



Universidad Veracruzana



UNIVERSIDAD VERACRUZANA

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

Zona Xalapa

Tesis

“Activación de las células dopaminérgicas en algunas estructuras del sistema mesolímbico en relación con el amamantamiento en la coneja”

Que para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biomédicas

Presenta:

Juan de Dios Aguirre Chiñas

DIRECTOR:

Dr. Mario Salvador Caba Vinagre
Centro de Investigaciones Biomédicas
Universidad Veracruzana

Xalapa, Veracruz

Enero 2018

Resumen

La conducta materna tiene un carácter motivacional y en el conejo ésta se restringe a un breve episodio de amamantamiento diario. Este corto y espontáneo evento induce un ritmo en la expresión de la proteína reloj PER1, en el área preóptica y el septum lateral, regiones clave para la expresión de la conducta materna. Además, activa poblaciones neuroendocrinas hipotalámicas importantes en la producción y eyección de leche. Se ha reportado que previo al amamantamiento la coneja aumenta su actividad motora, sugiriendo que está motivada para regresar al nido. Sin embargo, esto no ha sido determinado. Así, la hipótesis de esta investigación fue que se induce activación en las células dopaminérgicas del sistema mesolímbico y las células de sus núcleos aferentes por efecto del amamantamiento en la coneja. Con este fin, utilizando la proteína FOS, un marcador de actividad celular, se analizó la activación de células dopaminérgicas y de los núcleos del sistema mesolímbico en conejas sacrificadas 12 horas previo al amamantamiento (14:00 h; n = 4), previo al amamantamiento (02:00 h, n = 4) y posterior al amamantamiento (03:30 h; n = 4), así como en conejas vírgenes (03:30 h; n = 4). Los resultados mostraron un incremento de FOS previo al amamantamiento en células dopaminérgicas A10 y A10 rv, así como en el área tegmental ventral, el núcleo accumbens y la corteza prefrontal con respecto al control ($p < 0.01$). Efecto que se incrementa después del amamantamiento en todas las áreas excepto la corteza prefrontal. Estos resultados permiten concluir que las regiones del sistema mesolímbico analizadas participan en la expresión de la característica conducta de amamantamiento del conejo. Además abre la pauta para suponer que el incremento en la expresión de FOS en estas regiones del sistema mesolímbico puede estar relacionado con un estado motivacional previo al amamantamiento, coincidiendo además con el aumento de la actividad motora de la coneja antes de amamantar.

Índice

Resumen	I
Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1. La conducta materna en los mamíferos.....	3
2.2. Regulación neural de la conducta materna.....	6
2.3. La conducta materna, una conducta motivada.....	11
2.4. Mediación dopaminérgica de la conducta materna.....	13
2.6. La conducta materna en el conejo	16
3. Planteamiento del problema	19
4. Hipótesis	20
5. Objetivo	21
5.1. Objetivos específicos	21
6. Materiales y métodos	22
6.1. Sujetos experimentales y alojamiento	22
6.2. Grupos experimentales	22
6.3. Perfusión e inmunohistoquímica	23
6.4. Cuantificación del marcaje	24
6.5. Análisis estadístico.....	25
7. Resultados.....	26
7.1. Actividad locomotora	26
7.2. FOS en el ATV, A10 rv, núcleo accumbens, corteza prefrontal, APO y SLv.....	26
7.2.1. ATV	27
7.2.2. A10rv	27
7.2.3 Núcleo accumbens	27
7.2.4. Corteza prefrontal.....	30
7.2.5. APO	31
7.2.6 SLv	33
7.3. Expresión de FOS en las células dopaminérgicas del ATV y sus proyecciones.....	34
7.3.1. Células dopaminérgicas A10.....	34
7.3.2. Células dopaminérgicas A10 rv.....	34
8. Discusión.....	36
9. Conclusiones	39
10. Referencias.....	40

Índice de tablas

Tabla 1. Diferencias en la conducta materna en tres tipos de mamíferos.	9
--	---

Índice de figuras

Figura 1. Modelo hipotético de la función del APO con respecto a la conducta materna.	10
Figura 2. Representación hipotética del modelo neural general para la regulación de la conducta materna en mamíferos.	12
Figura 3. Sistema mesolímbico dopaminérgico.	19
Figura 4. Representación de un análisis de cosinor para la expresión de PER1 en el APO y el SL en su porción ventral (SLv).	21
Figura 5. Representación de la actividad locomotora de una coneja lactante.	28
Figura 6. Expresión de FOS en el ATV	30
Figura 7. Expresión de FOS en el A10rv	31
Figura 8. Expresión de FOS en el núcleo accumbens	32
Figura 9. Expresión de FOS en la corteza prefrontal	33
Figura 10. Expresión de FOS en el APO	34
Figura 11. Expresión de FOS en el SLv	35
Figura 12. Co-expresión de FOS/TH en las células de las poblaciones A10 y A10rv	37

Abreviaturas

APO	Área preóptica
NBET	Núcleo base de la estría terminal
ATV	Área tegmental ventral
6-HD	6-hidroxidopamina
BOP	Bulbo olfatorio principal
BOA	Bulbo olfatorio accesorio
AMe	Amígdala medial
AC	Amígdala cortical

SLi	Septum lateral intermedio
APG	Área periacueductal gris
HA	Hipotálamo anterior
NVM	Núcleo ventromedial hipotalámico
SLv	Septum lateral ventral
CPF	Corteza prefrontal
ABL	Amígdala basolateral
NA	Núcleo accumbens
PV	<i>Pallidum ventral</i>
GABA	Ácido gamma aminobutírico
CML	Cuerpo lateral mamilar
TO	Tubérculo olfatorio
CH	Complejo hipocampal
CAC	Corteza anterior del cíngulo
FOS	Proteína expresión del gen <i>c-fos</i>
PER1	Proteína de expresión del gen reloj <i>Per1</i>
ZT	Zeitgeber time (horario del sincronizador)
AR	Amamantamiento restringido
DP0	Día del parto
DP	Día post-parto
12h Pre-A	12 horas previo al amamantamiento
Pre- A	Previo al amamantamiento
Post-A	Posterior al amamantamiento
IV	Intravenoso
BF	Buffer de fosfatos
DAB	Diaminobenzidina
TH	Tirosina hidroxilasa
TH-ir	Tirosina hidroxilasa inmunorreactivo
E.E	Error estándar
SNC	Sustancia nigra compacta
SNR	Sustancia nigra reticular
Ac	Acueducto
fr	<i>Fasuculus retroflexus</i>
SuM	Núcleo supramamilar

tmt	Tracto mamilotegmental
ca	Comisura anterior
VL	Ventrículo lateral
Cg	Corteza del cíngulo
IL	Corteza infralímbica
PrL	Corteza prelímbica
III	Tercer ventrículo
QO	Quiasma óptico

Introducción

La conducta materna son todos los procesos que la madre realiza para asegurar la supervivencia y el desarrollo de su descendencia (Numan e Insel, 2003; Olazábal et al., 2013a). Se ha observado que en especies de mamíferos como los roedores, el conejo, entre otras. Un aumento en la concentración de estradiol, progesterona y prolactina al final de la gestación estimulan regiones cerebrales como el área preóptica (APO) y el núcleo base de la estría terminal (NBET), dando como resultado el inicio de la conducta materna (Rosenblatt y Snowdon, 1996; Numan e Insel, 2003; Bridges, 2015).

La influencia hormonal inicial del estradiol y progesterona que activa la conducta materna es transitoria, debido a que, durante la lactancia, esta conducta en roedores se mantiene por la estimulación somatosensorial durante la interacción madre-cría (Pereira et al., 2008; Pereira et al., 2011). Esta interacción se establece gracias a lo que se conoce como conductas de aproximación, y entre ellas se encuentran el acarreo y el lamido ano-genital (Olazábal et al., 2013b; Bridges, 2015). Las conductas de aproximación que la madre realiza durante la conducta materna son conductas denominadas proactivas, esto debido a que la madre las realiza por voluntad, dicho de otra manera, son conductas motivadas (Numan, 2007; Pereira et al., 2008).

El circuito neural APO/NBET y el sistema mesolímbico, que incluye el área tegmental ventral (ATV) y sus proyecciones, regulan las conductas proactivas en la madre (Pereira et al., 2008; Numan y Stolzenberg, 2009). La lesión electrolítica del APO (Numan y Smith, 1984) o un corte transversal bilateral que interrumpe las conexiones entre el APO y el ATV (Numan et al., 1990) inhiben la conducta materna en ratas.

El ATV con sus proyecciones a el núcleo accumbens y la corteza prefrontal son elementos clave del sistema mesolímbico (Alcaro et al., 2007). En este sistema la dopamina está involucrada en los procesos de motivación (Wise, 2002; Alcaro et al., 2007). Se ha demostrado que la activación de las células dopaminérgicas del ATV es esencial en el desarrollo de la conducta materna en ratas (Numan y Stolzenberg, 2009; Olazábal et al., 2013b). En la rata el contacto con sus crías aumenta la liberación de dopamina en el ATV y en el núcleo accumbens (Afonso et al., 2009). Además, si se lesionan o destruyen las neuronas dopaminérgicas del ATV con 6-hidroxidopamina (6-HD) se impide el desarrollo

de la conducta materna (Hansen et al., 1991). Estos estudios apoyan la participación de la dopamina del sistema mesolímbico en el desarrollo de la conducta materna.

En los conejos, a diferencia de los roedores, la conducta materna postparto se restringe a un espontáneo evento de amamantamiento que se repite diariamente y que tiene una corta duración (Zarrow et al., 1965; Jilge, 1995; González-Mariscal et al., 2009). Este retorno espontáneo de la madre al nido altera su patrón locomotor. Previo al amamantamiento las conejas incrementan su actividad motora, efecto que disminuye después del amamantamiento. Además, dicho incremento cambia en paralelo a la hora que se establece el amamantamiento, ya sea en el día o en la noche (Meza et al., 2008). Este incremento en la actividad motora junto con el retorno espontáneo al nido sugiere un estado motivacional en la madre por acceder a sus críos para amamantarlos, pero esto no está comprobado.

Por tal motivo, en esta investigación se analizó la activación de las células dopaminérgicas del sistema mesolímbico, en conejas antes y después de amamantar. Con este trabajo se pretende explorar acerca del mecanismo neural de la conducta de amamantamiento diario de los conejos. Adicionalmente contribuirá a un mejor entendimiento de la conducta materna en mamíferos.

2. Antecedentes

2.1. La conducta materna en los mamíferos

La conducta materna es esencial para la supervivencia de las especies de mamíferos (Numan e Insel, 2003; Olazábal et al., 2013b). Es muy diversa y se expresa de diversas formas y modalidades, es un proceso especie específico. Dichas conductas contribuyen a la supervivencia de las crías, al proveerlas de alimento, refugio, calor y protección, además de una adecuada estimulación para su desarrollo (Olazábal et al., 2013a).

En general todos los mamíferos presentan o desarrollan una conducta materna, y generalmente en las especies como los roedores son cuatro los procesos principales que caracterizan la conducta materna, 1) la construcción del nido 2) la conducta de acarreo o transporte, 3) la estimulación ano-genital y 4) el amamantamiento (Numan et al., 2005; Olazábal et al., 2013b). Generalmente las madres son las encargadas de brindar cuidados y beneficios a las crías, pero dependiendo de la estrategia reproductiva de cada especie, el macho o incluso otros individuos pueden contribuir con estos beneficios y cuidados (Numan e Insel, 2003; Numan, 2006; Olazábal et al., 2013a), dando paso a lo que se conoce como conducta parental.

La conducta materna se desarrolla bajo diferentes estados hormonales y condiciones fisiológicas, así como dentro de un contexto social particular de las especies (Olazábal et al., 2013b; Numan et al., 2006). Es decir, las nuevas madres necesitan adaptarse a los cambios que trae consigo la gestación, luego el parto y posteriormente el desarrollo de las crías. De tal manera que cuando la cría requiere de la atención y cuidado de la madre, está podrá cumplir con todos estos requerimientos nutrimentales y de atención (Numan e Insel, 2003; Numan et al., 2005). Los cambios fisiológicos de las hembras durante el embarazo y la lactancia provocan profundos cambios en el cerebro, lo que se conoce como “cerebro maternal” (Olazábal et al., 2013a), el cual involucra procesos neurales, tales como la activación de regiones específicas por acción de hormonas como el estradiol, la progesterona, la prolactina y la oxitocina. (Rosenblatt y Snowdon, 1996; Numan e Insel, 2003; Olazábal et al., 2013a). Este cerebro maternal, activado por la acción hormonal, modifica las conductas en la hembra permitiendo la expresión de lo que se conoce como conducta materna en las diferentes especies.

La conducta materna, normalmente se inicia durante la gestación con la construcción del nido y continúa en los días posteriores al parto, durante la lactancia (Numan e Insel, 2003). En la tabla 1 se enlistan algunas particularidades y similitudes en el despliegue y desarrollo de la conducta materna en los roedores (rata y ratón), lagomorfos (conejo) y en primates no humanos. En la tabla se observa que los mamíferos lactantes comparten muchas características en su comportamiento materno, tal es el caso del amamantamiento; otros aspectos como limpiar a los neonatos y consumir los residuos fetales y fluidos amnióticos no son procesos conservados en todas las especies (Rosenblatt y Snowdon, 1996; Numan e Insel, 2003). Los procesos maternos tienen un efecto inmediato en las crías, generando un tipo de huella de reconocimiento entre la madre y sus crías que permite la formación de un vínculo maternal (Numan, 2007). Sin embargo, las conductas específicas y el patrón de la interacción madre-cría de cada especie tienen un efecto directo en el desarrollo del neonato, así como en otros aspectos, tal es el caso de la conducta reproductiva y la interacción social (Olazábal et al., 2013a; Numan e Insel, 2003; González-Mariscal, 2016). Por lo tanto, no solo el componente hormonal es responsable de generar la conducta materna ya que otros factores como el ambiente psicosocial, y las interacciones estimulan el comportamiento materno o lo inhiben (Pereira et al., 2008).

En los roedores y primates se observa un componente emocional en la expresión de la conducta materna (Numan, 2007). En estas especies, las hembras muestran un interés instantáneo en sus recién nacidos. Por lo general los limpian, les dan refugio y adoptan posturas para amamantarlos, esto independientemente de la diferencia en el grado de desarrollo que presentan las crías de ambas especies (Numan e Insel, 2003; González-Mariscal y Poindron, 2002). En otras especies como capibaras y ungulados, las madres no muestran mucho interés en sus neonatos. No obstante, la conducta materna se expresa posteriormente cuando hay una interacción madre-cría en el amamantamiento, en la protección contra depredadores, en la limpieza y mediante vocalizaciones.

Tabla 1. Diferencias en la conducta materna en tres tipos de mamíferos. (González-Mariscal et al., 2009¹; Numan e Insel, 2003²; Champagne et al., 2003³; Rosenblatt y Snowdon, 1996⁴).

