

11281
23



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

**INSTITUTO DE
NEUROBIOLOGÍA**
CAMPUS UNAM, JURQUILLA, QRO.

**“MECANISMOS DE REGULACIÓN
ASOCIADOS A LA ACTIVIDAD SIMPÁTICA
INDUCIDA POR LA SUCCIÓN EN LA RATA
LACTANTE”.**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
(NEUROBIOLÓGÍA)

PRESENTA:

M. EN C. NEPHTALI MARINA GONZÁLEZ

DIRECTOR DE TESIS:
DR. FLAVIO MENA JARA

2003

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**TESIS
CON
FALLA DE
ORIGEN**

PAGINACIÓN DISCONTINUA

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional

NOMBRE: Nephtalí Mariana
Garralce

FECHA: 13 de marzo 2003

FIRMA: [Firma]

Esta tesis fue realizada bajo la asesoría del Dr. Flavio Mena Jara en el laboratorio de Fisiología del Instituto de Neurobiología, campus UNAM-UAQ, Juriquilla, Querétaro. Este trabajo fue apoyado por el donativo PAPIIT-UNAM IN-226599 y por una beca del CONACYT 138879 y de la Dirección General de Estudios de Posgrado.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Flavio Mena, por sus haberme enseñado el camino a seguir en la ciencia.

A la Dra. Teresa Morales por brindarme apoyo, y sobre todo su amistad.

A los miembros del jurado quienes revisaron cuidadosamente esta tesis.

A la M.C. Nilda Navarro por su valiosa cooperación en el trabajo experimental.

Al M.C. Martín García por su excelente apoyo técnico.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH	hormona adrenocorticocorticotrófica
ADH	hormona antidiurética
ADS	asta dorsal superficial
ADX	adrenalectomía bilateral
CAD	cueño del asta dorsal
CATs	catecolaminas
CGRP	péptido relacionado al gen de la calcitonina
ChAT	transferasa de colina y de acetilcolina
D1-M	desyodasa mamaria tipo 1
E	epinefrina
EENM	estimulación eléctrica de un nervio mamario
EV	estimulación vagino-cervical
Gal	galanina
GH	hormona de crecimiento
HX	hipofisectomía
ICV	intracerebroventricular
IML	columna intermedio-lateral
IMM	columna intermedio-medial
Ir	inmunorreactivo
KPBS	buffer de fosfatos
LID	leche intraductal
MSH	hormona estimulante de los melanocitos
NCL	núcleo cervical lateral
NGS	suero normal de cabra
NP	nucleus propius
NS	no-succionada
NPY	neuropéptido Y
OT	oxitocina
PGF ₂	prostaglandinas F ₂
PHI	péptido histidina isoleucina
PIM	presión intramamaria
PRL	prolactina
PROP	propranolol
PTH	paratohormona
PV	núcleo paraventricular
S	succión
SC	succión continua
SGV	sustancia gris ventral
SNA	sistema nervioso autónomo
SNC	sistema nervioso central
SNS	sistema nervioso simpático
SO	núcleo supraóptico
SP	sustancia P
T3	triyodotironina
T4	tiroxina
T13	segmento espinal torácico 13
TH	tirosina hidroxilasa
TSH	hormona estimulante de tiotropinas
VIP	péptido intestinal vasoactivo

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ÍNDICE

I. RESUMEN	1
II. SUMMARY	3
III. INTRODUCCIÓN	5
IV. ANTECEDENTES	7
GLÁNDULA MAMARIA	7
• Características morfológicas	7
• El aparato motor	9
• Inervación	10
• Desarrollo y crecimiento	14
MECANISMOS NEUROENDÓCRINOS DE LA LACTANCIA	23
• Secreción láctea	23
• Evacuación láctea	24
• Secreción de OT	25
• Regulación autonómica de la evacuación láctea	26
V. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS	28
VI. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	31
HIPÓTESIS	31
OBJETIVOS	32
VII. MATERIAL Y MÉTODOS	33

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

VIII. DISEÑO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS	45
IX. DISCUSIÓN	69
XI. CONCLUSIONES	90
XII. REFERENCIAS	91

RESUMEN

La regulación neuroendócrina de la lactancia comprende la activación, inducida por el estímulo de la succión, de mecanismos estimuladores e inhibidores que regulan la secreción y la evacuación láctea. Estudios previos muestran que la activación fisiológica del sistema simpático (SNS) puede inhibir la evacuación láctea en la rata. Así, se ha demostrado que las catecolaminas (CATs) suprarrenales deprimen la liberación de oxitocina (OT) por parte del lóbulo posterior de la hipófisis y antagonizan la acción de OT sobre las células mioepiteliales. Además de las CATs suprarrenales, existen mecanismos α y β adrenérgicos capaces de facilitar o de inhibir, respectivamente, la evacuación láctea a través de la inervación directa de la glándula mamaria. Aunque estas influencias pueden regular la evacuación láctea, permanece incierta la participación del estímulo de la succión en la activación del SNS, así como los mecanismos neurales que están involucrados en dicha regulación.

Los objetivos de esta tesis fueron (1) determinar si la succión inhibe de manera refleja la evacuación láctea inducida por OT en ratas lactantes anestesiadas y analizar si esta inhibición se debe a las CATs suprarrenales y/o neurales; (2) determinar si el efecto inhibitorio de la succión sobre la evacuación láctea puede ser bloqueado mediante la activación previa de mecanorreceptores ductales mamarios, (3) determinar las poblaciones neuronales de la médula espinal de la rata lactante que integran las señales aferentes inducidas por la succión, que a su vez son propagadas hacia niveles cerebrales superiores o que dan lugar a la activación refleja de mecanismos simpáticos, inhibitorios de la evacuación láctea.

Se utilizaron ratas anestesiadas con uretano, que fueron separadas de sus crías por 6h. La evacuación láctea fue determinada mediante el registro de la cantidad de leche obtenida por las crías y/o mediante el registro isométrico de la presión intramamaria (PIM) en respuesta a dosis conocidas de OT. En el primer caso, se administró OT (0,8mU cada 2 min) a las madres por vía endovenosa durante un período de succión. Algunos grupos de ratas fueron implantadas crónicamente con cánulas intracerebroventriculares (ICV), adrenalectomizadas (ADX) o hipofisectomizadas (HX). Los resultados muestran que la evacuación láctea fue escasa en animales control, falsamente operados, ADX y HX, pero en ratas intactas o HX que recibieron una dosis de propranolol (PROP) por vía endovenosa o ICV, la cantidad de leche obtenida por las crías fue significativamente mayor.

Por otro lado, se observó que la disminución en la evacuación láctea, así como la depresión en respuestas de PIM inducidas por la administración exógena de OT y el aumento en la resistencia ductal inducidas por el estímulo de la succión en ratas anestesiadas, fueron bloqueadas por la activación previa de mecanorreceptores ductales mamarios. Este efecto facilitador fue bloqueado a su vez, mediante la administración sistémica del bloqueador α adrenérgico prazosin, lo cual sugiere que la activación de mecanorreceptores ductales provoca la activación de un mecanismo α adrenérgico, probablemente de origen central, que contrarresta los efectos inhibitorios de la succión sobre la

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

evacuación láctea.

Finalmente, se analizó la inducción de la expresión del gen c-fos para identificar las poblaciones neuronales de la médula espinal activadas por un período de 5min de succión o por la estimulación eléctrica del cabo central del nervio correspondiente a la primera glándula abdominal (EENM), en ratas lactantes succionadas continuamente (SC) por sus crías, o separadas previamente de ellas (NS) por 6 ó 18h. Además, con el fin de investigar si se activan neuronas preganglionares simpáticas por estos dos estímulos, se realizó un doble inmunotinción contra Fos y contra transferasa de colina y acetilcolina (ChAT). La expresión de Fos fue baja en ratas SC y NS6h, pero en ratas NS18h fue escasa y prácticamente nula. En cambio, en ratas NS6h ocurrió un aumento significativo en la expresión de Fos en varias regiones de la sustancia gris de la médula espinal en animales que recibieron un período de 5 min de succión o de EENM. El patrón de expresión de Fos en cada lámina espinal fue diferente para cada estímulo, i.e., la succión provocó una mayor inducción de Fos en láminas profundas (laminas V-X de Rexed), mientras que con EENM se obtuvieron efectos más intensos en laminas superficiales (I-IV). La doble tinción reveló que la succión activa neuronas preganglionares simpáticas de la columna intermedio medial (IMM), mientras que EENM activa neuronas de la intermedio lateral (IML). Por otro lado, en ratas NS18h no hubo inducción de Fos en respuesta a la succión y solo se obtuvo un efecto discreto por EENM.

En conjunto, estos resultados confirman que el estímulo de la succión desencadena un arco reflejo a nivel segmentario, que activa neuronas preganglionares simpáticas de la columna IMM. Esto da lugar a un aumento en el tono simpático β adrenérgico que provoca un aumento en el tono de los conductos mamarios que está involucrado en la falta de evacuación láctea durante los primeros minutos de la succión. Asimismo, la activación de mecanorreceptores ductales desencadena un reflejo que probablemente involucra la activación de mecanismos centrales α adrenérgicos, que bloquean el control inhibitorio de la evacuación láctea.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

SUMMARY

Neuroendocrine regulation of lactation involves suckling-induced activation of stimulatory and inhibitory mechanisms, which regulate both, milk secretion and ejection. Previous studies show that physiological activation of the sympathetic nervous system (SNS) may inhibit milk ejection in the rat. Thus, adrenal catecholamines (CATs) counteract the milk ejection action of oxytocin (OT) by decreasing its release by the posterior lobe of the hypophysis and through competitive antagonism with OT at the myoepithelial cells. In addition to adrenal CATs, neural regulation of the mammary gland involves α - and β -adrenergic mechanisms capable of facilitating or inhibiting, respectively, milk ejection through the direct innervation of the mammary gland. These influences may participate in the overall regulation of milk ejection, but the role of suckling on its activation and the neural mechanisms involved remain unclear.

The aim of the present study was threefold: (1) to determine whether suckling inhibits milk ejection induced by OT in anesthetized lactating rats and to what extent such action may result from adrenal CATs and/or through the sympathetic innervation of the mammary glands, (2) to determine whether the inhibitory effect of suckling on milk ejection could be blocked by prior activation of mammary ductal mechanoreceptors, and (3) to analyze the neuronal populations in the spinal cord of the lactating rat responsible for the integration of suckling-induced afferent signals, which in turn are propagated to higher brain levels or that result in the reflex activation of sympathetic, milk ejection-inhibitory mechanisms.

Rats were isolated (6h) from their pups and then anesthetized. Milk ejection was determined by measuring the amount of milk received by the pups during suckling and/or by isometric recordings of intramammary pressure (IMP) in response to OT. The ductal tone was analyzed by the ductal resistance index measurements. In the first case, OT (0.8 mU every two min) was administered intravenously to the mothers during suckling. Rats were either chronically implanted with cannulae into the lateral cerebral ventricles (ICV), bilaterally adrenalectomized (ADX) or hypophysectomized (HX). The results show that milk yields were low in control, sham, ADX and HX rats, but not in rats given the β -adrenergic blocker propranolol (PROP; IV or ICV injected), nor PROP-HX rats.

On the other hand, both, the reduced milk ejection and intramammary pressure responses to OT, and the increased ductal resistance induced by suckling, could be prevented by prior activation of ductal mechanoreceptors. This effect was blocked by prior administration of the α -adrenergic blocker prazosin, suggesting that the activation of ductal mechanoreceptors promotes an α -adrenergic mechanism that counteracts the inhibitory effects of suckling upon milk ejection.

Finally, the induction of c-fos gene expression was used to identify neuronal populations in the spinal cord activated by acute 5 min suckling (S) or by electrical stimulation of the central stump of the first abdominal mammary nerve (EENM) in lactating rats previously separated from their litters for 6 or 18h. In addition, to investigate whether spinal sympathetic preganglionic neurons are activated by suckling, dual immuno-staining (Fos and choline acetyltransferase, ChAT) was performed. Fos was expressed at low levels in continuously suckled

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

(SC) and 6h non-suckled (NS) mothers, but no expression was found after 18h of non-suckling. On the other hand, in 6h NS rats, significant increments in Fos expression occurred in several regions after acute suckling and after electrical stimulation. Also, the pattern of Fos expression in each spinal laminae was different for the two stimuli, i.e., more intense effects of suckling in deep laminae (Rexed's laminae V-X) and more intense effects in laminae (laminae I-IV) with EENM. Double labeling after suckling was found only in sympathetic preganglionic neurons from the intermedio-medial (IMM) cell column, whereas after EENM, double label was observed only in neurons from the intermedio-lateral (IML) cell column. On the other hand, no effect upon Fos protein expression was observed after suckling and only a minor effect after EENM in 18hNS rats.

Together, these results confirm that suckling triggers a segmental reflex, which activates sympathetic preganglionic neurons from the IMM cell column. This in turn increases ductal tone through central β adrenergic mechanisms, resulting in a lack of milk ejection during the first minutes of suckling. Also, the activation of ductal mechanoreceptors presumably triggers a reflex involving central α adrenergic mechanisms that block the inhibitory control of milk ejection.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INTRODUCCIÓN

La lactancia es la fase final del ciclo reproductivo de los mamíferos: permite la conservación de estas especies al proveer la alimentación necesaria para la supervivencia de la progenie después de su nacimiento. En sí, esta función es un fenómeno neuroendócrino complejo. Su inicio acontece después del parto y su desarrollo depende de los estímulos continuados de la succión y de la estimulación exteroceptiva que recibe la madre proveniente de las crías.

Entre los mecanismos neuroendócrinos específicos de la lactancia están los relacionados con la síntesis, procesamiento y liberación a la circulación de prolactina (PRL) y de oxitocina (OT) por parte de los lóbulos anterior y posterior de la hipófisis, respectivamente. La PRL forma parte esencial de un complejo de hormonas que incluyen a la hormona de crecimiento (GH), la tiroxina (T4), los corticoides suprarrenales y la paratohormona (PTH). Este complejo hormonal varía según las especies y, en general, es responsable de estimular la síntesis de la leche por los alvéolos mamarios, mientras que la OT determina la evacuación de la leche hacia el exterior durante la succión.

Por otra parte, existen también mecanismos neurohumorales de naturaleza adrenérgica que influyen en el funcionamiento del tejido mamario y en su responsividad a las hormonas hipofisarias. Se considera que la activación de mecanorreceptores localizados en los conductos mamarios es capaz de regular estas acciones adrenérgicas para producir una facilitación en la evacuación de la leche.

TESIS CON
FALLA DE ... EN

En el presente proyecto se plantearon los siguientes objetivos: 1) determinar si el estímulo de la succión inhibe de manera refleja la evacuación láctea por la activación de la inervación simpática de la glándula; 2) determinar si el efecto inhibitorio de la succión sobre la evacuación láctea puede ser bloqueado mediante la activación previa de mecanorreceptores ductales mamarios; 3) determinar mediante técnicas inmunohistoquímicas, las poblaciones neuronales de la médula espinal de la rata lactante (interneurona / neurona preganglionar simpática) que se activan por la succión o la estimulación eléctrica de un nervio mamario.

Para definir la importancia relativa de este trabajo, a continuación se revisan de manera general los aspectos relacionados con la regulación neuroendócrina de la evacuación láctea en la rata, y se hace particular énfasis en la participación que tiene el sistema nervioso autónomo (SNA) en dicha regulación.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ANTECEDENTES

GLÁNDULA MAMARIA

-Características morfológicas

La glándula mamaria es una de las glándulas accesorias más importantes de la piel. Aunque su número, forma y distribución varía considerablemente entre las diferentes especies de mamíferos, se ha demostrado que su estructura interna es básicamente la misma en todas las especies (fig. 1). Así, el alvéolo es la unidad anatómica y funcional de la glándula mamaria. Los alvéolos son estructuras que en su cara interna están formados por una capa de células epiteliales donde se lleva a cabo la síntesis y secreción de la leche, la cual es vertida y almacenada en la cavidad alveolar. Los alvéolos son drenados por los conductos mamarios los cuales convergen entre sí dando lugar a los conductos galactóforos principales que desembocan en el pezón (Mayer y Klein, 1961).

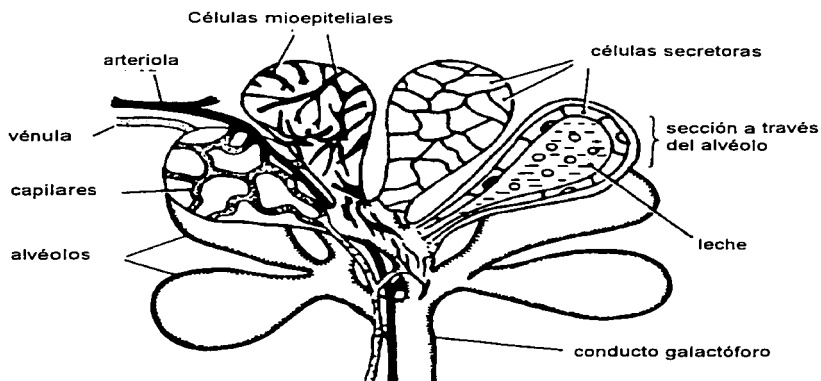


FIGURA 1. Representación de la estructura histológica de la glándula mamaria (Tomado de Mephram, 1987).

Por otra parte, la disposición de los conductos, así como la naturaleza de las cavidades donde se almacena la leche presentan grandes variaciones interespecie (fig. 2). En la rata, los conductos mamarios convergen en un sólo conducto principal (galactóforo), mientras que en el hombre o en el conejo, son varios los galactóforos que desembocan en el pezón. Finalmente, en los rumiantes, los galactóforos desembocan en una cisterna y la leche es evacuada a través de otra pequeña cisterna localizada en el pezón (Wakerley y col., 1994).

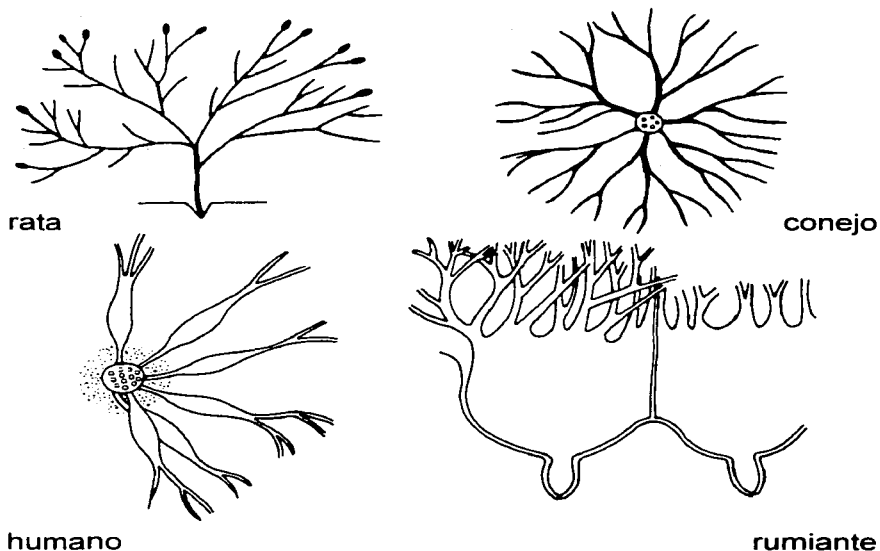
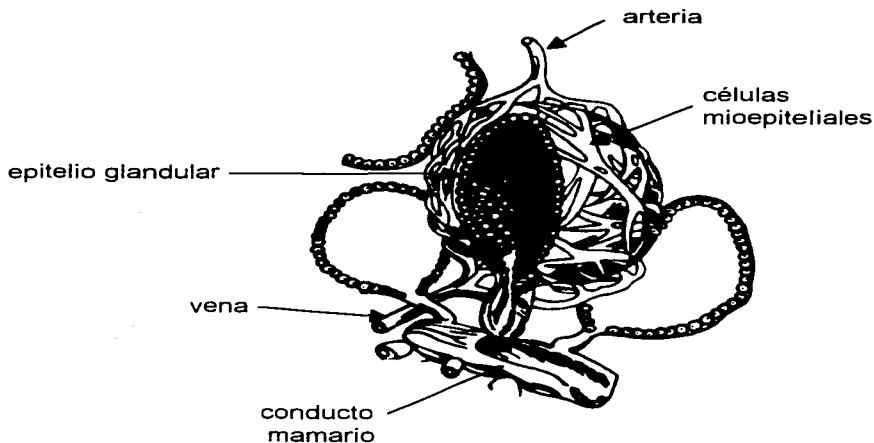


FIGURA 2. Morfología de la glándula mamaria en distintas especies de mamíferos. a) en la rata y en el ratón los conductos se unen para formar un solo galactóforo; b) en el conejo varios galactóforos tienen salida en el pezón; c) en el humano cada galactóforo está dilatado en la base del pezón para formar un seno; d) en los rumiantes los galactóforos desembocan en una cisterna o ubre, y la leche es evacuada a través del canal del pezón (Modificado de Wakerley y col., 1994).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

-El aparato motor

El aparato motor de la glándula mamaria está constituido por dos elementos: el mioepitelio y las fibras de músculo liso (fig. 3).



ALVEOLO MAMARIO

FIGURA 3. Representación esquemática del aparato motor de la glándula mamaria. (Tomado de Mayer y Klein, 1961).

El mioepitelio está formado por células de naturaleza contráctil las cuales se disponen en forma de estrella sobre la superficie alveolar y de manera longitudinal y diagonal sobre el eje mayor de los conductos de menor calibre (Bisset, 1974). Cuando estas células se contraen por acción de la OT liberada por el lóbulo posterior de la hipófisis, provocan que la luz alveolar disminuya y que los conductos se acorten y se ensanchen con lo que se facilita la expulsión de la leche hacia los conductos de mayor calibre (Linzell, 1955).

TESIS CON
FALLA DE CUBEN

Las células mioepiteliales se pueden encontrar en la glándula mamaria de hembras vírgenes pero no es sino hasta el embarazo cuando se incrementa su número. Esto se debe a que su desarrollo se estimula por las hormonas esteroideas, principalmente los estrógenos (Radnor, 1972; Sala y Freire, 1974). Los receptores a OT aparecen en las células mioepiteliales poco tiempo antes del parto y desaparecen algunos días después del destete (Soloff y col., 1979; Soloff y Wieder, 1983).

Por otro lado, las fibras de músculo liso forman parte de la pared de los conductos mamarios y se disponen en forma longitudinal en los conductos de menor calibre y de manera longitudinal y circular en los conductos mayores. Asimismo, las paredes de la cisterna glandular y de los vasos sanguíneos se encuentran revestidos por fibras de músculo liso (Zaks, 1962). Aunque las fibras de músculo liso alrededor de los conductos mamarios juegan un papel muy importante en la regulación del flujo de salida de leche de la glándula mamaria, no existe evidencia de que contribuyan a la fuerza expulsiva de la evacuación láctea, la cual se debe en su mayor parte a las células mioepiteliales (Wakerley y col., 1994).

-Inervación

Los nervios mamarios constan de dos componentes: uno aferente y otro eferente representado por fibras motoras simpáticas (Cross, 1961; Findlay y Grosvenor, 1969).

La inervación aferente de la glándula mamaria está constituida por fibras provenientes de receptores ubicados en el pezón, la piel cercana al mismo y el

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

parénquima mamario (Cross, 1961). Estos receptores son sensibles a estímulos táctiles, dolorosos y mecánicos, tales como la presión y el estiramiento durante la succión (Cross, 1961). Las fibras aferentes de los pezones de la rata tienen un diámetro de 1 - 25 μm y una velocidad de conducción de 6 a 36 m/seg, pero la mayoría de las fibras son del tipo C no mielinizadas (Haller, 1985); la latencia de activación de las neuronas espinales después de la estimulación va desde los 5 hasta los 180 milisegundos (Poulain y Wakerley 1986).

Además de las aferentes de la zona del pezón al sistema nervioso central (SNC), Findlay propone la existencia de otras, provenientes de mecanorreceptores ductales que aparentemente se encuentran ubicados en los conductos de mayor calibre en la glándula mamaria. Dichos receptores se activan al dilatarse los conductos por el paso de la leche hacia el exterior (Findlay, 1966; Findlay y Grosvenor, 1969). No existe mucha información acerca de las características electrofisiológicas y morfológicas de estos receptores, pero sí acerca de los efectos que produce su activación sobre la evacuación láctea. Por un lado, al igual que la succión, la estimulación de estos receptores facilita la liberación de OT por la neurohipófisis (Lincoln y Wakerley, 1975), mientras que, por otro lado, su activación bloquea la activación del SNA inducida por la succión, *vgr.*, inhiben la liberación fásica de catecolaminas suprarrenales (CATs) y bloquean el aumento en el tono neural de los conductos mamaros (Mena y col., 1979; Clapp y col., 1985; Mena y col., 1985).

La inervación eferente de la glándula mamaria es de naturaleza simpática. Anteriormente se consideraba que dicha inervación estaba confinada únicamente

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

al tejido conectivo y al músculo liso de los conductos mamarios y de los vasos sanguíneos (Cross, 1961; Findlay y Grosvenor, 1969). Sin embargo, Marchetti y col. (1990) describieron la presencia de receptores β adrenérgicos acoplados funcionalmente a adenilato ciclasa en las células epiteliales, alvéolos, ductos y adipocitos de la glándula mamaria de la rata embarazada y lactante (Marchetti y col., 1990). La densidad de estos receptores en la glándula mamaria es regulada por las hormonas ováricas y por PRL (Marchetti y Labrie, 1990).

Asimismo, existe evidencia neuroquímica de la presencia de terminales nerviosas simpáticas en la glándula mamaria de la rata (Donoso y col., 1992). Las CATs presentes en la glándula mamaria son de origen neural, ya que la denervación quirúrgica reduce significativamente el contenido de norepinefrina (NE) de la glándula. Además, se ha observado que la actividad neural simpática sufre cambios durante el ciclo reproductor, ya que el contenido de NE en la glándula mamaria se encuentra elevado durante la virginidad y durante la involución, mientras que durante la gestación y la lactancia disminuye, lo cual sugiere que la inervación simpática podría estar involucrada en algunas de las múltiples funciones de la glándula (Donoso y col., 1992).

Por otro lado, también se ha mostrado una rica distribución de fibras nerviosas en la glándula mamaria de la rata y del humano que pueden estar involucradas en el control local de la evacuación láctea (Eriksson y col., 1996b). En la Tabla 1 se muestra de manera resumida la inmunoreactividad que presentan algunas estructuras mamarias a diversos transmisores químicos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLA 1. Inmunoreactividad a transmisores quimicos en el tejido mamario. TH= tirosina hidroxilasa, CGRP= péptido relacionado al gen de la calcitonina, SP= sustancia P, VIP= péptido intestinal vasoactivo, PHI= péptido histidina isoleucina, NPY= neuropéptido Y, G= galanina. (Modificado de Eriksson y col., 1996b).

ESTRUCTURA	TRANSMISOR
1. Terminaciones nerviosas de la subdermis, fibras de músculo liso que rodean al pezón y tejido conectivo.	1. TH, CGRP, SP, VIP, PHI, NPY, G.
2. Nervio mamario.	2. TH, CGRP, VIP, NPY, G.
3. Adventicia de la arteria mamaria.	3. TH, NPY.
4. Tejido alrededor de la arteria mamaria.	4. CGRP, SP, VIP, PHI
5. Pared de la vena mamaria.	5. TH, CGRP, SP, NPY.
6. Alvéolos	6. TH, NPY.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

-Desarrollo y crecimiento.

El desarrollo de la glándula mamaria ocurre a través de diversas fases del ciclo reproductor. Se pueden distinguir cinco etapas en el desarrollo mamario: etapa embrionaria y fetal, etapa prepuberal, etapa puberal, gestación y finalmente, lactancia (Lyons y col., 1958). Después de la lactancia, la glándula mamaria sufre una involución muy rápida regresando a una etapa similar a la del crecimiento cíclico. En la figura 4 se esquematizan las diferentes etapas así como los factores que intervienen en el desarrollo y diferenciación de la glándula mamaria en el ratón y en la rata.

