotransmisores y neuropéptidos en un fenómeno circádico complejo tanto en la madre como en la cría, con una mínima manipulación. El objetivo en este estudio es la respuesta neural que la interacción circádica madre-cría provoca en los gazapos en relación al péptido oxitocina.

Los núcleos supraóptico (NSO) y paraventricular (NPV) del hipotálamo de los mamíferos contienen neuronas que producen oxitocina (OT), conocida tradicionalmente como una hormona que se secreta de la neurohipófisis y es esencial para la eyección de leche durante el amamantamiento y para las contracciones uterinas durante el parto. La OT también desempeña funciones dentro del propio sistema nervioso como un neurotransmisor y se ha involucrado en la conducta sexual, maternal, afiliativa y en la ingestión de alimento (Insel, 1992). Recientemente se inició el estudio acerca de la participación de la OT alrededor del momento del amamantamiento en el cerebro de los gazapos, bajo la pregunta de si el consumo de alimento provoca una activación de dicho sistema. Para estudiar fenómenos similares en la rata se extrae leche de la madre, esto es, se "ordeña" y se le administra a los críos o éstos se separan de la madre durante varias horas y posteriormente se les permite succionar (Nelson *et al.*, 1998), lo cuál es una condición completamente diferente a su ritmo normal como se mencionó anteriormente. En ambos casos se necesita manipular intensamente tanto a la madre como a los críos produciéndoles estrés, lo cuál provoca que sea más difícil la interpretación de los datos propios del consumo de alimento.

En el presente trabajo se estudió por medio de técnicas de inmunocitoquímica la posible participación del sistema oxitocinérgico alrededor del momento del amamantamiento en críos de conejo. Para

determinar la activación del sistema se utilizó la expresión de la proteína Fos, ya que es un marcador de actividad celular ampliamente usado en neurociencias con diversos fines (Caba *et al.* 2000).

## MATERIALES Y METODOS

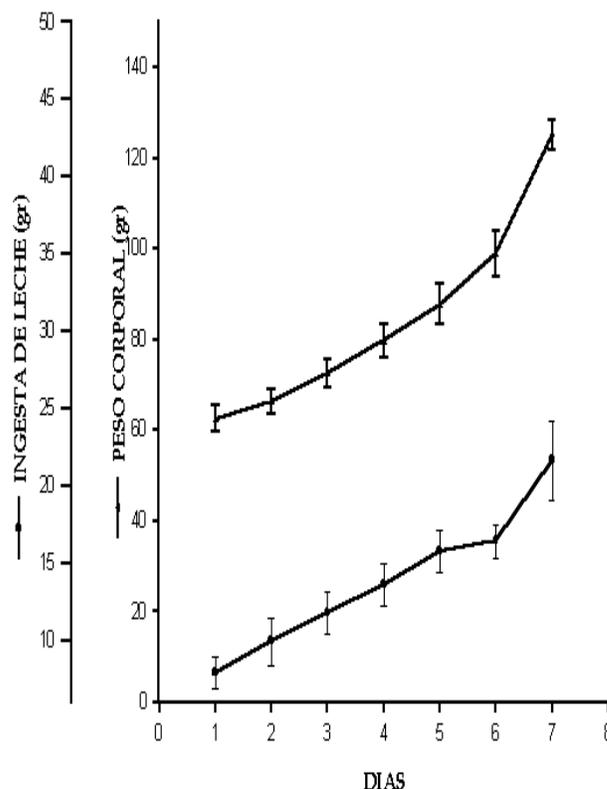
Conejas Nueva Zelanda blanco se aparearon y mantuvieron en jaulas individuales con alimento (Conejina, Purina) y agua *ad libitum*. Veinte días después del apareamiento se comprobó su embarazo, se transfirieron a jaulas maternas y se les proporcionó material para la construcción del nido. Después del parto los críos se separaron de su madre y se mantuvieron en una caja de plexiglás con material del nido materno. Todos los días a las 10:00 hrs. fueron estimulados a orinar, se pesaron y se colocaron con su madre. Ella inmediatamente los amamantó por unos minutos y terminó la lactancia saltando fuera del nido. Los gazapos fueron retirados, nuevamente estimulados a orinar, pesados y transferidos a su caja. El tiempo del amamantamiento se cuantificó. Este procedimiento que se basa en estudios circádicos implica una mínima manipulación experimental y ha sido ampliamente utilizado con diversos fines (Hudson y Distel, 1989; Escobar *et al.* 2000). Tres grupos se estudiaron: Grupo 1, antes de la succión (10:00 hrs); Grupo 2, después de la succión (90 minutos después, esto es, a las 11:30 hrs.) y Grupo 3, manipulación (similar al grupo anterior, pero los gazapos no se amamantaron). A las horas indicadas los sujetos fueron perfundidos intracardialmente y posteriormente el cerebro se cortó en secciones de 50  $\mu\text{m}$ . Las secciones fueron expuestas a suero normal de caballo, anticuerpo primario contra Fos, anticuerpo secundario, aumentador de la señal (Kit ABC) y finalmente con diaminobenzidina en presencia de sales de níquel y cobalto que producen un precipitado azul-negro. Inmediatamente se expusieron a otro procedimiento inmunocitoquímico similar solo que ahora se usó un anticuerpo primario contra oxitocina. Estos protocolos han sido utilizados ampliamente en este laboratorio tanto para oxitocina (Caba, 1995), como para