	Rata	Lagomorfos	Primates no humanos
Frecuencia de la conducta maternal	Alrededor de 16 h repartidas en diversos periodos ^{2,4}	Una vez cada 24 h por un periodo de entre 3 a 5 min ¹	Constante durante los primeros meses de vida ³
Número de crías	6 a 24 crías por parto ²	1 a 5 en especies pequeñas y hasta 12 en especies grandes ³	1 o 2 crías en promedio ^{2,3}
Tipo de cría	Altricial ²	Altricial ^{3,4}	Precocial ²
Procesos de interacción con las crías	*Amamantamiento ² *Acarreo o transporte ⁴ *Estimulación ano-genital ^{2,4}	*Amamantamiento ¹	*Amamantamiento ² *Acarreo o transporte ² *Acicalamiento ² *Estimulación genital ²
Procesos sin interacción con las crías	*Construcción del nido ² *Placentofagía ⁴ *Conducta defensiva ³	*Construcción del nido ¹ *Placentofagía ^{1,3}	*Ansiedad maternal ³ *Conducta defensiva ³
Estímulos de las crías	*Succión ² *Vocalización ^{2,4}	*Succión ¹ *Vocalización ^{2,4}	*Succión ² *Vocalización ^{2,4} *Expresión facial *Estímulos táctiles

En relación al grado de desarrollo de las crías se observa que en las especies altriciales, la conducta materna es instantánea. Las crías altriciales nacen sin pelo, incapaces de abrir los ojos y regular su temperatura corporal, además tienen un limitado desarrollo locomotor. Debido a esto la madre desarrolla más patrones conductuales para el cuidado de sus críos. Por ejemplo, previo al parto selecciona un lugar y construye un nido para el resguardo de las numerosas crías que paren (Numan, 2006; González-Mariscal y Poindron, 2002). El nido en algunas especies de roedores y conejos es por debajo del suelo (cueva o madriguera), pero en el caso de depredadores el nido es en la superficie o en los árboles en el caso de las ardillas y los prosimios (Kapeller, 1998; Rosenblatt y Snowdon, 1996). En contraste, las crías precociales tienen buena capacidad auditiva y de visión al momento de

nacer, además de presentar rápidamente actividad locomotora y una buena termorregulación, por lo que las crías pueden ponerse de pie e iniciar con el amamantamiento minutos después de nacer, por lo que no es necesaria la construcción de un nido maternal (Levy y Keller, 2008).

2.2. Regulación neural de la conducta materna

La conducta materna tiene su regulación en un circuito neural bastante conservado en los mamíferos (Olazábal et al., 2013a). En este circuito el APO es reconocido como un área esencial para su expresión (Figura 1; Numan e Insel, 2003; Olazábal et al. 2013a). Adicionalmente la interacción del APO con estructuras como el NBET y el ATV se han propuesto como los iniciadores de la motivación maternal (Numan, 2007; Numan y Stolzenberg, 2009; Olazábal et al., 2013a; Bridges, 2015). Como se puede observar, estímulos hormonales y somatosensoriales de las crías son importantes en este proceso (Numan, 2006; Bridges, 2015).



Figura 1. Modelo hipotético de la función del APO con respecto a la conducta materna. Estradiol, prolactina y oxitocina actúan en el APO favoreciendo la interacción con las crías e iniciando la conducta materna. La activación del APO involucra dos circuitos uno que inhibe el circuito neural defensivo y otro que facilita la conducta materna. Modificada de Numan y Stolzenberg, 2009.

El inicio de la conducta materna requiere un incremento en los niveles de estradiol y progesterona al inicio de la última fase de la gestación (Sheehan y Numan, 2002; Numan, 2006; Numan, 2007). Otras hormonas como la prolactina y la oxitocina también facilitan su desarrollo (Numan e Insel, 2003; Bridges, 2015). La infusión intracerebroventricular de prolactina y oxitocina en ratas y conejos promueve el rápido despliegue de la conducta materna (Bridges y Byrnes, 1999; González-Mariscal et al., 2004). Por otro lado, al inhibir o disminuir las concentraciones de estradiol y progesterona mediante ovariectomía o por supresión química, se observa una interrupción de dicha conducta (Bridges y Byrnes, 1999; Bridges, 2015). Efectos similares se observan con la inhibición en la liberación de prolactina y oxitocina (Bridges, 2015). Sin embargo, esta implicación hormonal no es necesaria para mantener la conducta materna una vez que ya está establecida, ya que la estimulación somatosensorial es suficiente para mantener esta conducta durante la lactancia (Pereira et al., 2008).

En las investigaciones sobre el mecanismo neural de la regulación maternal, se ha propuesto que el APO es la interface donde estradiol, progesterona, prolactina, oxitocina y otros mensajeros interactúan con múltiples receptores, generando la respuesta materna (Numan, 1974; Numan 2012). La destrucción de las neuronas del APO y el NBET mediante, una lesión eléctrica o mediante la infusión de aminoácidos citotóxicos interrumpen la conducta materna en ratas (Numan, 1974; Numan y Stolzenber, 2009). Estas lesiones también logran que hembras vírgenes que fueron expuestas a crías recién nacidas, y que han desarrollado conducta materna pierdan el interés por estar con sus crías adoptivas (Numan et al., 1977).

Para conocer y dilucidar qué estructuras cerebrales participan y que funciones realizan en la activación, inhibición, motivación y control de la conducta materna se han realizado numerosos estudios (Olazábal et al., 2013a). Por ejemplo, en los roedores, a través de estudios de microdiálisis *in vivo*, análisis electrofisiológicos, activación de genes de expresión temprana, estudios farmacológicos, estimulaciones eléctricas o químicas y lesiones de regiones cerebrales específicas, se han identificado regiones cerebrales que participan favoreciendo o inhibiendo la conducta materna (Olazábal et al., 2013a; Bridges, 2015). De esta manera se ha logrado establecer un hipotético modelo neural para la regulación de la conducta materna (Figura 2).

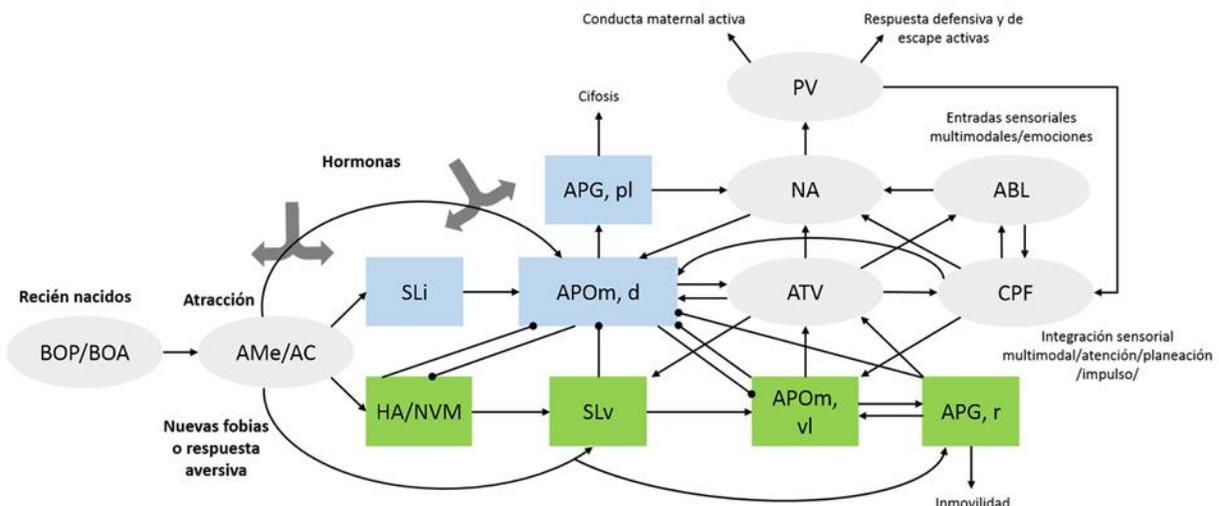


Figura 2. Representación hipotética del modelo neural general para la regulación de la conducta materna en mamíferos. La estimulación olfativa puede inhibir o activar la conducta materna dependiendo del estado fisiológico del animal. La acción de las hormonas en la última etapa de la gestación es esencial para el inicio de la conducta materna. Las áreas del cerebro representadas en los óvalos grises participan en el procesamiento de los estímulos que tienen un impacto positivo o negativo en la conducta materna. Las áreas en los cuadros azules representan la vía de activación y las áreas en los cuadros verdes representan la vía inhibitoria de la conducta materna. Las líneas que terminan en flecha representan activación, las líneas que terminan en círculo representan inhibición. BOP: bulbo olfatorio principal, BOA: bulbo olfatorio accesorio, AMe: amígdala medial, AC: amígdala cortical, SLi: septum lateral intermedio, APOm: área preóptica media, APG: área periacueductal gris, HA: hipotálamo anterior, NVN: núcleo ventromedial hipotalámico, SLv: septum lateral ventral, ATV: área tegmental ventral, CPF: corteza prefrontal, ABL: amígdala basolateral, NA: *núcleo acumbens*, PV: *pallidum ventral*. Modificada de Olazábal et al., 2013a.

El modelo clásico del sistema neural que regula la conducta materna propone que el bulbo olfatorio principal y el bulbo olfatorio accesorio están involucrados en el proceso de reconocimiento inicial. Depende del estado fisiológico del animal, que el estímulo olfativo facilite o inhiba el despliegue de la conducta materna, dependiendo del estado fisiológico de la hembra (Fleming et al., 1974; Levy y Keller, 2009; Olazábal et al., 2013a). Un cerebro sensibilizado por hormonas como estradiol es receptivo al estímulo olfativo y facilita el despliegue de la conducta. Sin embargo, un cerebro sin el estímulo hormonal responderá conductualmente con aversión al olor de las crías (Fleming et al., 1980; Bridges et al., 1999).

La información del bulbo olfatorio pasa a la amígdala medial y a la amígdala cortical, donde igualmente puede tomar un valor positivo o aversivo hacia los críos (Fleming et al., 1980). Luego, desde la amígdala, la información se envía al APO (Fleming et al., 1974, 1980; Bridges et al., 1999; Numan, 2006; Numan et al., 2005) y al núcleo anterior y ventromedial del hipotálamo, para estimular o inhibir la conducta materna respectivamente (Bridges et al., 1999; González-Mariscal et al., 2004; Numan et al., 2005, Numan, 2007).

Son las crías, a través de estimular a la madre, las que facilitan la activación de la vía APO/NBET, e inhiben la vía hacia el núcleo anterior y ventromedial del hipotálamo (Olazábal et al., 2013a). En otras especies denominadas “no maternas”, al recibir el estímulo olfativo de las crías, solo se activa la vía hacia el hipotálamo anterior y posteriormente áreas relacionadas con respuesta defensiva y aversiva como el área gris periacueductal en el mesencéfalo (Olazábal et al., 2013a; Lonstein et al., 1998).

Otras regiones cerebrales, como el SL, está directamente asociado con el APO y otras regiones como el ATV (Alcaro et al., 2007), y su función varía según la subregión (Olazábal et al., 2013a; Bridges, 2015). Por ejemplo, la porción ventral del SL (SLv) se activa en ratas no maternas expuesta a crías (Kirpatrick et al., 1994), esto es, regularmente desempeña un papel inhibitorio en la conducta materna. En el conejo igualmente la exposición a los críos también activa el SLv. Posterior al amamantamiento se observa un aumento en la expresión de FOS en esta estructura en las conejas lactantes en comparación con hembras vírgenes (González-Mariscal et al., 2009). Además, el efecto del amamantamiento genera un ritmo en la expresión de la proteína reloj PER1 en el SLv al igual que en el APO (Meza et al., 2015). Este hecho permite inferir que el SL al igual que el APO participan en la expresión de la conducta de amamantamiento diario en el conejo.

Dentro del SL se encuentran aferencias de proyecciones dopaminérgicas provenientes del ATV (Numan y Stolzenberg, 2009) y de oxitocina de núcleos hipotalámicos como el supraóptico (Olazábal et al., 2013b). Tanto dopamina como oxitocina participan en la regulación de la conducta materna en distintas especies de mamíferos (Numan y Stolzenberg, 2009; Olazábal et al., 2013a). No obstante, la función tanto de dopamina como de oxitocina en el SL no se conoce a detalle. Una hipótesis sugiere que la liberación de dopamina y oxitocina en esta región contribuye a remover la inhibición de la conducta materna (Olazábal et al., 2013b). Estas evidencias sugieren que el SL participa en el procesamiento de los estímulos generados por las crías. Posiblemente siendo una canal de conexión entre las vías maternas y motivacionales.

La estimulación de las crías a la madre se da de manera constante (Numan e Insel, 2003). La madre recibe esta estimulación a través de la vía auditiva mediante vocalizaciones, olfativa con el aroma de las crías (posiblemente feromonas). Pero, el mayor estímulo que la

madre recibe es durante el amamantamiento, cuando las crías succionan la leche materna (Rosenblatt y Snowdon, 1996; Numan e Insel, 2003).

Durante la interacción madre-crías diversos neuroquímicos son liberados, desde la hipófisis, así como de células neuroendócrinas en distintos puntos del cerebro (Bridges, 2015). Estos neuroquímicos activan los múltiples receptores dentro del APO y demás núcleos relacionados con la información materna tal como el NBET y el SLv. Sin embargo, la información de los estímulos de las crías también es procesada en regiones como el ATV, el accumbens, la corteza prefrontal y otras regiones límbicas (Numan et al., 2005; Numan, 2007). Dentro de los núcleos del sistema límbico la información química de los estímulos se traduce en una respuesta proactiva en la madre (Numan e Insel, 2003; Numan, 2007). Las conductas proactivas se caracterizan por estar dirigidas a la búsqueda de un objetivo o estímulo (Pereira et al., 2008), en este caso el contacto con las crías.

El APO recibe aferencias del ATV a través del haz medial del cerebro anterior (Numan y Stolzenberg, 2009). Es en esta conexión entre APO/ATV es donde se inhibe o se activa la respuesta maternal voluntaria (Numan, 2007). Entonces la respuesta maternal depende de la relevancia del estímulo, es decir, la capacidad para activar la conexión APO/ATV (Numan y Stolzenberg, 2009). Por el contrario, si el estímulo es aversivo se activan tanto el núcleo anterior como el ventromedial del hipotálamo inhibiendo la respuesta materna y favoreciendo la evitación de las crías (Numan, 2007).

Si una actividad se realiza voluntariamente se conoce como conducta proactiva (Pereira et al., 2008). Si este proceso voluntario se realiza para buscar un estímulo supuestamente placentero, esto es hedónico, se conoce como conducta apetitiva (Pereira y Morrell, 2009, Pereira et al., 2011). Estas conductas se expresan cuando el sistema mesolímbico se activa a consecuencia de un reforzador o estímulo placentero (Wise, 2002). Si los estímulos somatosensoriales que la madre recibe de las crías activan la conexión del APO con el ATV (Numan y Solzenberg, 2011), permiten que se establezca la conducta materna. Debe considerarse que la conducta materna es una conducta proactiva apetitiva (Olazábal et al., 2013b). En otras palabras, la conducta materna es una conducta motivada. Por lo cual, tanto el APO como el ATV funcionan como interface entre el estímulo y la motivación materna.

La dopamina regula los procesos de motivación y recompensa de muchos estímulos, como el sexo o la alimentación (Wise, 2005; Merrer et al., 2009) y participa en el componente proactivo de la conducta materna en rata (Numan y Stolzenberg, 2009).

2.3. La conducta materna, una conducta motivada.

La interacción madre-cría genera un vínculo (Numan e Insel, 2003), por lo que el mantenimiento de la conducta materna tiene un carácter emocional (Stern y Johnson, 1990; Pereira et al., 2011). En la rata, por ejemplo, durante la primera semana de lactancia las madres tienen preferencia por las crías que por recibir un estímulo de cocaína (Wansaw et al., 2008). En otras palabras, la madre presenta un estado motivacional por estar con sus crías (Olazábal et al., 2013b). Entonces, toda la estimulación que la madre recibe durante el contacto con las crías se considera que es un evento recompensante (Pereira et al., 2008; Olazábal et al., 2013b).