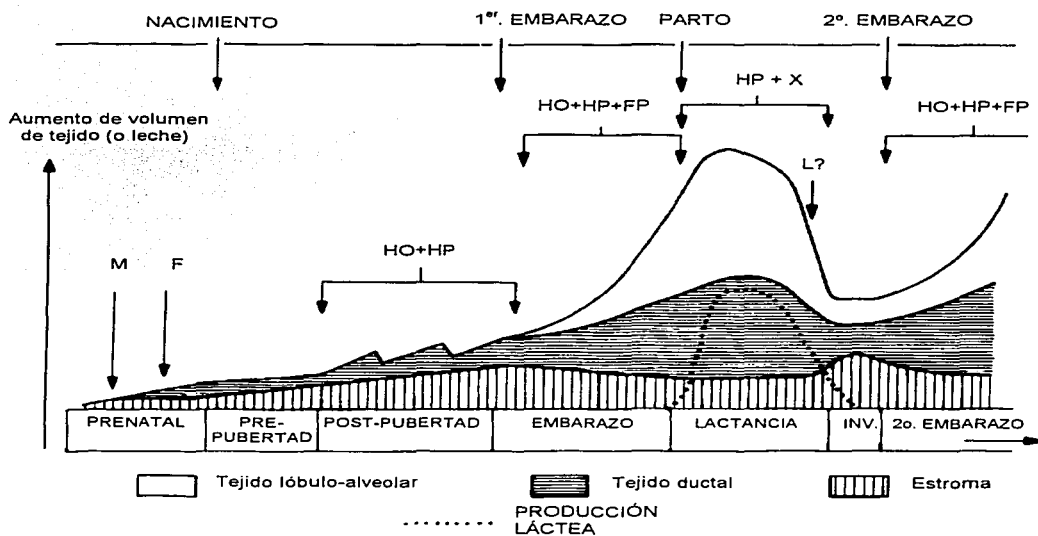


FIGURA 4. Representación esquemática del desarrollo mamario en ratas y ratones. INV. Involución; M, factores del mesénquima; F, factores endócrinos fetales; HO, hormonas ováricas; HP, hormonas pituitarias; FP, hormonas fetoplacentarias; X, otros factores humorales (identidad incierta); L, factores locales (identidad desconocida). (Tomado de Mephram, 1987).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Etapas embrionaria y fetal

La porción parenquimatosa de la glándula mamaria se deriva embriológicamente del ectodermo, mientras que el estroma que la rodea y el tejido adiposo provienen del mesodermo (Imagawa y col., 1994). El patrón de desarrollo fetal mamario es muy similar en el ratón y en la rata (Anderson, 1974). Hacia el día 10 de gestación ocurre una migración de células a lo largo de la línea mamaria, dando como resultado la aparición de cinco o seis pares de botones mamarios por acción de las hormonas tiroideas. Por debajo de los botones mamarios se localiza el mesénquima el cual forma dos compartimientos, el mesénquima denso compuesto por fibroblastos y el tejido precursor de adipocitos mamarios. El mesénquima juega un papel esencial en el desarrollo mamario, ya que ejerce una función inductiva en la epidermis, la cual es mediada a través de factores específicos (Cowie y Tindal, 1971; Cowie y col., 1980). Existe muy poco crecimiento mamario durante los días 11 y 16, pero a partir de los días 16 a 21 ocurre una proliferación muy rápida de las células del epitelio mamario en la hembra. En esta fase, se llevan a cabo una serie de movimientos morfogenéticos que dan lugar a una elongación del primordio mamario con lo que un cordón sólido de células epiteliales mamarias se extiende hasta el tejido precursor de adipocitos y penetra al mesénquima denso. Estos movimientos se llevan a cabo como consecuencia de un cambio conformacional de las células promovido por los microfilamentos y los microtúbulos (Cowie y Tindal, 1971). Posteriormente el cordón epitelial se canaliza y ramifica dando como resultado el patrón mamario típico. Al nacimiento, la glándula mamaria está formada por una porción epitelial, el parénquima, que

consiste de un árbol ductal pequeño y un estroma en el cual se desarrolla el epitelio (Imagawa y col., 1994). En el macho no se desarrollan los pezones debido a que se forma una condensación del mesénquima alrededor de los botones mamarios, lo cual produce una ruptura del tallo epitelial que conecta el primordio mamario con la epidermis (Anderson, 1974).

Durante la vida fetal de los roedores, el crecimiento mamario rápido ocurre solamente durante los primeros días de la gestación. Aunque no se conocen con exactitud los factores que intervienen en el crecimiento mamario durante los primeros días de la vida fetal, se ha observado que la aplicación de hormonas esteroideas masculinas a la madre o directamente al feto producen una masculinización del crecimiento mamario en la hembra, mientras que la aplicación de estrógenos produce una malformación y un retardo en el crecimiento mamario (Anderson, 1974).

Etapa prepuberal

Aparentemente en la rata prepuberal el crecimiento ductal es independiente de las gónadas y es muy similar en machos y en hembras. En la rata hembra ocurre una proliferación y una ramificación del sistema ductal mamario muy considerables entre el nacimiento y la pubertad (Cole, 1933). Las glándulas mamarias de los recién nacidos contienen solamente ductos rudimentarios con pequeños botones terminales. Estos botones están formados por grupos de células especializadas que se localizan al final de los conductos donde se lleva a cabo la ramificación ductal de la glándula en crecimiento (Cowie y Tindal, 1971) y

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

su aparición es el resultado del efecto residual de las hormonas maternas y fetales (Imagawa y col., 1994). El epitelio de los ductos y de los botones secreta un líquido semejante al colostro humano llamado "leche de brujas". Esta actividad solo puede durar hasta tres semanas ya que posteriormente, la glándula mamaria retorna a un estado de reposo en el cual, los ductos y los botones terminales presentan una regresión y el epitelio da lugar a la formación de una bicapa de células (Cowie y Tindal, 1971).

Pubertad

Durante la pubertad (cuatro a seis semanas) la ramificación ductal en la rata hembra sexualmente madura continúa hasta que los ductos alcanzan los límites del tejido graso. El crecimiento ductal probablemente es inducido por el mismo complejo mamogénico de la fase prepuberal, pero además se ha visto que los estrógenos y la progesterona provenientes de los ciclos ováricos regulares son esenciales para el desarrollo túbulo-alveolar (Bresciani, 1971).

Gestación

El desarrollo de la glándula mamaria durante la gestación comprende dos fases : la mamogénesis y la galactogénesis.

-Mamogénesis o período de desarrollo y diferenciación morfológica. Ocurre durante los dos primeros tercios de la gestación. En esta fase existe una estructuración y desarrollo del sistema de conductos, de los elementos vasculares y del tejido conectivo, así como una proliferación y diferenciación de las células

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

alveolares (Tucker, 1994). En la Tabla 2 se muestran los factores involucrados en estos cambios y sus principales funciones.

TABLA 2. Regulación endócrina de la mamogénesis.
(Tomado de Tucker, 1994).

HORMONA	ESPECIE	EFECTO PRINCIPAL
Estrógenos	Rata, ratón, hombre, rumiantes y conejo.	Crecimiento y diferenciación del árbol ductal. Permisivos con progesterona y con el lactógeno placentario en la diferenciación túbulo alveolar.
Progesterona	Rata, ratón, hombre, rumiantes y conejo.	Crecimiento y diferenciación lóbulo-alveolar.
Lactógeno placentario	Hombre, rumiantes, conejo y yegua.	Sinergiza con los estrógenos y con la progesterona en el crecimiento y en la diferenciación lóbulo-alveolar.
Glucocorticoides	Rata, ratón, hombre, rumiantes y conejo.	Permisivo con los estrógenos sobre la diferenciación del árbol ductal. Sinergizan con la progesterona y con el lactógeno placentario en el desarrollo lóbulo-alveolar.
Hormonas tiroideas	Rata, ratón, hombre, rumiantes y conejo.	Permisivo con los estrógenos sobre la diferenciación del árbol ductal. Sinergizan con progesterona, glucocorticoides y lactógeno placentario en el desarrollo lóbulo-alveolar.

-Galactogénesis o período de diferenciación funcional. Ocurre al final del último tercio de la gestación. En esta fase se observa un desarrollo e hipertrofia del aparato secretor, el cual da lugar al inicio de la secreción láctea (Tucker, 1994). En la Tabla 3 se muestran los factores involucrados en estos cambios y sus principales funciones.

TESIS CON
FALLA DE CUBRIR

TABLA 3. Regulación endócrina de la galactogénesis.
(Tomado de Tucker, 1994).

HORMONA	ESPECIE	EFEECTO PRINCIPAL
Estrógenos	Rata, ratón, hombre, rumiantes y conejo.	Sinergizan y facilitan a la prolactina en la diferenciación citológica y enzimática.
Prolactina	Rata, ratón, hombre, cabra y conejo.	Establecimiento de la síntesis de la leche. Determina la composición iónica de la leche.
Hormona de crecimiento	Rata, ratón, hombre y rumiantes.	Sinergiza la acción de la prolactina y de los glucocorticoides sobre la síntesis enzimática.
Glucocorticoides	Rata, hombre, rumiantes y conejo.	Facilitan la síntesis enzimática alveolar provocada por la prolactina y por la hormona del crecimiento.
Hormonas tiroideas	Rata, hombre, rumiantes y conejo.	Sinergizan la actividad y la síntesis enzimática provocada por la prolactina y por la hormona del crecimiento. Estimulan la síntesis de la α lactoalbúmina que es una subunidad de la lactosa sintetasa, constituyendo así la enzima limitante para la síntesis de la principal azúcar láctea, la lactosa.

Lactancia

Una vez que la glándula ha alcanzado la máxima fase de desarrollo, se establece la lactancia con un aumento repentino en la actividad secretora de las células epiteliales. Momentos antes del parto, la relación en la concentración plasmática de los estrógenos y la progesterona se invierte, con lo que se eleva bruscamente la concentración de estrógenos y disminuye la de progesterona. Al poco tiempo, como resultado de estos cambios, también aumentan las concentraciones de

PRL, prostaglandinas F₂ (PGF₂), OT y corticoesteroides suprarrenales (Cowie y col., 1980).

La lactancia incluye dos procesos estrechamente vinculados: a) la *secreción láctea*, que comprende a los mecanismos mediante los cuales se sintetizan los componentes de la leche en las células epiteliales y pasan del citoplasma al lumen alveolar y b) la *evacuación láctea* que determina la expulsión de la leche de la glándula mamaria (Beyer y Mena, 1969). Asimismo, la lactancia transcurre por diversas fases que son el resultado de una regulación activa por parte de influencias facilitadoras e inhibitoras de dicha función (Clapp y col., 1987):

-*Galactotrofia*. Es la fase temprana del ciclo, una vez que se inicia la succión y que ha ocurrido la lactogénesis. En esta fase, el incremento progresivo en la producción de leche está determinado por el predominio de las acciones estimuladoras de la succión.

-*Galactostasis*. Es la fase intermedia en el mantenimiento de la producción láctea, donde se equilibran las influencias estimuladoras e inhibitoras de la succión. Para que esta fase ocurra es necesario que la glándula mamaria sea vaciada frecuentemente. Sin embargo, aunque se mantenga una aplicación intensa de succión para obtener una tasa adecuada de eyección de leche, la lactancia no podrá ser sostenida indefinidamente (Tucker, 1974). Por esto, la síntesis y la evacuación láctea son dos procesos íntimamente asociados. La OT se requiere para la expulsión de leche mientras que algunas otras hormonas son necesarias para mantener la secreción intensa de la leche. Los requerimientos hormonales específicos varían entre las especies, pero en general el complejo galactopoyético

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

está conformado por PRL, GH, T4, corticoides suprarrenales y PTH (Tucker, 1974).

-*Galactolisis*. Es la fase de declinación de producción láctea y está determinada por el predominio de los efectos inhibidores de la succión. En esta fase ocurre un decaimiento gradual en la actividad secretora de la glándula mamaria, que da como resultado final el cese de la lactancia. Es común que cuando se reduce la frecuencia o la calidad de la evacuación láctea, la secreción de leche disminuye o cesa. Aunque no se conocen con precisión los mecanismos que producen el cese gradual de la secreción láctea, se ha observado que si se altera la frecuencia de estimulación de la hipófisis o de la glándula mamaria se producen cambios en la función secretora de la leche. Se han demostrado los siguientes efectos al disminuir la frecuencia de estimulación de la hipófisis (aumentando la duración del intervalo de no succión): la PRL se tarda en reaccumular en la hipófisis después de la succión; al principio aumenta la liberación de PRL, pero en tanto se alargue este intervalo (más allá de 12 horas) se bloquea la liberación de PRL en respuesta a la succión; se reduce la capacidad autónoma de la hipófisis para secretar PRL *in vitro* y finalmente, disminuye la respuesta secretora de leche de la glándula mamaria por la administración de PRL exógena (Grosvenor y Mena, 1974). Asimismo, se ha observado que hacia el final de la lactancia, independientemente de que la frecuencia de estimulación de la hipófisis sea la misma, pueden comenzar a actuar sistemas inhibidores específicos, los cuales provocan una inhibición de los efectos galactopoyéticos normales de la PRL que ha sido liberada hacia la circulación (Grosvenor y Mena, 1974).

TESIS CON
FALLA DE COTIZEN

Finalmente, también se ha observado en el conejo que la succión de las crías de finales de la lactancia es cualitativamente diferente de la succión de crías de principios de ciclo. Así, mientras que las crías jóvenes son capaces de prolongar el ciclo de la lactancia, la succión por crías viejas ejerce el efecto opuesto (Mena y col., 1990a).

TESIS CON
FALLA DE CUBIEN

MECANISMOS NEUROENDÓCRINOS DE LA LACTANCIA

Durante la lactancia, el principal estímulo de las crías sobre la madre es la succión ejercida sobre los receptores localizados en la zona del pezón. Esto desencadena un reflejo, cuyos impulsos ascienden por el SNC hasta los núcleos supraóptico (SO) y paraventricular (PV) del hipotálamo (Ely y Petersen, 1941). Dicho estímulo provoca la liberación a la circulación de las hormonas del complejo galactopoyético: Así, la adenohipófisis libera PRL, hormona adrenocorticocorticotrófica (ACTH), GH, hormona estimulante de tirotrinas (TSH) y hormona estimulante de los melanocitos (MSH); la neurohipófisis libera OT y hormona antidiurética (ADH) y la glándula suprarrenal secreta Epinefrina (E) y NE (Grosvenor y Mena, 1974). Todas estas hormonas están involucradas de manera interrelacionada en la síntesis y en la evacuación de la leche.

Secreción láctea.

Al comienzo de la lactancia, a los pocos días del parto, las células alveolares ya muestran todas las características morfológicas de una célula en fase activa de síntesis y secreción de proteínas, además de presentar otras características únicas para la secreción de grasa. Para esta última función, las células se encuentran polarizadas y contienen abundantes organelos de secreción como retículo endoplásmico rugoso (de predominio basal), aparato de Golgi y una gran cantidad de mitocondrias (Linzell y Parker, 1971).

Las células del epitelio alveolar elaboran los componentes de la leche (lactosa, grasa y proteína) a partir de sus precursores en el plasma (glucosa, ácidos grasos y amino ácidos). Este proceso incluye la captación y concentración de los

elementos plasmáticos (H_2O , iones, colesterol, etc.), así como la excreción de los productos elaborados hacia el lumen alveolar (Cowie y col., 1980).

La principal hormona involucrada en la secreción láctea es la PRL, la cual influye directamente sobre la función secretora de la glándula mamaria al ejercer diversos efectos. Se ha observado que estimula la proliferación celular y que es determinante para la adquisición final de las características ultraestructurales y funcionales que diferencian al tejido epitelial alveolar en secretor. Además, la PRL estimula la función secretora glandular mediante una acción generalizada sobre el metabolismo del epitelio alveolar que involucra la estimulación de la síntesis de proteínas, tanto las que son secretadas en la leche (caseína, α lactoalbúmina, β lactoglobulina, etc.), como las que participan en la elaboración de sus componentes. Asimismo, la PRL estimula el metabolismo de los lípidos y regula el flujo iónico a través del epitelio secretor (Cowie y col., 1980).

Evacuación láctea.

El reflejo neurohumoral de la evacuación láctea.

Durante la succión, la estimulación de receptores sensibles a la presión y al tacto, localizados en la zona del pezón, activa el reflejo de evacuación láctea. Los impulsos generados por esta estimulación se transmiten por los nervios segmentarios y por vías específicas dentro del SNC hasta los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo (Cross, 1961) provocando un aumento en la frecuencia de disparo de las neuronas oxitocinérgicas donde se lleva a cabo la síntesis, procesamiento y finalmente la liberación de OT a la circulación, a partir de

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

sus terminales axónicas (Lincoln y col., 1973). La OT liberada se acopla a sus receptores y estimula la contracción de las células mioepiteliales (Soloff, 1985), lo que provoca que la luz intra-alveolar disminuya y que los conductos de menor calibre se acorten y se dilaten (Linzell, 1955). De esta forma aumenta la presión intramamaria y la leche es expulsada desde los alvéolos hacia los conductos mayores o hacia la cisterna glandular mamaria en el caso de los rumiantes (Wakerley y col., 1994).

Secreción de OT.

La secreción de OT puede inferirse al registrar la presión intramamaria de la glándula o por la cantidad de leche evacuada después de un período de succión. Por otra parte, mediante el radioinmunoensayo, se han hecho mediciones directas de las concentraciones de OT en la circulación, las cuales son muy variables. En general, después de iniciarse la succión, la concentración aumenta rápidamente; este aumento es de corta duración y la cantidad de hormona disminuye, aún cuando continúe la estimulación de la glándula mamaria (Grosvenor y col., 1986). Aunque el circuito neuronal responsable de la transmisión del reflejo de la evacuación láctea es específico para las neuronas oxitocinérgicas, Lincoln y Rusell (1985) demostraron que diversos estímulos que provocan la liberación de ADH por parte de la neurohipófisis también provocan la liberación de OT. Estos pueden ser: la hemorragia, un aumento en la presión osmótica plasmática y la deshidratación (Lincoln y Russell, 1985).

También se ha observado que la activación de mecanorreceptores ductales provoca un aumento en la actividad rítmica neurosecretora de las células

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

oxitocinérgicas de los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo facilitando la liberación de OT (Lincoln y Wakerley, 1975).

Regulación autonómica de la evacuación láctea.

Desde hace tiempo se han acumulado evidencias experimentales que apoyan la hipótesis de que la glándula mamaria es un efector autonómico y que la evacuación láctea está regulada fisiológicamente por la división simpática del SNA (Mena y col., 1995).

El tono del músculo liso ductal y arteriolar de la glándula mamaria se encuentra regulado por la inervación eferente de tipo simpático (Findlay y Grosvenor, 1969). La activación del SNS da lugar a un aumento en la resistencia ductal y/o de la vasoconstricción mamaria, provocando en última instancia una disminución en la tasa de expulsión de leche. Así mismo, se ha demostrado que al practicar una simpatectomía quirúrgica o farmacológica se produce un aumento en la velocidad del flujo de la leche hacia el exterior (Mena y col., 1979).

El control simpático de la glándula mamaria de la rata parece estar sostenida de manera tónica, aunque en parte también muestra un componente de activación fásica (Grosvenor y col., 1972) que ocurre a través de un reflejo espinal secundario a la estimulación de receptores en la glándula mamaria (Mena y col., 1978).

En resumen, la regulación de la evacuación láctea es muy compleja y en ella participan diversos mecanismos neurales y humorales como son:

- Hormonas hipofisarias (OT)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- El SNA a través de las CATs circulantes provenientes de la médula suprarrenal.
- Mecanismos centrales adrenérgicos que pueden regular el funcionamiento del aparato motor de la glándula mamaria por medio de su inervación (Mena y col., 1995).

Por todo esto, la lactancia es un excelente modelo para estudiar la interacción del SNA y el sistema endócrino. En lo antecedentes específicos se detalla la información acerca de la participación del SNA en la regulación de la evacuación láctea.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

La glándula mamaria es un órgano de secreción externa, cuyo producto es sintetizado y evacuado mediante una compleja regulación neuroendócrina que abarca la activación de mecanismos estimuladores e inhibidores inducidos por el estímulo de la succión. Así, la liberación de OT por el estímulo de la succión provoca la evacuación de la leche, pero a su vez también puede ser facilitada o contrarrestada por acción del SNS.

En el caso de la facilitación se ha observado que los mecanismos α adrenérgicos en el SNC estimulan la liberación de OT (Crowley y Armstrong, 1992). Así mismo, el estímulo de succión provoca un aumento en la secreción de NE hacia las regiones magnocelulares del hipotálamo lo cual está correlacionado con un aumento en la liberación de OT (Crowley y col., 1987). Se ha demostrado a través de la determinación de los niveles sanguíneos de OT (Bridges y col., 1976) y mediante la detección de un aumento en la presión intramamaria (Clarke y col., 1979), que la administración central de NE y de agonistas α adrenérgicos también estimulan la liberación de la OT.

Estudios previos han mostrado que los inhibidores de la síntesis de NE y los antagonistas α adrenérgicos bloquean el reflejo de la evacuación láctea inducida por la succión (Clarke y col., 1979; Song y col., 1988). Así mismo, también existe evidencia de la inhibición de la evacuación láctea (Clarke y Lincoln, 1976; Moos y Richard., 1979) y de la liberación de OT (Song y col., 1988) a través de la estimulación de receptores β adrenérgicos.

TESIS CON
FALLA DE CÍGEN

Por otro lado, el Sistema Nervioso Simpático también es capaz de bloquear la evacuación láctea por efecto de las CATs que se liberan sistémicamente en respuesta al estímulo de la succión (Mena y col., 1979; Clapp y col., 1985; Song y col., 1988). También se ha visto que eventos tales como la estimulación eléctrica de un nervio mamario provocan la liberación hacia la sangre de E y NE (Kuanyshbekova, 1976; Barowicz, 1979; Ewy y Barowicz, 1981; Clapp y col., 1985).

Asimismo, se ha observado que la aplicación intracerebroventricular (ICV) de agonistas α y β adrenérgicos facilita o inhibe, respectivamente, las respuestas de presión intramamaria inducidas por la administración exógena de OT. Dichos efectos son mediados a través de la inervación eferente de la glándula mamaria ya que no ocurren cuando se seccionan las raíces ventrales correspondientes (Mena y col., 1995).

El mecanismo mediante el cual las CATs circulantes dan lugar a la inhibición de la evacuación láctea se debe en parte a que provocan un aumento en el tono del músculo liso de la glándula mamaria lo que produce una constricción de las arteriolas y de los ductos de la glándula mamaria (Cross 1955; Bisset y col., 1967; Vorherr, 1971), además de que ejercen un antagonismo competitivo con la OT en el mioepitelio efector (Chan, 1965).

Sin embargo, existe un mecanismo reflejo que bloquea las acciones antagónicas del SNA sobre la evacuación láctea. Se piensa que existen mecanorreceptores localizados en los conductos principales que se activan cuando los conductos mamaros se dilatan por efecto de la leche que es movilizada hacia el exterior

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

(Findlay, 1966; Findlay y Grosvenor, 1969). Estudios previos han mostrado que la activación de mecanorreceptores ductales inducida por la administración de leche al interior de una glándula torácica, bloquea la liberación fásica de E (Clapp y col., 1985) inducida por la estimulación eléctrica del cabo central de un nervio mamario (EENM). De igual forma, se ha observado que la activación de mecanorreceptores ductales bloquea la depresión de las respuestas de presión intramamaria inducidas por EENM (Mena y col., 1979) o por la administración central de agonistas β adrenérgicos (Mena y col., 1995).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Todo lo anterior muestra que durante la succión, la activación del SNA inhibe la evacuación láctea a través de las CATs sistémicas y neurales, y que dichos efectos pueden ser bloqueados mediante la activación de mecanorreceptores ductales. Sin embargo, hasta la fecha no se conocen los mecanismos que median la activación del SNA por la succión, así como los mecanismos neurales mediante los cuales se ejerce esta regulación. De igual forma, no se conocen las poblaciones neuronales de la médula espinal responsables de la integración de las señales aferentes generadas por la succión, y que son propagadas hacia niveles cerebrales superiores o que dan lugar a la generación de reflejos segmentales y a la activación de estructuras simpáticas.

HIPÓTESIS

En el presente trabajo se propone la hipótesis de que la regulación simpática de la evacuación láctea es activada de manera refleja por el estímulo de la succión y es a su vez regulada por la activación de mecanorreceptores ductales.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

OBJETIVOS

1. Determinar si el estímulo de la succión inhibe de manera refleja la evacuación láctea inducida por OT en ratas lactantes anestesiadas con uretano. Analizar si los efectos inhibitorios de la succión se deben a las CATs suprarrenales y/o a la inervación simpática de la glándula mamaria.
2. Determinar si la activación de mecanorreceptores ductales bloquea la inhibición de la evacuación láctea inducida por la succión.
3. Determinar mediante técnicas inmunohistoquímicas, las poblaciones neuronales de la médula espinal de la rata lactante que se activan por la succión o la estimulación eléctrica de un nervio mamario.
4. Determinar la posible existencia de reflejos autonómicos segmentarios sobre la regulación funcional de las glándulas mamarias.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MATERIAL Y MÉTODOS

Se usaron ratas lactantes primíparas de la variedad Wistar, provenientes de una colonia desarrollada en el bioterio del Instituto de Neurobiología. Los animales se mantuvieron en cajas individuales en un cuarto con luz y temperatura controlados (23 - 25° C) con ciclos de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad. Fueron alimentados con alimento Purina y agua *ad libitum*. Las camadas fueron ajustadas a 10 crías en el día 2 - 4 post parto. Todos los animales fueron manipulados diariamente con el fin de minimizar los efectos no específicos durante la manipulación experimental.

Registros de evacuación láctea (cantidad de leche obtenida por las crías).

Una semana antes de los experimentos, algunos animales fueron implantados con una cánula guía de acero inoxidable en cada ventrículo cerebral (intracerebroventricular, ICV) bajo anestesia con éter. Las coordenadas estereotáxicas fueron usadas en relación a la línea interaural: A-P: +5mm, L: - 2,5mm, D-V +4,5mm (Paxinos y Watson, 1982). En el día 8-14 postparto, cada madre fue separada de sus crías y se anestesió con uretano (etil carbamato; Cedrosa, Cd. México, México) administrado por vía intraperitoneal a una dosis de 115-130 mg/100g de peso corporal para después ser colocada en decúbito dorsal sobre un colchón con un sistema de circulación de agua tibia que mantenía la temperatura a 32-35°C. Se insertó un catéter de polietileno en la vena yugular y una cánula de plástico en la tráquea. A un grupo de animales se les practicó una hipofisectomía (HX) a través de un abordaje parafaríngeo, mientras que a otro

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

grupo se le practicó una adrenalectomía bilateral (ADX), a través de una incisión dorsal mediante la ligadura de las glándulas suprarrenales. Después de la cirugía, se permitió un período de recuperación de por lo menos 2h antes de cualquier manipulación experimental. Al final de cada experimento, se confirmó con un microscopio de disección que cada procedimiento quedara completo y que la posición de las cánulas ICV fuera la indicada.

Las vejigas de todas las crías fueron vaciadas manualmente y posteriormente, la camada fue colocada en contacto con la superficie ventral de la madre permitiendo un período de succión de 15 minutos para establecer contacto con los pezones. Una vez que la succión se había establecido claramente, se administraron inyecciones intrayugulares de 0.8 mU de OT (Syntocinon; Sandoz, Basel, Suiza) en 50 μ l de solución salina cada 2 minutos durante 4 periodos de 10 min cada uno. La evacuación láctea se determinó pesando a las crías al final de cada período consecutivo de succión y la diferencia de peso se expresó como gramos de leche. Las sustancias empleadas fueron administradas 5 min. antes del primer período de 10 min. y se analizó su efecto sobre la evacuación láctea. Para determinar las diferencias estadísticas significativas entre grupos experimentales, se usó una ANOVA de una vía seguida de la comparación múltiple de Tukey.

Inyección Intracerebroventricular (ICV) de propranolol (PROP)

Diez minutos antes de cada experimento, se introdujo a la cánula ICV un catéter de polietileno de 0.011 pulgadas de diámetro conectado a una jeringa de Hamilton de 25 μ l. El catéter se llenó con agua destilada hasta que se pudo distinguir bien un microlitro de agua en el interior de la jeringa y pudiera ser confiablemente

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

expulsado. Después de esto, se introdujo 0.5 μ l de aire en el catéter y se colocó en la solución de PROP (hidrocloruro de propranolol, Aldrich Chem. Co., USA). Durante las inyecciones, el movimiento de la burbuja de aire fue el marcador que aseguraba que la sustancia había sido inyectada en el cerebro.