Fos (Caba *et al.*, 2000). La inmunorreactividad que se observa es la siguiente: las neuronas activas presentan núcleos de Fos azul-negro y si dicha neurona es de oxitocina tiene un citoplasma color café. Por lo tanto, lo que se obtiene son núcleos de Fos, pericariones de oxitocina (neuronas "sencillas") y neuronas "dobles" Fos/OT, las cuáles indican que fueron activadas. Posteriormente las secciones fueron montadas en portaobjetos, selladas con una resina y cubreobjetos y observadas al microscopio de luz. De cada individuo se seleccionó una sección similar en donde cada uno de los núcleos analizados coincidiera al mismo nivel. La distribución de las neuronas de OT se comparó con la ya registrada para el cerebro de adultos (Caba *et al.*, 1996) y se cuantificó el número de neuronas sencillas (sólo OT) y dobles (Fos/OT), a dos niveles en el núcleo supraóptico, denominadas supraóptico rostral (SOR) y supraóptico retroquiasmático (SORq), y 3 niveles en el núcleo paraventricular, porción anterior (PVA), porción media (PVM) y porción caudal (PVC). Los resultados fueron comparados en base a un análisis de Varianza (ANOVA) de una vía y con la prueba post hoc Tukey Kramer del paquete estadístico GB Stat versión 6 para windows.

## RESULTADOS

### ***Ingestión de leche durante los primeros siete días de lactancia.***

Las crías fueron observadas del día uno al siete de la lactancia; durante este período el tiempo en que la hembra permaneció alimentando a sus crías fué de  $228 \pm 6$  segundos. A pesar de la brevedad de este episodio obtuvieron suficiente leche para cubrir los requerimientos energéticos y crecer diariamente, como podemos observar de acuerdo al incremento de su peso corporal representado en la figura 1. La ingestión de leche el primer día de lactancia es mínima ya que únicamente consumen  $4.7 \pm 0.6$  % en comparación con el día siete en el que los sujetos consumieron  $34.95 \pm 9.0$  % de su peso corporal en leche en menos de 4 minutos.



**Figura 1.** Ingestión de leche ((gr) y aumento de peso corporal (gr) del día 1 al 7 de lactancia.

### ***Distribución de la inmunorreactividad de oxitocina en el hipotálamo***

La distribución de las neuronas de OT y sus procesos celulares (dendritas y axones) fué similar a la obtenida anteriormente en conejos adultos (Caba 1995, Caba *et al.*, 1996). Las neuronas se encontraron en densos agregados identificados como los núcleos supraóptico y paraventricular. En el núcleo supraóptico se identificaron dos diferentes tipos de poblaciones, una localizada en la porción más anterior del hipotálamo denominadas subdivisión rostral (SOR) y otra a nivel más posterior denominada subdivisión retroquiasmática (SORq). El núcleo paraventricular se distribuye a través de una extensa porción antero-caudal a los lados del tercer ventrículo. Se determinaron tres niveles para análisis: paraventricular anterior (PVA), paraventricular medial (PVM) y paraventricular caudal (PVC). Tanto en el núcleo supraóptico como en el paraventricular se detectaron neuronas inmunorreactivas solo a oxitocina y neuronas de oxitocina que además expresaron Fos.