La motivación requiere de un estímulo incentivo para efectuar una conducta (Pereira et al., 2011). Este estímulo denominado reforzador (Pereira et al., 2008), brinda sensación de bienestar o recompensa a los sujetos expuestos a él (Paredes, 2009). Los procesos motivacionales están acompañados de procesos proactivos, caracterizados por ser conductas de acercamiento al estímulo (Wise, 2004). En el caso de la conducta materna, considerada una conducta motivada, la interacción con las crías son el incentivo que permite que la conducta se exprese. (Numan, 2007; Pereira et al., 2008). En esta interacción madre-cría, el amamantamiento podría ser el evento clave en la estimulación (Panksepp et al., 1994, Panksepp, 2003), esto se puede suponer debido a que el amamantamiento es el único proceso que se conserva en la mayoría de las especies de mamíferos (Rosenblatt y Snowdon, 1996).

Durante el amamantamiento las hormonas prolactina y oxitocina se liberan a la circulación (Kutlu et al., 2004), lo cual favorece la producción y expulsión de leche. Por otro lado, la dopamina también se libera durante el amamantamiento (Selmanoff y Gregerson, 1986; Bridges, 2015). El papel de la dopamina en la conducta materna se relaciona con la acción de este neurotransmisor en el sistema mesolímbico, lo que apoya la propuesta de que la dopamina favorece la interacción madre-cría (Bridges, 2015).

Los conceptos de recompensa y reforzador importantes en la motivación no son sinónimos. El reforzador hace referencia a un estímulo positivo o aversivo que incentiva una conducta (Paredes, 2009). El termino recompensa refiere que el sujeto ha tenido contacto con el incentivo o reforzador, lo que modifica su patrón de comportamiento (Merrer et al., 2009; Paredes, 2009). Así, la motivación se divide en dos fases (Pereira et al., 2008). La primera fase de la motivación es cuando el sujeto busca contacto con el reforzador (fase apetitiva); y la segunda fase es la recompensa (fase consumativa) (Pereira et al., 2008, 2011).

Para determinar que una conducta es motivada se puede analizar mediante un paradigma de condicionamiento operante clásico o de preferencia por un lugar condicionado (Paredes, 2009; Pereira et al., 2008, 2011). El condicionamiento operante clásico evalúa las conductas apetitivas o de aproximación a un estímulo (Paredes, 2009), en otras palabras, analiza el comportamiento previo a recibir la recompensa. Por otro lado, la preferencia por un lugar condicionado evalúa un estado afectivo positivo o de recompensa (Paredes 2009) y consiste en elegir entre dos compartimentos (Bardo y Bevins, 2000). En uno de los compartimentos, aversivo para el sujeto se coloca un estímulo positivo denominado estímulo condicionado. Otro de los compartimentos tiene un estímulo que el sujeto conoce, y se le denomina estímulo no condicionado (Bardo y Bevins, 2000; Paredes, 2009). En general, la preferencia por un lugar condicionado, analiza porque los sujetos prefieren exponerse a lugares aversivos con estímulos positivos (Bardo y Bevnis, 2000; Wansaw et al., 2008).

En el caso de la conducta materna, en los roedores se ha observado que la madre prefiere estar en contacto con sus crías por encima de estímulos aversivos o positivos (Pereira et al., 2008). Así, se ha determinado que tanto el acarreo como el lamido ano-genital dos procesos maternos en los roedores son conductas proactivas apetitivas (Olazábal et al., 2013b), es decir, la madre busca contacto con las crías. Por otro lado, procesos maternos como el amamantamiento se consideran consumativos (Bridges, 2015). Un proceso consumativo hace referencia a que los sujetos han sido recompensados (Pereira y Morrell., 2009). Así, cuando el sujeto recibe la recompensa, este finaliza la conducta (Merrer et al., 2009).

La preferencia a un lugar o hacia algo, ya sea situación u objeto, no es otra cosa que un proceso motivacional (Paredes, 2009). Los procesos motivacionales resultan de la activación del sistema mesolímbico por un estímulo reforzador (Merrer et al., 2009). Dentro

del sistema mesolímbico la dopamina está involucrada en considerar si el estímulo recibido es hedónico, placentero y se liberará este neurotransmisor (Wise, 2002). Entonces niveles elevados de dopamina correlacionan con procesos de recompensa (Wise, 2005; Wansaw et al., 2008). La maternidad es un proceso motivado, por lo cual, la conducta materna debe corresponder a una elevación en los niveles de dopamina en comparación con hembras vírgenes.

2.4. Mediación dopaminérgica de la conducta materna

Comer, dormir y la actividad sexual, son ejemplos de conductas motivadas, es decir, generan recompensa al sujeto que las realiza (Merrer et al., 2009). La motivación está asociada a un estímulo reforzador y asegura que el sujeto busque repetir conductas que lo pongan en contacto con el estímulo (Alcaro et al., 2007; Pierce y Kumaresan, 2006; Merrer et al., 2009).

En el sistema nervioso un sistema neural conocido como sistema de motivación y recompensa o mesolímbico, es el encargado de regular los procesos motivacionales (Ikemoto, 2010; Alcaro et al., 2007). Fue gracias al descubrimiento de la autoestimulación eléctrica del cerebro (Olds y Milner, 1954) y la caracterización del sistema dopaminérgico (Ungerstedt, 1971), que se determina la importancia del sistema mesolímbico y de la dopamina en la generación de la motivación (Alcaro et al., 2010). Entonces, la acción de la dopamina dentro de estructuras como el ATV es necesario para que se establezcan las conductas proactivas propias de la motivación (Ikemoto, 2010). Por ejemplo, se puede observar que los procesos que son recompensantes provocan liberación de dopamina dentro del sistema mesolímbico (Wise, 2002), es decir, existe aumento de dopamina que correlaciona con la búsqueda del estímulo (Wise, 2005; Alcaro et al., 2010). No obstante, el papel de la dopamina en el sistema mesolímbico es influenciado por otros mediadores químicos, como GABA que inhibe la acción de la dopamina y los opioides que la estimulan (Wise, 2005).

Para entender como dentro del sistema mesolímbico la dopamina favorece el proceso de motivación y recompensa se han realizado experimentos de autoestimulación eléctrica intracraneal en ratas (Alcaro et al., 2007). Los procesos de autoestimulación analizan las veces que el sujeto busca el estímulo eléctrico por encima de otros estímulos como la comida

y el sexo (Ikemoto, 2010). Cuando los sujetos se auto estimulan, los niveles de dopamina aumentan en regiones cerebrales específicas como el ATV, el núcleo accumbens y la corteza prefrontal, entre otras (Alcaro et al., 2010). Al analizar el aumento de la neurotransmisión dopaminérgica por efecto de la estimulación eléctrica en estas regiones específicas, logro dilucidarse las partes que componen el sistema mesolímbico (Olds et al., 1971). Estas están conectadas a través del haz medial del cerebro anterior (Ungerstedt, 1971; Pierce y Kumaresan, 2006; Ikemoto, 2010). Así, la información dopaminérgica del ATV se envía a las regiones eferentes para establecer los procesos de motivación y recompensa (Wise, 2002; Ikemoto, 2010).

Dentro del sistema mesolímbico, la información de los estímulos externos se interpreta a través de la neurotransmisión dopaminérgica (Ikemoto, 2010), cuyos cuerpos neuronales están agrupados en el mesencéfalo (Alcaro et al., 2007) en tres poblaciones predominantes. Las poblaciones se conocen como células A8 en el campo retrorubral, células A9 en la sustancia nigra y células A10 en el ATV y otro grupo que se conoce como A10 ventro rostral (Ungerstedt, 1971). No obstante, solo la población dopaminérgica A10 pertenece al sistema mesolímbico y participa en la regulación de las conductas motivadas (Alcaro et al., 2007)

Las células A10 en el ATV son el origen del sistema mesolímbico dopaminérgico. Estas células se encuentran en el mesencéfalo, donde proyecciones ascendentes vía el haz medial del cerebro anterior llegan a regiones del telencéfalo (Numan y Stolzenberg, 2009). Por ejemplo, el ATV tienen eferencias en núcleo accumbens, la amígdala, el hipocampo, la corteza prefrontal y el *pallidum ventral* (Figura 3; Alcaro et al., 2007; Ikemoto, 2010). Cada una de estas estructuras participa en la regulación de procesos cognitivos, en la recompensa y la motivación, provocando patrones conductuales específicos (Wise 2002; Alcaro et al., 2007; Ikemoto, 2010). Es decir, en este sistema se define el comportamiento a partir de lo que nos gusta y lo que no (Pierce y Kumaresan, 2006).

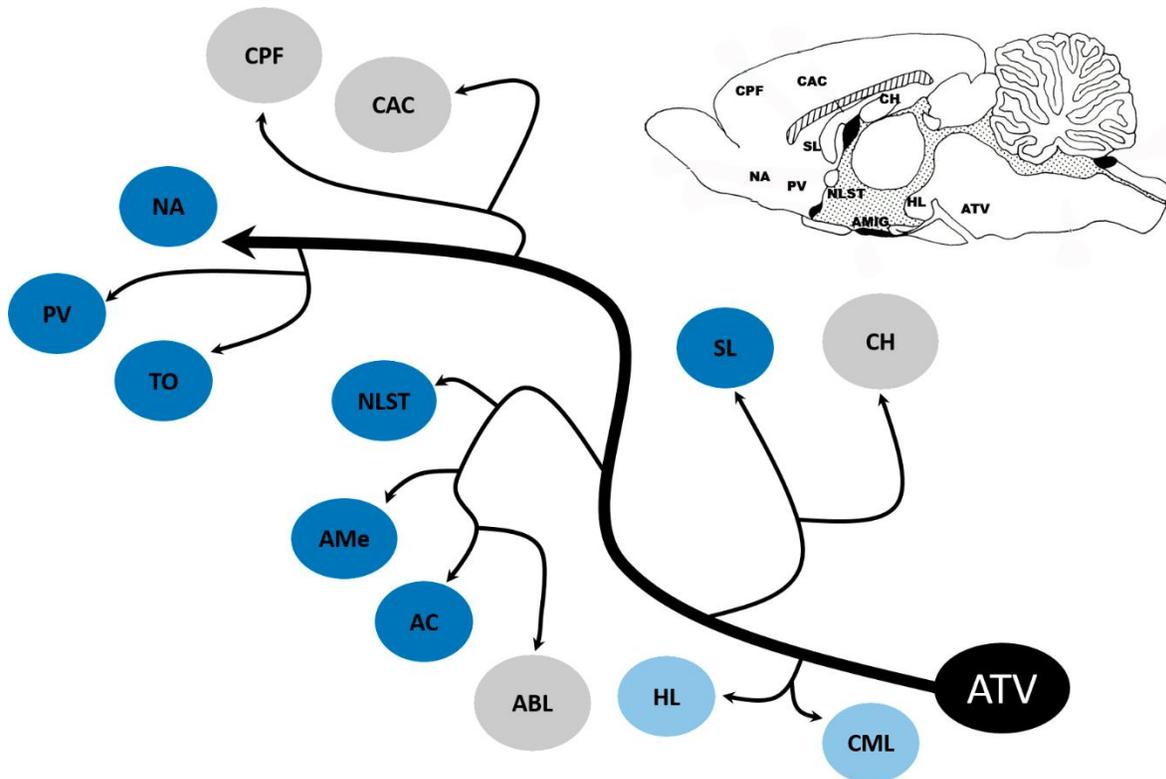


Figura 3. Sistema mesolímbico dopaminérgico. La figura muestra una representación esquemática de las estructuras que integran el sistema mesolímbico dopaminérgico en el cerebro de rata (parte superior derecha) y su conexión. De acuerdo a su anatomía y criterio evolutivo, las estructuras inervadas por el sistema mesolímbico dopaminérgico están divididas en diencéfalicas (círculos azul claro), prosencéfalicas basales (azul marino), prosencéfalicas superiores (grises). Mesencéfalo: ATV (área tegmental ventral). Diencéfalo: HL (hipotálamo lateral), CML (cuerpo mamilar lateral). Prosencéfalo basal: AMe (amígdala medial), AC (amígdala central), NLST (núcleo lecho de la estría terminal), SL (septum lateral), TO (tubérculo olfatorio), PV (*pallidum ventral*), NA (*núcleo accumbens*). Prosencéfalo superior: ABL (amígdala basolateral), CH (complejo hipocampal), CAC (corteza anterior del cíngulo), CPF (corteza prefrontal). Modificada de Alcaro et al., 2007.

En el caso de la conducta materna en la rata, se ha propuesto que la motivación materna es consecuencia de la interacción de la conexión APO/NBET con el ATV (Numan, 2007; Numan y Stolzenberg, 2009). A partir de esta conexión, el flujo de información de las células dopaminérgicas del ATV pasa tanto al núcleo accumbens como a la corteza prefrontal generando la respuesta materna voluntaria, es decir una conducta proactiva (Numan et al., 2006; Numan y Stolzenberg, 2009; Numan y Stolzenberg, 2011). Estos estudios anatómicos muestran la importancia de la neurotransmisión dopaminérgica en la conexión APO/NBET, ATV y núcleo accumbens, en la regulación de la conducta materna en la rata. El aumento de la neurotransmisión dopaminérgica efecto de la interacción madre-cría es la base de la motivación materna (Numan, 2007; Pereira et al., 2008). Sin embargo, las células dopaminérgicas del ATV reciben aferencias de otros mediadores como GABA y péptidos

opioides (Wise, 2002), los cuales tienen un efecto sobre la neurotransmisión dopaminérgica. Por lo cual, tanto GABA como los péptidos opioides también participan de manera directa o indirecta en los procesos de motivación y recompensa (Wise, 2005; Merrer et al., 2009) incluida la conducta materna.

2.6. La conducta materna en el conejo

La conducta materna en los conejos se inicia en la última etapa de la gestación con la construcción del nido dentro de una madriguera con materiales como pelo que la madre arranca de su pecho y paja (Zarrow et al., 1965). De esta manera la coneja puede mantener la temperatura de los gazapos, que son altriciales (Rosenblatt y Snowdon, 1996). Este inicio de la conducta materna tiene una base hormonal y son el estradiol, la progesterona, la prolactina y la testosterona las hormonas que participan en el proceso de construcción del nido (González-Mariscal, 2001; González-Mariscal et al., 2004).

Después del parto, la conducta materna del conejo se restringe a un único, espontáneo y breve (3 a 5 min) evento de amamantamiento diario (Zarrow et al., 1965; Jilge, 1995). Se ha calculado que, en este breve evento, los gazapos consumen hasta el 30% de su peso corporal en leche en espera del próximo episodio de amamantamiento (Rovirosa et al., 2003; González-Mariscal et al., 2004). Durante el amamantamiento la madre adopta una postura (dorsoflexión) que permite a los gazapos tener acceso a los pezones. Al final, el amamantamiento es interrumpido abruptamente, y la madre salta fuera del nido dejando a sus gazapos (González-Mariscal, 2001).

La conducta materna del conejo después del parto representa un modelo ideal para estudiar el amamantamiento de manera aislada, sin los otros componentes conductuales que existen en por ejemplo los roedores. Previamente se ha reportado que el APO y el SL son clave en la expresión del amamantamiento. Esto se demostró por la detección y cuantificación de la proteína FOS, un indicador de activación neuronal, en el APO y SL por efecto del amamantamiento (González-Mariscal et al., 2009). La detección de esta proteína se considera una herramienta muy utilizada en la investigación para determinar estructuras que participan en la regulación materna (Fleming et al., 1974; Numan y Numan, 1994). Por otro lado, en nuestro laboratorio recientemente se demostró que el amamantamiento induce un ritmo en la expresión de la proteína reloj PER1 en el APO y el SL (Figura 4; Meza et al.,

2015). Esto sugiere que ambas estructuras se involucran en la temporalidad con la que se presenta el amamantamiento. Este ritmo de PER1 por efecto del amamantamiento, también se presenta en las células de dopamina de la vía tuberoinfundibular dopaminérgica, importantes para la producción de prolactina (Meza et al., 2011). Además, se presenta también en las células de oxitocina de los núcleos supraóptico y preventricular del hipotálamo, que ayudan a la expulsión de la leche (Meza et al., 2008). No obstante, el amamantamiento no altera el ritmo de PER1 en el núcleo supraquiasmático, reloj maestro del organismo, quien rige el ciclo sueño vigilia. Ni en la región incertohipotalámica, donde células de dopamina favorecen procesos de adicción y movilidad (Meza et al., 2011). En este contexto es importante señalar que el efecto del amamantamiento en la coneja, solo se sincroniza en estructuras relevantes en la conducta materna. Sin embargo, aún no se establece que efecto permite que el amamantamiento en la coneja presente una temporalidad cercana a las 24 h (Meza et al., 2015).