Registros de Presión intramamaria (PIM)

Las determinaciones de PIM fueron realizadas en la forma descrita previamente (Mena y col., 1979; Clapp y col., 1985). Se utilizaron ratas lactantes anestesiadas con uretano a las que se les introdujo en una glándula mamaria abdominal una cánula de acero inoxidable del número 26 sin bisel, sosteniéndola verticalmente con unos seguros. Posteriormente la cánula fue conectada mediante un tubo en T de polietileno de 6mm de diámetro a un transductor de presión Statham P23Db (Gould Inc.). A través de la otra rama del tubo en T se inyectó leche y la salida del transductor fue registrada en un polígrafo Grass modelo 79 (fig. 5).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

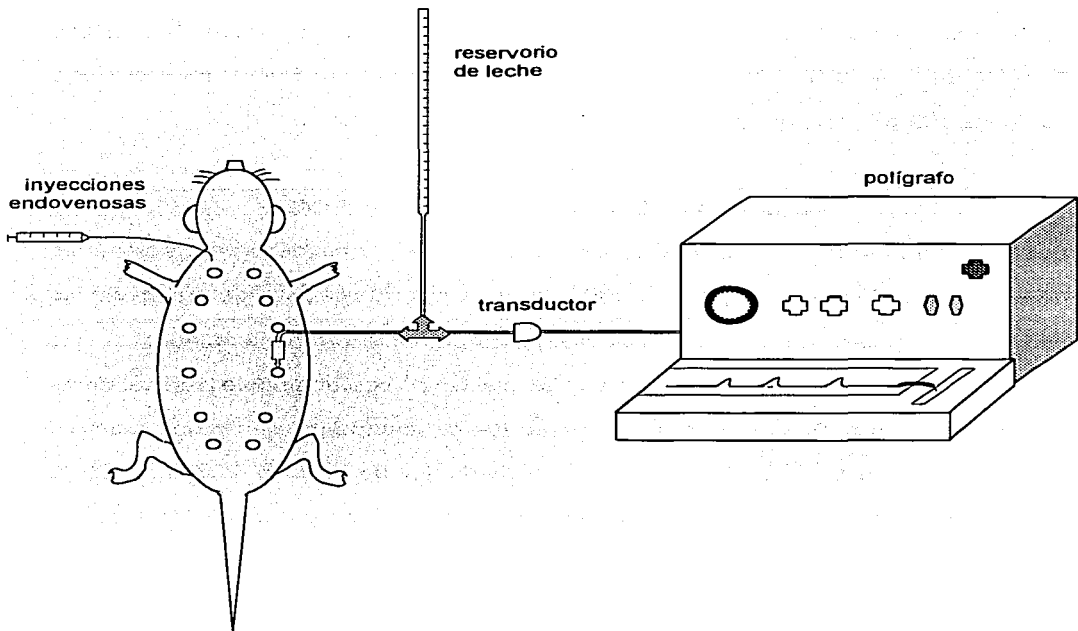


FIGURA 5. Representación esquemática del montaje empleado para realizar registros de presión intramamaria y de la tasa de entrada de leche a la glándula mamaria. (Ver descripción en el texto).

Posteriormente, se introdujo leche tibia de vaca en la glándula canulada desde una pipeta colocada a 50 cm. por encima de la rata. El volumen total de leche dentro de cada glándula fue pequeño (0.3 – 0.7 ml). La glándula mamaria se adaptaba al volumen añadido en pocos minutos, lográndose una estabilización de la PIM en pocos centímetros de agua por encima de la presión atmosférica. Se

TESIS CON
FALLA DE CONTEN

administró una inyección intrayugular de 1-2 mU de OT para provocar la distribución homogénea de la leche dentro de la glándula para posteriormente aplicar dosis de 0.1 - 1 mU de OT intrayugulares (cada dosis en un volumen de 50 μ l) para estabilizar las respuestas de presión normales en un rango de entre 5 y 10 centímetros de agua. Esto es necesario porque normalmente existe una variación considerable en la respuesta de la glándula mamaria a la OT. Una vez establecida una relación dosis - respuesta se aplicó en cada caso aquella dosis que produjo un poco menos del incremento máximo en la PIM. Dicha dosis se administró varias veces durante un período control. Con el fin de lograr una atenuación completa de la PIM, el intervalo entre las inyecciones de OT nunca fue menor de 1-2 minutos.

Registro de la tasa de entrada de leche a la glándula mamaria

Algunos experimentos fueron diseñados para determinar si un aumento en la resistencia ductal está involucrado en los efectos inhibitorios de la succión sobre la evacuación láctea. El método empleado, con pequeñas modificaciones, fue descrito por Grosvenor y Findlay (1968); permite medir de manera indirecta la ductoconstricción de la glándula mamaria mediante la determinación de la tasa de entrada de incrementos sucesivos de leche a la glándula mamaria de la rata anestesiada con uretano (fig.5).

En cada experimento, las glándulas mamarias de la rata fueron vaciadas inicialmente mediante la succión de una camada de crías previamente separadas por 6h de la madre. Asimismo, con el propósito de que las crías obtuvieran toda la

leche presente en las glándulas, se administró una dosis de 50mU de OT a la madre antes de la succión. Posteriormente, en una glándula abdominal se introdujo una cánula de acero inoxidable conectada mediante un tubo en T de poliestireno a un transductor de presión Statham P23Db. A través de la otra rama del tubo en T se inyectó la leche. La señal de salida del transductor fue registrada en un polígrafo Grass. Antes de canular la glándula se llenaba con leche todo el reservorio y se mantenía a una presión constante de 90 mm de Hg, de manera que el fluido entraba a la glándula mamaria siempre a la misma presión. El volumen de leche que fluye a la glándula mamaria se regula con una llave de paso entre la pipeta y el tubo en T. Por operación manual de la llave de paso se dejaba pasar 0.1 ml de leche hacia la glándula cada 5 minutos. Se registró el tiempo en segundos que toma la entrada de cada dosis de leche a la glándula mamaria (tiempo de entrada). El tiempo de entrada se comparó con el tiempo requerido para que el mismo volumen pase por el sistema antes de canular la glándula (tiempo de flujo por el sistema).

La tasa de entrada (TaE) de leche fue calculada en cada experimento de la siguiente forma:

$$TaE = \frac{\text{tiempo de flujo por el sistema}}{\text{tiempo de entrada a la glándula mamaria}} \times 100$$

Esta manera de calcular la tasa de entrada de leche anula las diferencias en la viscosidad de la leche que se use en cada experimento. En estos experimentos, los registros se realizaron antes, durante y después de la manipulación experimental i.e., 15 minutos de succión, que fue aplicada por las crías en las

TESIS CON
FALLA DE CÍGEN

glándulas restantes. Para las diferencias entre grupos experimentales se usó una ANOVA de dos vías seguida de la prueba múltiple de Tukey, comparando el efecto de las dosis subsecuentes de leche a la glándula mamaria y el efecto de la succión.

Estimulación eléctrica del nervio mamario (EENM)

Se seleccionó el nervio segmentario correspondiente a la primera glándula abdominal, el cual fue disecado hasta un punto cercano a su emergencia de la columna vertebral, tomando como referencia el ángulo costovetral (fig. 6). Se ha demostrado que la estimulación eléctrica de este nervio intercostal desencadena la evacuación láctea y provoca la liberación de OT, PRL y otras hormonas. Por esta razón ha sido denominado "nervio mamario" por distintos autores (Mena y col., 1978; 1980; Clapp y col., 1985; Haller, 1985; Voloschin y col., 1988).

El nervio fue seccionado en su porción distal a tres centímetros de distancia de la glándula mamaria y fue montado sobre un electrodo bipolar de plata para estimulación. Se mantuvo sumergido en una jareta de piel con petrolato líquido (Nujol; Plough de México, S.A. de C.V.) lo cual permite estimular el nervio por varias horas en condiciones óptimas de conducción del estímulo eléctrico. Se empleó un estimulador Grass modelo S44, conectado a una unidad de aislamiento Grass modelo SIU5 y se dieron pulsos de 1 msec de duración por 5 minutos con una frecuencia de 10-20 / seg y una intensidad de 20 Amp.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

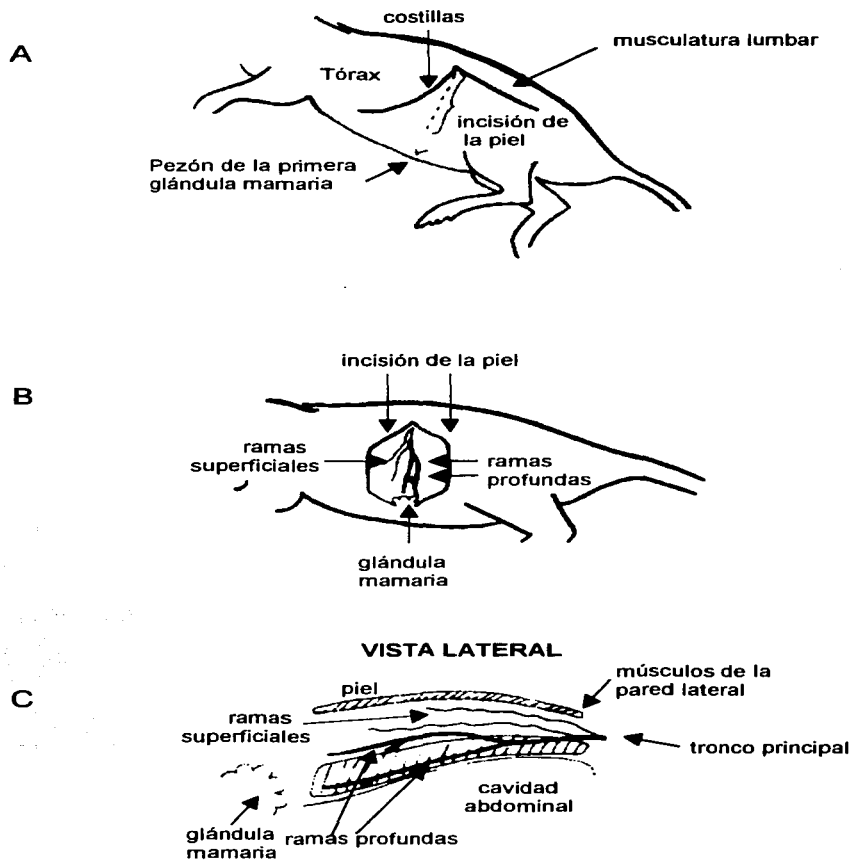


FIGURA 6. Esquema de la disección del nervio mamario correspondiente a la primera glándula abdominal izquierda. A. El nervio mamario se localizó incidiendo la piel a lo largo de una línea imaginaria desde el ángulo formado por la última costilla y la musculatura lumbar hasta el pezón de la glándula mamaria. **B y C.** El nervio antes de alcanzar la glándula se ramifica generalmente en dos ramas delgadas ubicadas entre la piel y la pared muscular abdominal y en dos ramas de mayor diámetro envueltas en la musculatura de la pared abdominal. (Tomado de Mena, y col., 1980).

Histología

A. Perfusión. Las ratas fueron anestesiadas profundamente con uretano al termino del período de separación de las crías ó 60 min. después de las manipulaciones experimentales, y se perfundieron a través de la aorta ascendente con 150ml. de solución salina al 0.9% seguido de 350 ml de paraformaldehído al 4% (pH 9.5 a 10°C). Se disecó la médula espinal a nivel de T13 y se postfijó en la misma solución durante tres horas a 4° C. Posteriormente se cambió a sacarosa al 10% por un período de 24 horas.

La médula espinal fue marcada al nivel del segmento torácico 10 y se guardó un fragmento caudal de 1 cm. Se colectaron secciones transversales de 40 µm de espesor con un microtomo de congelación LEICA modelo SM2000R a nivel de T13 a L1 y se guardaron en solución anticongelante (etilen-glicol al 30% y glicerol al 20% en buffer de fosfato de sodio al 0.05M) a -20°C hasta ser procesadas histoquímicamente. El segmento torácico 13 (T13) fue elegido porque varios estudios sobre la evacuación láctea se han enfocado en el registro o estimulación eléctrica de el nervio segmentario correspondiente a la primera glándula mamaria abdominal (Mena y col., 1980; Clapp y col., 1985; Voloschin y col., 1988) y las raíces correspondientes a este nervio mamario se localizan a este nivel espinal (Voloschin y col., 1988).

En otro grupo de ratas se realizaron cortes longitudinales de 25µm de espesor a lo largo de los segmentos T10 a L5, con el fin de visualizar las columnas de neuronas preganglionares de la médula espinal en dirección céfalo-caudal. Todas las secciones dorso-ventrales fueron colectadas y guardadas en anti-congelante.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

B. Inmunohistoquímica. La inmunoreactividad a fos (*Fos-ir*) fue detectada mediante la técnica convencional de avidina–biotina–inmunoperoxidasa (Sawchenko y col., 1990): Se enjuagan las secciones de médula espinal con KPBS, para después incubar con peróxido de hidrógeno al 0.6% en agua desionizada para bloquear toda actividad endógena de peroxidación. Se incuban las secciones con un anticuerpo primario anti-Fos (rabbit polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology) a una dilución de 1:5000, por 48 horas a 4° C, en 20 ml de KPBS + triton X100 al 0.3% + 400 µl de Suero Normal de Cabra (NGS). Las secciones medulares fueron subsecuentemente enjuagadas en cuatro ocasiones en KPBS y se incubaron por dos horas a temperatura ambiente con IgG biotinilada de cabra anti-conejo (laboratorios Vector, Burlington CA; 1: 200 en 10 ml de KPBS / triton X 100 0.3%). A continuación, las secciones se enjuagaron dos veces en KPBS y se incubaron en solución ABC (laboratorios Vector; Elite kit) por 60 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las secciones se enjuagaron cuatro veces en KPBS y dos veces en acetato de sodio 0.1 M y reaccionaron con 3,3' diaminobenzidina al 0.025% con intensificación de níquel. Después de enjuagar las secciones con KPBS, fueron montadas en un portaobjetos previamente gelatinado, se deshidrataron en alcoholes graduales y se cubrieron con un cubreobjetos usando Entellán (Merck). Las células *Fos-ir* se identificaron como una reacción negra, localizada en el núcleo celular. Las regiones específicas de la médula espinal se determinaron de acuerdo al atlas de Paxinos y Watson (1982) bajo microscopía de campo claro.

TESIS CON
FALLA DE CUBREN

C. Conteo de células

La fuerza relativa de inducción de Fos como resultado del tratamiento fue contada en todos los miembros de cada grupo por un observador que desconocía el estado de los animales. Se seleccionaron cinco secciones de T13-L1 de cada rata, las cuales mostraban el mayor número de células marcadas. Se contó y se promedió el número de células marcadas. Todas las células que mostraron Fos-ir fueron contadas sin importar la intensidad del marcaje. Para cada rata, incluyendo al grupo EENM, se contó el número subtotal de células en subdivisiones específicas en el lado izquierdo de la sustancia gris espinal (ipsilateral al nervio estimulado). Las subdivisiones usadas fueron definidas por otros autores (Presley y col., 1990; Tsou y col., 1996; Hagihira y col., 1997) de la siguiente manera: a) asta dorsal superficial (ADS, laminas I y II), b) nucleus proprius (NP, laminas III y IV), c) cuello del asta dorsal (CAD, laminas V y VI) y d) sustancia gris ventral (SGV, laminas VII, VIII, IX y X).

Las diferencias significantes entre los grupos que recibieron succión o EENM se determinaron mediante un análisis de varianza de una vía y la prueba de comparación múltiple Scheffe. Los valores de p menores a 0.05 fueron considerados estadísticamente significativos.

D. Caracterización inmuno-histoquímica de neuronas preganglionares simpáticas. *Doble tinción de inmunoperoxidasa.*

El doble marcaje para Fos-ir y transferasa de colina y acetilcolina (ChAT)-ir se realizó localizando en primer lugar la Fos-ir, utilizando un protocolo estándar de intensificación con níquel (*el producto de la reacción es de color negro*), como se

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

describió anteriormente. Posteriormente, el tejido se incubó en suero de conejo anti-ChAT (1:5,000; Chemicon) y la identificación de las neuronas ChAT-ir se realizó sin intensificación (café). Se identificaron las células que mostraron tinción nuclear para Fos e inmunorreactividad citoplásmica para ChAT.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESULTADOS

Objetivo 1. DISEÑO EXPERIMENTAL:

1.1. Determinar si la succión inhibe la evacuación láctea inducida por OT en ratas lactantes. Analizar el papel de las catecolaminas adrenales y/o neurales en dicha inhibición.

1.1.1. Se utilizaron ratas lactantes anestesiadas con uretano en las que se analizó la evacuación láctea inducida por OT exógena mediante el registro de la cantidad de leche obtenida por las crías. Los grupos control incluyeron animales sin ningún tratamiento, animales que recibieron solución salina por vía ICV y animales falsamente operados. En el primer grupo experimental se bloqueó el Sistema Nervioso Simpático de manera farmacológica con la administración sistémica o central del bloqueador β adrenérgico propranolol (PROP), mientras que en otro grupo, se realizó una extracción quirúrgica de las glándulas suprarrenales (ADX). Asimismo, para evaluar si el bloqueo en la evacuación láctea se debe a un bloqueo en la liberación de OT neurohipofisiaria secundaria a la activación simpática, se incluyeron dos grupos de animales hipofisectomizados (HX), que recibieron una dosis de solución salina o de PROP por vía ICV.

	EXPERIMENTAL	CONTROL
GRUPO 1	PROP IP (250 μ g) PROP ICV (5 μ g)	Control Salina ICV
GRUPO 2	ADX HX + Salina HX + PROP ICV (5 μ g)	ADX SHAM HX SHAM

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Efecto del estímulo de la succión sobre la evacuación láctea en ratas anestesiadas.

La figura 7 muestra que la evacuación láctea fue muy baja en los animales intactos (tanto control, como tratados con solución salina por vía ICV) después de un período de 40 minutos de succión por las crías. Así mismo, se observaron valores muy similares en ratas adrenalectomizadas (ADX) e hipofisectomizadas (HX). Sin embargo, la cantidad de leche obtenida por las crías fue significativamente mayor en las ratas que recibieron una dosis del bloqueador β adrenérgico por vía sistémica o central.

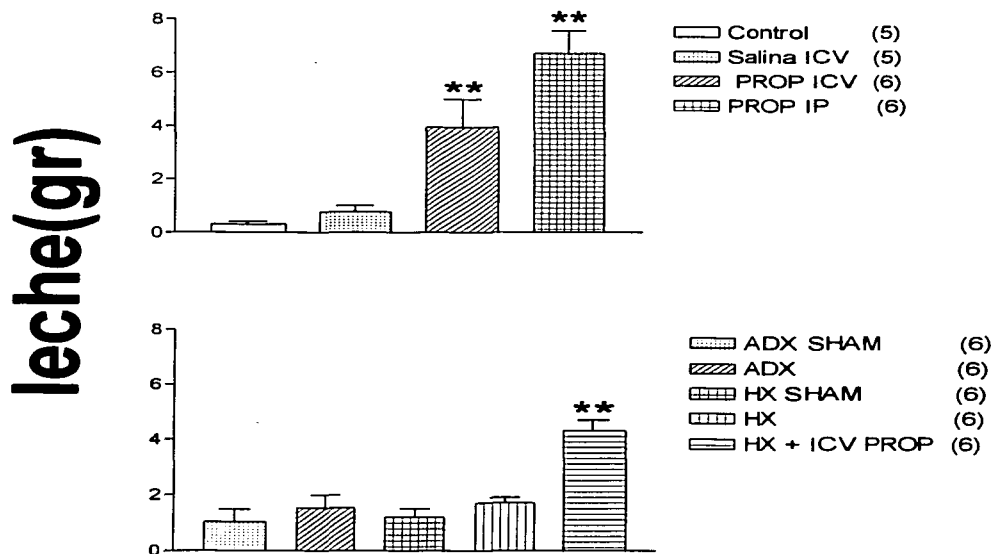


FIGURA 7. CANTIDAD DE LECHE OBTENIDA POR LAS CRIAS EN 5 PERIODOS DE SUCCION. Los valores son expresados en gramos de leche (promedio \pm ee). **= $p < 0.001$ en comparación a los grupos control (evaluado mediante una ANOVA de una vía y la prueba de comparación múltiple de Tukey).

Objetivo 2. DISEÑO EXPERIMENTAL:

- 2.1. Determinar si la estimulación de los mecanorreceptores ductales previa a la aplicación de la succión en la rata, es capaz de facilitar la evacuación láctea en respuesta a la OT y de disminuir el tono muscular de los conductos mamarios.
- 2.1.1. Se utilizaron ratas anestesiadas en las que se provocó la dilatación del sistema ductal 40 minutos antes de cada experimento, ya sea en forma mecánica (administración de leche al interior de una glándula canulada en ratas anestesiadas) o en ratas despiertas, mediante la movilización intraglandular de leche inducida por la OT aplicada exógenamente (60 mU por vía intraperitoneal) o por la OT liberada en respuesta a un período breve de succión. Se ha demostrado que ambos procedimientos contrarrestan la depresión inicial de la evacuación láctea que ocurre normalmente durante un período de 30-40 minutos de succión (Grosvenor & Mena, 1982; Deis, 1968). Las crías no obtienen nada de leche durante un período de 5 minutos de succión (Grosvenor & Mena, 1982; Deis, 1968) a pesar de que se libera OT de la neurohipófisis (Mena y col., 1985; Goodman y Grosvenor, 1983). Así, la OT inyectada exógenamente o liberada endógenamente por la succión, supuestamente moviliza a la leche dentro del sistema ductal, dando lugar a la activación de mecanorreceptores. Posteriormente se aplicó un período de succión y se analizó su efecto sobre la evacuación láctea y sobre el tono ductal de la glándula mamaria. La evacuación láctea inducida por OT se midió mediante

el registro isométrico de las respuestas de presión intramamaria (RPIM) de una glándula abdominal inducidas por dosis repetidas de OT (OT) y mediante el registro de la cantidad de leche obtenida por las crías. El tono ductal se analizó mediante el registro de la tasa de entrada de incrementos sucesivos de leche al interior de una glándula canulada.

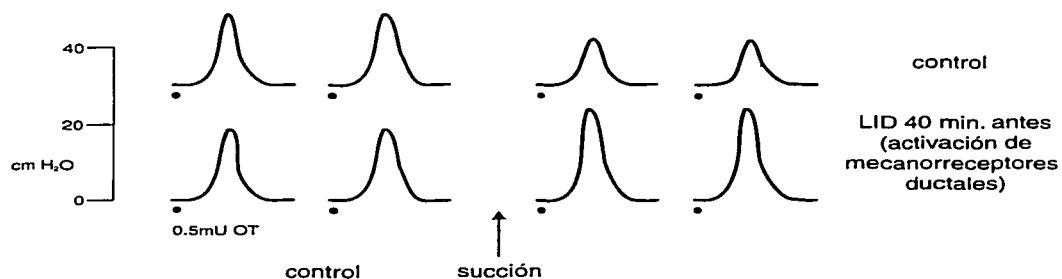
2.1.2. Dado que la NE aplicada por vía Intracerebroventricular es capaz de facilitar las respuestas de PIM debidas a OT en la rata anestesiada, se analizó la posibilidad de que la NA central esté mediando los efectos de la activación de los mecanorreceptores ductales. Para tal fin se aplicó una dosis de 250 μ gr de un bloqueador α_1 adrenérgico (prazosín) por vía intraperitoneal (IP) y se analizó el efecto de la dilatación ductal sobre la cantidad de leche obtenida por las crías tras un período de succión.

	EXPERIMENTAL (40 min. antes)	CONTROL (40 min. antes)	REGISTRO
GRUPO 1	LECHE INTRADUCTAL (LID, 0.1-0.2 ml)	Control	RESPUESTAS DE PIM OCASIONADAS POR DOSIS REPETIDAS DE OT
GRUPO 2	OT IP SUCCIÓN 5' PRAZOSÍN+SUCCIÓN 5'	SALINA IP MANIPULACIÓN 5'	CANTIDAD DE LECHE OBTENIDA POR LAS CRIÁS
GRUPO 3	SUCCIÓN 5'	MANIPULACIÓN 5'	TASA DE ENTRADA DE INCREMENTOS SUCESSIVOS DE LECHE AL INTERIOR DE UNA GLÁNDULA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Efecto de la activación de mecanorreceptores ductales sobre las respuestas de presión intramamaria a la OT.

La figura 8 muestra que el estímulo de la succión provoca una disminución en la pendiente de subida y en la amplitud de las respuestas de presión intramamaria (PIM) ocasionadas por la administración intravenosa de dosis repetidas de OT. Sin embargo, la activación de los mecanorreceptores ductales, secundaria a la aplicación de 0.1 - 0.2 ml. de leche intraductal (LID) cuarenta minutos antes de la succión, bloquea dicho efecto.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FIGURA 8. Registro de presión intramamaria de una glándula mamaria abdominal en ratas lactantes anestesiadas. Se administraron dosis de 0.5 mU de OT (indicado por los puntos negros debajo de cada registro) antes y después de un período de succión (indicado por la flecha). Efecto de la administración intraductal de 0.1-0.2 ml de leche (LID) en una glándula torácica sobre la depresión de las repuestas de PIM a la OT exógena de una glándula abdominal, inducida por un período de 15 minutos de succión.

Efecto de la activación de mecanorreceptores ductales sobre la evacuación láctea.

La figura 9 muestra que la cantidad de leche obtenida por las crías durante 5 períodos de succión es significativamente mayor en el grupo que había recibido previamente una dosis de OT por vía intraperitoneal, en comparación con el grupo control que recibió solución salina.

Por otro lado, la figura 9 muestra que cuando los animales reciben un período corto de succión, 40 minutos antes de ser succionados nuevamente, la cantidad de leche obtenida por las crías es significativamente mayor que la del grupo que solamente había sido manipulado. Inclusive, el efecto fue considerablemente mayor que el observado en los animales tratados con OT. Así mismo, se observa que el efecto facilitador que provoca la aplicación del período corto de succión previo al experimento, es bloqueado por la administración sistémica del antagonista α_1 adrenérgico prazosín, lo cual sugiere que dicho efecto es mediado por la activación de mecanismos α adrenérgicos.

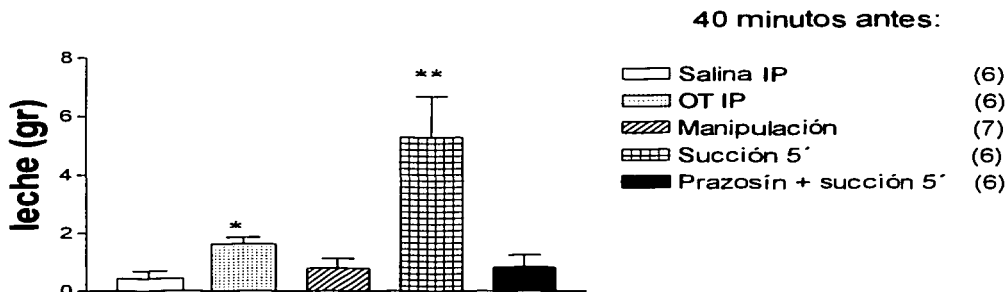


FIGURA 9. CANTIDAD DE LECHE OBTENIDA POR LAS CRIAS EN 5 PERIODOS DE SUCCION. Los valores son expresados en gramos de leche (promedio \pm ee). * = $p < 0.05$ o ** = $p < 0.01$ en comparación al grupo salina IP o manipulación, respectivamente (evaluado mediante una ANOVA de una vía y la prueba de comparación múltiple de Tukey).

TESIS CON
FALLA DE CUMPLIMIENTO

Efecto de la activación de mecanorreceptores ductales sobre el tono de los conductos mamarios.

La figura 10 muestra la modificación de la tasa de entrada de leche a una glándula mamaria de una rata anestesiada con uretano por la aplicación del estímulo de la succión.

La gráfica muestra que en el grupo control, el cual solamente fue manipulado 40 minutos antes del experimento, el estímulo de la succión provoca una disminución significativa en la tasa de entrada de leche a la glándula mamaria. Por otro lado, en los animales que recibieron un período breve de succión 40 minutos antes del experimento no se observa dicho efecto. Esto sugiere que el estímulo de la succión provoca de manera reversible, un aumento en la resistencia al flujo de entrada de la leche debido a un aumento en el tono de los conductos mamarios y que dicho efecto es bloqueado por la dilatación ductal inducida por la OT liberada endógenamente durante la succión inicial.