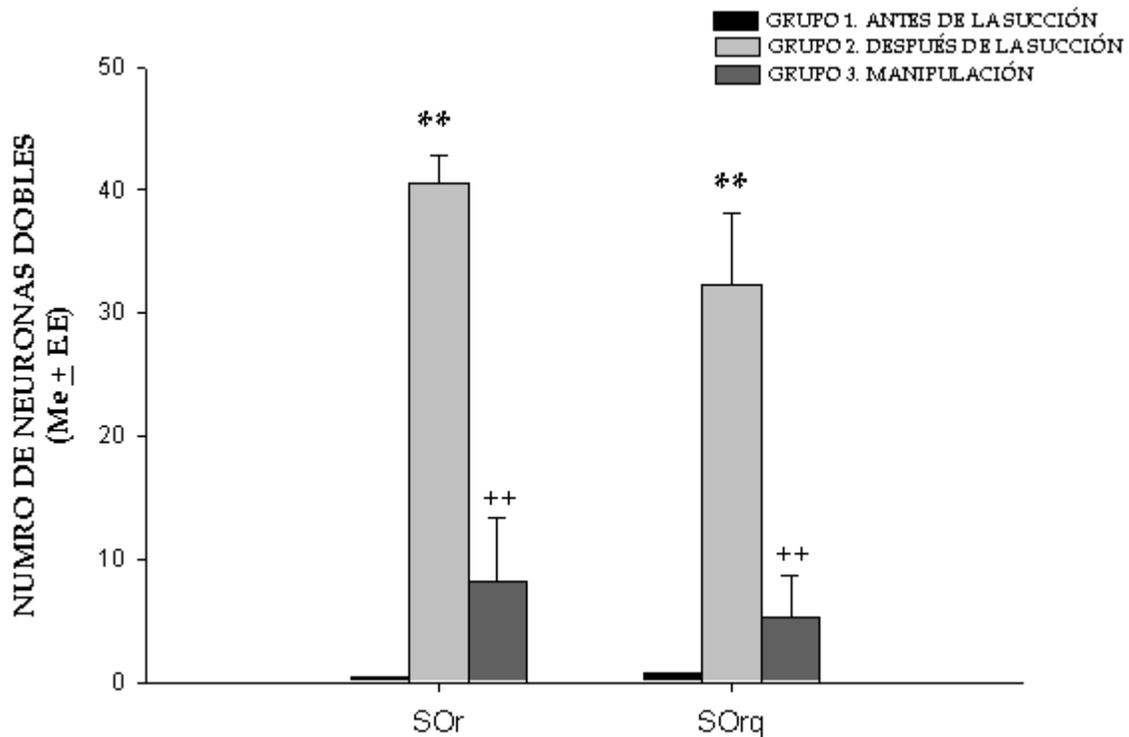


Figura 2. Número de neuronas dobles en las dos subregiones del Núcleo Supraóptico. En ambos existe un notable aumento en el número de neuronas que expresan Fos después de la succión, con respecto al Grupo 1 Antes de la succión. \*\* $p < 0.01$ . el grupo de manipulación también presentó incrementos significativos pero solo con respecto al Grupo 2, ++ $p < 0.01$ .