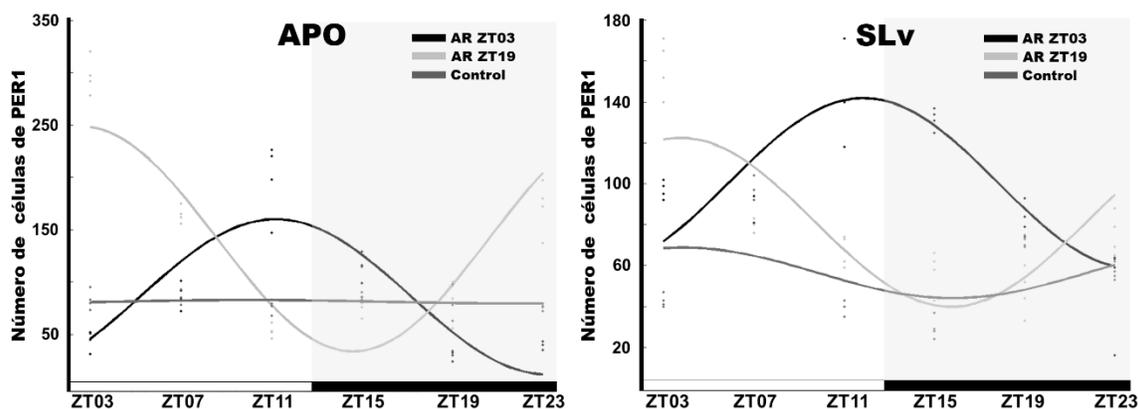


Figura 4. Representación de un análisis de cosinor para la expresión de PER1 en el APO y el SL en su porción ventral (SLv). El análisis de cosinor mostró que las conejas que amamantaron (AR ZT03; AR ZT19) presentan un ritmo en la expresión de PER1 en comparación con el control, con una acrofase 8 h después del amamantamiento, independientemente de la hora (ZT03 ó ZT19) en la que se estableció. El eje "X" representa el ciclo luz oscuridad en el que se mantenían las hembras. AR: amamantamiento restringido, ZT: zeitgeber time (tiempo de sincronización). Modificado de Meza et al., 2015.

La periodicidad con la que se presenta el amamantamiento y el tiempo que la madre permanece en el nido se correlaciona con el número de gazapos de la camada (González-Mariscal et al., 2013). Cuando la camada es menor a cinco gazapos la periodicidad circadiana se pierde y la coneja entre intermite mente al nido. Esto efecto, permite suponer que la temporalidad del amamantamiento en el conejo se debe a la estimulación de los gazapos.

Además, considerando que el retorno espontáneo de la madre al nido es una conducta proactiva (Olazábal et al., 2013b), y que antes del amamantamiento se incrementa la conducta locomotora (Meza et al., 2008) se puede suponer que la conducta materna en el conejo es una conducta motivada, donde la estimulación de los gazapos desempeña un papel esencial.

Teniendo en cuenta que, en los roedores durante la fase apetitiva de las conductas motivadas, como la conducta sexual y la alimentación, se observa un aumento de la neurotransmisión dopaminérgica en el ATV (Pfaus y Phillips, 1991; Balfour et al., 2006) analizamos si en la fase previa al amamantamiento en la coneja hay un aumento de actividad en las células dopaminérgicas del ATV, así como en el sistema mesolímbico

3. Planteamiento del problema

La conducta materna en los roedores es considerada una conducta motivada ya que la madre busca la interacción con la cría (Numan, 2007; Pereira et al., 2008). En el conejo, la conducta materna se restringe a un espontáneo y breve episodio de amamantamiento diario (Zarrow et al., 1965; Gilge, 1995). Este único evento de amamantamiento sincroniza estructuras cerebrales como el APO y el SL importantes en la regulación de la conducta materna (Meza et al., 2015). Reportes previos han mostrado que antes del amamantamiento la coneja aumenta la actividad locomotora (Meza et al., 2008). Este incremento en la actividad motora junto al espontáneo retorno de la madre al nido sugiere que la coneja presenta motivación por estar con sus crías. Sin embargo, esto no ha sido comprobado. Debido a que la activación de las células dopaminérgicas del sistema mesolímbico se considera está asociado a la motivación en esta investigación analizó la posible activación de estas células en el área A10. Además, se analizó también la posible activación de células no dopaminérgicas del sistema mesolímbico, esto es el ATV, corteza prefrontal y septum lateral, así como en el APO y SL que están involucrados en la conducta materna, antes y después del amamantamiento en la coneja. Con esto se busca explorar que efecto tiene el amamantamiento sobre las células dopaminérgicas del sistema mesolímbico en la coneja lactante. Además, si se está considerando que cuando la madre acude al nido está motivada entonces es posible que las células dopaminérgicas estén activas antes de dicho episodio. En general esta investigación busca contribuir al entendimiento del fenómeno circadiano de la lactancia en la coneja a través de explorarla desde un punto motivacional, no explorado anteriormente.

4. Hipótesis

- Durante la anticipación al amamantamiento se induce activación neuronal en las células dopaminérgicas del sistema mesolímbico, así como en las células de sus núcleos eferentes.
- El sistema mesolímbico de la coneja se activa consecuencia del estímulo de amamantamiento.

5. Objetivo

Analizar antes y después del amamantamiento la activación de las células dopaminérgicas y de núcleos del sistema mesolímbico y áreas relacionadas a la conducta materna en la coneja.

5.1. Objetivos específicos

1. Analizar el patrón de activación celular por efecto del amamantamiento en el ATV, núcleo accumbens y la corteza prefrontal, regiones que forman parte del sistema mesolímbico.
2. Analizar el patrón de activación celular por efecto del amamantamiento en el APO y el SL, regiones que regulan la conducta materna en el conejo y reciben aferencias del ATV.
3. Analizar la variación en la cantidad de células de dopamina en el sistema mesolímbico y por efecto del amamantamiento en la coneja lactante.
4. Analizar el patrón de activación por efecto del amamantamiento en la coneja lactante, en las poblaciones dopaminérgicas A10 y A10 rv que forman parte del ATV.

6. Materiales y métodos.

6.1. Sujetos experimentales y alojamiento

Se utilizaron 16 conejas (*Oryctolagus cuniculus*) de la raza Nueva Zelanda blancas de 3 a 3.5 Kg de peso. Los sujetos fueron alojados en condiciones controladas de luz/oscuridad (12: 12 h; 07:00 h encendido de la luz), temperatura constante $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ y libre acceso a agua y alimento; dentro del bioterio del Centro de Investigaciones Biomedicas de la Universidad Veracruzana, en Xalapa, Veracruz. Doce conejas fueron expuestas a un macho para ser preñadas y después fueron colocadas en cajas individuales de acero y se monitorearon durante los 28 a 30 días de gestación. Las cajas tienen dos compartimentos uno para la madre y otro para el nido (0.60 m ancho, 0.50 m largo y 0.40 m alto, dimensiones de ambos), conectados por un túnel (0.25 m ancho, 0.50 m largo y 0.40 m alto) con puertas móviles en cada entrada. Para corroborar el aumento de la actividad motora previo al amamantamiento de acuerdo a lo descrito en protocolos previos (Meza et al., 2008, 2011), en la parte superior de cada compartimento se colocaron detectores infrarrojos que monitorearon la actividad motora de los sujetos las 24 horas.

El día 20 de gestación, las 12 hembras gestantes y el control tuvieron libre acceso al compartimento del nido y se les proporciono 300g de paja para la construcción del nido. El día del parto (DP0), las camadas fueron ajustadas a cinco o seis gazapos por hembra lactante y las puertas que conectan los compartimentos fueron cerradas.

Todos los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo a las especificaciones de la NOM-062-ZOO-1999, así como del Statement of Assurance with Standards of Human Care, y del Use of Laboratory animals del NIH de los EE.UU

6.2. Grupos experimentales

A partir del DP1 y hasta el DP7, la puerta fue abierta a las conejas a las 02:00 h; horario seleccionado por la cercanía al horario natural de amamantamiento de los conejos (Caba y González-Mariscal, 2009; González-Mariscal et al., 2013). Al abrir las puertas las hembras entraron al nido, observándose una duración promedio del amamantamiento de 225 ± 3 s. En el DP7 los sujetos se sacrificaron en tres distintos horarios. Un grupo se sacrificó 12 h antes

del amamantamiento (12h Pre-A; n = 4), otro grupo fue sacrificado justo antes del amamantamiento (Pre-A; n = 4) y otro grupo se sacrificó 90 min después del último amamantamiento (Post-A; n = 4). Como control se utilizaron conejas vírgenes alojadas en condiciones idénticas a las hembras lactantes, pero no estuvieron expuestas a los gazapos y fueron sacrificadas a las 03:30 h (Control; n = 4).

6.3. Perfusión e inmunohistoquímica

Los sujetos fueron eutanizados con una sobredosis de pentobarbital sódico (60 mg/Kg, IV) y se les realizó una perfusión intracardiaca con solución salina (0.9%) y paraformaldehído al 4% en buffer de fosfato (BF). El encéfalo fue extraído y colocado en soluciones de crioprotección de sacarosa al 10%, 20% y 30% sucesivamente. Luego de la crioprotección, el cerebro fue seccionado coronalmente a 50 μm de grosor, utilizando un criostato (Microm[®], Walldorf, Germany) a -23 ± 2 °C. Las secciones fueron colocadas en solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M a pH 7.4, y recolectadas a partir de núcleo olfatorio anterior y hasta la última porción del ATV a nivel del núcleo pontino. Las secciones fueron sometidas a una serie de lavados con solución amortiguadora de fosfatos para eliminar el exceso de aldehídos y colocadas durante 10 min en H₂O₂ al 0.5% para inactivar la peroxidasa endógena. Después el tejido se preincubó en suero normal de caballo (Vector Lab, Burlingame CA USA) al 3% durante una hora, luego se le colocó el anticuerpo policlonal anti-FOS hecho en cabra (sc-52-G, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz CA, USA) diluido 1:5000 en BF con tritón (Triton X-100, Sigma-Aldrich) al 0.3%. Al pasar 48 h de la incubación, el tejido fue lavado tres veces con solución de fosfatos e incubado con un anticuerpo biotinilado anti-cabra hecho en caballo (Vector Lab) diluido 1:200. Después de una hora el tejido se lavó 3 veces con BF y se incubó con un compuesto de avidina-biotina y peroxidasa de rábano (ABC kit; Vector Lab) durante 1 h. El marcaje pudo visualizarse utilizando diaminobencidina (DAB; Polyscience Inc., Warrington PA, USA) al 0.05% en BF con sales de níquel y cobalto 10 mg/ml (Fisher Scientific, Pittsburgh, USA) y H₂O₂ al 0.01% como sustrato. La reacción de revelado se detuvo pasando el tejido a una solución de fosfatos.

Para determinar la expresión de FOS en las células dopaminérgicas de los grupos celulares A10 y A10 rv, el tejido fue incubado con anti-tirosina hidroxilasa (MAB 318; Chemicon Int Inc., TemelUCA CA, USA) diluido 1:1000. Luego de 24 h de incubación, el

tejido se colocó con un anticuerpo biotinilado anti-ratón (Vector Lab) diluido 1:250. Después de 1h fue pasado al complejo ABC. Las células inmunoreactivas a tirosina hidroxilasa (TH-ir) fueron reveladas con DAB al 0.05% y H₂O₂ al 0.01%, observándose un precipitado color café.

Al final del marcaje el tejido se montó en portaobjetos gelatinizados y se deshidrató en etanol al 100%. Al portaobjetos se les colocó Permount y un cubreobjetos para su observación

6.4. Cuantificación del marcaje

Las secciones fueron analizadas con un microscopio de campo claro Olympus BX41 (Olympus, Tokio, Japón). Las células inmunoreactivas a FOS se observaron como un precipitado color negro en el núcleo. Las células inmunoreactivas a TH se observaron como un precipitado color marrón citoplasmático. Para la cuantificación del marcaje nuclear y citoplasmático se determinó la densidad óptica de una región de fondo sin marcaje y se comparó con la intensidad de color de cada marca. Utilizando el software Image-Pro Premier 9.2 (Media Cybernetics) se determinó que células que excedieron 5 veces o más la densidad óptica del fondo se consideraron positivas. En el caso de los dobles marcajes, FOS/TH se determinó el porcentaje de células dobles inmunoreactivas FOS/TH.

La localización de las estructuras cerebrales se determinó según el atlas estereotáxico de Girgis y Shi-Chang (1981), y utilizando trabajos anteriores donde se utilizó cerebro de conejo adulto (Meza et al., 2008; Meza et al., 2011; Meza et al., 2015). Para la corteza prefrontal, por lo extenso de la estructura, el análisis inició a partir de la corteza del cíngulo y hasta la región infralímbica y se seleccionó un área de conteo de 4.5 mm² (Figura 9A). En el núcleo accumbens se analizó la parte medial del núcleo, donde las dos subregiones del accumbens, central y exterior se acercan en proporción. Se determinó analizar un área de 1.21 mm² para el núcleo accumbens central y 1.970 mm² para el accumbens exterior (Figura 8A). El análisis del APO se realizó, tanto en la zona periventricular como en la zona medial, similar a estudios previos (Gonzalez-Mariscal et al., 2009; Meza et al., 2015), para lo cual se seleccionó un área de 1.913 mm² (figura 10A). El SL, se analizó en su porción ventral SLv con un área de 0.313 mm² (figura 11A), debido a que no hubo marcaje en la parte dorsal ni en la porción intermedia. Para la porción A10 que corresponde al ATV, se analizó un área de

2.46 mm², y para su proyección rostro ventral A10 rv un área de 1.165 mm² (figuras 6A y 7A). Las regiones seleccionadas corresponden a los niveles: Anterior (A) 5.5 mm para la corteza prefrontal, A4.5 mm para el núcleo accumbens, A1.5 para el SLv, A2 para el APO, Posterior (P) 5 mm y P6 mm para A10 rv y para el A10, según el atlas estereotáxico de conejo de Girgis y Chi-Chang, 1981.

6.5. Análisis estadístico

El análisis del número de células que expresaron FOS y de los porcentajes de células FOS/TH, se realizó mediante un análisis de varianza de una vía. Para las pruebas donde se observó diferencias significativas se realizó un análisis *post hoc* Tukey-Kramer. Las pruebas corrieron en el software Sigma Plot 10.0 con los complementos Stat habilitados. Los valores de probabilidad $P \leq 0.05$ fueron considerados significativos. Las gráficas de los resultados se muestran como la media (\bar{X}) \pm el error estándar (E.E.). Para determinar la normalidad de los datos se utilizó una prueba de Kolmogorov-Smirnov, los valores de $P > 0.05$ se consideraron normales. Los datos que fallaron en los supuestos de homogeneidad de varianza y normalidad fueron ranqueados (Conover e Iman, 1989).