Estos resultados en conjunto apoyan la hipótesis que la activación simpática inducida por la succión provoca un aumento en el tono de los conductos mamarios que bloquea la salida de la leche y que dicho efecto es modulado por la activación de mecanismos intraglandulares sensibles a los cambios de presión.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

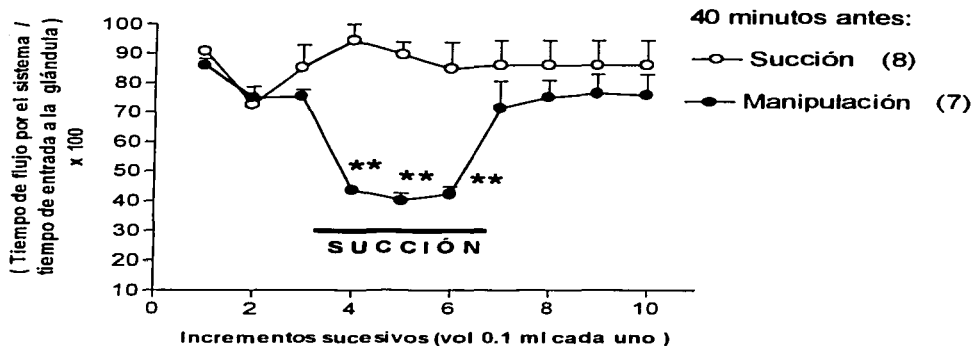


FIGURA 10. EFECTO DE LA SUCCIÓN SOBRE LA TASA DE ENTRADA DE INCREMENTOS SUCESIVOS DE LECHE A LA GLÁNDULA MAMARIA DE RATAS ANESTESIADAS SUCCIONADAS O MANIPULADAS 40 MINUTOS ANTES DEL EXPERIMENTO. Cada punto representa la media \pm ee. La significancia estadística fue evaluada mediante una ANOVA de dos vías (** $p < 0.01$).

TESIS CON
FALLA DE COPIEN

Objetivo 3. DISEÑO EXPERIMENTAL:

3.1. Determinar mediante técnicas inmunohistoquímicas, la expresión del marcador de activación neuronal temprana *c-fos* en el segmento T-13 de la médula espinal por la succión o por la estimulación eléctrica de un nervio mamario.

3.1.1. Se utilizaron ratas despiertas, separadas de sus crías por un período de 6 ó 18 horas, a las que se aplicó un período de succión de 5 minutos. Se analizó la expresión del marcador de activación neuronal *c-fos* en el segmento t-13 de la médula espinal. Los grupos control incluyeron animales con succión continua (SC) y animales separados de sus crías por 6-18 horas (NS).

3.1.2. Se utilizaron ratas anestesiadas, separadas de sus crías por un período de 6 ó 18 horas, que recibieron estimulación eléctrica del cabo central de un nervio mamario (EENM). El grupo control incluyó animales anestesiados con uretano y animales anestesiados falsamente estimulados. Se analizó la expresión del marcador de activación neuronal *c-fos* en el segmento t-13 de la médula espinal.

3.2. Determinar mediante técnicas inmunohistoquímicas, que tipo de neurona espinal (interneurona vs. neurona preganglionar simpática) expresa el marcador

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

c-fos en el segmento T-13 de la médula espinal. Las neuronas preganglionares simpáticas fueron identificadas usando un anticuerpo contra ChAT.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Distribución de neuronas Fos-ir en la médula espinal de ratas lactantes.

En cada grupo experimental se observó de manera confiable la inducción de inmunorreactividad a Fos (Fos-ir) expresada en las secciones coronales de la médula espinal correspondientes a los segmentos T13-L1, y se distribuyó de manera uniforme en los núcleos de las neuronas marcadas. La figura 11 resume la cuantificación de la expresión de Fos en las diferentes regiones de la sustancia gris de la médula espinal como función del tratamiento. A pesar del hecho de que la Fos-ir se observó bilateralmente en la mayoría de las condiciones estudiadas, con el fin de establecer las comparaciones adecuadas entre los resultados observados en los animales sometidos a EENM en los cuales la inducción de Fos-ir ocurrió exclusivamente en el lado ipsilateral a la estimulación del nervio mamario, el conteo de las neuronas positivas se realizó en forma unilateral en todos los grupos estudiados.

Los animales control, *vgr.*, madres despiertas succionadas crónicamente por sus crías, mostraron en general pocas neuronas Fos-ir. La figura 12 muestra la localización anatómica de las neuronas Fos positivas en una de las secciones del segmento espinal torácico 13 en ratas despiertas con succión continua (SC). En este grupo, las neuronas Fos-ir se localizaron principalmente en ADS (8 ± 1.4) y en NP (6.75 ± 1.43), aunque también se observaron algunas neuronas Fos-ir en CAD (1.33 ± 0.28) y en SGV (2 ± 0.5), aunque en menor proporción (fig. 11).

En ratas despiertas separadas de sus crías por 6 horas (NS6h), el número y distribución de neuronas Fos-ir fueron muy similares a los de ratas SC (fig. 13A)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

y no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos: ADS (5.6 ± 0.98); NP (7.33 ± 1.36); CAD (3.33 ± 0.98); SGV (1 ± 0.5) (fig. 11).

En cambio, en ratas despiertas NS6h que recibieron 5 minutos de succión (S) (fig. 13B) se observó un aumento significativo en el número de células Fos-ir en todas las regiones analizadas: ADS (10.25 ± 0.85), NP (24.5 ± 3.6), CAD (11.25 ± 3.4) y SGV (12.5 ± 4.9). De esta forma, las neuronas Fos-ir en cada región espinal de ratas succionadas aumentaron 1.8, 3.3, 3.4 y 17.5 veces más, i.e., 3.3X, etc., en comparación con el grupo de ratas NS (fig. 11).

Los animales control para los experimentos EENM fueron ratas anestesiadas con uretano sin otro tratamiento y animales falsamente estimulados. Los resultados muestran que el número y localización de neuronas Fos-ir en el grupo control de ratas anestesiadas era muy similar al de el grupo de ratas NS6h (fig. 11): ADS (5.36 ± 0.72), NP (7.12 ± 1.67), CAD (3.1 ± 0.42) y SGV (0.8 ± 0.2). Sin embargo, en el grupo falsamente estimulado, se observó un aumento significativo en el número de células Fos-ir en el ADS ipsilateral (12.92 ± 0.13), el cual pudo haber ocurrido en respuesta a la disección y a la manipulación del nervio (fig. 11). Los valores en el resto de las regiones no presentaron cambios significativos: NP (6.9 ± 1.89), CAD (2.5 ± 0.73) y SGV (1.2 ± 0.7).

En ratas NS6h anestesiadas que recibieron EENM se observó una gran cantidad de neuronas Fos-ir en el ADS ipsilateral al nervio estimulado (69 ± 8 , i.e., 10X), y en menor proporción en NP (27.5 ± 0.5 , i.e., 3.7X) aunque en este último, los valores de expresión de Fos fueron muy similares a aquellos observados en esa misma región en ratas succionadas tras un período de 6 horas de separación

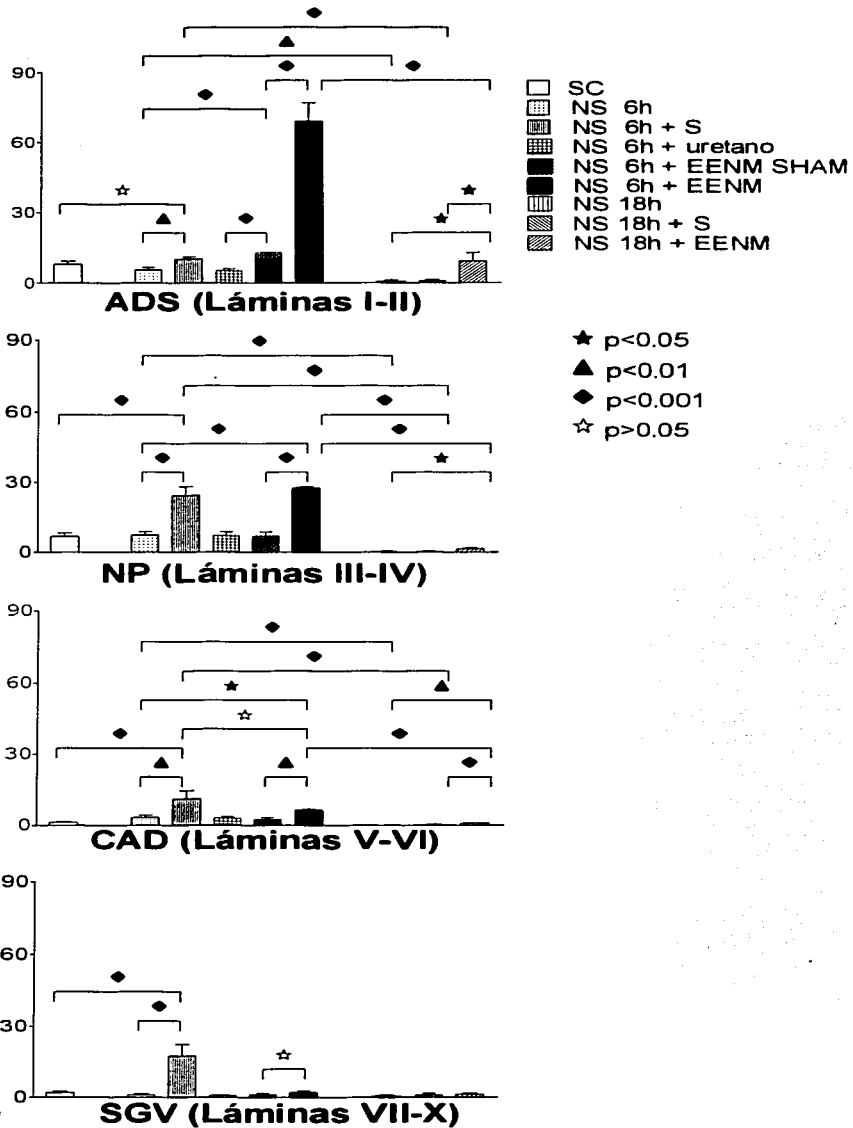
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

(fig. 11). También se observó un aumento muy pequeño, aunque significativo ($p < 0.01$, i.e., 1.9X), en el número de neuronas Fos-ir en CAD (fig. 13C). No se encontraron cambios significativos en SGV (2 ± 0.6) o en ninguna otra región del lado contralateral.

En contraste con el grupo experimental de ratas NS6h, en los animales NS18h se observó una disminución significativa en el número de neuronas Fos-ir en todas las regiones analizadas (fig. 14A). El número de neuronas Fos-ir era muy bajo y significativamente menor que el de ratas SC y NS6h (Fig. 11): ADS (0.8 ± 0.6), NP (0.2 ± 0.13), CAD (0.2 ± 0.18) y SGV (0.5 ± 0.4). Cuando se aplicó succión en animales NS18h, no hubo inducción de Fos (fig. 14B) siendo muy similar a la cantidad observada en ratas 18hNS: ADS (0.9 ± 0.5), NP (0.4 ± 0.2), CAD (0.3 ± 0.27) y SGV (1 ± 0.6). Finalmente, en ratas 18hNS que recibieron EENM se observó un pequeño aumento, aunque significativo, en el número de neuronas Fos-ir en ADS (9.3 ± 3.7 , i.e., 11.6X), NP (1.5 ± 0.4 , i.e., 7X) y CAD (1 ± 0.2 , i.e., 5X) (fig. 14C). No se encontraron cambios en SGV ipsilateral (1.3 ± 0.4) ni en el asta dorsal contralateral.

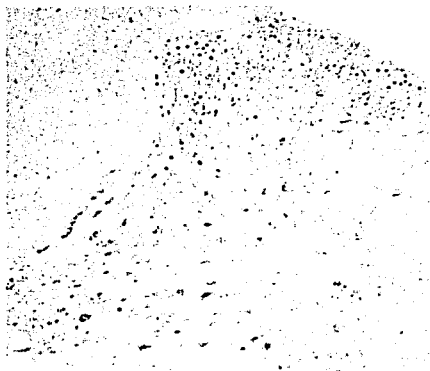
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

NÚMERO DE NEURONAS FOS-IR/SECCIÓN



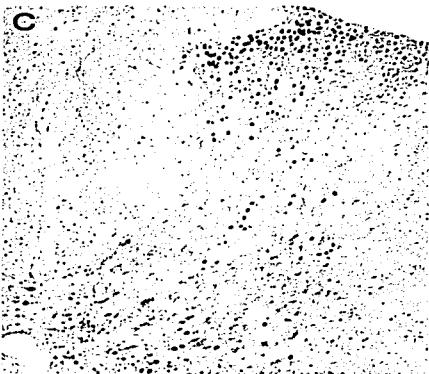
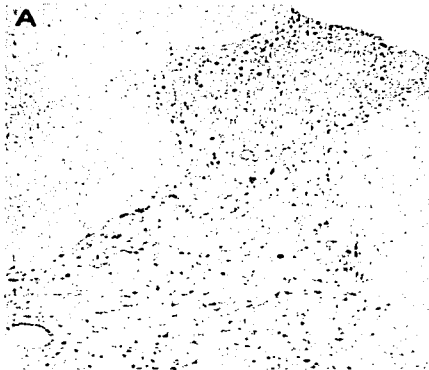
TESIS CON FALLA DE ORIGEN

FIGURA 11. Histograma que muestra la distribución unilateral de neuronas Fos-ir en el segmento torácico 13 de la médula espinal. Las células positivas fueron contadas en cuatro regiones: ADS (Asta Dorsal Superficial), NP (Núcleos Propios), CAD (Cuello del Asta Dorsal) y SGV (Sustancia Gris Ventral). Cada grupo estuvo compuesto por 5 animales: SC= Succión continua; 6h/18h NS No Succionada por 6 ó 18h; S= Succión; EENM SHAM= Falsa estimulación eléctrica del cabo central de un nervio mamario abdominal; EENM estimulación eléctrica del cabo central de un nervio mamario abdominal. En el recuadro se muestra un esquema de las regiones espinales analizadas. Los diferencias estadísticas entre grupos y por región espinal se muestran a un lado de la figura.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

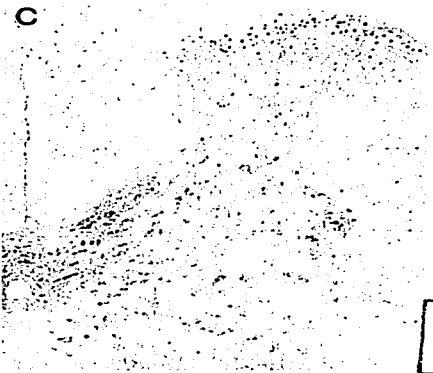
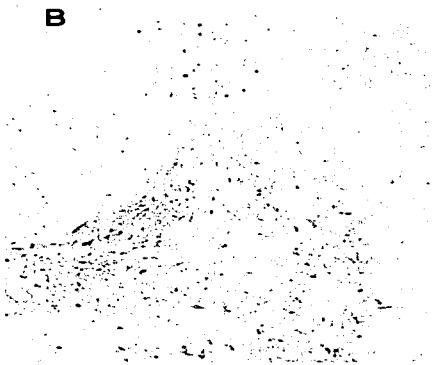
FIGURA 12. Fotomicrografía que muestra la expresión de Fos-ir en el segmento espinal torácico 13 de ratas con succión continua. La expresión de Fos es baja y se distribuye de manera bilateral en ADS y CAD (100X).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FIGURA 13. Fotomicrografía que muestra la expresión de Fos-ir en el lado izquierdo de una sección coronal en el segmento espinal torácico 13 en ratas lactantes profundidas después de un periodo de separación de 6h (A), o en ratas NS6h que recibieron 5 min. de succión (B) o EENM (C). La expresión de Fos-ir es baja en el grupo NS6h y se localiza principalmente en el ADS y NP. La succión provocó un aumento significativo en el número de neuronas Fos-ir en ambos lados de la sustancia gris de la médula espinal. Las regiones que mostraron incremento en la expresión de Fos en respuesta a la succión incluyeron ADS, NP, CAD y SGV. La EENM indujo una expresión notable de Fos en el lado ipsilateral a la estimulación nerviosa en ADS y NP (100X).

TESIS CON
FALLA DE CENSO



TESTIS CON
FALLA DE CILGEN

FIGURA 14. Fotomicrografía que muestra la expresión de Fos-ir en el lado izquierdo de una sección coronal en el segmento espinal torácico 13 en ratas lactantes profundidas después de un período de separación de 18h (A), o en ratas NS18h que recibieron 5 min. de succión (B) o EENM (C). La expresión de Fos-ir fue escasa en el grupo 18hNS. La succión no provocó un efecto significativo en el número de neuronas Fos-ir en ambos lados de la sustancia gris de la médula espinal. En el grupo que recibió EENM solamente se observó una expresión moderada de Fos en el lado ipsilateral a la estimulación nerviosa en ADS y NP (100X).

Identificación de neuronas preganglionares simpáticas

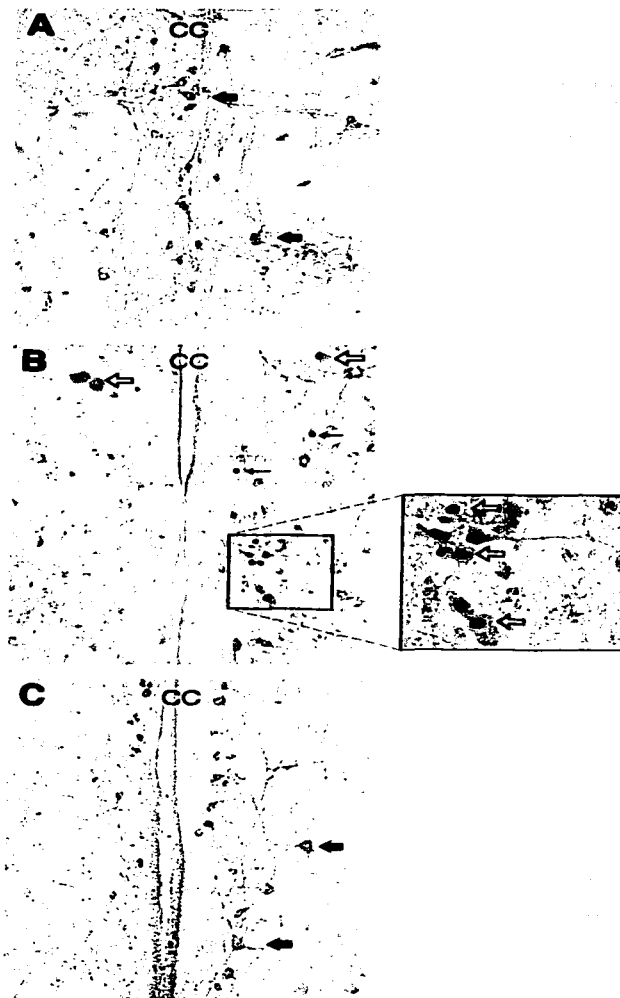
Dada la importancia de la activación fisiológica del SNS durante la lactancia (Mena y col., 1985), se realizó una doble inmunotinción para determinar que tipo de neurona (interneurona vs. neurona preganglionar simpática) responde al estímulo de la succión en las columnas intermedio-medial (IMM) e intermedio-lateral (IML). Para esto, se inmunotifieron secciones longitudinales del segmento torácico 13 de la médula espinal para ChAT (citoplasma café) y Fos (nucleos oscuros) en ratas NS6h, NS6h + S y NS6h + EENM.

La inmunotinción de ChAT permitió una identificación clara de las columnas IMM e IML, las cuales se localizaron en vecindad al canal central y en los límites periféricos de la sustancia gris espinal, respectivamente (figs. 15 y 16).

En las ratas NS6h se observaron neuronas ChAT-ir en las columnas IMM e IML, cuyos núcleos no estaban teñidos y por lo tanto, no expresaban Fos (Figs. 15A y 16A). En cambio, en las ratas NS6h que recibieron un período de succión de 5 minutos se observaron grupos de 3-5 neuronas ChAT-ir que co-expresaban Fos de manera bilateral, en la columna IMM (Fig.15B). Las células ChAT-ir de la columna IML no mostraron Fos-ir (Fig. 16B).

Finalmente, las ratas NS6h que recibieron EENM por 5 minutos, no mostraron Fos-ir en las células de la columna IMM. Sin embargo, se detectaron algunas neuronas Fos-ir alrededor del canal central que fueron negativas a ChAT (Fig.

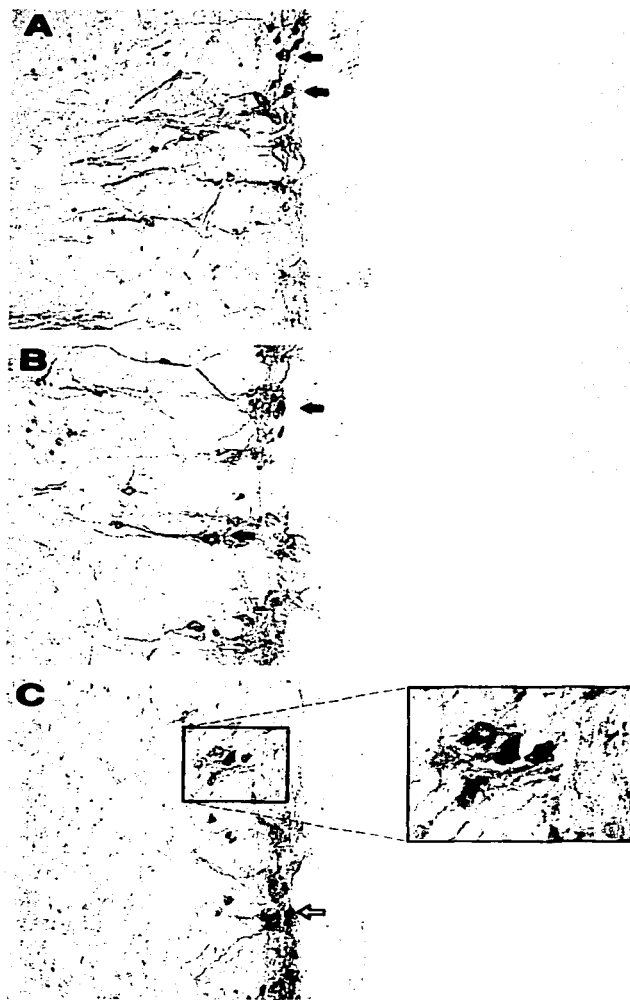
15C). En cambio, en la columna IML ipsilateral al lado de estimulación, se observaron grupos de 2-3 neuronas Fos-positivas (Fig. 16C). No se detectó Fos-ir en las motoneuronas del asta ventral (datos no mostrados).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FIGURA 15. Doble inmunolocalización de Fos (núcleos oscuros) y ChAT (citoplasma café) en neuronas de la columna intermedio-medial (IMM) en ratas lactantes no succionadas por 6h (A), o en ratas no succionadas por 6h que recibieron 5 min. de succión (B) o EENM (C). Las flechas abiertas indican co-localización de ambos antígenos; Las flechas delgadas denotan núcleos Fos-ir y las flechas gruesas, citoplasma ChAT-ir. No se observó Fos-ir en las neuronas ChAT-positivas de los animales NS6h y EENM (200X). En cambio, en ratas que recibieron 5 min de succión después de 6h de separación de sus crías, se observaron grupos bilaterales de 3-5 células ChAT-ir co-expresando Fos (amplificado a 400X en el recuadro). CC= Canal central.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FIGURA 16. Doble inmunolocalización de Fos (núcleos oscuros) y ChAT (citoplasma café) en neuronas de la columna intermedio-lateral (IML) en ratas lactantes no succionadas por 6h (A), o en ratas no succionadas por 6h que recibieron 5 min. de succión (B) o EENM (C). Las flechas abiertas indican co-localización de ambos antígenos; Las flechas gruesas denotan citoplasma ChAT-ir. No se observó Fos-ir en las neuronas ChAT-positivas de las ratas No Succionadas y Succionadas (200X). En cambio, en ratas que recibieron 5 min de EENM después de 6h de separación de sus crías, se observaron grupos de 2-3 células ChAT-ir co-expresando Fos (amplificado a 400X en el recuadro).

DISCUSIÓN

La regulación neuroendócrina de la evacuación láctea en ratas y en otras especies involucra la activación por la succión de mecanismos estimuladores e inhibidores que interaccionan en distintos niveles. Aunque se han estudiado ampliamente los mecanismos neuroendócrinos que controlan la liberación de OT, se ha considerado que la influencia del Sistema Nervioso Simpático en la evacuación láctea tenía poca importancia fisiológica (Lincoln y Paisley, 1982).

En el presente trabajo, se observó que el estímulo de la succión bloquea la evacuación láctea inducida por la administración exógena de OT en madres anestesiadas, ya que la cantidad de leche obtenida por las crías es muy pequeña. Este efecto no involucra a las CATs de origen suprarrenal ni tampoco se debe a efectos inhibitorios sobre la liberación de OT, ya que la adrenalectomía o la hipofisectomía no afectaron la inhibición en la evacuación láctea inducida por la succión. En cambio, la administración central o sistémica del bloqueador β adrenérgico propranolol facilitó la evacuación láctea en forma significativa. Esto sugiere que la inhibición de la evacuación láctea, es el resultado de la activación refleja por la succión de mecanismos β adrenérgicos y que estos son mediados a través de la inervación simpática de la glándula mamaria.

Por otro lado, se observó que la succión provoca una depresión considerable en las respuestas de PIM debidas a OT (fig. 8), así como una disminución reversible en la tasa de entrada de leche a la glándula mamaria, en los animales que solamente fueron manipulados (fig. 10). Estos resultados sugieren que la succión provoca de manera refleja un aumento en el tono del músculo liso mamario y por

ende, una constricción del sistema ductal. Así, los cambios de presión intramamaria no pueden ser detectados normalmente por el sistema de registro debido a la estrechez de los conductos, dando lugar de igual manera a un aumento en la resistencia al flujo de entrada de leche a la glándula.

Se ha demostrado que los receptores mamarios pueden activar de manera refleja el sistema inhibitor motor de la glándula mamaria tanto en la vaca como en la cabra (Grachev, 1949; Cochrane, 1949). También se ha observado un aumento en la liberación de CATs por efecto de la estimulación eléctrica del pezón en las cabras (Kuanyshbekova, 1976) y del nervio mamario en las ratas (Mena y col., 1979; Clapp y col., 1985), así como durante la ordeña en las ovejas y en la vaca (Barowicz 1979; Ewy y Barowicz, 1981) y la succión en las ratas (Clapp y col., 1985). Por lo tanto, debido a que los sistemas adrenérgico y neurohipofisiario se activan fisiológicamente durante la lactancia, es probable que la regulación de la evacuación láctea resulte de la interacción fisiológica de ambos sistemas.

Los efectos ya mencionados provocan una falta de obtención de leche por parte de las crías durante los primeros 10-15 minutos de haberse iniciado la succión, a pesar de que, al mismo tiempo, se observa una elevación en los niveles de OT en la circulación (Deis, 1968; Goodman y Grosvenor, 1983; Samson y col., 1983). Se ha demostrado que la liberación de CATs puede estar involucrada en la inhibición temprana de la evacuación láctea a través de una vaso-constricción, o de una ducto-constricción en la glándula mamaria y mediante un antagonismo competitivo con la OT a nivel del mioepitelio efector (Chan, 1965). Aunado a esto, nuestros resultados muestran que el bloqueo de la evacuación láctea, debido al estímulo de la succión, es consecuencia de la elevación en el tono de los conductos mamarios,

la cual da lugar a un aumento en la resistencia al flujo de salida de leche.

Aunque las CATs adrenales liberadas por la succión participan en menor grado en el bloqueo de la evacuación láctea en la rata anestesiada, es posible que la inervación simpática y las CATs humorales jueguen papeles complementarios en la evacuación láctea. Así, quizás la principal influencia de las CATs liberadas por la succión (Clapp y col., 1985) es la inhibición de la liberación de OT por parte del lóbulo posterior de la hipófisis (Song y col., 1988). En paralelo, el mismo estímulo puede activar mecanismos β adrenérgicos que regulan el tono ductal a través de la inervación directa de la glándula. Se ha asociado la disminución en la tasa de evacuación láctea con un aumento en la actividad simpática, mientras que la simpatectomía quirúrgica o farmacológica resulta en un aumento en la tasa de evacuación láctea (Findlay y Grosvenor, 1969; Mena y col., 1979; 1995). Además, se ha demostrado recientemente que la regulación de la glándula mamaria involucra mecanismos α y β adrenérgicos, capaces de facilitar o inhibir, respectivamente, la evacuación láctea a través de la inervación simpática de la glándula mamaria (Mena y col., 1995). Así, por medio de estos mecanismos, la activación del sistema simpático durante los primeros minutos de succión en la rata lactante pueden inhibir la evacuación láctea al actuar en el lóbulo posterior de la hipófisis y en la glándula mamaria.