### Variación en la expresión de Fos

El número de neuronas de oxitocina en los tres grupos fue similar tanto en el núcleo supraóptico como en el paraventricular. Sin embargo, sí hubo diferencias significativas (ver adelante) en la expresión de Fos en dichas neuronas. En el núcleo supraóptico (figura 2) la succión provocó aumentos significativos en el número de neuronas de oxitocina que expresan Fos en relación al Grupo 1 Antes de succionar. SOr ANOVA  $p = .0002$ , Tukey  $p < 0.01$ ; SOrq ANOVA  $p = .0045$ , Tukey  $p < 0.01$ . La mayor parte de las neuronas de este núcleo se activaron con la succión, esto es el 67.9% en el SOr y 58.2% en el SOrq. El grupo 3 Manipulación, también presentó un incremento en el número de neuronas dobles pero debido a que este aumento es pequeño sólo fue significativo con respecto al Grupo 2 Después de la succión ( $p < 0.01$ ). En el núcleo paraventricular (figura 3) también observamos un aumento después de succionar en dos de las subregiones con respecto al Grupo 1 Antes de la succión. PVA ANOVA  $p = .0003$ , Tukey  $p < 0.01$ , que representa el 54.2%; PVM ANOVA  $p = .029$ ,

Tukey  $p < 0.05$ , que corresponde al 77.5% de las neuronas del núcleo. La manipulación provocó un aumento significativo en el PVA con respecto al Grupo 1 Antes de la succión ( $p < 0.05$ ). En el PVC no hubo aumentos significativos en ninguno de los tres grupos; no obstante que después de la succión el 73.4% de neuronas de OT expresa Fos, un número importante de neuronas también lo expresa antes de la succión (47%) y con la manipulación (45.7%), por lo tanto no hubo diferencias significativas.

En ambos núcleos se observó inmunorreactividad a Fos que no corresponde a células de oxitocina. Resultados preliminares indican que en el caso del NSO dicho marcaje corresponde a células productoras de vasopresina lo cuál coincide a lo ya reportado en el cerebro de adultos (Caba *et al.*, 1996). De manera similar también en el caso del NPV algunos núcleos de Fos también corresponden a neuronas de vasopresina, sin embargo, a diferencia del NSO, se observan aún otros núcleos de Fos cuya identidad neuroquímica se ignora.