7. Resultados

7.1. Actividad locomotora

La figura 5 muestra la actividad motora de una coneja lactante durante siete días. Similar a lo reportado previamente (Meza et al., 2008), se observó un aumento en la actividad motora antes del amamantamiento. Este efecto se observó más claramente a partir del DP3, cuando los sujetos estaban sincronizados con el horario del amamantamiento.

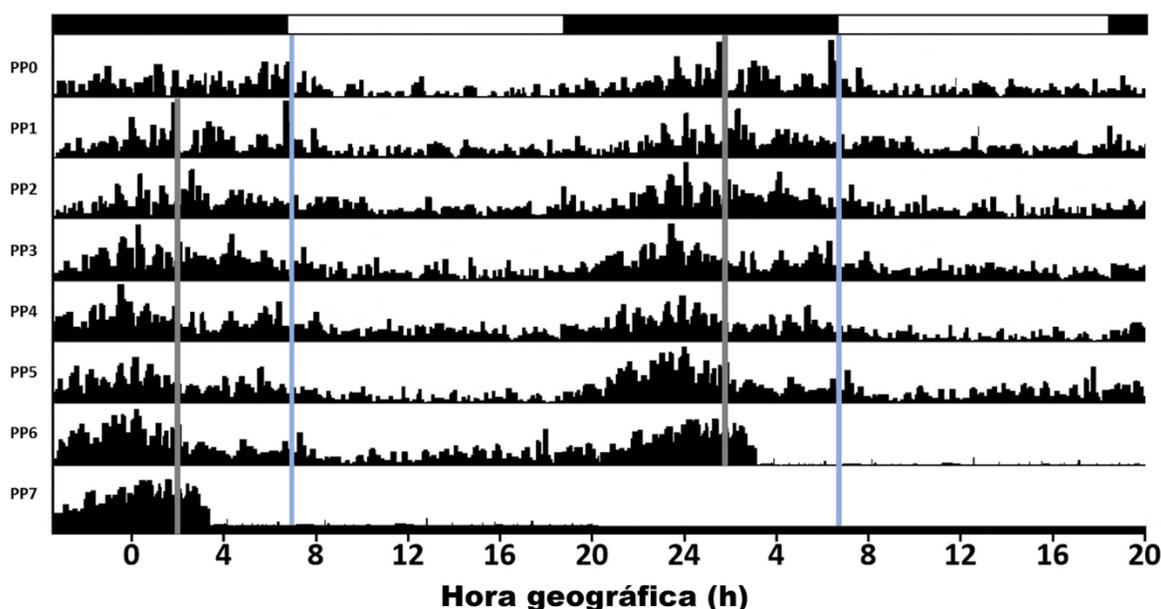


Figura 5. Representación de la actividad locomotora de una coneja lactante. El actograma de doble ploteo muestra la actividad locomotora de una coneja lactante que amamanta en un horario nocturno 02:00 h. La barra superior en blanco y negro representa el ciclo luz/oscuridad (12/12 h). La escala en el eje "X" representa la hora geográfica en 24 h. La línea vertical gris representa el horario del amamantamiento (02:00 h). La línea vertical azul representa el encendido de la luz (07:00 h). DP0, representa el día del parto y DP1 el primer día de amamantamiento. DP: día postparto.

7.2. FOS en el ATV, A10 rv, núcleo accumbens, corteza prefrontal, APO y SLv

En todos los grupos y en todas las estructuras analizadas se observó la expresión de la proteína FOS. El patrón de expresión varió entre las distintas regiones neurales, no obstante, en la mayoría de las estructuras analizadas, se observó un incremento en la expresión de FOS previo al amamantamiento, efecto que se incrementó después del amamantamiento. En el caso de la corteza prefrontal se observó el aumento FOS comparado con el control se mantuvo incluso después del amamantamiento, sin embargo, este aumento no se modificó después de recibir el estímulo de la succión.

7.2.1. ATV

La figura 6 muestra la expresión de FOS en el ATV en el control y en las conejas lactantes. El análisis cuantitativo indicó que la expresión de FOS vario significativamente entre grupos ($F_{3,12} = 104.189$; $P < 0.001$; Figura 6B). Los grupos Pre-Amamantamiento y Post-Amamantamiento tuvieron una alta expresión de FOS comparadas con los grupos 12h Pre-Amamantamiento y Control ($P < 0.001$). Sin embargo, el grupo Post-Amamantamiento mostro una mayor expresión comparado con el grupo Pre-Amamantamiento ($P < 0.001$).

7.2.2. A10rv

La figura 7 muestra la expresión de FOS dentro de A10 rv en las conejas lactantes y el grupo control. El análisis cuantitativo indicó que la expresión de FOS vario significativamente entre grupos ($F_{3,12} = 321.802$; $P < 0.001$; Figura 7B). Los grupos Pre- y Post-Amamantamiento tuvieron una alta expresión de FOS comparados con los grupos 12h Pre-Amamantamiento y Control ($P < 0.002$), este efecto fue mayor en el grupo Post-Amamantamiento en comparación con el grupo Pre-Amamantamiento ($P < 0.001$).

7.2.3 Núcleo accumbens

La figura 8 muestra la expresión de FOS en el núcleo accumbens en hembras el grupo control y en las hembras lactantes. El análisis cuantitativo indicó que la expresión de FOS en el accumbens central varió significativamente entre los grupos ($F_{3,12} = 143.458$; $P < 0.001$; Figura 8B). Los grupos Pre- y Post-Amamantamiento tuvieron una mayor expresión de FOS comparado con los grupos 12h Pre-Amamantamiento y Control ($P < 0.01$). No obstante, el grupo Post- tuvo mayor expresión en comparación con Pre-Amamantamiento ($P < 0.001$). El análisis cuantitativo mostró que en el NA exterior la expresión de FOS vario significativamente entre grupos ($F_{3,12} = 78.404$; $P < 0.001$; Figura 8B) Los grupos Pre- y Post-Amamantamiento tuvieron una mayor expresión de FOS comparados contra los grupos 12h Pre-Amamantamiento y Control ($P < 0.001$). Sin embargo, el grupo Post- mostró una mayor expresión comparado con el grupo Pre-Amamantamiento ($P < 0.001$).

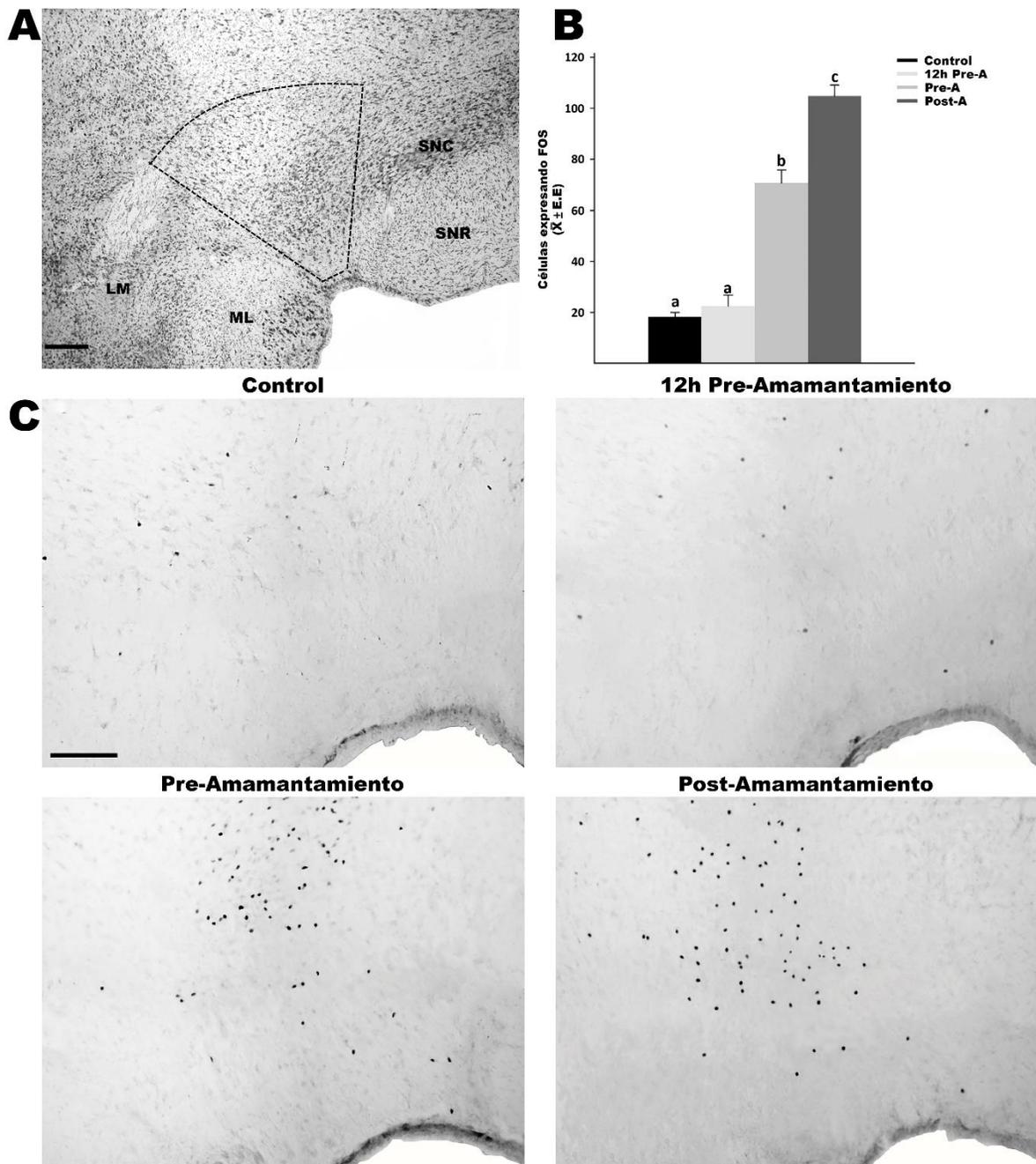


Figura 6. Expresión de FOS en el ATV. (A) Fotomicrografía (tinción con tionina) muestra la localización del ATV; las líneas discontinuas delimitan el área de conteo. Barra de escala 300 μ m. (B) Células expresando FOS en los grupos Control, 12h Pre-, Pre- y Post-Amamantamiento; diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0.001$) entre grupos ($n = 4$, para cada grupo); ver el texto para detalles. Los valores se muestran como la media \pm error estándar (E.E.). (C) Fotomicrografías de una sección representativa del ATV de los grupos Control, 12h Pre-, Pre- y Post-Amamantamiento. Barra de escala 100 μ m. LM: núcleo lateral medial, ML: núcleo mamilar lateral, SNC: sustancia nigra compacta, SNR: sustancia nigra reticular.

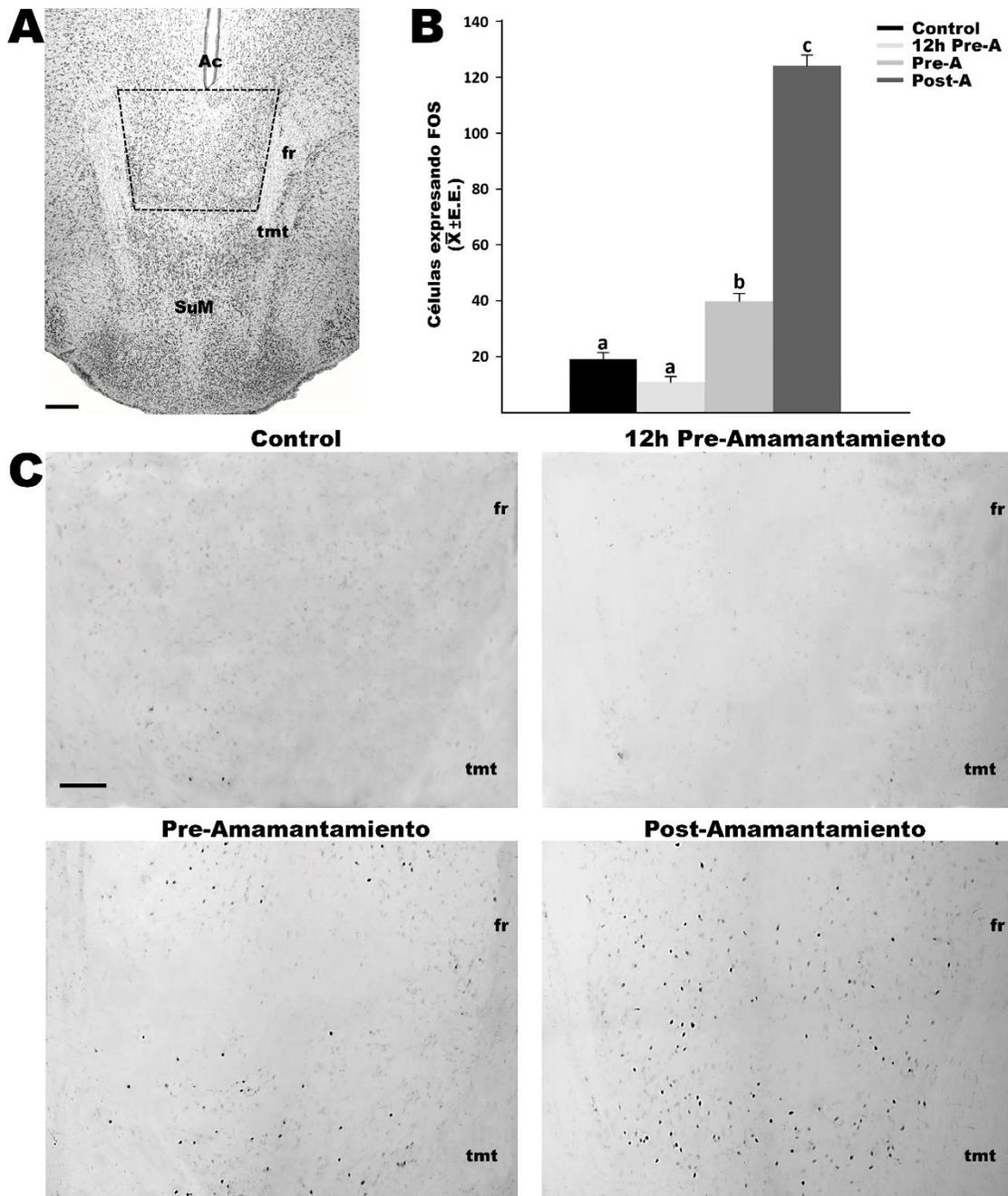


Figura 7. Expresión de FOS en el A10rv. (A) Fotomicrografía (tinción de tionina) que muestra la localización del Arv; la línea discontinua delimita el área contada. Barra de escala 300 μ m. (B) Células expresando FOS en los grupos Control, 12h Pre-, Pre- y Post-Amamantamiento; diferentes letras indican diferencia significativa ($P < 0.002$) entre grupos ($n = 4$, para cada grupo); ver el texto para detalles. Los valores se muestran como la media \pm E.E. (C) Fotomicrografías de una sección representativa del A10rv de los grupos Control, 12h Pre-, Pre- y Post-Amamantamiento. Barra de escala 100 μ m. Ac: acueducto, fr: *fasiculus retroflexus*, SuM: núcleo supramamilar, tmt: tracto mamilotegmental.