Por otro lado, la disminución en la evacuación láctea, i.e., cerca del 40% del total de leche (fig. 9), así como la depresión en respuestas de PIM inducidas por la administración exógena de OT (fig. 8) y el aumento en la resistencia ductal (fig. 10) inducidas por el estímulo de la succión en ratas anestesiadas fueron

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

bloqueadas en estos experimentos por la activación previa de mecanorreceptores ductales mamarios.

El hecho de que dicho efecto es bloqueado mediante la administración sistémica de prazosín, sugiere que la activación de mecanorreceptores ductales provoca la activación de un mecanismo α adrenérgico, probablemente de origen central, que contrarresta los efectos inhibitorios de la succión sobre la evacuación láctea. En este sentido, se ha observado que la activación de receptores α adrenérgicos en el SNC estimula la evacuación láctea en las ratas al provocar la liberación de OT (Crowley y Armstrong, 1992) y que el estímulo de succión provoca un aumento en la secreción de NE hacia las regiones magnocelulares del hipotálamo, lo cual está correlacionado con un aumento en la liberación de OT (Crowley y col., 1987). De esta forma, la activación de mecanorreceptores ductales, al activar receptores α adrenérgicos centrales, estaría contrarrestando los efectos inhibitorios de la succión al facilitar la liberación de OT por parte del lóbulo posterior de la hipófisis (Crowley y col., 1987; Crowley y Armstrong, 1992) y al facilitar la evacuación láctea, a través de la inervación simpática de la glándula mamaria (Mena y col., 1995).

Estudios previos han mostrado que la activación de mecanorreceptores ductales juega un papel crucial en la regulación de la evacuación láctea. Se ha observado que la activación de mecanorreceptores ductales bloquea de manera refleja la liberación de CATS inducidas por la succión o por EENM (Mena y col., 1979; Clapp y col., 1985), facilita la liberación de OT (Lincoln y Wakerley, 1975) y previene la inhibición de la evacuación láctea mediada por mecanismos β

TESIS C. N.
FALLA DE ORIGEN

adrenérgicos de origen neural (Mena y col., 1995). De esta forma, existe un balance fisiológico entre la activación del SNA inducida por la succión y la regulación de este efecto por la activación de mecanorreceptores ductales. Ambos mecanismos además juegan un papel muy importante sobre la regulación del metabolismo de la rata durante la lactancia. Estudios previos han mostrado que las CATs de origen neural liberadas en respuesta a la succión, estimulan la actividad de la enzima desyodasa mamaria tipo I (D1-M), la cual convierte a la T4 en triyodotironina (T3) en la glándula mamaria (Aceves y col., 1999a; b). Se ha observado que dicha estimulación de la actividad enzimática se bloquea en animales en los que se activan los mecanorreceptores ductales una hora antes de aplicar la succión (Aceves y col., 1999b). De esta forma, la activación simpática inducida por la succión bloquea inicialmente la evacuación láctea y detiene transitoriamente el funcionamiento de la glándula mamaria. Esto probablemente es necesario para permitir que se lleve a cabo la estimulación de la actividad de la D1-M, la cual eventualmente proporcionará una mayor actividad biológica a la hormona tiroidea, tanto para su acción en la propia glándula mamaria como para su utilización subsecuente por parte de las crías, una vez que ha sido transferida a la leche. La activación de los mecanorreceptores ductales provoca de manera refleja el bloqueo de la actividad simpática con lo cual, la leche es finalmente expulsada hacia el exterior y la estimulación de la enzima se ve interrumpida hasta el siguiente período de succión. La existencia de este mecanismo regulador de la actividad simpática puede jugar un papel importante para la supervivencia de las especies al contrarrestar la activación simpática inducida por la succión o por condiciones estresantes, permitiendo la evacuación láctea durante la succión.

Poblaciones neuronales en la médula espinal activadas por la succión y por EENM.

Los cambios neurales y neuroendócrinos que dan lugar a los mecanismos de adaptación durante la lactancia se deben principalmente a los estímulos que recibe la madre durante la succión. Esta estimulación activa receptores específicos de adaptación rápida localizados en el pezón, i.e., presión, estiramiento y temperatura (Findlay, 1966; Poulain y Wakerley, 1986) mientras que la estimulación exteroceptiva proveniente de las crías es percibida por el olfato, principalmente (Mena y Grosvenor, 1971; 1972). De esta forma se activa la liberación a la circulación de hormonas adeno- (Grosvenor, 1965; Moltz y col., 1969; Grosvenor y col., 1970; Zarrow y col., 1972; Grosvenor y Mena, 1973) y neurohipofisarias (Deis, 1968). También el sistema simpático adrenal y la innervación simpática de la glándula mamaria liberan CATs en forma tónica (Grosvenor y Mena, 1974; Mena y col., 1985) y fásica (Mena y col., 1985; Clapp y col., 1985) que, como se explicó anteriormente, antagonizan los efectos de las hormonas sobre la secreción y evacuación láctea (Mena y col., 1974; Grosvenor y col., 1977; Mena y col., 1990a; b).

Estudios previos han empleado lesiones (Eayrs y Baddeley, 1952; Beyer y Mena, 1969; Fukuoka et al., 1984), estimulación eléctrica (Poulain y Wakerley, 1986; Fenelon y Poulain, 1992) o detección de 2-desoxiglucosa (Sutherland y Fink, 1983) para identificar las vías y núcleos relacionados con el reflejo de evacuación láctea. Sin embargo, estas técnicas limitan la interpretación de los datos y la identidad de las vías sensibles a la succión ya que las lesiones espinales o de tallo cerebral pueden interrumpir una variedad de estímulos somatosensoriales, lo cual

complica la interpretación de los resultados. En segundo lugar, las estimulaciones o lesiones eléctricas dañan el área de estudio y no permiten un estudio más profundo de los substratos neuroquímicos que pueden estar involucrados en la vía. En contraste, la expresión del producto del gen de expresión inmediata *c-fos* ha probado ser un marcador útil de la activación neuronal. *c-fos* es activado rápida y transitoriamente en respuesta a una variedad de estímulos en el cerebro y sirve como un factor de transcripción que puede alterar la expresión de otros genes (Morgan y Curran, 1991). Por lo anterior, en el presente estudio, se justificó el uso de la inducción de la expresión de *c-fos* por el estímulo de la succión y por EENM, con el fin de conocer las poblaciones neuronales de la médula espinal, que están involucradas en la transmisión de los impulsos nerviosos inducidos por la succión y que pueden influir en la inhibición refleja de la evacuación láctea.

Nuestros resultados muestran que la expresión de Fos en el asta dorsal, i.e., láminas I-IV, de madres con succión continua es baja y que los niveles son aún menores en láminas profundas (V-X). Así mismo, estudios previos en el núcleo paraventricular del hipotálamo han mostrado que existe muy poca o ninguna actividad de Fos en las neuronas magnocelulares de ratas lactantes con succión continua (Fenelon y col., 1993; Eriksson y col., 1996a). El bajo nivel de expresión de Fos en rats SC se podría deber a que la rata amamanta a sus crías cada 1-2h (Lincoln y col., 1973; Wakerley y Drewett, 1975; Wakerley y col., 1994) y en estas condiciones de estimulación repetida, la transcripción de *c-fos* estaría reprimida por su propio producto (Sassone-Corsi y col., 1988) después de varias días de lactancia. De hecho, diversos reportes han mostrado que diferentes estructuras del SNC reducen marcadamente su activación de Fos en respuesta a una

estimulación crónica o de larga duración (Morgan y col., 1987; Sharp y col., 1991; Chen y Herbert, 1995).

En cambio, se ha demostrado que 24 horas después del parto, la expresión de Fos es elevada en diversas estructuras del cerebro involucradas en la expresión de la conducta materna y en el reflejo neuroendócrino de la evacuación láctea (Lin y col., 1998). De acuerdo a estos autores, la expresión de Fos en las madres lactantes es inducida por el estímulo de la succión, ya que es eliminada en animales a los que se les retiran las crías inmediatamente después del parto. Sin embargo, se desconoce el curso temporal durante el cual la expresión de Fos disminuye en la médula espinal y en el SNC como resultado de la succión continua. Además, los niveles tan bajos de Fos en ratas NS18h, indican que la ausencia de succión también puede dar lugar a una disminución en la expresión de Fos. Así, para determinar si un período agudo de succión aumenta el número de neuronas Fos-ir en la médula espinal, se utilizó un paradigma de separación-resucción. En forma similar a la que Eriksson y col. (1996a) han utilizado, ésta consiste en permitir la succión después de un período de separación de 4 horas, ello induce la expresión de Fos en el núcleo paraventricular de ratas lactantes. Este modelo consistente en retirar a las crías de la madre por 4-12h y luego aplicar 5-30 min de succión aguda, ha sido ampliamente utilizado en diversos estudios en los que se documentan los efectos neuroendócrinos de la succión en la rata (Paape y Desjardins, 1971; Mena y col., 1978; Fuchs y col., 1984; Clapp y col., 1985; Grosvenor y col., 1986). Estas evidencias, en conjunto, sugieren que el estímulo de la succión promueve la actividad transcripcional de c-fos después de un período corto de estimulación. Sin embargo, dicha activación puede habituarse

por la estimulación crónica proporcionada durante la lactancia. Así mismo, los resultados observados en las neuronas espinales activadas por la succión, son consistentes con estudios anatómicos (Tasker y col., 1986) y electrofisiológicos (Poulain y Wakerley, 1986) que muestran que las aferencias provenientes de las glándulas mamarias proyectan a regiones similares a las encontradas en el presente estudio y que pueden ser activadas por la succión o por la estimulación eléctrica de los pezones en ratas anestesiadas. Estos cambios en la actividad espinal se originan durante la succión, que es un estímulo muy complejo que involucra diversos tipos de receptores mamarios. Esta estimulación, ya sea táctil, apretando el pezón entre dos dedos, aplicando una tracción suave, estimulando eléctricamente el pezón o por succión de una cría en ratas (Poulain y Wakerley, 1986; Voloschin y col., 1988) o en conejos (Findlay, 1966), provoca potenciales de acción de diferente tamaño y frecuencia en el nervio mamario (Findlay, 1966; Voloschin y col., 1988) y en la superficie y a diferentes profundidades de la médula espinal (Poulain y Wakerley, 1986; Wakerley, 1994).

En esta ocasión, la succión se aplicó por un período de 5min, a diferencia de las 2h empleadas por Eriksson y col (1996a). Esto se debe a que el objetivo principal del estudio fue analizar cuáles poblaciones neuronales se activan por la succión, en especial, las relacionadas con las neuronas preganglionares simpáticas. Este diseño se justifica en hallazgos previos que muestran que la activación simpática inducida por la succión dura pocos minutos antes de ser bloqueada por la activación de presuntos mecanorreceptores ductales (Mena y col., 1979; Clapp y col., 1985). Sin embargo, dichos períodos cortos de succión son suficientes para activar también procesos neuroendócrinos centrales (Mena y col., 1978; Fuchs y

col., 1984; Clapp y col., 1985; Grosvenor y col., 1986). De igual forma, en este estudio analizamos la expresión de Fos en ratas NS6h que recibieron EENM, con el fin de determinar si se activan las mismas estructuras espinales por este tipo de estimulación que por la succión. Así, EENM provocó una gran activación de neuronas de ADS y en menor proporción de NP. Estos resultados confirman estudios previos en los que se usaron trazadores neuronales inyectados subdérmicamente, en un pezón abdominal y mostraron que las fibras sensoriales finas (C y Aδ) del nervio mamario (Haller, 1985; Voloschin y col., 1988) envían sus proyecciones hacia las láminas I y II y, ocasionalmente, hacia regiones más profundas del asta dorsal (Tasker y col., 1986; Rousselot y col., 1994).

Por otro lado, en nuestro estudio se halló una clara discrepancia en el número y distribución de neuronas Fos-ir inducidas por EENM o por succión. En la primera, las neuronas activadas se localizan principalmente en el ADS y NP y disminuyen gradualmente hacia las regiones más profundas, i.e., láminas V-X. En cambio, se hallaron pocas células Fos-ir activadas por la succión en las láminas I-II y el número aumentó progresivamente en las regiones más profundas (láminas III-IV) hasta encontrar la mayor expresión en las láminas VII-X. La diferencia en la calidad y la intensidad de estimulación provocadas por la EENM vs la succión de 10 crías, podrían explicar las diferencias en las respuestas observadas, ya que la EENM es un estímulo artificial, que origina impulsos en todas las fibras nerviosas. Sin embargo, cabe resaltar que ambos estímulos indujeron niveles similares de Fos en NP. Esto sugiere que dicha región juega un papel muy importante en la transmisión de señales aferentes provenientes de la glándula mamaria. Además,

la inducción de Fos-ir en neuronas localizadas en láminas más profundas de la médula espinal (SGV) por acción de la succión de varias glándulas, y la ausencia de dicho efecto por EENM, sugiere que EENM no reproduce del todo el efecto de la succión más allá del nivel de NP y que además, la activación de esta región por la succión de diez crías puede deberse a la convergencia y a la sumación de los estímulos aferentes a nivel espinal. Recientemente se ha demostrado que, en paralelo al bloqueo de la evacuación láctea, la enzima D1-M, es estimulada a través de la activación refleja de la inervación simpática inducida por la succión, y que esta regulación involucra la participación de circuitos locales y segmentarios (Aceves y col., 1999a; b). Así, se encontró que la succión de seis glándulas es igualmente efectiva que la succión de todas las glándulas en la restitución del contenido de RNAm y la actividad de la enzima en animales separados de sus crías por 12h. Sin embargo, cuando se succionan tres glándulas, la enzima se restituye completamente en las glándulas succionadas y de manera parcial en el resto de ellas. Finalmente, cuando se aplica succión en una sola glándula, se observa únicamente la restitución enzimática en la glándula estimulada sin que haya efecto en las demás (Aceves y col., 1999b). Estos datos, aunados a diversas evidencias anatómicas (Tasker y col., 1986) y electrofisiológicas (Poulain Wakerley, 1986) apoyan la hipótesis de que, a nivel de la médula espinal, puede ocurrir en arreglos segmentales la integración de la información aferente proporcionada por la succión. Sin embargo, existe un umbral de entre tres y seis crías para que ocurra dicha activación segmentaria. De esta forma, las aferentes neurales mamarias ejercen un mecanismo regulador local capaz de regular la D1-M en cada glándula succionada (Aceves y col., 1999b).

En conjunto, los datos de este estudio muestran que el uso de la expresión de Fos fue adecuado para identificar las poblaciones neuronales de la médula espinal activadas por la succión lo cual apoya su participación en el reflejo de evacuación láctea y en la activación simpática refleja de la glándula mamaria (Mena y col., 1985). Nuestros resultados son consistentes con estudios previos que muestran que las primeras láminas del asta dorsal poseen neuronas de amplio rango dinámico activadas por estimulación de baja y de alta intensidad, como la succión, y células que responden a estímulos mecánicos muy específicos (Molander y Grant, 1995). Algunas de ellas, localizadas principalmente en la lámina II, proyectan hacia el núcleo cervical lateral (ncl) (Giesler y col., 1978), que participa en la vía nerviosa relacionada con la evacuación láctea (Dubois-Dauphin y col., 1985). De igual forma, en las láminas III-IV se encuentran células que responden sólo a estímulos mecánicos ligeros y células de amplio rango dinámico que también proyectan hacia el núcleo cervical lateral (Molander y Grant, 1995).

La sustancia gris central también mostró una expresión importante de Fos en respuesta a la succión. Esta región, en especial la lámina VII, es de particular importancia debido a la presencia de las neuronas preganglionares simpáticas, que podrían estar regulando el tono simpático de la glándula mamaria (Mena y col., 1995). Se ha reportado ampliamente que en la rata, la succión y la EENM desencadenan la activación refleja del SNS, provocando la liberación de CATs suprarrenales y posganglionares (Barowickz y col., 1979; Clapp y col., 1985; Mena y col., 1995). De esta forma, con el fin de analizar la actividad simpática en la médula espinal, caracterizamos el fenotipo (interneurona vs. neurona preganglionar simpática) de las neuronas activadas por la succión o por EENM.

Encontramos que ambos estímulos activan diferentes poblaciones de neuronas preganglionares, ya que la succión activa bilateralmente neuronas de la columna IMM, mientras que la EENM estimula células de la columna IML en forma ipsilateral al lado de estimulación. Además de las diferencias cualitativas en los tipos de estimulación aplicada, una posible explicación para estos efectos podría ser que, por un lado, la succión desencadene un arco reflejo a nivel segmentario, que da lugar a la activación de neuronas de la columna IMM. En cambio, la activación ipsilateral de neuronas de IML en respuesta a EENM podría deberse a que la estimulación eléctrica (que es un estímulo artificial muy potente), active de manera ortodrómica a las neuronas de la columna IML. En apoyo a esta hipótesis, estudios previos han mostrado mediante la inyección de trazadores neuronales en el pezón de ratas con sección de las raíces ventrales, que numerosas fibras del nervio mamario proyectan directamente hacia la columna IMM ipsilateral al sitio de inyección (Haller, 1985). Por otro lado, Gerendai y col. (2001), mediante el trazado retrógrado de las eferencias mamarias, mostraron recientemente que las fibras simpáticas del nervio mamario provienen de las neuronas preganglionares simpáticas de la columna IML y del núcleo autonómico central (columna IMM). A su vez, dichas neuronas reciben aferencias provenientes de diversos núcleos simpáticos del tallo cerebral, hipotálamo y diencefalo (tabla 4), los cuales podrían estar involucrados en el control central de la inervación simpática de la glándula mamaria (Gerendai y col., 2001).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLA 4. Núcleos simpáticos del tallo cerebral, diencefalo y telencefalo conectados con la glándula mamaria de la rata. (Modificado de Gerendai y col., 2001):

TALLO CEREBRAL	grupos de células noradrenérgicas A5 núcleos del rafé caudal grupos de células noradrenérgicas y adrenérgicas A1/C1 núcleo del tracto solitario área postrema área reticular gigantocelular locus coeruleus sustancia gris periacueductal núcleo rojo
DIENCEFALO	núcleo paraventricular hipotalámico hipotálamo lateral área retroquiasmática hipotálamo anterior
TELENCEFALO	área preóptica núcleo de la cama de la estría terminal amígdala central

Similitud en la activación de neuronas espinales por la succión y por estímulos dolorosos.

Por otro lado, vale la pena mencionar que en ratas que reciben estimulación vagino-cervical (EV) (Chinapen y col., 1992) o estimulación dolorosa (Hunt y col., 1987), se ha reportado un patrón de expresión de Fos similar al que ocurre en respuesta a la succión en ratas NS6h. Además, la activación de Fos inducida por EV se correlaciona con un aumento en la liberación de OT (Sansone y col., 2002) que a su vez es mediador de la activación de neuronas preganglionares simpáticas de la médula espinal (Sansone y Komisaruk, 2001).

Aunque el dolor es capaz de activar la expresión de Fos en todas las láminas espinales (Hunt y col., 1987; Abbadie y Besson, 1993), se ha observado que el

dolor crónico producido por la artritis inducida por adyuvante (AIA) después de la 2ª y hasta la 11ª semana posterior al tratamiento se asocia con un aumento en la expresión de Fos en ADS y SGV (Abbadie y Besson, 1993). Estas similitudes sugieren que la naturaleza crónica del estímulo de la succión que es aplicada cada 1-2h (Lincoln y col., 1973; Wakerley y Drewett, 1975; Wakerley y col., 1994) involucra estructuras espinales similares a las que se activan por la aplicación crónica de estímulos dolorosos. En apoyo a la similitud de estas dos condiciones, se ha observado, en animales lactantes, que cuando se administran por vía ICV o intratecal agentes farmacológicos que pueden inducir analgesia como la NE (Yaksh, 1985; Chance, 1986; Kuraishi y col., 1987), el sulfato de morfina (Benyhe, 1994) o la OT (Lundeberg y Uvnas-Moberg, 1994; Robinson y col., 2002), ocurre un aumento en el tono simpático de las glándulas mamarias resultando en una menor responsividad a la OT (Morales y col., 1994). Así mismo, se sabe que el aminoácido excitador glutamato y la sustancia P, juegan un papel muy importante en la transmisión de estímulos dolorosos (Yaksh y col., 1980; Duggan y col., 1988; Taiwo y col., 1989), particularmente, a nivel de las láminas I y II (Basbaum, 1999). En el caso del dolor de tipo crónico, se ha observado la presencia e internalización de receptores a sustancia P en las láminas I-V (Duggan y col., 1990; Basbaum, 1999). Así, es probable que estos receptores puedan estar involucrados en la transmisión de impulsos aferentes para la liberación de OT, en la vía del reflejo de evacuación láctea (Tasker y col., 1988; Traurig y col., 1984).

TESIS CON
FALLA DE CUBIERTA

Modelo propuesto para explicar la regulación de la evacuación láctea en la rata por influencias facilitadoras e inhibidoras.

En la figura 17, están representados los principales elementos que regulan la evacuación láctea: glándula mamaria (pezón, sistema ductal y sistema alveolar), glándula suprarrenal, médula espinal, núcleos simpáticos centrales, hipotálamo y lóbulo posterior de la hipófisis. Así mismo, se describen las interacciones ejercidas entre las CATs centrales y circulantes sobre la liberación de OT y sobre el aparato motor de la glándula mamaria.

Así, en ausencia de la succión predomina un tono β adrenérgico proveniente de los núcleos simpáticos del tallo cerebral, hipotálamo y telencéfalo (Gerendai y col., 2001), que previenen la liberación de OT y mantienen el tono muscular de los conductos mamaros (Mena y col., 1979; Clapp y col., 1985) a través de las neuronas preganglionares simpáticas de la columna IML y de la inervación simpática de la glándula (Gerendai y col., 2001). Cuando se aplica la succión, se activan receptores específicos localizados en el pezón (Findlay, 1966; Poulain y Wakerley, 1986) y se desencadena un reflejo neuroendócrino que se transmite por los nervios raquídeos, pasando por el ganglio de la raíz dorsal, hasta proyectar en las interneuronas del asta dorsal superficial de la médula espinal. A partir de esta región los impulsos nerviosos ascienden en forma ipsilateral a través del finículo dorsolateral pasando por el ncl de la médula oblonga hasta finalmente llegar a los núcleos SO y PV del hipotálamo. Por otro lado, a nivel segmentario dan lugar a un arco reflejo que aumenta la actividad de neuronas preganglionares simpáticas de la columna IMM. Esta activación simpática a nivel segmentario resulta en la liberación de EN posiblemente a partir de las terminaciones eferentes del nervio

mamario (Mena y col., 1995) y activa receptores β adrenérgicos de la musculatura lisa y de las células epiteliales alveolares (Marchetti y col., 1990a). Esto, a su vez, da lugar a: 1) una constricción del sistema ductal que bloquea la salida de la leche durante los primeros minutos de iniciada la succión (Grosvenor y col., 1972; Mena y col., 1979; Mena y col., 1995) y 2) se estimula la transcripción de la enzima alveolar D1-M (Aceves y col., 1999a; b), que remueve una molécula de yodo de la molécula de la T4 para formar T3. Además, la succión provoca la liberación de CATs suprarrenales (Kuanyszbekova, 1976; Clapp y col., 1985) las cuales, a nivel central, deprimen la liberación de OT por parte de la neurohipófisis (Song y col., 1988). En la periferia, aumentan el tono del músculo liso, con lo que reducen el acceso de OT a las glándulas mamarias (secundario a una vasoconstricción), provocan una constricción del sistema ductal (Cross, 1955; Bisset y col., 1967; Vorherr, 1971) y antagonizan de manera competitiva la acción de la OT sobre las células mioepiteliales (Chan, 1965). Como resultado de estas acciones, la leche no es expulsada durante los primeros minutos (Deis y col., 1968; Lincoln y col., 1973). Simultáneamente, se estimula la actividad de la D1-M, que se encarga de mantener el suministro de T3 para los elevados requerimientos metabólicos de las glándulas mamarias de la rata durante la lactancia y, además, confiere una tasa de yodo y de T3 a la leche para ser obtenida por las crías (Aceves y Valverde, 1989).

Además de estos efectos, la succión también activa mecanismos centrales α adrenérgicos que contrarrestan los efectos inhibidores de la evacuación láctea antes descritos, ya que facilitan la liberación de OT, (Bridges y col., 1976; Clarke y

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

col., 1979; Crowley y col., 1987) y disminuyen el tono neural de los conductos mamarios (Mena y col., 1995). También, los mecanismos α adrenérgicos estarían reforzados por la PRL, la cual al ser liberada por el estímulo de la succión, favorecería la liberación de OT (Parker y col., 1991). Finalmente, como resultado de estos eventos, la OT estimula la contracción de las células mioepiteliales con lo que aumenta la presión intramamaria. La consecuente movilización intraglandular de leche dilata a los conductos mamarios, provocando así la activación de mecanorreceptores ductales. A su vez, la activación de los mecanorreceptores ductales: 1) deprime de manera refleja la liberación de CATs (Mena y col., 1979; Clapp y col., 1985); 2) bloquea el control central β adrenérgico del tono ductal (Mena y col., 1979; 1995) y 3) facilita la activación de mecanismos centrales α adrenérgicos promoviendo aún más la liberación de OT (Lincoln y Wakerley, 1975).

De acuerdo con este modelo, la participación de los mecanorreceptores ductales, cambiaría el balance de las influencias antagónicas a favor de la salida de leche, con lo cual aumentaría la eficiencia de la succión para evacuarla. Este mecanismo facilitador de la evacuación láctea estaría reforzado por la acción central de OT, PRL y GH (Mena y col, 1995).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

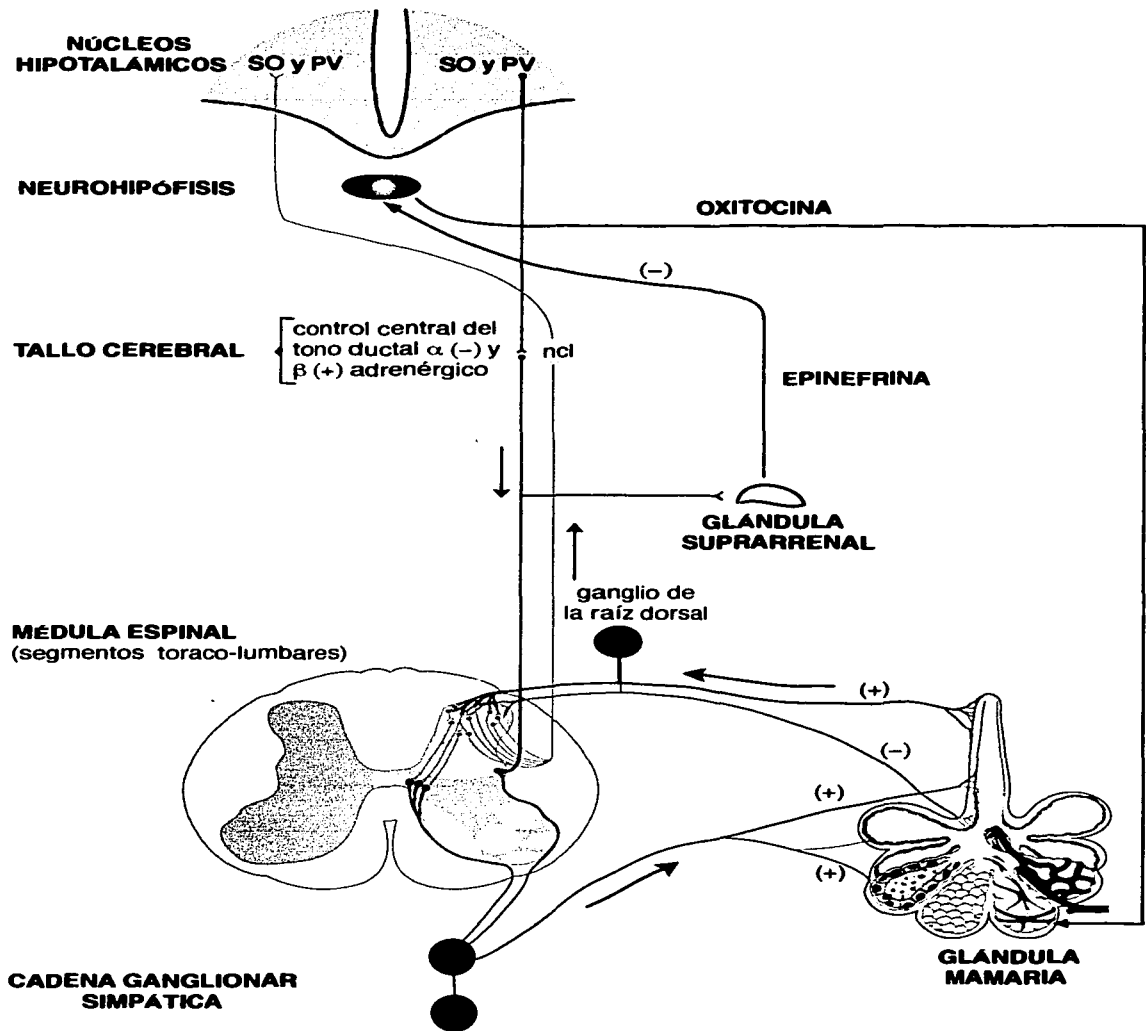


FIGURA 17. Mecanismos involucrados en la regulación de la evacuación láctea durante un periodo de succión en la rata lactante. (Ver descripción en el texto).