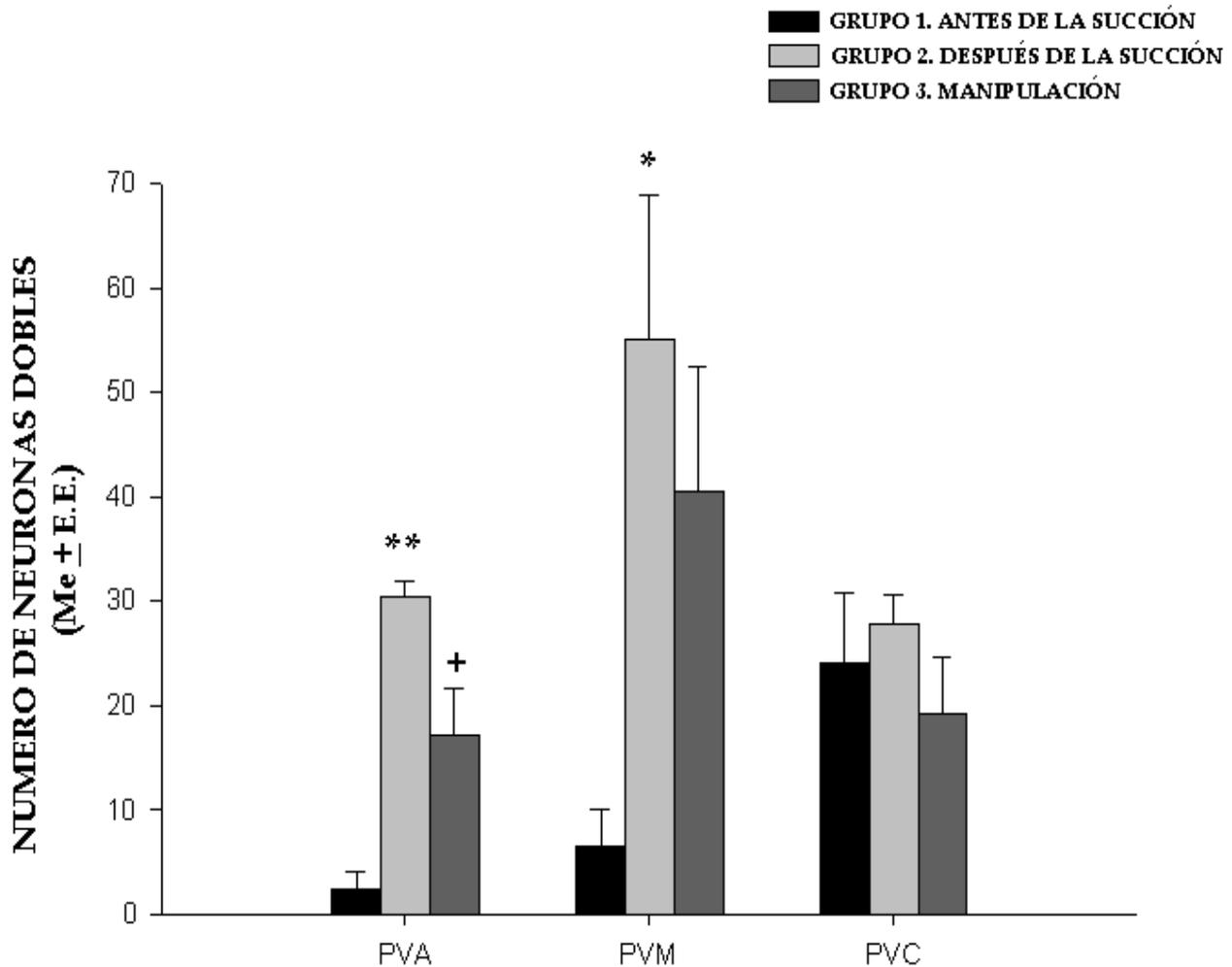


Figura 3. Número de neuronas dobles en las tres subregiones del núcleo paraventricular. La succión provocó aumentos significativos con respecto al Grupo 1 en el PVA (\*\* $p < .01$ ) y en el PVM (+ $p < .05$ ). La manipulación también presentó un aumento significativo con respecto al Grupo 1 ( $p < .05$ ) en el PVA. En el PVC no hubo cambios.

## DISCUSIÓN

El tiempo promedio de amamantamiento de los gazapos fué de  $228 \pm 6$  segundos, esto es menos de 4 minutos, lo cuál es similar a lo registrado por otros investigadores (Hudson y Distel, 1989; Gonzalez-Mariscal *et al.*, 1994). Esta corta interacción es suficiente para que los críos aumenten diariamente de peso (figura 1). Experimentos sobre el metabolismo de gazapos de siete días de edad explican por qué resulta tan eficiente un solo período diario de succión a esta edad. En base al análisis del peso estomacal así como de carbohidratos y ácidos grasos tanto del hígado como del plasma, se determinó que los gazapos tienen un metabolismo

sumamente lento, esto es, el estómago se vacía muy lentamente pero de manera constante a lo largo de las 24 horas, de tal manera que el organismo tiene un aporte continuo de nutrientes a lo largo de dicho período (Escobar *et al.*, 2000). Esto es, lo que se pudiera considerar como un estado de ayuno para otros organismos, en el conejo significa un estado de alimentación constante. En general, la característica más notable de estos sujetos es su eficiencia metabólica que les permite sobrevivir y crecer solamente con un breve período diario de succión el cual alcanza niveles extraordinarios el séptimo día de lactancia. Experimentos en ratas han demostrado que la distensión mecánica del tracto gastrointestinal dispara señales neurales

aférentes al sistema nervioso central que desempeñan un papel clave en la terminación del consumo de alimento, ya que provocan la sensación de saciedad (Phillips y Powley, 1996; Renaud *et al.*, 1987). En los gazapos es probable que la distensión estomacal no desempeñe un papel determinante, como en la rata, en la regulación a corto plazo de la ingesta de alimento, porque en esta especie es la madre quien determina la longitud del período de succión. Sin embargo, en base a este trabajo se propone que sí provoca respuestas neurales. En el tubo digestivo existen abundantes mecanorreceptores los cuáles forman parte de las fibras del nervio vago que transmiten información aferente hacia el sistema nervioso central (Shapiro y Miselis, 1985). Además, existen abundantes quimiorreceptores que detectan diversos compuestos que se van formando como consecuencia de la digestión (Havel *et al.*, 2000). La información de este nervio es transmitida al tallo cerebral y de aquí al NSO y NPV (Sawchenko y Swanson, 1982) y ésta puede ser la ruta que se activó por el consumo de leche, aunque en el conejo no se han realizado este tipo de estudios anatómicos.