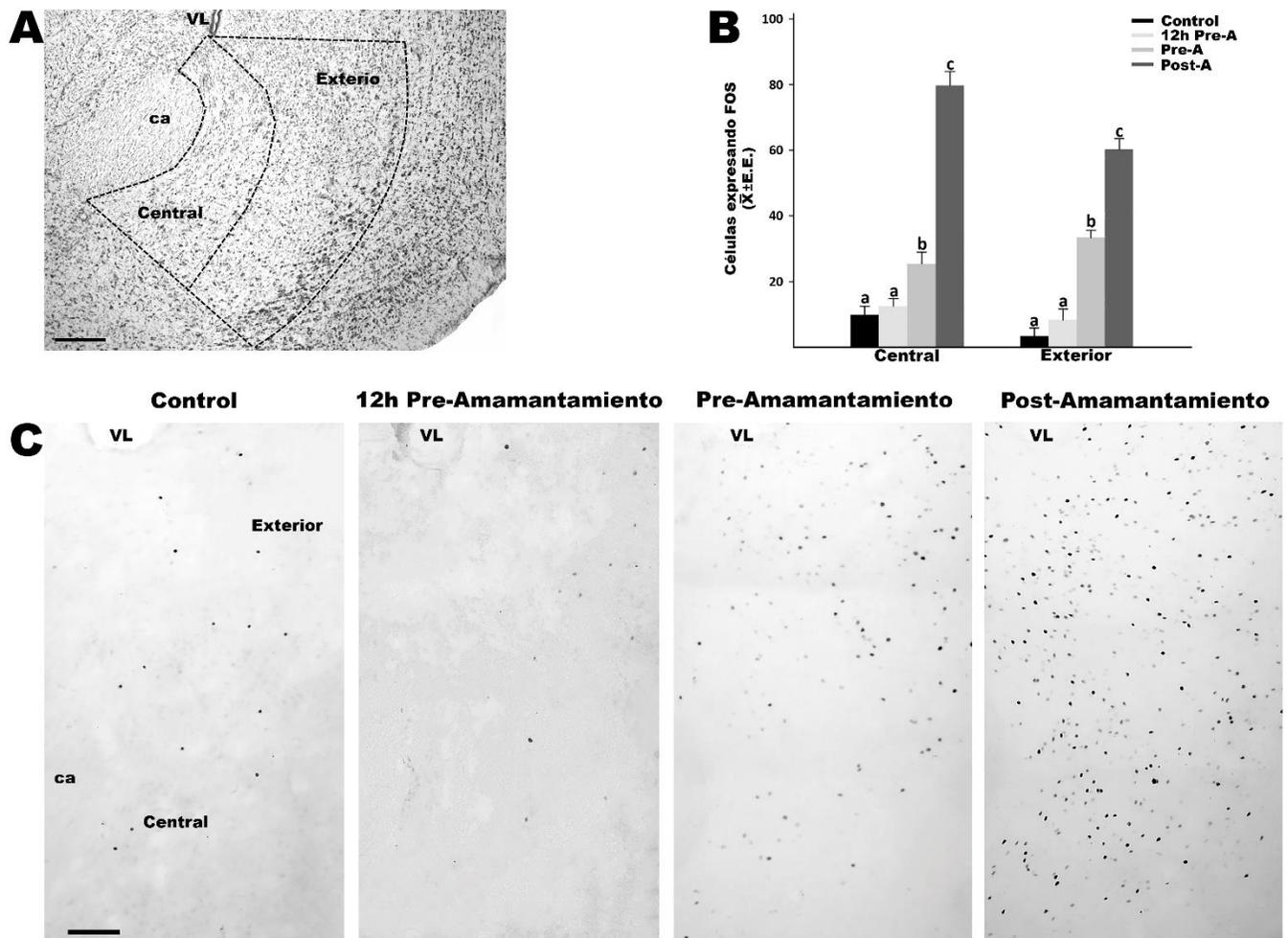


Figura 8. Expresión de FOS en el núcleo accumbens. (A) Fotomicrografía (tinción de tionina) que muestra la localización del núcleo accumbens; la línea discontinua delimita el área contada para el accumbens central y accumbens exterior. Barra de escala 300 μ m. (B) Células expresando FOS en el núcleo accumbens central y exterior, en los grupos Control, 12h Pre-, Pre- y Post-Amamantamiento; diferentes letras indican diferencia significativa ($P < 0.01$) entre grupos ($n = 4$, para cada grupo); ver el texto para detalles. Los valores se muestran como la media \pm el E.E. (C) Fotomicrografías de una sección representativa del núcleo accumbens de los grupos Control, 12h Pre-, Pre- y Post-Amamantamiento. Barra de escala 100 μ m. ca: comisura anterior, VL: ventrículo lateral.

7.2.4. Corteza prefrontal

En la figura 9 se muestra la expresión de FOS en la CPF en los grupos Control y de hembras lactantes. El análisis estadístico indicó diferencias significativas en la expresión de FOS entre grupos ($F_{3,12} = 138.579$; $P < 0.001$; Figura 9B). Los grupos Pre- y Post-Amamantamiento mostraron una mayor expresión de FOS comparado con los grupos 12h Pre-Amamantamiento y Control ($P < 0.001$), pero no se observó diferencia entre los grupos Pre- y Post-Amamantamiento ($P = 0.167$)

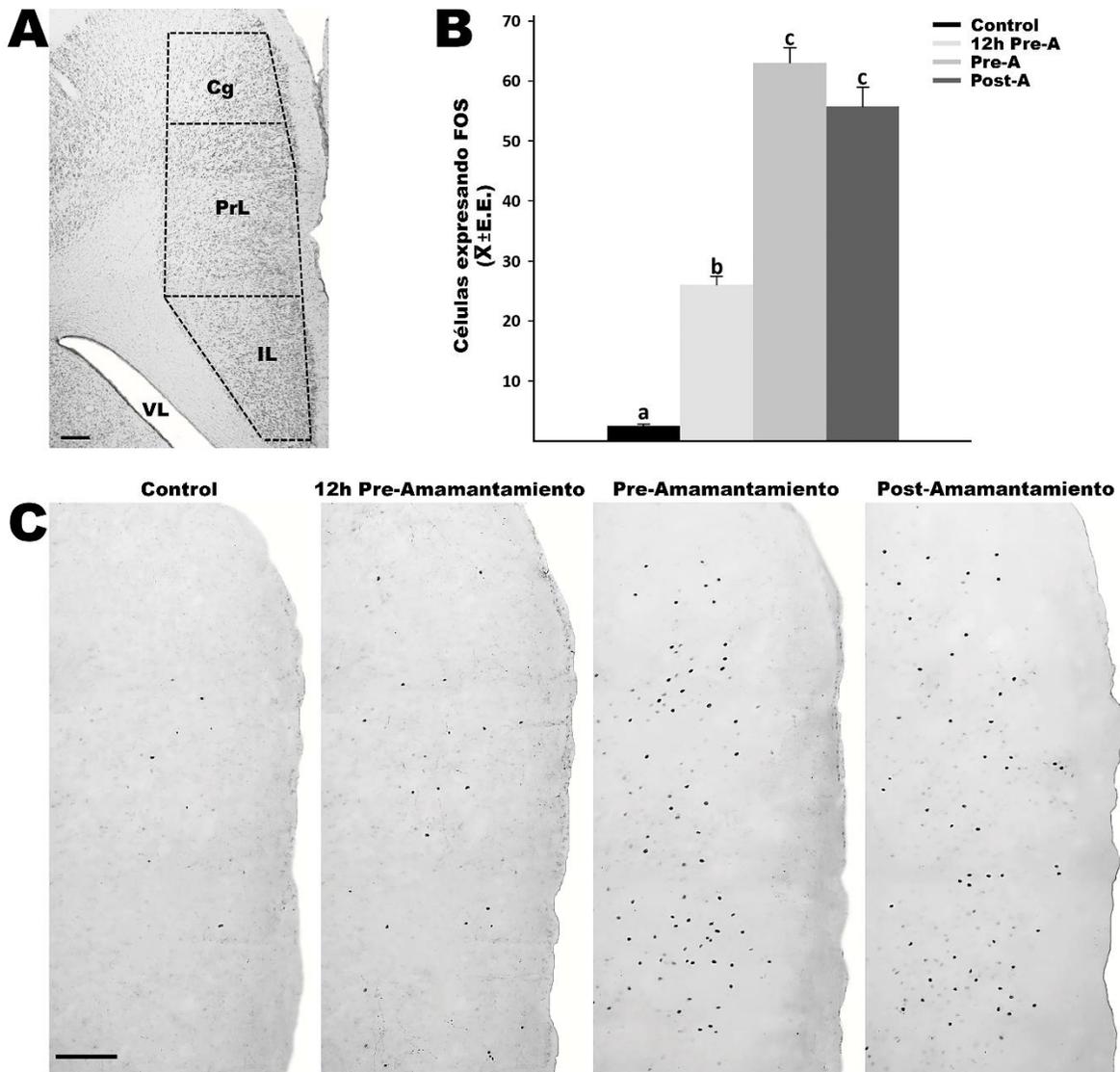


Figura 9. Expresión de FOS en la corteza prefrontal. (A) Fotomicrografía (tinción de tionina) donde se muestra la localización de la corteza prefrontal; las líneas discontinuas delimitan las regiones de la corteza prefrontal donde se realizó el conteo. Barra de escala 300 μ m. (B) Células expresando FOS en la corteza prefrontal de los grupos Control, 12h Pre-, Pre- y Post-Amamantamiento; diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0.001$) entre grupos ($n = 4$, para cada grupo); ver el texto para detalles. Los valores se muestran como la media \pm el E.E. (C) Fotomicrografías de una sección representativa de la corteza prefrontal de los grupos Control, 12h Pre-, Pre- y Post-Amamantamiento. Barra de escala 100 μ m. Cg: corteza del cíngulo, IL: corteza infralímbica, PrL: corteza prelímbica, VL: ventrículo lateral.

7.2.5. APO

La figura 10 describe la expresión de FOS en el APO de los grupos Control y de hembras lactantes. El análisis cuantitativo reveló que la expresión de FOS vario significativamente entre grupos ($F_{3,12} = 756.552$; $P < 0.001$; Figura 10B). Las hembras lactantes mostraron una mayor expresión de FOS comparadas con el grupo Control ($P < 0.01$). En la comparación de

las hembras lactantes, el grupo Post- mostro una mayor expresión de FOS comparas contra ambos grupos Pre-Amamantamiento ($P < 0.001$), en los cuales no se observó diferencia ($P = 0.285$).

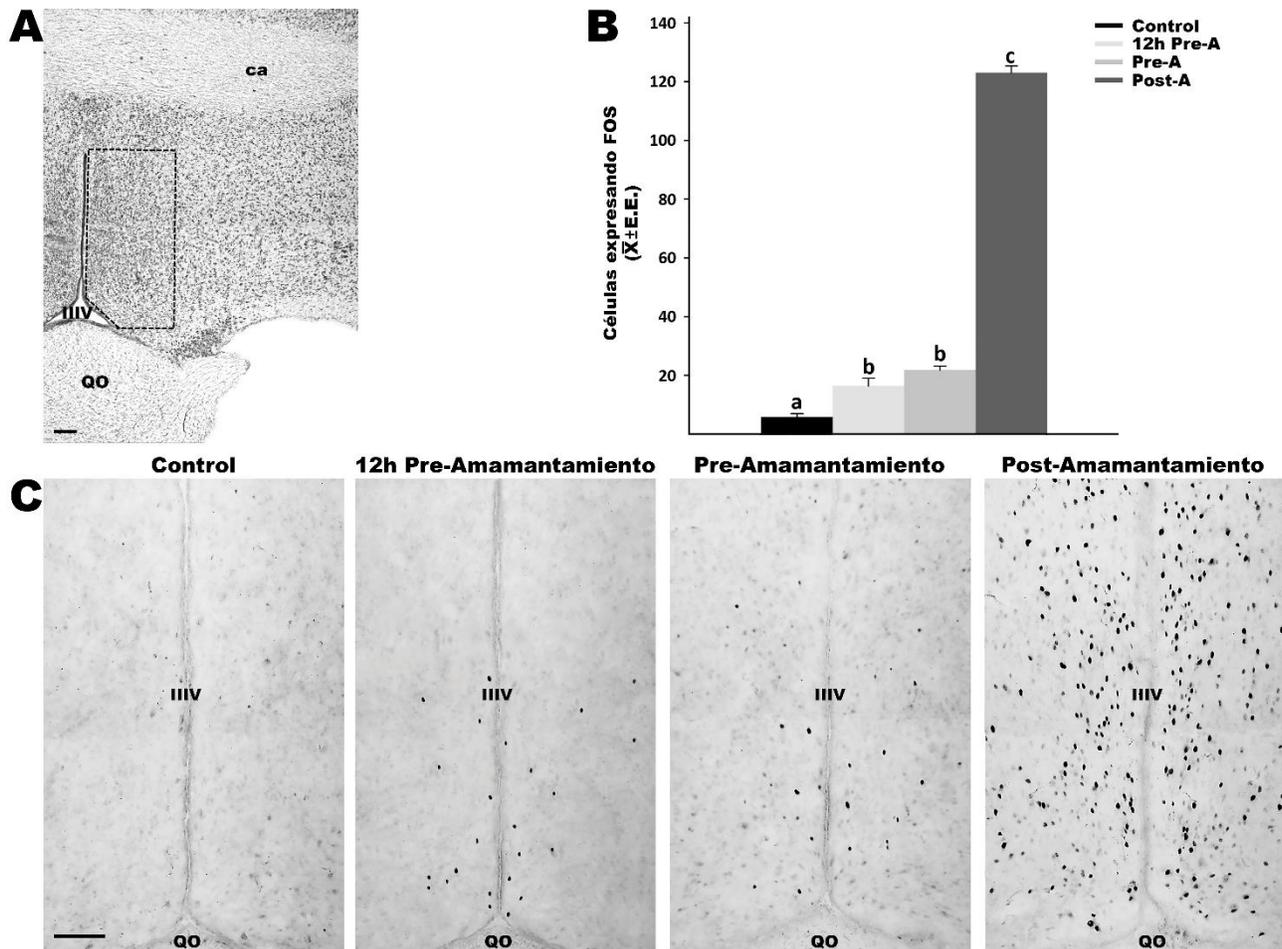


Figura 10. Expresión de FOS en el APO. (A) Fotomicrografía (tinción de tionina) donde se muestra la localización del APO; las líneas discontinuas delimitan en área contada. Barra de escala 300 μ m. (B) Células expresando FOS en el APO en los grupos Control, 12h Pre-, Pre- y Post-Amamantamiento; diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0.01$) entre grupos ($n = 4$, para cada grupo); ver el texto para detalles. Los valores se muestran como la media \pm el E.E. (C) Fotomicrografías de una sección representativa del APO de los grupos Control, 12h Pre-, Pre- y Post-Amamantamiento. Barra de escala 100 μ m. IIIIV: tercer ventrículo, ca: comisura anterior, QO: quiasma óptico.

7.2.6 SLv

En la figura 11 se observa la expresión de FOS en el SLv de los grupos Control y de hembras lactantes. El análisis cuantitativo indicó que la expresión de FOS vario significativamente entre grupos ($F_{3,12} = 2245.312$; $P < 0.001$; Figura 11B). Los grupos Pre- y Post-Amamantamiento tuvieron una mayor expresión de FOS comparados con los grupos 12h Pre-Amamantamiento y Control ($P < 0.001$), y este incremento fue mayor en las hebras Post-comparadas contra las Pre-Amamantamiento ($P < 0.001$).