Finalmente, observamos que la expresión de Fos en la médula espinal inducida por la succión o por la EENM después de una separación de las crías de 6 horas, es abolida cuando la estimulación es aplicada después de 18 horas de No-succión. Esto sugiere que la privación de estimulación aferente por períodos tan largos afecta profundamente la transmisión y/o la responsividad central a estos impulsos nerviosos. Estos resultados son consistentes con estudios previos que muestran, que una disminución en la frecuencia de estimulación de la glándula mamaria y/o en la frecuencia de estimulación hormonal, provocan una modificación en las respuestas hipotalámicas inducidas por la succión (Mena y col., 1976; Hoffman y col., 1994; Wintrip y col., 1997; Woodside y Amir, 1996; Berghorn y col., 2001), hipofisiario (Grosvenor y col., 1974) y mamario (Grosvenor y col., 1970, Aceves y col., 1999a). Además, la importancia de mantener la succión en un límite de 8h ha sido apoyada por el hecho de que los efectos neuroendócrinos inducidos por la succión, que son irreversibles en ratas NS16h, se pueden revertir aplicando un período de 5-30min de succión a la mitad del período de 16h de no succión (Mena y col., 1976; 1987). Así, cuando analizamos el efecto de la succión o de EENM sobre la expresión de Fos en ratas NS18h fue con el propósito de explorar si la expresión de Fos, como marcador de actividad neuronal, seguía ocurriendo en estos animales. Nuestros resultados están en aparente desacuerdo con las observaciones de Li y col., (1999) quienes reportaron que la succión en ratas NS48h, induce un aumento en la expresión de Fos en diversas estructuras del tallo cerebral y en áreas neuroendócrinas hipotalámicas. Desgraciadamente, estos autores no incluyeron otros indicadores de lactancia aparte de la expresión de Fos, tales como liberación de hormonas adeno- y/o

neurohipofisiarias o evacuación láctea y por lo tanto, la comparación de sus resultados con los nuestros es muy difícil. Además, se ha mostrado ampliamente, que los ciclos estrales reaparecen en ratas lactantes, entre 02 a 4 días después de que la succión ha sido terminada y que estos cambios pueden revertirse restituyendo la succión con crías suplentes, debido a la inhibición de la liberación de gonadotropinas inducida por la succión (McNeilly, 1994). Esto sugiere que a los dos días, el período de refractoriedad de 18h encontrada en nuestro estudio, ha desaparecido.

TESIS CON
FALLA DE CUBRIR

CONCLUSIONES

A partir del presente estudio se puede concluir lo siguiente:

1. El estímulo de la succión provoca una gran activación de las neuronas de todas las capas de la médula espinal, especialmente de las neuronas del ADS y NP, que forman un relevo sináptico en la vía de transmisión del reflejo de la evacuación láctea.
2. El estímulo de la succión desencadena un arco reflejo a nivel segmentario, que activa a neuronas preganglionares simpáticas de la columna IMM, probablemente pertenecientes al circuito neuronal involucrado en el aumento del tono simpático β adrenérgico. Esto provoca, resultando en la falta de evacuación láctea durante los primeros minutos de la succión.
3. La activación de mecanorreceptores ductales desencadena un reflejo que probablemente involucra la activación de mecanismos centrales α adrenérgicos, que bloquean el control inhibitorio de la evacuación láctea.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

REFERENCIAS

- Abbadie C y Besson JM (1993): C-fos expression in rat lumbar spinal cord following peripheral stimulation in adjuvant-induced arthritic and normal rats. *Brain Research*; 607: 195-204.
- Aceves C y Valverde C (1989): Type I 5' monodeiodinase activity in the lactating mammary gland. *Endocrinology*; 124: 2818-2820.
- Aceves C, Pineda O, Ramirez I, de la Luz Navarro M y Valverde C (1999a): Mammary type I deiodinase is dependent on the suckling stimulus: differential role of norepinephrine and prolactin. *Endocrinology*; 140: 2948-2953.
- Aceves C, Rojas-Huidobro R, Marina N, Morales MT y Mena F (1999b): Mammary gland sympathetic innervation is a major component in type 1 deiodinase regulation. *Endocrine*; 11: 115-21.
- Anderson RR (1974): Development and structure of the mammary gland: Endocrinological control. En: Larson BL y Smith VR (eds.), *Lactation: A Comprehensive Treatise*. Academic Press, London. 97-142.
- Basbaum AI (1999): Spinal mechanisms of acute and persistent pain. *Regional anesthesia and Pain Medicine*; 24: 59-67.
- Barowicz T (1979): Changes of blood catecholamine levels in the sheep during machine milking. *Journal of Dairy Research*; 46: 555-557.
- Benyhe S (1994): Morphine: new aspects in the study of an ancient compound, *Life Science*; 13: 969-979.
- Berghorn KA, Le WW, Sherman TG y Hoffman GE (2001): Suckling stimulus suppresses messenger RNA for tyrosine hydroxylase in arcuate neurons during lactation. *Journal of Comparative Neurology*; 438: 423-432.
- Beyer C y Mena F (1969): Neural factors in lactation. En: Bajusz (ed.), *Physiology and pathology of adaptation mechanisms*. Pergamon Press-Oxford y New York. 310-344.
- Bisset GW, Clarke BJ y Lewis GP (1967): The mechanism of the inhibitory action of adrenaline on the mammary gland. *British Journal of Pharmacology*; 31: 550-559.
- Bisset GW (1974): Milk ejection. En: *Handbook of Physiology. Section: Endocrinology*. American Physiological Society. Waverly Press, Baltimore: 493-519.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Bresciani F (1971): Ovarian steroid control of cell proliferation in the mammary gland and cancer. En: Hubinont P, Leroy F y Galand P (eds.), **Basic actions of sex steroids on target organs**. Karger Press, Basel: 130-159.
- Bridges TE, Hillhouse EW y Jones MT (1976): The effect of dopamine on neurohypophyseal hormone release *in vivo* and from the rat neural lobe and hypothalamus *in vitro*. *Journal of Physiology*; 260: 647-666.
- Clapp C, Martínez de la Escalera G, Morales MT, Shyr SW, Grosvenor CE y Mena F (1985): Release of catecholamines follows suckling or electrical stimulation of mammary nerve in lactating rats. *Endocrinology*; 117: 2498-2504 .
- Clapp C, Martínez de la Escalera G, Aguayo D y Mena F (1987): Regulación integrativa de la lactancia. *Boletín de Estudios Médicos y Biológicos*; 35: 63-107.
- Clarke G y Lincoln DW (1976): Effects of catecholamine antagonists on the milk ejection reflex of anesthetized rats. *British Journal of Pharmacology*; 57: 458-459.
- Clarke G, Lincoln DW y Merrick LP (1979): Dopaminergic control of oxytocin release in lactating rats. *Journal of Endocrinology*; 83: 409-420.
- Cochrane ER (1949): Observations on a reflex controlling milk flow in the individual gland of the cow. *British Veterinary Journal* 105: 320.
- Cole HA (1933): The mammary gland of the mouse during the oestrus cycle, pregnancy and lactation. *Proceedings of the Royal Society (Biology)*; 114: 136-161.
- Cowie AT y Tindal JS (1971): Physiology of the mammary gland. En: Cowie AT y Tindal JS (eds.), **The Physiology of Lactation**. Monographs of the Physiological Society. Arnold Press, London: 3-34.
- Cowie AT, Forsyth IA y Hart IC (1980): **Hormonal control of lactation**. Springer-Verlag, Berlin: 58-124.
- Cross BA (1955): The hypothalamus and the mechanism of sympathetico-adrenal inhibition of milk ejection. *Journal of Endocrinology*; 12: 15-28.
- Cross BA (1961): **Neural Control of Lactation**. En: Kon SK y Cowie AT (eds), **Milk: The mammary gland and its secretion Vol. 1**. Academic Press, New York: 229-254.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Crowley WR, Shyr SW, Kacksoh B y Grosvenor CE (1987): Evidence for stimulatory noradrenergic and inhibitory dopaminergic regulation of oxytocin release in the lactating rat. *Endocrinology*; 121: 14-20.
- Crowley WR y Armstrong WE (1992): Neurochemical regulation of oxytocin secretion in lactation. *Endocrine Reviews*; 13: 33-65.
- Chan WY (1965): Mechanisms of epinephrine inhibition of the milk ejecting response to oxytocin. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapy*; 147: 48-53.
- Chance WT (1986): The role of brain and spinal cord norepinephrine in autoanalgesia. *Annals of the New York Academy of Science*; 467: 309-330.
- Chen X y Herbert J (1995): Regional changes in c-fos expression in the basal forebrain and brainstem during adaptation to repeated stress: correlations with cardiovascular, hypothermic and endocrine responses. *Neuroscience*; 64:675-685.
- Chinapen S, Swann JM, Steinman JL y Komisaruk BR (1992): Expression of c-fos protein in lumbosacral spinal cord in response to vaginocervical stimulation in rats. *Neuroscience Letters*; 145: 93-96.
- Deis RP (1968): The effect of an exteroceptive stimulus on milk ejection in lactating rats. *Journal of Physiology*; 197: 37- 46.
- Donoso EA, Sapag-Hagar M y Lara HE (1992): Neurochemical evidence for the presence of sympathetic nerve terminals in the rat mammary gland: changes during the lactogenic cycle. *Molecular and Cellular Neuroscience*; 3: 23-28.
- Dubois-Dauphin M, Armstrong WE, Tribollet E y Dreifuss JJ (1985): Somatosensory systems and the milk-ejection reflex in the rat. II. The effects of lesions in the ventroposterior thalamic complex, dorsal columns and lateral cervical nucleus-dorsolateral funiculus. *Neuroscience*; 15: 1131-1140.
- Duggan AW, Hendry IA, Morton CR, Hutchison WD y Zhao ZQ (1988): Cutaneous stimuli releasing immunoreactive substance P in the dorsal horn of the cat. *Brain Research*; 451: 261-273.
- Duggan AW, Hope PJ, Jarrott B, Schaible HG y Fleetwood-Walker SM (1990): Release, spread and persistence of immunoreactive neurokinin A in the dorsal horn of the cat following noxious cutaneous stimulation. *Studies with antibody microprobes. Neuroscience*; 35: 195-202.
- Eayrs JT y Baddeley RM (1956): Neural pathways in lactation. *Journal of Anatomy*; 90: 161-171.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Ely F y Petersen WE (1941). Factors involved in the ejection of milk. *Journal of Dairy Science*; 24: 211-223.
- Eriksson M, Ceccatelli S, Uvnas-Moberg K, Iadarola M y Hokfelt T (1996a): Expression of Fos-related antigens, oxytocin, dynorphin and galanin in the paraventricular and supraoptic nuclei of lactating rats. *Neuroendocrinology*; 63: 356-367.
- Eriksson M, Lindh B, Uvnas-Moberg y Hokfelt T (1996b); Distribution and origin of peptide containing nerve fibers in the rat and human mammary gland. *Neuroscience*; 70: 227 -245.
- Ewy Z y Barowicz T (1981): Interaction of neurohypophyseal and adrenal catecholamines and oxytocin hormones in the ewe during the milk ejection reflex. *Advanced Physiological Sciences*; 20: 209.
- Fenelon VS y Poulain DA (1992): Electrical activity of dorsal horn neurons during the suckling-induced milk ejection reflex in the lactating rat. *Journal of Neuroendocrinology*; 4: 575-584.
- Fenelon VS, Poulain DA y Theodosis DT (1993): Oxytocin neuron activation and Fos expression: a quantitative immunocytochemical analysis of the effect of lactation, parturition, osmotic and cardiovascular stimulation. *Neuroscience*; 53: 77-89.
- Findlay ALR (1966): Sensory discharges from lactating mammary glands. *Nature*; 211: 1183-1184.
- Findlay ALR y Grosvenor CE (1969): The role of mammary gland innervation in the control of the motor apparatus of the mammary gland: A review. *Dairy Science Abstracts*; 31:109-116.
- Fuchs AR, Cubile L, Dawood MY y Jorgensen FS (1984): Release of oxytocin and prolactin by suckling in rabbits throughout lactation. *Endocrinology*; 114: 462-469.
- Fukuoka T, Negoro H, Honda K, Higuchi T y Nishida E (1984): Spinal pathway of the milk-ejection reflex in the rat. *Biology and Reproduction*; 30: 74-81.
- Gerendai I, Tóth IE, Kocsis K, Boldogkői Z, Medveczky I y Halász B (2001): Transneuronal labeling of nerve cells in the CNS of female rat from the mammary gland by viral tracing technique. *Neuroscience*; 108: 103-118.
- Giesler GJ, Cannon JT, Urca G y Liebeskind JC (1978): Long ascending projections from substancia gelatinosa Rolandi and the subject dorsal horn in the rat. *Science*; 202: 984-986.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Goodman GT y Grosvenor CE (1983): Neuroendocrine control of the milk ejection reflex. *Journal of Dairy Science*; 66: 2226 - 2235.
- Grachev II (1949): Reflexes from the mammary gland. *Zhurn Obshch Biologii*; 10: 401-420.
- Grosvenor CE (1965): Evidence that exteroceptive stimuli can release prolactin from the pituitary gland of the lactating rat. *Endocrinology*; 30: 195-200.
- Grosvenor CE y Findlay ALR (1968): Effect of denervation on fluid flow into the mammary gland. *American Journal of Physiology*; 214: 820-824.
- Grosvenor CE, Meiweg H y Mena F (1970): Effect of nonsuckling interval on ability of prolactin to stimulate milk secretion in rats. *American Journal of Physiology*; 219: 403-408.
- Grosvenor CE, DeNuccio DJ, King SF, Meiweg H y Mena F (1972): Central and peripheral neural influences on the oxytocin-inducing pressure response of the mammary gland of the anesthetized lactating rat. *Journal of Endocrinology*; 55: 299-309.
- Grosvenor CE y Mena F (1973): Evidence that suckling pups, through an exteroceptive mechanism, inhibit the milk stimulatory effects of prolactin in the rat during late lactation. *Hormones and Behavior*; 4: 209-222.
- Grosvenor CE y Mena F (1974): Neural and hormonal control of milk secretion and milk ejection. En: Larson BL y Smith VR (eds.). *Lactation: A Comprehensive Treatise*. Academic Press, London: 227-267.
- Grosvenor CE, Mena F y Whitworth NS (1977): Sensory stimuli from pups involved in inhibition of milk secretion in rats during late lactation. *Hormones and Behavior*; 8: 287-296.
- Grosvenor CE, Shyr SW, Goodman GT y Mena F (1986): Comparison of plasma profiles of oxytocin and prolactin following suckling in the rat. *Neuroendocrinology*; 43: 679-685.
- Hagihira S, Taenaka N y Yoshiya I (1997): Inhalation anesthetics suppress the expression of c-Fos protein evoked by noxious somatic stimulation in the deeper layer of the spinal cord in the rat. *Brain Research*; 751: 124-130.
- Haller EW (1985): Neural and anatomic characteristics of peripheral afferent fibers in the milk ejection reflex. *Brain Research Bulletin*; 15: 563-567.
- Hoffman GE, Le WW, Abbud R, Lee WS y Smith MS (1994): Use of Fos-related antigens (FRAs) as markers of neuronal activity: FRA changes in dopamine

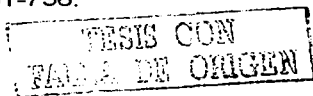
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

neurons during proestrus, pregnancy and lactation. *Brain Research*; 654: 207-215.

- Hunt SP, Pini A y Evan G (1987): Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature*; 328: 632-634.
- Imagawa W, Yang J, Guzman R y Nandi S (1994): Mammary Gland Development. En : Knobil E y Neill JD (eds.), *The Physiology of Reproduction* vol. 2. Raven Press, New York: 1085-1130.
- Kuanyshbekova GA (1976): Reflex discharge of catecholamines during milk ejection inhibition in goats. *Akad Nauk SSR (Biologii)*; 14: 62-65.
- Kuraishi Y, Satoh M y Takagi H (1987): The descending noradrenergic system and analgesia. *Pain & Headache*; 9: 101-128.
- Li C, Chen P y Smith MS (1999): Neural populations in the rat forebrain and brainstem activated by the suckling stimulus as demonstrated by c-Fos expression. *Neuroscience*; 94: 117-129.
- Lin SH, Miyata S, Matsunaga W, Kawarabayashi T, Nakashima T y Kiyohara T (1998): Metabolic mapping of the brain in pregnant, parturient and lactating rats using Fos immunohistochemistry. *Brain research*; 787: 226-236.
- Lincoln DW, Hill A y Wakerley J (1973): The milk ejection reflex of the rat: An intermittent function not abolished by surgical levels of anaesthesia. *Journal of Endocrinology*; 57: 49-60.
- Lincoln DW y Wakerley JB (1975): Factors governing the periodic activation of supraoptic and paraventricular neurosecretory cells during suckling in the rat. *Journal of Physiology*; 250: 443-461.
- Lincoln DW y Paisley AC (1982): Neuroendocrine control of milk ejection, *Journal of Reproduction and Fertility*; 65: 571-586.
- Lincoln DW y Russell JT (1985): The electrophysiology of magnocellular oxytocin neurons. En: Amico, JA y Robinson AG (eds.), *Oxytocin: Clinical and laboratory studies*. Elsevier, Amsterdam: 53-76.
- Linzell JL (1955): Some observations on the contractile tissue of the mammary glands. *Journal of Physiology*; 130: 257-267.
- Linzell JL y Parker M (1971): Mechanisms of milk secretion. *Physiological Reviews*; 51: 564-597.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Lundeberg T, Uvnas-Moberg K, Agren G y Bruzelius G (1994): Anti-nociceptive effects of oxytocin in rats and mice. *Neuroscience Letters*; 170: 153-157.
- Lyons WR, Li CH y Johnson RE (1958): The hormonal control of mammary growth and lactation. *Recent Progress in Hormone Research*; 14: 219-254.
- Marchetti B, Fortier M, Poyet P, Folléa N y Pelletier G (1990): β -Adrenergic receptors in the rat mammary gland during pregnancy and lactation: Characterization distribution and coupling to Adenylate Cyclase. *Endocrinology*; 126: 565-574.
- Marchetti B y Labrie F (1990): Hormonal regulation of β -adrenergic receptors in the rat mammary gland during the estrous cycle and lactation: role of sex steroids and prolactin. *Endocrinology*; 126: 575-581.
- Mayer GI y Klein M (1961): Histology and cytology of the mammary gland. En: Kon SK y Cowie AT (eds.), *Milk: The mammary gland and its secretion*. Academic press, London: 47-127.
- McNeilly A (1994): Suckling and the control of gonadotropin secretion. En: Knobil E and Neill J (eds.), *The Physiology of Reproduction*, Vol. 2. Raven Press, NewYork, 1994, pp. 1179-1212.
- Mena F y Grosvenor CE (1971): Release of prolactin in rats by exteroceptive stimulation; sensory stimuli involved. *Hormones and Behavior*; 2: 107-116.
- Mena F y Grosvenor CE (1972): Effect of suckling and of exteroceptive stimulation upon prolactin release in the rat during late lactation. *Journal of Endocrinology*; 52: 11-22.
- Mena F, Reyes G, Aguayo D y Grosvenor CE (1974): Effect of acute reduction in milk removal from some glands upon the ability of a single rabbit mammary gland to secrete milk. *Journal of Endocrinology*; 62; 431-438.
- Mena F, Enjalbert A, Carbonell L, Priam M y Kordan C (1976): Effect of suckling on plasma prolactin and hypothalamic monoamine levels in the rat. *Endocrinology*; 99: 445-451.
- Mena F, Pacheco P, Aguayo D, Clapp C y Grosvenor CE (1978): A rise in intramammary pressure follows electrical stimulation of mammary nerve in anesthetized rats. *Endocrinology*; 103: 1929-1936.
- Mena F, Pacheco P, Aguayo D, Martínez de la Escalera G y Grosvenor CE (1979). Reflex regulation of autonomic influences upon the oxytocin-induced contractile response of the mammary gland in the anesthetized rat. *Endocrinology*; 104:751-756.



- Mena F, Pacheco P y Grosvenor CE (1980): Effect of electrical stimulation of mammary nerve upon pituitary and plasma prolactin concentrations in anesthetized lactating rats. *Endocrinology*; 106: 458-462.
- Mena F, Clapp C y Martínez de la Escalera G (1985): Integrative regulation of milk ejection. En: Amico JA y Robinson AG (eds.), *Oxytocin: Clinical and Laboratory studies*. Excerpta Medica, New York: 179-199.
- Mena F, Martínez de la Escalera G, Clapp C, Aguayo D, Morales MT y Grosvenor CE (1987): Investigation into the role of dopamine and lysosomes in the impairment of prolactin transformation and release imposed by long periods of non-suckling in the rat. *Acta Endocrinologica (Copenhagen)*; 114: 371-378.
- Mena F, Clapp C, Aguayo D, Morales T y Martínez de la Escalera G (1990a): Age related stimulatory and inhibitory effects of suckling regulate lactation in rabbits. *Physiology and Behavior*; 48: 307-310.
- Mena F, Clapp C, Aguayo D y Martínez de la Escalera G (1990b): Prolactin and propranolol prevent the suckling-induced inhibition of lactation in rabbits. *Physiology and Behavior*; 48: 311-315.
- Mena F, Aguayo D, Pacheco P y Morales MT (1995): Central effects of catecholamines on mammary contractility in rats are neurally mediated. *Neuroendocrinology*; 61: 722-730.
- Mepham T (1987): Endocrine Control of Mammary Growth and Function. En: Mepham T (ed.), *Physiology of Lactation*. Open University press, Philadelphia: 109-128.
- Molander C y Grant G (1995): Spinal cord cytoarchitecture. En: Paxinos G (ed.), *The Rat Nervous System*. Academic Press, Australia; 2nd edition. 39-46.
- Moltz H, Levin R y Leon M (1969): Prolactin in the postpartum rat: synthesis and release in the absence of suckling stimulation. *Science*; 163: 1083-1084.
- Moos F y Richard P (1979): The inhibitory role of β adrenergic receptors in oxytocin release during suckling. *Brain Research*; 169: 595-599.
- Morales MT, Shapiro E y Mena F (1994): Central effects of morphine, serotonin and acetylcholine upon milk ejection in rats. 3rd international congress of Neuroendocrinology, Budapest, Hungary: P4.22.
- Morgan JI, Cohen DR, Hempstead JL y Curran T (1987): Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. *Science*; 237: 192-197.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Morgan JI y Curran T (1991): Stimulus- transcription coupling in the nervous system: Involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annual Review of Neuroscience*; 14: 421-451.
- Paape MJ y Desjardins C (1971): Nursing duration and suckling intensity: effects on plasma corticosterone, circulating leukocytes, and mammary nucleic acids. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*; 138: 12-17.
- Parker SL, Armstrong WE, Wang W y Grosvenor CE (1991): Excitatory and inhibitory dopaminergic regulation of oxytocin secretion in the lactating rat: Evidence for respective mediation by D-1 and D-2 dopamine receptor subtypes. *Neuroendocrinology*; 53: 503-510.
- Paxinos G y Watson CH (1982): *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, New York.
- Poulain DA y Wakerley JB (1986): Afferent projections from the mammary glands to the spinal cord in the lactating rat-II. Electrophysiological responses of spinal neurons during stimulation of the nipples, including suckling. *Neuroscience*; 19: 511-521.
- Presley RW, Menetrey D, Levine JD y Basbaum AI (1990): Systemic morphine suppresses noxious stimulus-evoked Fos protein-like immunoreactivity in the rat spinal cord. *Journal of Neuroscience*; 10: 323-335.
- Radnor CJP (1972): Myoepithelium in the pre-lactating and lactating mammary glands of the rat. *Journal of Anatomy*; 112: 337-353.
- Robinson DA, Wei F, Wang GD, Li P, Kim SJ, Vogt SK, Muglia LJ y Zhuo M (2002): Oxytocin mediates stress-induced analgesia in adult mice, *Journal of Physiology*; 540: 593-606.
- Rousselot P, Poulain DA y Theodosis DT (1994): Ultrastructural visualization and neurochemical characterization of spinal projections of primary sensory afferents from the nipple: combined use of transganglionic transport of HRP-WGA and glutamate immunocytochemistry. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*; 42: 115-123.
- Sala NL y Freire F (1974): Relationship between ultrastructure and response to oxytocin of the mammary myoepithelium throughout pregnancy and lactation: effect of estrogen and progesterone. *Biology and Reproduction*; 11: 7-17.
- Samson WK, Lunpkin MD y McCann SM (1983): Further correlation of oxytocin and prolactin releases: Lactation. *Society for Neuroscience* 9: 462.