¿Cuál es el significado de la activación de las neuronas de OT? Teniendo en cuenta las proyecciones del NSO hacia la neurohipófisis se propone que dicha activación debe provocar un aumento en la concentración plasmática de OT, similar a la reportada en modelos de consumo de alimento (Renaud *et al.*, 1987). La interpretación que se ha dado es que dicha elevación plasmática es un indicador periférico de saciedad. Por otro lado, los resultados obtenidos en el núcleo paraventricular pueden interpretarse en base a las conexiones de este núcleo hacia otras regiones hipotalámicas ó extra-hipotalámicas ya que se sabe que este nonapéptido también funciona como neurotransmisor, inclusive dentro del núcleo paraventricular (Insel, 1992). La pregunta que surge es conocer hasta qué grado las propias neuronas del núcleo paraventricular están involucradas en este mecanismo de hambre-saciedad ó si son parte de un circuito neural que involucra a la oxitocina como

neurotransmisor. Es posible que la activación de algunas de las neuronas esté relacionada al papel integrador que se le reconoce al NPV en base a la compleja información metabólica que recibe. Sobre ello resulta muy interesante que las neuronas de la región medial y caudal del NPV, envían proyecciones oxitocinérgicas hacia regiones en el tallo cerebral que contienen neuronas que inervan el tubo digestivo, formando probablemente un circuito de control sobre el consumo de alimento, utilizando a la OT como neurotransmisor a nivel central.

Finalmente, en los resultados de esta publicación se observa que la manipulación produjo aumentos de neuronas dobles Fos/OT, particularmente en el PVM; se proponen dos posibles explicaciones para este efecto. Se sabe que algunos tipos de manipulación que producen estrés activan el sistema oxitocinérgico del núcleo paraventricular y que la OT liberada forma parte de la cascada neuroendocrina del estrés (Nishioka *et al.*, 1998), esto es, el procedimiento utilizado tal vez provocó dichos aumentos Fos/OT en el PVM. Otra explicación puede estar relacionada a la función afiliativa asociada a la oxitocina. En ratas se sabe que la estimulación sensorial del abdomen incrementa la liberación de oxitocina tanto a nivel periférico como central, la cuál puede estar asociada al reforzamiento de la relación social entre la madre y su cría (Uvnas-Moberg, 1998). Como se recordará, en los tres grupos que se analizaron los críos se estimularon a orinar y esta acción podría por sí misma activar el sistema oxitocinérgico a nivel central, específicamente del NPV, el cuál a nivel medial muestra un gran incremento en neuronas Fos-OT en el grupo de Manipulación. La función de la oxitocina en este paradigma es la de promover una interacción social positiva la cuál finalmente tiene efectos fisiológicos sobre el desarrollo óptimo del individuo (Uvnas-Moberg, 1998).

En conclusión, se aportan datos nuevos acerca de cambios neurales alrededor del momento de la succión en los gazapos, principalmente reforzando el papel asociado a la oxitocina en el consumo de alimento. Sin embargo, otros péptidos están involucrados, como la vasopresina, ya

mencionada y otros más, que deben ser estudiados. En conjunto el presente trabajo forma parte de una serie de experimentos tendientes a estudiar el fenómeno circádico de amamantamiento en el conejo en donde además se está caracterizando la expresión de Fos en el núcleo supraquiasmático, el cual es el principal reloj biológico de los mamíferos.

## AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fué realizada gracias a un donativo del Conacyt para el proyecto "Alteración de la inmunoreactividad a péptidos y proteínas durante la lactancia en el conejo" (Reg. # 34652-N) a cargo de Mario Caba.