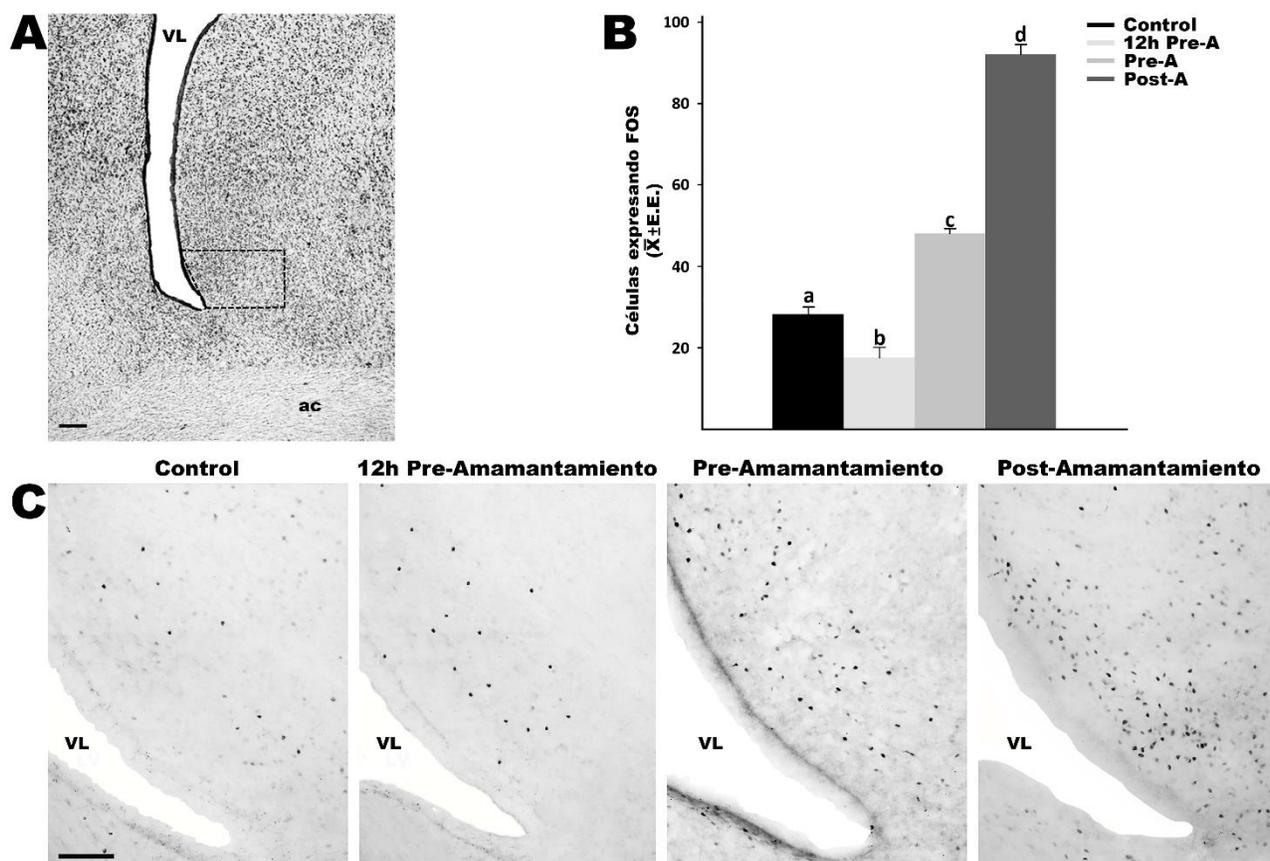


Figura 11. Expresión de FOS en el SLv. (A) Fotomicrografía (tinción de tionina) donde se muestra la localización del SLv; las líneas discontinuas delimitan el área contada. Barra de escala 300 μ m. (B) Células expresando FOS en el SLv en los grupos Control, 12h Pre-, Pre- y Post-Amamantamiento; letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.001$) entre grupos ($n = 4$, para cada grupo); ver el texto para detalles. Los valores se muestran como la media \pm el E.E. (C) Fotomicrografías de una sección representativa del SLv de los grupos Control, 12h Pre-, Pre- y Post-Amamantamiento. Barra de escala 100 μ m. ca: comisura anterior, VL: ventrículo lateral.

7.3. Expresión de FOS en las células dopaminérgicas del ATV y sus proyecciones.

El número de células dopaminérgicas de las poblaciones A10 ($F_{3,12} = 0.036$; $P = 0.990$) y A10 rv ($F_{3,12} = 0.105$; $P = 0.955$) no mostraron cambios entre los grupos, y solo algunas de estas células expresaron FOS en los grupos Control, 12h Pre-, Pre- y Post-Amamantamiento. No obstante, el porcentaje de células FOS/TH mostró un aumento durante la fase previa al amamantamiento efecto que se incrementó después que las hembras amamantan.

7.3.1. Células dopaminérgicas A10

La figura 12 muestra la co-expresando FOS/TH en la población dopaminérgica A10, en los grupos Control y de hembras lactantes. El análisis cuantitativo indicó que el porcentaje de células co-expresando FOS/TH dentro de la región A10 vario significativamente entre grupos ($F_{3,12} = 113.938$; $P < 0.001$; Figura 12C). Los grupos de conejas lactantes tuvieron un mayor porcentaje de células FOS/TH en comparación con el grupo control ($P < 0.001$). No obstante, las hembras Control mostraron un mayor porcentaje en comparación con los grupos 12h Pre- y Pre-Amamantamiento ($P < 0.001$).

7.3.2. Células dopaminérgicas A10 rv

La figura 12 muestra la co-expresión de FOS/TH en la población dopaminérgica A10 rv en los grupos Control y de conejas lactantes. El análisis cuantitativo indicó que el porcentaje de células que co-expresan FOS/TH en la región A10rv se modificó significativamente entre grupos ($F_{3,12} = 39.987$; $P < 0.001$; Figura 12D). Los grupos Pre- y Post- Amamantamiento tuvieron un mayor porcentaje de células FOS/TH en comparación con los grupos 12h Pre-Amamantamiento y Control ($P < 0.05$). Sin embargo, este aumento fue mayor en el grupo Post- en comparación con el grupo Pre-Amamantamiento ($P < 0.01$).

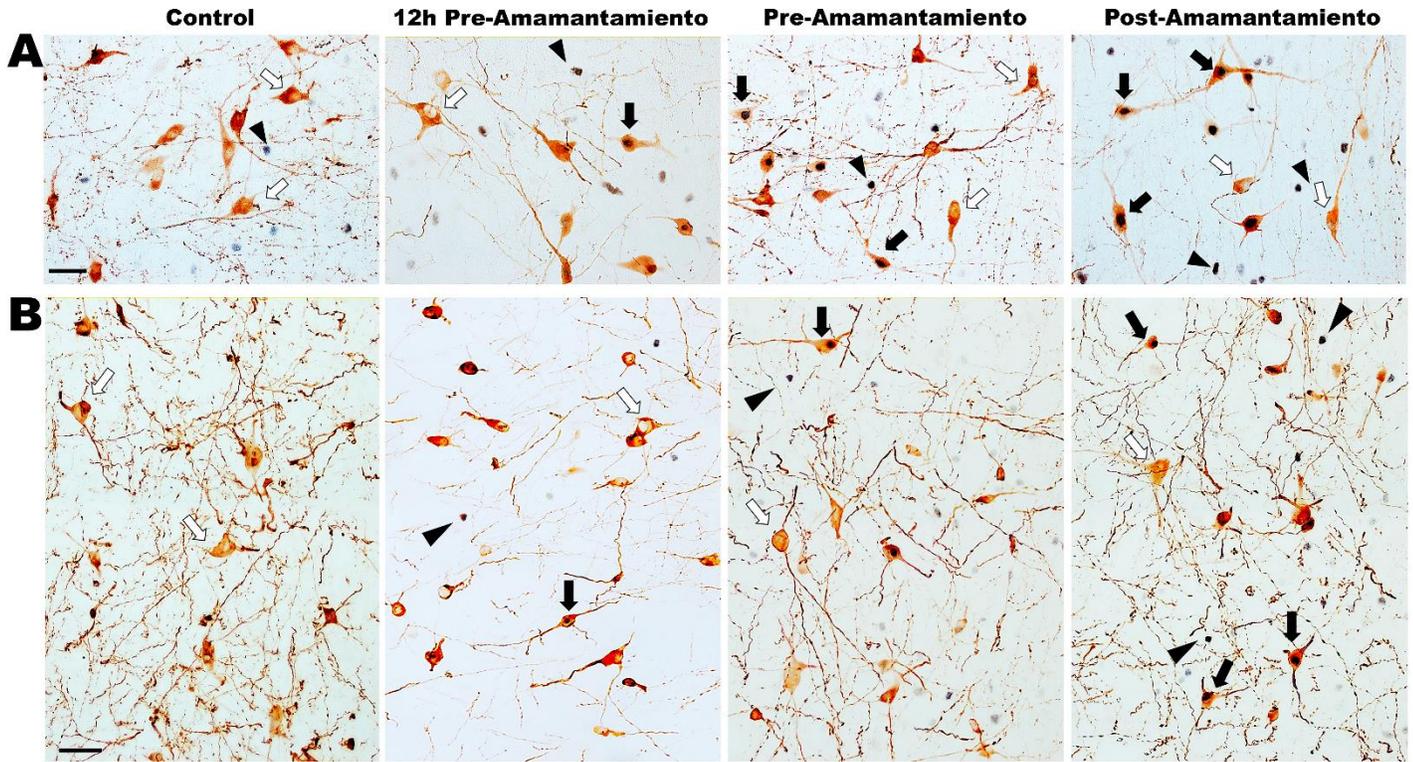
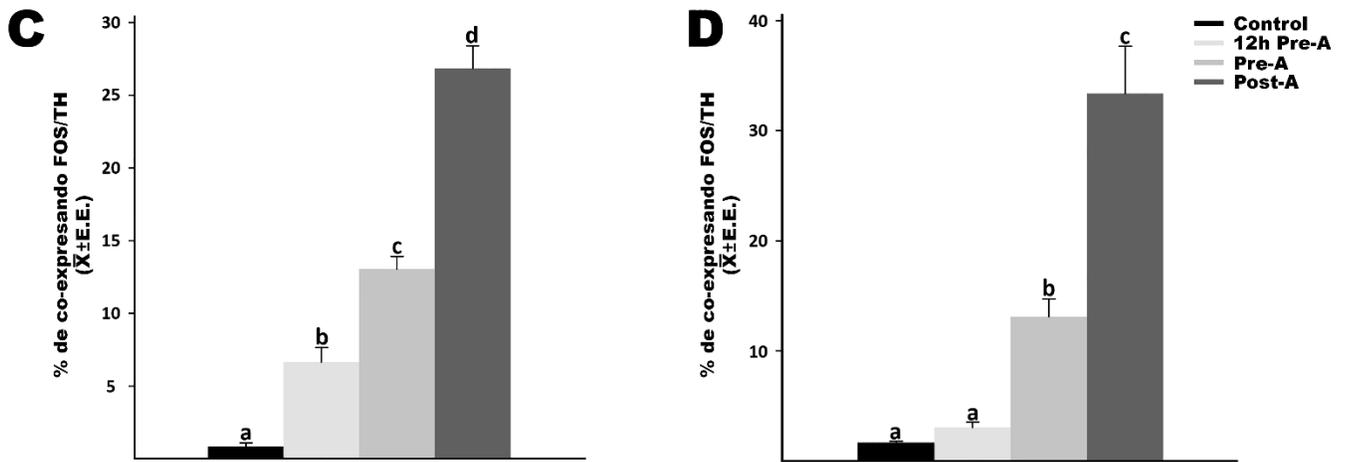


Figura 12. Co-expresión de FOS/TH en las células las poblaciones A10 y A10rv. Las fotomicrograffas muestran una sección representativa de las regiones A10 (A) y A10 rv de los grupos Control, 12h Pre-, Pre- y Post-Amamantamiento. Flechas negras: células FOS/TH, flechas blancas: células de TH, cabezas de flecha: FOS. Barra de escala 30 μm .



Porcentaje de células co-expresando FOS/TH en las poblaciones A10 (C) y A10 rv (D), en los grupos Control, 12h Pre-, Pre- y Post-Amamantamiento; diferentes letras indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre grupos ($n = 4$, para cada grupo); ver el texto para detalles.

8. Discusión

Los resultados de la investigación indican que el sistema mesolímbico dopaminérgico, participa en la regulación de la característica conducta materna del conejo. De acuerdo con la hipótesis, las células dopaminérgicas del ATV, el núcleo accumbens y la corteza prefrontal mostraron un incremento en la expresión de la proteína FOS antes del amamantamiento. Por otro lado, en la población dopaminérgica A10 y A10 rv se observó que el amamantamiento induce activación neuronal. Este resultado brinda la primera evidencia de la participación de la dopamina del sistema mesolímbico en la lactancia del conejo.

El sistema mesolímbico anticipa el amamantamiento. Los resultados indican que el ATV, la corteza prefrontal y el núcleo accumbens se activan previo al amamantamiento. En la rata, mediante un análisis electrofisiológico “*in vivo*” se demostró que en la fase apetitiva de una conducta motivada se activa el sistema mesolímbico (Jensen et al., 2003; Balfour et al., 2006). Considerando que el retorno de la coneja al nido es una conducta apetitiva (Olazábal et al., 2013b) y con el resultado del aumento en la activación de las células dopaminérgicas previo al amamantamiento se puede proponer que la coneja presenta un estado motivacional previo al amamantamiento. Esta motivación parece tener su regulación en las regiones del sistema mesolímbico. El ATV, núcleo accumbens y la corteza prefrontal guardan una conexión recíproca vía el haz medial del cerebro anterior (Kelley et al., 2007; Alcaro et al., 2007). Investigaciones muestran que cuando el ATV se encuentra activo en los procesos motivados como la alimentación, también el accumbens y la corteza prefrontal se observan activos (Jesen et al., 2003; Wise 2004). Nuestros resultados muestran que las tres estructuras se activaron previo al amamantamiento. Después del amamantamiento tanto el ATV como el accumbens muestran una activación adicional. Estudios en roedores y el gato han determinado que en el accumbens la respuesta de la transmisión dopaminérgica a un estímulo depende de la región que se active (Bassareo y Di-Chiara, 1999). El núcleo accumbens se divide en parte central y exterior, aunque ambas reciben innervación del ATV, su heterogeneidad celular les permite tener funciones específicas (Salamone et al., 2005). Particularmente el accumbens exterior recibe mayor innervación dopaminérgica (Jones et al., 1996), por lo cual, se le relaciona más con la generación de la motivación (Jones et al., 1996; Bassero y Di-Chiara, 1999). En el caso del accubens central, se ha observado que participa

regulando los procesos motores dirigidos a un objetivo (Heimer et al., 1997). Nuestro análisis del núcleo accumbens indicó que ambos núcleos presentan activación previa al amamantamiento, la cual aumenta después de la succión. Este patrón de activación de ambas regiones del accumbens parece estar relacionado tanto a la anticipación de un estímulo, como al aumento de la actividad motora previo al amamantamiento. En el caso de la corteza prefrontal mostró que 12 h previo al amamantamiento la expresión de FOS aumenta con respecto al control. En la rata, la corteza prefrontal se asocia con la generación de ritmos en las estructuras límbicas en relación con un estímulo recompensante (Baltazar et al., 2103). Considerando esta evidencia y nuestros resultados, se puede considerar que la corteza prefrontal participa en la temporalidad con la que se presenta el amamantamiento en el conejo apoyando un proceso motivacional. No obstante, un análisis de genes reloj y sus proteínas de expresión en la corteza prefrontal será necesario para demostrar que esta estructura se sincroniza con el amamantamiento. Esto es importante debido a que no es posible determinar si la expresión de FOS previo al amamantamiento en esta área responde a un proceso motivacional o al aumento en la actividad motora.