- Sansone GR y Komisaruk BR (2001): Evidence that oxytocin is an endogenous stimulator of autonomic sympathetic preganglionics: the pupillary dilatation response to vaginocervical stimulation in the rat. *Brain Research*; 898: 265-271.
- Sansone GR, Gerdes CA, Steinman JL, Winslow JT, Ottenweller JE, Komisaruk BE y Insel TR (2002): Vaginocervical stimulation releases oxytocin within the spinal cord in rats. *Neuroendocrinology*; 75: 306-315.
- Sassone-Corsi P, Ransone LJ, Lamph WW y Verma IM (1988): Direct interaction between fos and jun nuclear oncoproteins: role of the 'leucine zipper' domain. *Nature*; 336: 692-695.
- Sawchenko PE, Arias C y Bittencourt J (1990): Inhibin β somatostatin- and enkephalin-immunoreactivities coexist in caudal medullary neurons that project to the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Journal of Comparative Neurology*; 291: 269-280.
- Sharp FR, Sagar SM, Hicks K, Lowenstein D y Hisanaga K (1991): c-fos mRNA, Fos, and Fos-related antigen induction by hypertonic saline and stress. *Journal of Neuroscience*; 11: 2321-2331.
- Soloff MS, Alexandrova M y Fernstrom MJ (1979): Oxytocin receptors: triggers for parturition and lactation. *Science*; 204: 1313-1315.
- Soloff MS y Wieder MH (1983): Oxytocin receptors in rat involuting mammary gland. *Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology*; 61: 631-635.
- Soloff MS (1985): Oxytocin receptors and mechanism of oxytocin action. En: Amico JA y Robinson AG (eds.), *Oxytocin: Clinical and Laboratory studies*. Excerpta Medica, New York: 259-276.
- Song SL, Crowley WR y Grosvenor CE (1988): Evidence for the involvement of an adrenal catecholamine in the β adrenergic inhibition of oxytocin release in lactating rats. *Brain Research*; 457: 303-309.
- Stern JM, Yu YL y Crockett David (2002): Dorsolateral columns of the spinal cord are necessary for both suckling-induced neuroendocrine reflexes and the kyphotic nursing posture in lactating rats. *Brain Research*; 947: 110-121.
- Sutherland RC y Fink G (1983). The milk ejection pathway in brain studied with the 2-deoxyglucose method. *Brain Research*; 273: 291-296.
- Taiwo YO, Bjercknes LK, Goetzl EJ y Levine JD (1989): Mediation of primary afferent peripheral hyperalgesia by the cAMP second messenger system. *Neuroscience*; 32: 577-580.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

- Tasker JG, Theodosias DT y Poulain DA (1986): Afferent projections from the mammary glands to the spinal cord in the lactating rat-I. A neuroanatomical study using the transganglionic transport of horseradish peroxidase-wheatgerm agglutinin. *Neuroscience*; 19: 495-509.
- Tasker JG, Theodosias DT y Poulain DA (1988): The effect of neonatal capsaicin treatment on the sensory innervation of the nipple and on the milk ejection reflex in the rat. *Experimental Brain Research*; 73: 32-38.
- Traurig H, Papka RE, Saria A y Lembeck F (1984): Substance P immunoreactivity in the rat mammary nipple and the effects of capsaicin treatment on lactation. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*; 328: 1-8.
- Tsou K, Lowitz KA, Hohmann AG, Martin WJ, Hathaway CB, Bereiter DA y Walker JM (1996): Suppression of noxious stimulus-evoked expression of Fos protein-like immunoreactivity in rat spinal cord by a selective cannabinoid agonist. *Neuroscience*; 70:791-798.
- Tucker HA (1974): General endocrinological control of lactation. En: Larson BL y Smith VR (eds.), *Lactation: A Comprehensive Treatise*. Academic Press, London: 277-326.
- Voloschin LM, Decima E y Tramezzani JH (1988): Electronmicroscopic and electrophysiological studies of the teat branch of the XIII thoracic nerve: relationship with lactation in the rat. *Journal of Endocrinology*; 118:471-483.
- Vorherr H (1971): Catecholamine antagonism to oxytocin-induced milk ejection. *Acta Endocrinologica Supplies*; 154: 5-38.
- Wakerley JB y Drewett RF (1975): Pattern of sucking in the infant rat during spontaneous milk ejection. *Physiology and Behavior*; 15: 277-281.
- Wakerley JB, Clarke G y Summerlee A (1994): Milk ejection and its control. En: *The Physiology of Reproduction vol 2*. Raven Press, New York: 1131-1170.
- Wintrip N, Nance DM y Wilkinson M (1997): The effect of lactation on induced Fos-like immunoreactivity in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Research*; 754: 113-120.
- Woodside B y Amir S (1997): Lactation reduces Fos induction in the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus after urethane administration in rats. *Brain Research*; 752: 319-323.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Yaksh TL, Jessell TM, Gamse R, Mudge AW y Leeman SE (1980): Intrathecal morphine inhibits substance P release from mammalian spinal cord in vivo. *Nature*; 286: 155-157.
- Yaksh TL (1985): Pharmacology of spinal adrenergic systems which modulate spinal nociceptive processing. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*; 22: 845-858.
- Zaks MG (1962): The storage function of the mammary gland. En: Zaks MG (ed.), *The Motor Apparatus of the Mammary Gland*. Oliver and Boyd Ltd., London. 1-26.
- Zarrow MX, Schlein PA, Denenberg VH y Cohen HA (1972): Sustained corticosterone release in lactating rats following olfactory stimulation from the pups. *Endocrinology*; 91: 191-196.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Mammary Gland Sympathetic Innervation Is a Major Component in Type 1 Deiodinase Regulation

Carmen Aceves, Rita Rojas-Huidobro, Nephtali Marina, Maria Teresa Morales, and Flavio Mena

Departamento de Neuroendocrinología, Centro de Neurobiología, Campus Juriquilla, UNAM, Querétaro, México

Recent observations have shown that in lactating rats previously deprived of suckling, either suckling stimulus or ip injection of norepinephrine was capable of increasing mammary deiodinase type 1 (M-D1) mRNA content and enzyme activity. In the present work, we show that intact efferent sympathetic mammary innervation is required to restore both mammary D1 mRNA content and enzyme activity, whereas suckling-induced secretion of catecholamines from the adrenal glands does not seem to participate in M-D1 enzyme regulation. The data also indicate that the sympathetic reflex activation in response to suckling involves two complementary autonomic components: (1) activation, presumably through mammary segmental arrangement affecting neighboring mammary glands; and (2) an individual reflex regulatory mechanism capable of maintaining M-D1 activity within each mammary gland. In addition to these findings, we show that the suckling-induced sympathetic activation of M-D1 activity could be blocked by prior activation of ductal mechanoreceptors. This set of regulatory and counterregulatory mechanisms seems to ensure the optimal control of mammary energetic expenditure according to litter size.

Key Words: Thyroid hormone metabolism; deiodinases; sympathetic innervation; mammary gland; lactation.

Introduction

Mediated through the binding of triiodothyronine (T_3) to specific nuclear receptors, thyroid hormones regulate important processes in the organism, e.g., growth and development, thermogenesis, and energy expenditure (1,2). Metabolically active T_3 is mainly generated by the extrathyroidal enzymatic 5' deiodination of thyroxine, which is catalyzed by deiodinase type 1 (D1) and type 2

(D2). D1 is extremely sensitive to inhibition by propylthiouracil, has a ping-pong catalytic mechanism, and is responsible for generating $\approx 80\%$ of circulating T_3 . D2 has a sequential catalytic mechanism, and its function seems to be the local generation of T_3 for tissue-specific autoconsumption (3). A concerted adaptive response of organ-specific changes in deiodinase activity and sympathoadrenal activity, aimed at preserving the organism's metabolic fitness, has been suggested by previous work (4). We and others have shown that lactation resembles a selective pseudohypothyroidism state in which deiodinase activity is decreased in the liver, kidney, and brown adipose tissue, whereas at the level of the mammary gland, D1 is expressed *de novo* and its activity is directly related to the intensity of lactation (5-7). Moreover, mammary D1 (M-D1) activity may provide the lactating gland with a local large quantity of T_3 , which represents more than 80% of the nuclear T_3 content (8). Recent findings have also shown that M-D1 is positively regulated by suckling through β -adrenergic receptors (9). These findings are consonant with previous data showing that the mammary gland is an effector of the autonomic nervous system, in which both milk ejection and secretion may be regulated physiologically by catecholamines (CATs) (10). In the present study, we sought to determine the role played by the adrenals and/or mammary nerve endings on the suckling-induced activation of M-D1. In addition, we analyzed the relation between the number of glands suckled and the degree of M-D1 enzyme restitution. Finally, we conducted a series of experiments to determine whether the suckling-induced M-D1 activity could be inhibited by the activation of ductal mechanoreceptors.

Results

Adrenalectomy

Bilateral adrenalectomies or sham operations (exposure of adrenal glands without ligation) were performed through a dorsal incision under ether anesthesia 48 h before the experimental procedure. The mothers were returned to their pups 2 h after surgery, and they were given saline water to drink *ad libitum*. On the day of the experiment, the mothers were separated from their pups for 12 h. One group was sacrificed (12 h nonsuckled group [12hNS]) and the

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Received April 27, 1999; Revised June 21, 1999; Accepted July 7, 1999.
Author to whom all correspondence and reprint requests should be addressed: Carmen Aceves, Departamento de Neuroendocrinología, Centro de Neurobiología, Campus Juriquilla, UNAM, Apartado Postal 1-1141, Querétaro, Qro. 76001, México. E-mail: caracev@servidor.unam.mx

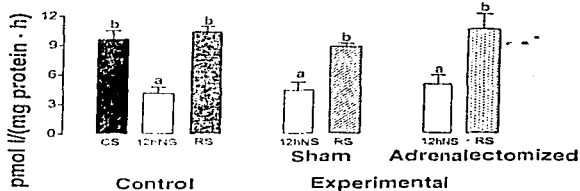


Fig. 1. Effect of 15 min of resuckling on M-D1 activity in conscious intact, sham, and bilaterally adrenalectomized mothers. Pups were removed from their mothers for 12 h. One group of mothers was sacrificed (12 h nonsuckled group [12 h NS]), and the others were resuckled by their pups for 15 min and sacrificed 4 h later (resuckled group [RS]). Control animals included intact mothers in which suckling was continuous (CS). Data are expressed as the mean \pm SD ($n = 4$). Means with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

other was resuckled by their pups for 15 minutes and sacrificed 4 h later (resuckled group [RS]). As shown in Fig. 1, restitution of M-D1 activity was complete after 4 h in conscious control, sham, and adrenalectomized rats previously nonsuckled for 12 h and then suckled for 15 min.

Suckling Stimulation in Anesthetized Rats

Several groups of intact mothers were used. Each mother was separated from her pups for 12 h. In one set of experiments, mothers were anesthetized with urethane and placed on their backs on a warm slide (32–35°C). Next, the pups (one, two, three, or six pups) were manually placed in contact with the ventral surface of the mother and allowed a 1- or 2-min period for establishing contact and to attach to the nipples. Once suckling was established, the pups suckled for 15 min and then were removed. In a second set of experiments, conscious mothers were returned with their 10 pups allowing random suckling in all the glands for 15 min. In all experiments the mothers were killed 4 h later. Restitution of M-D1 mRNA content and enzyme activity in mammary glands varied according to the number of glands suckled by the pups. Thus, as shown in Fig. 2, whereas complete restoration occurred in all glands when 10 or 6 pups were allowed to suckle, suckling of three glands provoked maximal restoration in the corresponding suckled glands, and only a partial effect was observed in the rest of the glands. Finally, suckling of one or two glands provoked full restoration exclusively in the glands in which the stimulus was applied.

Denervation

The segmental nerve corresponding to the first left abdominal mammary gland (gland no. 7) was exposed and subsequently cut. Denervation or sham operations were performed under ether anesthesia 12 h before the experimental procedure. On the day of the experiment, the rats

were anesthetized with urethane and suckling was applied for 15 min by one pup on each pair, the denervated or sham, and the contralateral intact gland. Next, the mothers were killed 4 h later. When suckling was applied by one pup to a denervated gland, restoration of M-D1 mRNA content and enzyme activity did not occur (Fig. 3).

Activation of Ductal Mechanoreceptors

Experiments were designed to determine whether the stimulatory effect of suckling on M-D1 activity could be blocked by prior activation of ductal mechanoreceptors (11,12). To this end, 60 mU of oxytocin (OT) were given to the rats 40 min before applying the 15-min period of suckling with the litter (10 pups). As compared to control rats, which were injected intraperitoneally with saline, activation of mechanoreceptors by OT effectively blocked the suckling-induced restoration of both M-D1 mRNA content and enzyme activity (Fig. 4).

Discussion

This study was based on our recent observation that either suckling or intraperitoneally injected norepinephrine was able to increase mammary D1 mRNA content and its enzyme activity through activation of β -adrenergic receptors (9). Also, a large body of information exists concerning the regulatory influence exerted by the sympathetic system on mammary gland physiology (10). Thus, it was shown that suckling provoked the release of CAT from the adrenals into the circulation and that mammary innervation regulated milk ejection (13,14). Mammary innervation consists of the somatic sensory (afferent) nerves, conveying impulses from tactile cutaneous and parenchyma mechanoreceptors to the central nervous system (CNS), and the sympathetic motor (efferent) nerves, which innervate blood vessels and contractile muscles of the teat and the ducts (10,15). Previous work suggested that alveolar cells are not innervated, but more recent evidence suggests that the sympathetic nerve terminals in the mammary gland participate in the alveolar cell biosynthetic machinery. Thus, besides their presence in epidermis and dermis, around smooth muscle cells and blood vessels in the nipple and in the ducts, sympathetic nerve endings have also been found surrounding the alveoli (16). The alveolar cell possesses β -adrenergic receptors, functionally coupled to adenylate cyclase, whose number and affinity are modified during lactation (17). The content of norepinephrine of mammary gland exhibits changes during the reproductive cycle, and surgical denervation of the gland decreases both the content of norepinephrine and β -receptors (18,19). In the present work, we observed that efferent mammary innervation is responsible for restoring the M-D1 activity and that adrenal glands do not seem to participate. These findings, together with previous data in which we showed that M-D1 activity is confined to the alveolar cell (20), indicate that efferent innervation to the mammary glands is

TESIS CON
 CALA DE ORO

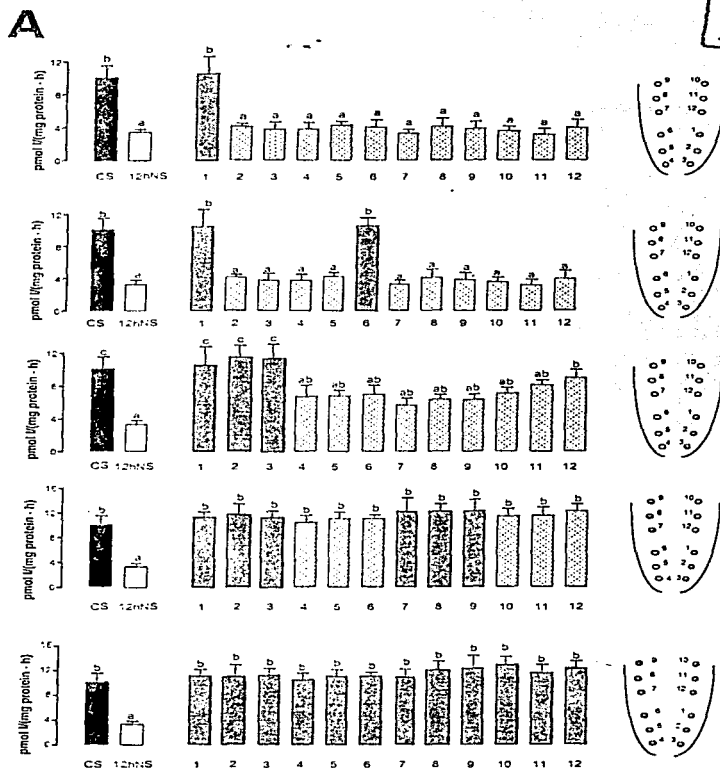


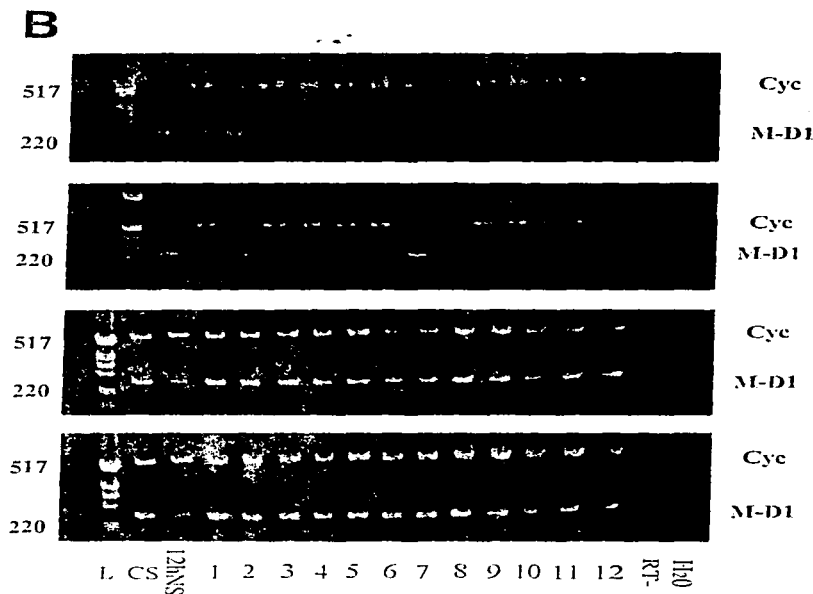
Fig. 2. Effect of differential suckling stimulation on M-D1 enzyme in anesthetized or conscious rats. 12h nonsuckled mothers were stimulated by 1, 2, 3, 6, or 10 pups (see details in Results section). (A) Comparison of M-D1 activity between mammary glands that were suckled (solid bar) or not suckled (open and dotted bars). (Right) Positions of the nipples that were suckled in each group. Data are expressed as the mean \pm SD ($n = 4$). Means with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

involved in regulating energetic expenditure of the lactating mammary gland through the generation of local T_3 .

Another finding in this study was the observation of a clear relationship between the number of glands suckled and the degree of M-D1 enzyme restitution. Thus, consistent with previous reports that six pups suckling is sufficient for maintaining lactation in all the glands (21), suckling of six glands was as effective as suckling of all glands on the restitution of M-D1 mRNA content and enzyme activity. On the other hand, when three glands were suckled, full restoration of M-D1 enzyme was observed in

the glands that were suckled, and only partial restoration occurred in the rest of the glands. Furthermore, when only one or two glands were suckled, enzyme restoration was found in the same gland and no effect was observed in the rest of the glands. Based on the reflexive sympathetic activation elicited by suckling, the present results suggest that the activation of D-1 in the different mammary glands is exerted through segmental arrangements; that a certain threshold, however, exists for these effects, between suckling by three and six pups; and that in addition to their involvement in the segmental effects, mammary neural

TESIS CON
FALLA DE
SEN



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 2. Effect of differential suckling stimulation on M-D1 enzyme in anesthetized or conscious rats. 12h nonsuckled mothers were stimulated by 1, 2, 3, 6, or 10 pups (see details in Results section). (B) Ethidium bromide-stained gel showing reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) products for M-D1 (251 bp) and Cyclophilin (Cyc) (521 bp) after 28 cycles of amplification. L, ladder; CS, animals with continuous suckling; 12hNS, mothers whose pups were removed for 12 h; 1–12, mammary glands; RT-, RNA sample and the appropriate oligonucleotide primers, but without the RT; H₂O, water with all the PCR reagents. (Top to bottom) M-D1 mRNA content of animals that were suckled by 1, 2, 3, or 6 pups. The experiments were repeated twice with independent RNA samples.

afferents exert a local regulatory mechanism capable of maintaining M-D1 activity on each suckled gland. The existence of these complementary mechanisms may have important survival value for the species, i.e., allowing a differential adjustment of energetic expenditure gland by gland, depending on the size of the litter.

Finally, our finding that suckling was ineffective in restoring M-D1 mRNA and enzyme activity in rats previously injected with 60 mU of OT is consonant with previous data (12, 14) showing that the activation of mechanoreceptors interrupts sympathetic mammary outflow. These results suggest that under normal conditions, sympathetic activation within the first minutes of suckling simultaneously interrupts milk ejection and induces M-D1 enzyme, leading to maintenance of the high metabolic rate that characterizes the lactating mammary gland. Following this period, ductal mechanoreceptors may be activated and the milk obtained by the pups. In support of this interpretation is the fact that

15 min or fewer of suckling are sufficient for full restoration of M-D1 activity in the mammary glands (9).

In conclusion, we have shown herein that regulation of M-D1 activity is exerted through reflex activation of mammary innervation by suckling. This sympathetic regulation involves segmental and local nervous arrangements, as well as the activation of ductal mechanoreceptors. This set of regulatory and counterregulatory mechanisms seems to ensure the optimal control of the mammary energetic expenditure according to litter size. Further work is required to determine whether the sympathetic reflex is processed at the spinal cord or involves higher levels of the CNS, and to determine the nature of ductal mechanoreceptors.

Materials and Methods

Reagents

Nonradioactive thyronines were obtained from Henning (Berlin, Germany). Radiolabeled rT_3 (sa 1174 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$) was

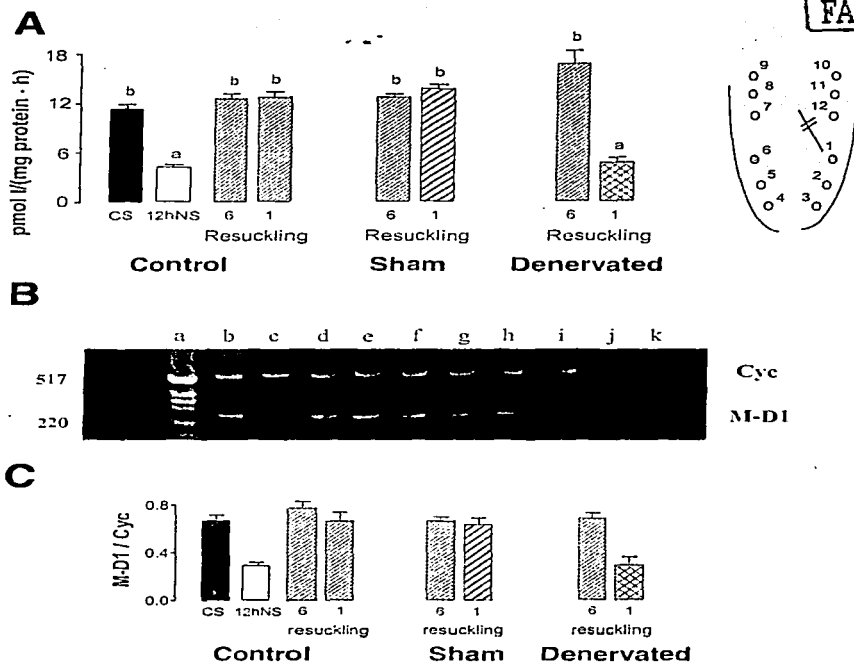


Fig. 3. Effect of 15 min of resuckling on M-D1 activity and mRNA content in intact, sham, or left abdominal mammary-denervated mothers. Anesthetized rats were resuckled for 15 min by one pup on both the denervated or sham and the contralateral intact gland (numbers 1 and 6). The mothers were killed 4 h later. Control animals included mothers in which suckling was continuous (CS), mothers in which the pups were removed for 12 h (12hNS), and 12hNS mothers resuckled by 15 min and killed 4 h later. (A) M-D1 enzyme activity. Data are expressed as the mean \pm SD ($n = 4$). Means with different letters are significantly different ($p < 0.05$). (Right) The position of the nipples that were suckled. (B) Ethidium bromide-stained gel showing RT-PCR products for M-D1 (251 bp) and Cyc (521 bp) after 28 cycles of amplification. Lane a, ladder; lanes b-i, experimental animals described above in the same order; lane j, RNA sample and the appropriate oligonucleotide primers, but without the RT; lane k, water with all the PCR reagents. (C) Quantitation by densitometry of Polaroid negative of ethidium bromide-stained gel. The experiments were repeated twice with independent RNA samples and the values were normalized to Cyc RNA amplicons (M-D1/Cyc).

purchased from New England Nuclear (Boston, MA). Dithiothreitol (DTT) was obtained from Calbiochem (La Jolla, CA) and OT from Armour (La Jolla, CA). Urethane (ethyl carbamate) was purchased from Cedrosa (Mexico City, Mexico). Oligonucleotides were synthesized by Gibco-BRL (Gaithersburg, MD). All other reagents were of the highest purity commercially available.

Animals

Primiparous rats of the Wistar strain were housed in individuals cages in a room with alternating 14 h of light

and 10 h of dark. On postpartum d 1, the size of the litter was adjusted to 10 pups per mother, and all the experimental procedures were conducted on postpartum d 10 ± 1 . The rats were fed Purina Lab Chow and tap water ad libitum. Procedures regarding care, administration of treatment, and euthanasia of animals were reviewed and approved by the supporting DGAPA/UNAM committee. Mothers were anesthetized with urethane administered intraperitoneally at a dose of 115–130 mg/100 g, and were killed by decapitation. Two grams of different mammary glands of each individual were dissected; 1 g of tissue was frozen imme-

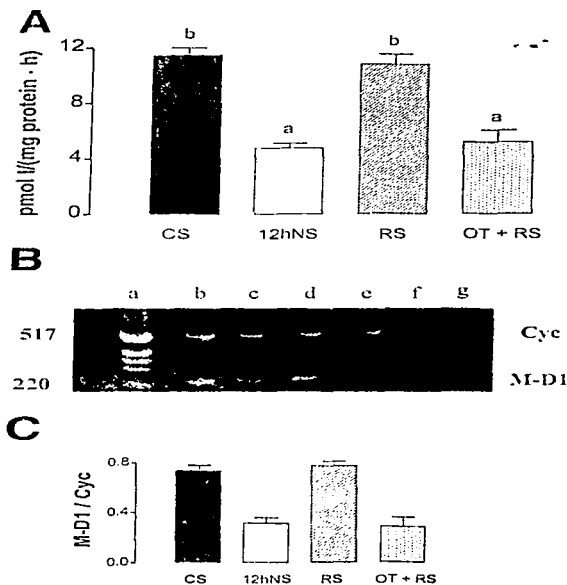


Fig. 4. Effect of 15 min of resuckling in conscious animals in which mammary mechanoreceptors were activated 40 min before resuckling (OT + RS). Animals received saline or 60 mU of OT 40 min before resuckling. Animals were resuckled for 15 minutes and sacrificed 4 h later. (A) M-D1 enzyme activity. Data are expressed as the mean \pm SD ($n = 4$). Means with different letters are significantly different ($p < 0.05$). (B) Ethidium bromide-stained gel showing RT-PCR products for M-D1 (251 bp) and Cyc (521 bp) after 28 cycles of amplification. Lane a, ladder; lanes b-e, experimental animals described above in the same order; lane f, RNA sample and the appropriate oligonucleotide primers, but without the RT; lane g, water with all the PCR reagents. (C) Quantitation by densitometry of Polaroid negative of ethidium bromide-stained gel. The experiments were repeated twice with independent RNA samples and the values were normalized to Cyc RNA amplicons (M-D1/Cyc). Abbreviations as in Fig. 1.

diately on acetone-dry ice and 1 g was homogenized in guanidine thiocyanate.

All experiments and all test periods had parallel controls that consisted of rats with continuous suckling and 12hNS rats. Whenever the glands were not resuckled by pups, accumulated milk was removed by ip administration of OT (30 mU) 1 min before sacrifice. This procedure ensures that accumulated milk will not act as a dilution factor when tissue proteins are quantified.

Enzymatic Assay

Mammary D1 activity was determined by a modification of the radiolabeled iodide release method as described elsewhere (22) and standardized for mammary gland (20). Mammary glands were homogenized in 10 mM HEPES, pH 7.0, with 0.32 M sucrose, 1.0 mM EDTA, and 10 mM DTT. The glands were centrifuged at 2800g, 30 min at 4°C. Assay conditions were as follows: 200 μ g of protein, 2 nM 125 I- rT_3 , 0.5 μ M nonradiolabeled rT_3 , and 5 mM DTT. After a 3-h incubation, released acid-soluble radioiodide was isolated by chromatography in Dowex 50W-X2 columns. Proteins were measured by the Bradford method (Bio-Rad protein assay, Bio-Rad, Richmond, CA). Results are expressed as pmol of radioiodide released/mg of protein-h.

Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

D1 mRNA in lactating mammary glands was identified by using a previously standardized semiquantitative PCR procedure in which an amplicon of the structural protein Cyc was simultaneously amplified (9). Briefly, the RT reaction was primed with oligo (dT) subscript, and a specific M-D1 antisense oligo primer (660-ATC CTG CCT TCC TGT ATC-677) with 5 μ g of total mammary RNA that was isolated by a modification of Chirgwin's method (23,24). The PCR reaction was carried out using 5 μ L of RT mixture and the following primers: for D1, 377-GCA CCT GAC CTT CAT TTC TT-396 (sense) and 627-CTG GCT GCT CTG GTT CTG-610 (antisense); and for Cyc, 7-AGA CGC CGC TGT CTC TTT TCG-27 (sense) and 527-CCA CAC AGT CGG AGA TGG TGA TC-507 (antisense). The PCR mixture contained 25 pmol of each oligonucleotide primer, 200 μ M dNTPs, 1.5 mM $MgCl_2$, and 2.5U of *Taq* polymerase (Gibco-BRL) in a 100- μ L reaction. Amplification was carried out for 28 cycles of melting at 94°C for 45 s, annealing at 54°C for 45 s, and extension at 72°C for 1 min. As a control, a reaction mixture containing an RNA sample and the appropriate oligonucleotide primers, but without the RT was included in every experiment. The resultant PCR fragments were 251 bp for M-D1 and 521 bp for Cyc, and were resolved on a 3% agarose gel and visualized using ethidium bromide. The sizes of the bands were confirmed by a restriction-digested pUC plasmid (1-kb DNA ladder, Gibco-BRL). After a Polaroid photograph was taken, the photograph was digitized using a Hewlett Packard Scanner Jet 11CX, and the signals were analyzed by using an editing version of the National Institutes of Health-image program. Values obtained were normalized according to the Cyc mRNA levels detected in each sample.

Statistical Analysis

Data are expressed as the mean \pm SD. Differences between experimental groups were analyzed using a one-way analysis of variance and Tukey's HSD test. Differences with a $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Acknowledgments

We are grateful to Felipe Ortíz Cornejo for animal care and technical assistance. We also Thank Aurea Orozco and Michael C. Jeziorski for their critical review of this manuscript. This work was supported in part by grants PAPIIT IN-206496 from DGAPA/UNAM and 25598M from CoNaCyT.