## LITERATURA CITADA

- CABA, M. 1995. Distribución y características celulares de neuronas oxitocinérgicas en el hipotálamo de coneja en estro y después del parto. *Temas selectos de neurociencias*. Universidad Autónoma Metropolitana, pp:111-126.
- CABA, M, SILVER R, GONZÁLEZ-MARISCAL G, JIMÉNEZ A, AND C. BEYER. 1996. Oxytocin and Vasopressin immunoreactivity in rabbit hypothalamus during estrus, late pregnancy, and postpartum. *Brain Research*. 720:7-16.
- CABA, M, PAU, K.Y, BEYER C., GONZÁLEZ-MARISCAL G, SILVER R, AND H.G. SPIES. 2000 Coitus-induced activation of c-Fos and gonadotropin-releasing hormone in hypothalamic neurons in female rabbits. *Molecular Brain Research*. 78 (1-2): 69-79.
- ESCOBAR, C., HUDSON, R., MARTÍNEZ-GÓMEZ, M., AND R. AGUILAR-ROBLERO. 2000. Metabolic correlates of the circadian pattern of suckling-associated arousal in young rabbits. *J. Comp. Physiol.* A186:33-38.
- GONZALEZ-MARISCAL, G., DÍAZ-SÁNCHEZ, V., MELO, A.I., BEYER, C., AND J. ROSENBLATT. 1994. Maternal behavior in New Zealand white rabbits: quantification of somatic events, motor patterns, and steroid plasma levels. *Physiology and Behavior* 55:1081-1089.
- HAVEL, P.J., LARSEN, P.J., AND J.L. CAMERÓN. 2000. Control of food intake. En: P. Michael Conn y M.E. Freeman (eds.) *Neuroendocrinology in Physiology and Medicine*. Humana Press Inc. New Jersey.
- HUDSON, R, AND H. DISTEL. 1989. The temporal pattern of suckling in rabbit pups: a model of circadian synchrony between mother and young. En: S.M. Reppert (ed.) *Development of Circadian rhythmicity and photoperiodism in mammals*. Perinatology Press Boston.
- INSEL, T.R. 1992. Oxytocin. A neuropeptide for affiliation: evidence from behavioral, receptor autoradiographic, and comparative studies. *Psychoneuroendocrinology* 17:3-35.
- JILGE, B. 1993. The ontogeny of circadian rhythms in the rabbit. *J Biol Rhythms* 8(3):247-260.
- JILGE, B. 1995. Ontogeny of the rabbit's circadian rhythms without an external zeitgeber. *Physiology and Behavior* 58:131-140.
- NELSON, E., ALBERTS, J.R., TIAN, AND J.G. VERBALIS. 1998. Oxytocin is elevated in plasma of 10-day-old rats following gastric distension. *Developmental Brain Research* 111:301-303.
- NISHIOKA, T., ANSELMO-FRANCI, J., LI, P., CALLAHAN, M.F. AND M. MORRIS. 1998. Stress increases oxytocin release within the hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Research*. 781:57-61.
- PHILLIS, R.J., AND T.L. POWLEY. 1996. Gastric volume rather than nutrient content inhibits food intake. *Am. J. Physiol.* 271: R766-R779.
- RENAUD, L.P., TANG, M., McCANN, M.J., STRICKER, E.M.S. AND J.G. VERBALIS. 1987. Cholecystokinin and gastric distension activate oxytocinergic cells in rat hypothalamus. *Am. J. Physiol.* 253:RR661-R665.
- ROSENBLATT, J.S., MAYER A.D AND SIEGEL H. I. 1985 *Maternal behavior among the nonprimate mammals*. Handbook of behavioral neurobiology. Vol. 7 Reproduction. Plenum Press, New York and London.
- SAWCHENKO, P.E. AND L.W. SWANSON. 1982. The organization of noradrenergic pathways from the brainstem to the paraventricular and supraoptic nuclei in the rat. *Brain Research Reviews*. 4:175-325.
- SHAPIRO, R.E. AND R.R. MISELIS. 1985. The central organization of the vagus nerve innervating the stomach of the rat. *J. Comp. Neurol.* 238:473-488.
- UVNAS-MOBERG, K. 1998. Oxytocin may mediate the benefits of positive social interaction and emotions. *Psychoneuroendocrinology* 23:819-835.