El amamantamiento activa la conexión APO/ATV. En roedores el APO y el ATV son parte de un circuito que regula la motivación maternal (Numan y Sheehan 1997; Numan y Stolzenberg, 2009). Esto se demostró mediante un corte unilateral o una lesión eléctrica entre la conexión del APO/NBET y el ATV. Lesión que interrumpe la conducta materna postparto (Numan y Sheehan, 1997). En esta investigación, en el conejo el amamantamiento induce un aumento significativo en la expresión de FOS tanto en el APO como en el ATV. Evidencia que refuerza la idea que la conexión APO y ATV es importante en la expresión de la conducta materna. Otras regiones que regulan la conducta materna como el SL que, también reciben aferencias del ATV se activan por efecto de la succión (Balfour et al., 2006; Alcaro et al., 2007). Lesiones del SL en roedores (Stolnick y Nigrosh, 1975) y en el conejo (Cruz y Beyer, 1972), interrumpen la conducta materna. Particularmente en el conejo el SL se sincroniza con el evento del amamantamiento (Meza et al., 2015). En este trabajo, observamos que el SLv presenta activación previo al amamantamiento similar a las regiones del sistema mesolímbico. Esta evidencia sugiere una participación del SL en la temporalidad con la que se presenta el amamantamiento en el conejo.

La activación de células dopaminérgicas de la población A10 parecen desempeñar un papel esencial de la conducta de anticipación al amamantamiento en la coneja. La dopamina es un neurotransmisor muy importante en relación con la motivación en la conducta materna, ya que la inhibición de la neurotransmisión dopaminérgica con 6-HD o mediante lesiones electrolíticas en el ATV, interrumpen la conducta materna en ratas, específicamente los componentes proactivos de la conducta materna con el acarreo y la conducta defensiva se afectan (Hanse et al., 1991; Olazábal et al., 2013^a, Bridges, 2015). Nuestros resultados mostraron que, en el conejo, se presenta un aumento de la expresión de FOS en la región del ATV, donde se encuentra la población A10. Debido a que las innervaciones dopaminérgicas del ATV influyen sobre las regiones del sistema mesolímbico, resultando en la generación de procesos de motivación y recompensa (Wise, 2005; Merrer et al., 2009). Este resultado sugiere que las células A10 están activando la corteza prefrontal y el accumbens. Anatómicamente el mayor grupo de células A10 se concentran en el ATV (Dahlstrom y Fuxe, 1964). No obstante, esta población presenta una extensión rostral en la región supramamilar (A10rv; Swanson, 1982; Hökfelt et al., 1984). Un hecho novedoso en este trabajo es que antes no se había estudiado otro grupo de células dopaminérgicas fuera del ATV en relación con la conducta materna en la coneja. Los resultados en esta investigación muestran la activación de A10 y A10 rv en anticipación al amamantamiento. Ambas poblaciones presentan proyección tanto a las regiones del sistema límbico corteza prefrontal y accumbens, como al APO y el SL (Carter y Fibiger, 1977; Swanson, 1982). Estos resultados dan la primera evidencia de la participación del sistema dopaminérgico en la conducta materna del conejo. Además de sugerir que esta activación está involucrada en la anticipación al amamantamiento en la madre, esto es, en el proceso circadiano de lactancia diaria.

9. Conclusiones

- Con este trabajo se obtuvo evidencia de la participación del sistema mesolímbico dopaminérgico en la característica conducta materna del conejo, al observarse la activación de este sistema por efecto del amamantamiento.
- La observación anatómica de las estructuras cerebrales y la cuantificación del inmunomarcaje de FOS reveló que el ATV, el núcleo accumbens y la corteza prefrontal forman parte del circuito maternal para la expresión de la conducta materna en el conejo.
- De acuerdo con lo reportado en especies como la rata donde las células dopaminérgicas se activan durante los procesos de motivación. Mediante lo encontrado con esta investigación podemos decir que las células dopaminérgicas de la porción A10 y A10 rv, parecen estar relacionadas a la motivación materna en el conejo.

10. Referencias

Afonso VM, King S, Chatterjee D, Fleming AS. Hormones that increase maternal responsiveness affect accumbal dopaminergic responses to pup- and food-stimuli in the female rat. *Hormones and Behavior* 2009; 56(1): 11-23.

Alcaro A, Huber R, Panksepp J. behavioral functions of the mesolimbic dopaminergic system: An affective neuroethological perspective. *Brain Research Reviews* 2007; 56: 283-321.

Al-Hasani R. y Bruchas MR. Molecular Mechanisms of Opioid Receptor-Dependent Signaling and Behavior. *Anesthesiology* 2011; 115(6): 1363–1381

Balfour ME, Yu L, Coolen LM. Sexual behavior and sex-associated environmental cues activate the mesolimbic system in male rats. *Neuropsychopharmacology* 2004; 29(4): 718-730.

Baltazar RM, Coolen LM, Webb IC. Diurnal rhythms in neural activation in the mesolimbic reward system: critical role of the medial prefrontal cortex. *European Journal of Neuroscience* 2013; 38(2): 2319-2317.

Bardo MT. y Bevins RA. Conditioned place preference: what does it add to our preclinical understanding of drug reward? *Psychopharmacology* 2000; 153: 31–43

Bridges RS. Y Byrnes EM. Neuroendocrine regulation of maternal behavior. In *Neuroendocrinology in Physiology and Medicine*. The Human Press Inc. Totawa NJ 1999; pp. 3301-315.

Bridges RS. Neuroendocrine regulation of maternal behavior. *Frontiers in Neuroendocrinology* 2015; 36: 178-196.

Byrnes EM, Rigerio B, Bridges R. Opioid receptors antagonism during lactation in the increased duration of nursing bouts. *Physiology & Behavior* 2000; 70: 211-216.

Caba M, Tovar A, Silver R, Mogado E, Meza E, Zavaleta Y, Juárez C. Nature's food anticipatory experiment: entrainment of locomotor behavior, suprachiasmatic and dorsomedial hypothalamic nuclei by suckling in rabbits pups. *European Journal of Neuroscience* 2008; 27: 432-443.

Champagne FA, Weaver IC, Diorio J, Sharma S, Meaney MJ. Natural variations in maternal care are associated with estrogen receptor alpha expression and estrogen sensitivity in the medial preoptic area. *Endocrinology* 2003; 144(11): 4720-4724

Fleming AS, Vaccarino F, Luebke C. Amygdaloid inhibition of maternal behavior in the nulliparous female rat. *Physiology and Behavior* 1980; 25: 731–743.

Fleming AS, Rosenblatt J. 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* 1974; 86(2): 221–232.

Franceschini R, Venturi PL, Cataldi A, Barreca T, Ragni N, Rolandi E. Plasma beta-endorphin concentrations during suckling in lactating women. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 1989; 96: 711-713.

González-Mariscal G, Caba M, Martínez-Gómez M, Bautista A, Hudson R. Mothers and offspring: the rabbit as a model system in the study of mammalian maternal behavior and sibling interactions. *Hormones and Behavior* 2016; 77: 30-41.

González-Mariscal G, Jiménez A, Chirino R, Beyer C. Motherhood and Nursing stimulate c-FOS expression in the rabbit forebrain. *Behavioral Neuroscience* 2009; 123: 731-739.

González-Mariscal G, Chirino R, Flores-Alonso JC, Rosenblatt JS, Beyer C. Intracerebroventricular Injections of Prolactin Counteract the Antagonistic Effect of Bromocriptine on Rabbit Maternal Behaviour. *Journal of Neuroendocrinology* 2004; 16: 949-955.

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

Gulledge C, Mann P, Bridges R, Bialos M, Hammer R. Expression of μ -opioid receptor mRNA in the medial preoptic area of juvenile rats. *Developmental Brain Research* 2000; 119: 269-276.

Hansen S, Harthorn C, Wallin E, Lofberg L, Svensson K. Mesotelencephalic dopamine system and reproductive behavior in the female rat: effects of ventral tegmental 6-hydroxydopamine lesions on maternal and sexual responsiveness. *Behavioral Neuroscience* 1991; 105(4): 588-598.

Ikemoto S. Brain reward circuit beyond the mesolimbic dopamine system: A neurobiological theory. *Neuroscience and Behavioral Reviews* 2010; 35: 129-150.

Jilge B. Ontogeny of the rabbit's circadian rhythms without an external zeitgeber. *Physiology and Behavior* 1995; 5: 131–140.

Kapeller PM. Nests, tree holes, and the evolution of primate life histories. *American Journal of Primatology* 1998; 46: 7–33.

Kirkpatrick B, Kim JW, Insel TR. Limbic system fos expression associated with paternal behavior. *Brain Research* 1994; 658: 112–118.

Kutlu S, Yilmaz B, Canpolat S, Sandal S, Ozcan M, Kumru S, Kelestimur H. Mu Opioid Modulation of Oxytocin Secretion in Late Pregnant and Parturient Rats. *Neuroendocrinology* 2004; 79: 197-203.

Levy F. y Keller M. Neurobiology of maternal behavior in sheep. *Advances in the Study of Behavior* 2008; 38: 300-473.

Levy F. y Keller M. Olfactory mediation of maternal behavior in selected mammalian species. *Behavioral Brain Research* 2009; 200: 336-345.

Lonstein JS, Simmons DA, Swann JM, Stern JM. Forebrain expression of c-FOS due to active maternal behaviour in lactating rats. *Neuroscience* 1998; 82(1): 267-281.

Luntz PE. y Kieffer BL. Opioid receptors: distinct roles in mood disorders. *Cell* 2103; 36(3): 195-206.

Mann P, Pasternak G, Bridges R. Mu₁ Opioid receptor involvement in maternal behavior. *Physiology & Behavior* 1989; 47: 133-138.

Merrer JL, Becker JA, Befort K, Kieffer BL. Reward Processing by the Opioid System in the Brain. *The American Physiological Society* 2009; 89: 1379-1412.

Meza E, Juárez C, Morgado E, Zabaleta Y, Caba M. Brief daily suckling shifts locomotor behavior and induces PER1 protein in paraventricular and supraoptic nuclei, but not in the suprachiasmatic nucleus, of rabbit does. *European Journal of Neuroscience* 2008; 28: 1394-1403.

Numan M. Medial preoptic area and maternal behavior in the female rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 1974; 87: 746-759.

Numan M. y Sheehan TP Neuroanatomical circuitry for mammalian maternal behavior. *Annals of New York Academy Science* 1977; 807: 101-125.

Numan M. y Smith HG. Maternal behavior in rats: evidence for involvement of preoptic projections to the ventral tegmental area. *Behavioral Neuroscience* 1984; 98: 712-727.

Numan M, McSparren J, Numan MJ. Dorsolateral connections of the medial preoptic area and maternal behavior in rats. *Behavioral Neuroscience* 1990; 104: 964-979.

Numan M. Motivational systems and the neural circuitry of maternal behavior in the rat. *Developmental Psychobiology* 2007; DOI 10.1002/dev: 12-21.

Numan M. Maternal behavior: neural circuits, stimulus valence, and motivational processes. *Parenting Science and Practices* 2012; 12: 105-114.

Numan M. Motivational systems and the neural circuitry of maternal behavior in the rat. *Developmental Psychobiology* 2006; 49: 12-21. Numan M, Fleming AS, Lévy F. Maternal

behavior. In: Neil JD (ed), Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. Elsevier 2006, San Diego, pp.1921-1993.

Numan M, Numan MJ, Schwarz J, Neuner C, Flood T, Smith C. Medial preoptic area interactions with the nucleus accumbens-ventral pallidum circuit and maternal behavior in rats. Behavioral Brain Research 2005; 53-68.

Numan M, Insel T. Neurochemistry and molecular biology of maternal behavior. The Neurobiology of Parental Behavior 1^a ed, Edit Springer-Verlag, New York 2003; 194-226.

Numan M, Sotzlenberg DS. Medial preoptic area interactions with dopamine neural systems in the control on the onset and maintenance of maternal behaviors in rats. Frontiers in Neuroendocrinology 2009; 30: 46-64.

Olazábal DE, Pereira M, Agrati D, Ferreira A, Fleming AS, González-Mariscal G, Lévy F, Lucion AB, Morrell JI y Numan M. Flexibility and adaptation of the neural substrate that supports maternal behavior in mammals. Neuroscience and Biobehavioral Reviews 2013a; 37: 1875-1892.

Olazabal DE, Pereira M, Agrati D, Ferreira A, Fleming AS, González-Mariscal G, Lévy F, Lucion AB, Morrell JI, Numan M, Uriarte N. New theoretical and experimental approaches on maternal motivation in mammals. Neuroscience Biobehavioral Reviews 2013b; 37 (8): 1860-1874.

Olds J. y Milner P. Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. Journal of Comparative and Physiological Psychology 1954; 47 (6): 419-427.

Olds J, Allan WS, Briese E. Differentiation of hypothalamic drive and reward centers. American Journal Physiology 1971; 221 (1): 368-375.

Panksepp J, Nelson E, Siviy S. Brain opioids and mother-infant social motivation. Acta Paediatrica 1994; 397: 40-46.

Panksepp J. At the interface between the affective, behavioral and cognitive neurosciences: decoding the emotional feelings of the brain. Brain Cogn 2003; 52: 4-14.

Paredes RG. Evaluating the neurobiology of sexual reward. ILAR Journal 2009; 50: 15-27.

Paredes. Evaluating the Neurobiology of Sexual Reward. ILAR Journal 2009; 50: 15-27.

Pereira M, Seip KM, Morrell JI. Maternal motivation and its neural substrate across the postpartum period. Neurobiology of the Parental Brain 2008; 3: 39-58.

Pereira M. y Morrell JI. The changing role of the medial preoptic area in the regulation of maternal behavior across the postpartum period: facilitation followed by inhibition. Behavioral Brain Research 2009; 205 (1): 238-248

- Pereira M, y Morrell JI. Functional mapping of the neural circuitry of rat maternal motivation: effects of site-specific transient neural inactivation. *Journal of Neuroendocrinology* 2011; 23: 1020-1025.
- Pfaus JG, Phillips AG. Role of dopamine in anticipatory and consummatory aspects of sexual behavior in the male rat. *Behavioral Neuroscience* 1991; 105(5): 727-743.
- Pierce RC, Kumaresan V. the mesolimbic dopamine system: the final common pathway for the reinforcing effect of drugs of abuse? *Neuroscience and Behavioral Reviews* 2006; 30: 215-238.
- Rosenblatt JS, Snowdon CT. Biochemical basis of rat parental behavior. *Parental Care: Evolution, Mechanisms and adaptive significance* 1^a ed. Edit Academic Press, San Diego 1996; 215-241.
- Selmanoff M, Gregerson KA. Suckling-induced prolactin release is suppressed by naloxone and simulated by beta-endorphin. *Neuroendocrinology* 1986; 42 (3): 255-259.
- Stern JM, Johnson SK. Ventral somatosensory determinants of nursing behavior in the Norway rat: I. Effects of variations in the quality and quantity of pup stimuli. *Physiology and Behavior* 1990; 47: 993-1011.
- Sheehan T. y Numan M. Estrogen, progesterone, and pregnancy termination alter neural activity in brain regions that control maternal behavior in rats. *Neuroendocrinology* 2002; 75 (1); 12-23.
- Standifer KM, Pasternak GW. G proteins and opioid receptor-mediated signaling. *Cell Signal* 1997; 9: 237-248.
- Ungerstedt U. Stereotaxic mapping of the monoamine pathways in the rat brain. *Acta Physiologica Scandinavica* 1971; 367: 1-48.
- Wansaw MP, Pereira M, Morrell JI. Characterization of maternal motivation in the lactating rat: Contrasts between early and late postpartum responses. *Hormones and Behavior* 2008; 54: 294-301
- Wise RA. Brain reward circuitry: Insights from unsensed incentives. *Neuron* 2002; 36: 229-240.
- Wise RA. Dopamine, learning and motivation. *Nature Reviews* 2004; 5: 1-13.
- Wise RA. Forebrain substrates of reward and motivation. *The Journal of Comparative Neurology* 2005; 493: 115-121.
- Zarrow MX, Denenberg VH, Anderson CO. Rabbit: Frequency of suckling in the pup. *Science* 1965; 150: 1835-1836.