References

- Larsen, P. R., Silva, J. E., Kaplan, M. M. (1981). *Endocr. Rev.* 2, 87-102.
- Oppenheimer, J. H. and Samuels H. H. (eds.) (1983). *Molecular Basis of Thyroid Hormone Actions*. Academic: New York.
- Kohrle, J. (1994). *Exp. Clin. Endocrinol.* 102, 63-89.
- Aceves, C., Navarro, L., Ramirez del Angel, A., Luna, M., and Valverde-R. C. (1994). *Endocrine* 2, 547-551.
- Giralt, M., Iglesias, R., Villarroya, F., and Mampel, T. (1987). *Horm. Metab. Res.* 19, 510-513.
- Kahl, S., Capuco, A. V., and Bitman, J. (1987). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 184, 144-150.
- Valverde-R, C. and Aceves, C. (1989). *Endocrinology* 124, 1340-1344.
- Aceves, C., Morales, T., Pineda, O., Rodón-Fonte, C., Navarro, L., Valverde-R, C., and Mena, F. (1996). 5th International Symposium Hormonal Bioactive Substances in Milk. Slovak Republic.
- Aceves, C., Pineda, O., Ramirez, C. I., Navarro, L., and Valverde-R, C. (1999). *Endocrinology* 140, 2948-2953.
- Mena, F., Clapp, C., Martínez-Escalera, G., Pacheco, P., Grosvenor, C. E. (1985). In: *Oxytocin: Clinical and Laboratory Studies*. Amico, J. A. and Robinson, A. G. (eds.). Elsevier: Amsterdam.
- Grosvenor, C. E. and Mena, F. (1982). In: *Neuroendocrine Perspectives*, vol. 1. Muller, C. E. E. and McLeod, R. M. (eds.). Elsevier: Amsterdam.
- Deis, R. P. (1968). *J. Physiol. (Lond.)* 197, 37-46.
- Clapp, C., Martínez-Escalera, G., Morales, M. T., Shyr, S. W., Grosvenor, C. E., and Mena, F. (1985). *Endocrinology* 117, 2498-2504.
- Mena, F., Aguayo, D., Pacheco, P., and Morales M. T. (1995). *Neuroendocrinology* 61, 722-730.
- Mempham, T. B. (1987). *Physiology of Lactation*. Open University Press: Philadelphia.
- Eriksson, M., Lindh, B., Uvnäs-Morberg, K., and Hokfelt, T. (1996). *Neuroscience* 70, 227-245.
- Marchetti, B., Fortier, M. A., Poyet, P., Follea, N., Pelletier, G., and Labrie, F. (1990). *Endocrinology* 126, 565-574.
- Donoso, E. A., Sapag-Hagar, M., and Lara H. E. (1992). *Mol. Cell. Neurosci.* 8, 23-28.
- Wakade, A. R. (1979). *Nature* 281, 374-376.
- Aceves, C., Rodón, C., Ramírez-C. I., Wilson, S., Pineda, O., López, L., Mancilla, R., and Valverde-R, C. (1995). *Endocrine* 3, 95-99.
- Mena, F. and Grosvenor, C. E. (1968). *Endocrinology* 82, 623-626.
- Leonard, J. L., and Rosenberg, I. N. (1980). *Endocrinology* 107, 1376-1383.
- Chrigwin, J. M., Przybyla, A. E., McDonald, R. J., and Rutter, W. J. (1979). *Biochemistry* 18, 5294-5299.
- Galton, V. A., Morganelli, C. M., Schneider, M. J., and Yee, K. (1991). *Endocrinology* 129, 2298-2300.

TESIS CON
FALLA DE CARGEN



Sympathetic innervation of mammary glands mediates suckling-induced reflex inhibition of milk yield in rats

Teresa Morales, Edna Shapiro, Nephtalí Marina, Flavio Mena*

Centro de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Campus UNAM, Apdo. Postal 1-1141 76230 Juriquilla, Querétaro, Qro., México

Received 30 November 2000; received in revised form 22 March 2001; accepted 24 April 2001

Abstract

Previous work has shown that physiologic activation of the sympathetic system may inhibit milk yield (ME) in rats. Thus, adrenal catecholamines (CAs) are released by suckling, but it is not known whether such inhibition results also from reflex activation by the same stimulus of neural sympathetic upon the mammary gland. The present experiments were designed to determine whether suckling inhibits ME induced by oxytocin (OT) in the urethane-anesthetized lactating rat, and whether such inhibition results from adrenal and/or neurally released CAs. Rats were isolated (6 h) from their pups and then anesthetized. OT (0.8 mU every 2 min) was administered intravenously to the mothers during suckling. Rats were either chronically implanted with cannulae into the lateral cerebral ventricles (intracerebroventricularly), bilaterally adrenalectomized (ADX), hypophysectomized (HX), spinal cord transected (SCT; T3–T4), or had the nipple area (NA) locally anesthetized before suckling. MEs were low in control, sham, ADX and HX rats, but not in rats given the β -adrenergic blocker propranolol (PROP; intravenously or intracerebroventricularly injected), nor in SCT, NA or PROP-HX rats. As revealed by ductal resistance measurements as an indicator of ductal tone, suckling-induced inhibition of ME was due to ductal constriction within the mammary glands. These effects of suckling, however, could be prevented by prior activation of ductal mechanoreceptors. Together, these results indicate that suckling inhibits ME through the reflex activation of neurally mediated central β -adrenergic mechanisms, and that these effects, in turn, can be regulated by ductal mechanoreceptor activation. © 2001 Elsevier Science Inc. All rights reserved.

Keywords: Mammary gland; Sympathetic innervation; Lactation; Milk yield

1. Introduction

Neuroendocrine regulation of milk yield (ME) in rats and other species involves activation by suckling of antagonistic mechanisms, which interact at different levels. Thus, the suckling-evoked release of CAs [2,3,6,10,16] may inhibit the release of oxytocin (OT) [29]. In turn, circulating CAs may counteract the milk ejecting action of OT by ductal constriction within the mammary glands [11,13] and through competitive antagonism with OT at the myoepithelial cells [4,5,30]. Milk is not immediately obtained during the first minutes of suckling [9,15,17]. This may result from a dominance of the sympathetic system [6,21]. However, as the sympathetic activity subsides due to activation of ductal mechanoreceptors [6,18,21], OT

becomes more effective and the litter can then obtain much larger amounts of milk.

In addition to adrenal CAs, the sympathetic inhibition of ME can be exerted through the innervation of the mammary gland. A reduction in the rate of milk removal is associated with increased sympathetic activity, whereas either surgical or pharmacological sympathectomy results in a faster rate of milk flow [11,21,24]. Moreover, as shown recently, neural regulation of the mammary gland involves α - and β -adrenergic mechanisms capable of facilitating or inhibiting ME through the direct innervation of the mammary gland [24]. These central mechanisms may participate in the overall regulation of ME, but the role of suckling on its activation remains unclear.

The aim of the present study was threefold: (1) to determine whether suckling inhibits ME induced by OT in urethane-anesthetized lactating rats, (2) to what extent such action may result from adrenal CAs [6] and/or through the sympathetic innervation of the mammary glands [24] and

* Corresponding author. Tel.: +52-42-34-04-81; fax: +52-42-34-03-44.
E-mail address: fmena@servidor.unam.mx (F. Mena).

(3) whether the inhibitory effect of suckling on ME could be blocked by prior activation of ductal mechanoreceptors [21].

2. Materials and methods

Primiparous rats of the Wistar strain were housed in individual cages in a room maintained at 23–25°C and with 14 h of light and 10 h of darkness (lights on 07:00–21:00 h). Animals were given Purina Lab Chow and water ad libitum. The litters were adjusted to 8–10 young on postpartum days 2–4. One week before the experiments, some animals were implanted with a 21-gauge stainless steel guide cannula with inner stylet into each lateral ventricle (intracerebroventricularly). For surgery, animals were anesthetized with ether. The stereotaxic coordinates [27] used were relative to interaural line: A–P: +5 mm, L: –2.5 mm, D–V: +4.5 mm. All protocols were approved by the Institutional Animal Care at the Center for Neurobiology, UNAM.

2.1. Experiment 1: Effect of suckling stimulation upon ME in anesthetized rats

On days 8–14 postpartum, the mothers were separated from their pups for 6 h and then anesthetized with urethane (ethyl carbamate; Cedrosa, México City, México) administered intraperitoneally at a dose of 115–130 mg/100 g bw and placed on their backs on a slide warmer maintained at 32–35°C. A polyethylene cannula was inserted to the jugular vein and a plastic cannula was placed in the trachea.

The bladders of the pups were manually emptied and then they were placed in contact with the ventral surface of the mother and allowed 10–15 min to become attached to the nipples and to initiate suckling. Once suckling had been clearly established, intrajugular injections of 0.8 mU of OT in a 50- μ l saline were given to the mother every 2-min during four periods of 10 min. ME was determined by weighing the litter to the nearest 0.1 g at the end of each of four consecutive periods of suckling. Test solutions (i.e., see ahead: Experiment 3) were administered 5 min before the first 10-min period of suckling and their effects assessed upon ME. At the end of the experiments, the mothers were autopsied and the location of the intracerebroventricular (ICV) cannulae was confirmed. Any animal with misplaced cannulae was excluded from the study.

2.1.1. Determination of ductal resistance

To determine whether effects of suckling upon OT-induced ME are mediated through increased mammary ductal resistance, the method employed was that of Grosvenor and Findlay [13]. To this end, each lactating rat employed was anesthetized, placed in a supine position and one of the anterior pair of abdominal mammary glands was cannulated with a stainless steel cannula, which was connected by wide-bore polyethylene tubing to a Statham

P23 Db pressure transducer. The transducer output was recorded on a Grass polygraph and was calibrated using a mercury manometer. The transducer was filled with 0.9% saline and the rest of the system with citrated cow's milk. A "T" junction was placed between the transducer and the mammary gland to allow the addition of milk to the system from a pipette. The latter was connected to a pressure reservoir, which was maintained at a constant pressure of 90 mm Hg, so that the fluid entered the mammary gland at this pressure. The volume of milk flowing into the mammary gland was regulated by means of a stopcock placed between the pipette and the T-junction.

Increments of 0.1 ml were introduced until the intramammary pressure, which rose in response to the preceding increment, had fallen and stabilized. The time in seconds required for each increment to enter the mammary gland ("entry time for the gland") could be measured from the pressure record of the transducer. This displayed a value of 90 mm Hg for as long as the stopcock was open ("the entry time") and fell sharply when the stopcock was closed after addition of 0.1-ml fluid. The entry time so measured was compared with the time required for the same volume of fluid to flow out the cannula when not in the mammary gland ("flow time for the system"). The rate of entry of the milk was then expressed as follows: (flow time for system/entry time for gland) \times 100, i.e., ductal resistance index. Calculation of resistance of the gland was not done because of the lack of a constant-pressure differential between the pressure reservoir and the mammary gland as the gland filled and because of the difficulty at present in evaluating the dynamic resistance components of the mammary gland.

In the present experiments, these recordings were made before, during and after the experimental manipulations, i.e., 15 min suckling, which was applied by the pups in all the remaining glands, or drug injections being investigated, in which case they were administered 5 min before introducing milk into the mammary gland.

2.2. Experiment 2: Effect of local anesthesia of the nipple area (NA), adrenalectomy, hypophysectomy or spinal cord transection

Because one objective of these experiments was to determine the effect of suckling upon ME, afferent stimulation from the mammary glands was blocked. To this end, a local anesthetic, i.e., xilocaine 2% (Astra Chemicals, México, México), was injected intradermally around the nipples (120 μ l each nipple) of the lactating rats, immediately before suckling. Control rats for this experiment were injected in the skin of the legs with the same amount of anesthetic as the experimental rats.

The effect of suckling on ME and on ductal resistance was tested in bilaterally adrenalectomized (ADX) and on ME in spinal cord transected rats. Hypophysectomy was performed through the parapharyngeal approach. Adrena-

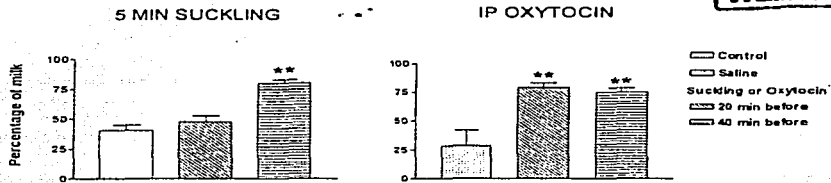


Fig. 1. Effect of applying 5 min suckling (left panel), or 60 mU ip OT or saline (right panel), 20 or 40 min before 15 min suckling, to lactating rats upon milk yield. Values represent percent of total milk in mammary glands ($n = 6-8$ rats per group). Statistical significance was evaluated by one-way ANOVA performed to original data. Asterisks denote that P values were significantly less, i.e., $P < .01$, than control or suckling 20 min before (left panel) or than saline-injected control (right panel).

lectomy was accomplished through a dorsal incision and the adrenals were ligated. Spinal cord transection was performed by removing the laminae using a dental drill and then removing the thin pieces of bone with small forceps. The meninges over the exposed cord were dissected and the spinal cord was sectioned at the T3-T4 level. The skin was then sutured and covered with gauze soaked in mineral oil. Following surgery, the rats were allowed at least 2 h for recovery prior to the experimental manipulation. At the end of the experiment, the completeness of each procedure was confirmed by examination with a dissecting microscope. Any animal showing incomplete adrenal ligation or incomplete spinal cord transection was excluded from the study. Control rats for these experiments were those in which either both adrenals, the pituitary gland or the spinal cord were exposed without removing the glands or sectioning the cord. Except for this, control rats were treated the same as the experimental rats.

2.3. Experiment 3: Effect of centrally administering adrenergic agonists and antagonists upon ME and ductal resistance

Several groups of anesthetized rats were employed to determine the effect of the respective β -adrenergic agonist and antagonist, isoproterenol (5 μ g) and propranolol (5 μ g) (ISOP and PROP), upon the effect of suckling on ME and on ductal tone. The procedure and doses for ICV injections were taken from a previous study [24]. In brief, a 30-gauge inner cannula was connected to a 25- μ l syringe by a 0.011-in. (ID:) polyethylene tube. Distilled water was then drawn up the tube until 1 μ l of water could reliably be drawn and expelled. Following this, 0.5 μ l of air was drawn up into the inner cannula, whereupon the inner cannula was placed into the test solution and 1 μ l was drawn. During injections, movement of the air bubble ensured that the test solution had actually been injected into the brain.

ISOP and PROP were dissolved in acidified saline solution (900 μ l saline + 10 μ l HCl 0.1 N) and solutions

were adjusted with NaOH 0.1 N to pH 7.4. All solutions employed were prepared fresh on the day of the experiment, stored in dark plastic tubes and kept cold (4°C) before and during the experiments.

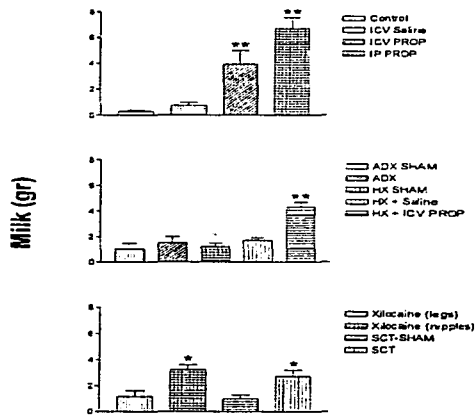


Fig. 2. Effect of applying four 10-min periods of suckling to urethane anesthetized rats upon milk yield induced by intravenous doses of OT (0.8 mU every 2 min during 10-min periods). Upper panel: effect of ICV (5 μ g) and intraperitoneal PROP (10 μ g). Groups (five to six rats each) included control intact and intracerebroventricular-saline injected rats. Middle panel: effect of ADX, HX and HX plus ICV-PROP. Controls included ADX sham, HX sham and HX + saline. Lower panel: effect of injections of 100 μ l of xilocaine in the skin around the nipples; and of spinal-cord transection (T2-T3 level). Controls included xilocaine injections in the legs and SCT sham. After surgery, at least 2 h were allowed for recovery. Statistical significance was evaluated by one-way ANOVA. Asterisks denote that P values were significantly less, i.e., $P < .01$ or $P < .001$ (double asterisks) than corresponding controls.

Injections of test solutions or saline in control rats were applied in all instances 5 min before the experimental manipulation.

2.4. Experiment 4: Stimulation of ductal mechanoreceptors in conscious rats

Experiments were made to determine whether the inhibitory effect of suckling upon ME in anesthetized rats, could be counteracted by prior activation of ductal mechanoreceptors. We had observed in anesthetized rats that the inhibiting effects of ICV-isoproterenol upon the OT-induced intramammary pressure responses, could be blocked by prior administration of intraductal milk into a thoracic gland [24]. A procedure that was previously shown to block catecholamines (CAs) release by mammary nerve stimulation through activation of ductal mechanoreceptors and that, once CA blockage had been accomplished, such inhibiting effect lasted for several

hours [6]. Therefore, in an attempt to mimic ductal mechanoreceptor activation in conscious rats, and considering the long duration of such activation, either a short period (5 min) of suckling by the litter or 60 mU ip of OT were given to the rats 20 or 40 min before determination of ME (see below). After the pretreatment, animals were anesthetized and the effect of suckling upon ME and ductal tone was determined.

As shown previously [9,15], both procedures counteract the initial depression of ME that normally occurs during a 30-40 min suckling period [9,15,17]. The pups do not obtain any milk during the 5-min suckling period [9,15] even though OT is released from the pituitary gland [12,22]. Thus, OT either exogenously injected or endogenously released by suckling, would presumably mobilize the milk within the mammary ductal system and thereby activate ductal mechanoreceptors. In these experiments, control rats for the pretreatment of the 5-min suckling experiment or for OT injection were, respect-

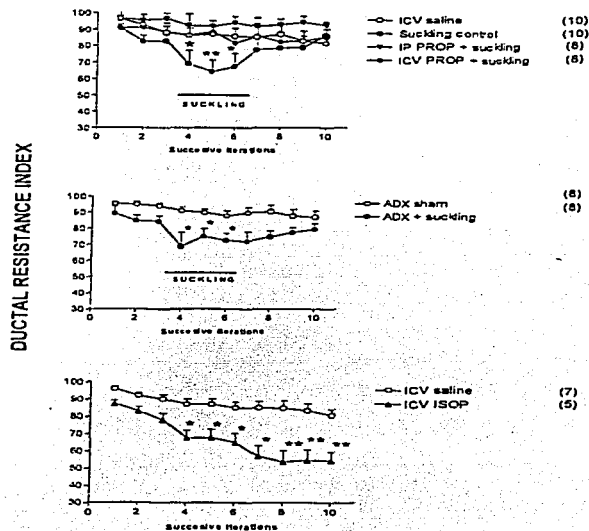


Fig. 3. Graph showing the rate of entry of successive increments of 0.1 ml of fluid into intact (upper panel) or ADX (middle panel) anesthetized lactating rat mammary glands, before and after a 15-min period of suckling and/or ICV administration of ISOP (5 μ g) (lower panel). Ductal resistance index refers to resistance of the mammary gland to milk flow. This was calculated by dividing the flow time for the system between the entry time for the gland and multiplying this value per 100 (see Section 2 for further details). Each point represents mean \pm S.E.M. Numbers within brackets represent the number of glands tested. Statistical significance was evaluated by two-way ANOVA. In upper panel, suckling control values were significantly less, i.e., * $P < .05$, ** $P < .01$ than all other groups; in middle and lower panels, suckling in ADX rats and ICV ISOP values were significantly less than unsuckled ADX sham and than ICV saline, respectively.

ively, handled for a few minutes or injected intraperitoneally with saline 40 min before anesthesia and determination of ME and ductal resistance. Further, to determine whether or not the above procedures would effectively increase MEs during suckling, a pilot experiment was first conducted employing conscious rats in which ME was determined after 15 min of suckling and following a 6-h period of isolation. Following this, the rest of the milk remaining in the mammary glands was determined by applying a second 15-min period of suckling, in which the mother was injected with exogenous OT (300 mU sc). This was done to exclude the possibility that changes occurring in the rate of ME as a result of the experimental manipulations, were due to low amounts of milk existing within the mammary glands. ME in these experiments was expressed as percentage of the total ME.

As shown in Fig. 1, compared to control rats, increased MEs were seen when ductal mechanoreceptors were stimulated by 5 min suckling, 40 but not 20 min before suckling; whereas higher yields were observed when stimulation by OT was made at either 20 or 40 min before suckling. Therefore, each procedure was applied to the rats

while conscious, 40 min before they were anesthetized, and the effect of suckling upon ME and ductal resistance was determined.

2.5. Statistical analysis

Statistical comparisons were made by using a one- or two-way ANOVA followed by Tukey-Kramer multiple comparisons test.

3. Results

3.1. Effect of suckling on ME

OT-induced MEs were low after 40 min of suckling by the pups in both intact, control and saline ICV-injected rats. Similar values were observed in ADX, HX and in control rats injected with the local anesthetic xilocaine into the skin of the legs (Fig. 2). These effects, however, were counteracted either by local anesthesia of the NA, by spinal-cord transection or by systemic or central administration of the β -adrenergic blocker propranolol (PROP).

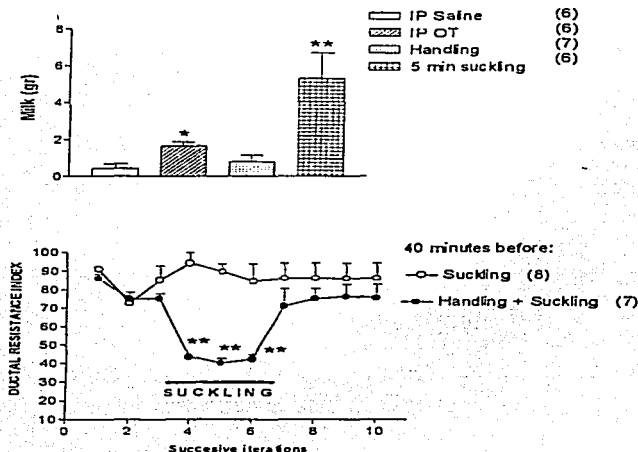


Fig. 4. Upper panel: effect of applying for 5 min, either suckling or handling, or 60 mU ip OT, or saline to rats while conscious, 40 min before anesthesia, upon milk yield induced by intravenous doses of OT, after four 10-min periods of suckling. Numbers within brackets indicate number of rats per group. Lower panel: effect of 5 min suckling or handling, 40 min before anesthesia upon the rate of entry (ductal resistance index) of successive increments of fluid into mammary glands, before, during and after a 15-min period of suckling. Values in upper panel represent means \pm S.E.M. and in lower panel each point represents mean \pm S.E.M. Numbers within brackets represent the number of glands tested. Statistical significance was evaluated by two-way ANOVA. * $P < .05$, ** $P < .01$. In upper panel, intraperitoneal OT and 5-min suckling values were significantly different than intraperitoneal saline and than handling, respectively.

3.2. Effect of suckling on ductal resistance

To analyze the mechanisms, by which suckling stimulation inhibits ME, the resistance to fluid into an abdominal mammary gland of anesthetized rats was determined before, during, and after suckling in intact and ADX rats. Also, the involvement of central β -adrenergic mechanisms was investigated by either applying suckling to PROP-treated rats, and by comparing the effects of this stimulation upon ductal resistance with that provoked by ICV administration of the β -agonist isoproterenol (ISOP). Albeit indirect, the method employed is adequate to determine changes in ductal tone within the mammary gland of rats, in response to manipulation of the sympathetic innervation of the mammary glands [13]. As shown in Figs. 3 and 4, the resistance of the mammary glands to milk flow was significantly increased during suckling in intact rats. This effect of suckling was of rapid onset, lasted only during the period of stimulation, was not counteracted by bilateral adrenalectomy and did not occur in PROP-treated rats. Also, even with a much longer duration, a similar effect of suckling was provoked by ICV administration of the β -adrenergic agonist ISOP (Fig. 3).

3.3. Effect of activating ductal mechanoreceptors upon suckling effects on ME and ductal resistance

Each of the procedures employed in conscious rats for activating ductal mechanoreceptors, i.e., a 5-min period of suckling by her litter or an ip injection of 60 mU OT (see Section 2, Fig. 1), were applied to the mothers while conscious and then, 40 min later they were anesthetized and the effect of suckling upon ME and ductal resistance was determined. As compared to control rats which were either handled for 5 min or injected ip with saline 40 min before, either suckling or OT injection applied 40 min before, effectively counteracted both the suckling-induced inhibition of ME, and the effect of this stimulation upon ductal resistance (Fig. 4).

4. Discussion

The results of this study indicate that suckling stimulation by the litter inhibits ME induced by exogenous OT in anesthetized lactating rats. This inhibition was unaffected by ADX or HX, yet was blocked in rats in which afferent stimuli from the nipples had been removed by local anesthesia or in spinal cord transected animals. This finding suggests that the inhibitory effect of suckling is mediated mainly through the direct innervation of the mammary glands. In addition, ductal constriction within the mammary glands occurred during suckling in intact and in ADX rats. These effects were either mimicked by intracerebroventricular administration of the β -adrenergic agonist ISOP or blocked by prior administration to the rats of the β -adren-

ergic blocker PROP. This finding strongly suggests that the inhibition of ME resulted mainly from the reflex activation by suckling of β -adrenergic mechanisms regulating ductal tone within the mammary glands. Also, these results are consistent with previous work showing that autonomic efferents influence the motor apparatus of the mammary gland to regulate ME through the direct innervation of the organ [8,13,14,19,20,21,24,28].

As shown previously, β -adrenergic mechanisms may inhibit ME in conscious [23,26] and anesthetized rats [7,24,25]. The mechanisms involved in these effects included both, an inhibition of OT release through circulating CAs [29] and a neurally mediated ductal constriction in the mammary glands [13,24]. Although adrenal CAs apparently participate less than mammary efferents in the suckling-induced decreased MEs, it is possible that sympathetic innervation and humoral CAs upon ME play complementary roles. Hence, perhaps the main influence of CAs release from the adrenals by suckling [6] is to inhibit OT release from the neural lobe of the pituitary gland [29]. In parallel, the same stimulus may activate β -adrenergic mechanisms regulating ductal tone through the direct innervation of the mammary glands. Thus, by these mechanisms, the arousal of the sympathetic system during the first minutes of suckling in the lactating rat may inhibit ME by acting both at the posterior lobe of the pituitary and, by activating preganglionic neurons at the intermediolateral region of the spinal cord, and the subsequent arousal of sympathetic post ganglionic fibers reaching the mammary gland ductal system. In this regard, recent evidence showed that segmental sympathetically regulated mammary gland enzymatic activity may be induced by suckling [1] and also, suckling-induced *c-fos* expression of spinal cord preganglionic neurons [unpublished observation].

The reduced MEs, i.e., about 40% of total milk in the present study (Fig. 1), which are normally observed after 15 min of suckling in conscious rats, as well as depressed yields (and ductal constriction) resulting from suckling in anesthetized rats (Fig. 4), were counteracted in the present experiments by prior activation of ductal mechanoreceptors. Thus, increased MEs resulted in conscious rats after 15 min of suckling when 40 min before, either 5-min suckling or OT (60 mU ip) were given to the rats. Also, presumably due to the long duration of the inhibition of CAs release by ductal mechanoreceptor activation, when preceded by each of these procedures, significantly less or no inhibition of ME (and ductal constriction) occurred after suckling in anesthetized rats. Interestingly, the finding that increased yields occurred when 5-min-suckling, but not when OT was injected to conscious rats 40 but not 20 min before suckling, suggests that a carry-over effect of suckling, and thus of endogenous OT was not involved in these effects. These results confirm and extend previous observations [6,9,15,18,21,24] on the effect of ductal mechanoreceptor activation upon ME.

Previous work has shown that activation of ductal mechanoreceptors plays a pivotal role on ME. This entails by blocking the mammary-induced release of CAs [6,21], facilitating the release of OT [18], and by preventing the neurally mediated β -adrenergic inhibition of ME [24]. Therefore, according to the results shown here, a physiological balance appears to exist between the suckling-induced ductal constriction and the regulation of this effect by activation of ductal mechanoreceptors. It appears that such a balance is established prior to the milk-ejecting action of OT upon the mammary glands. Thus, as shown previously, the sympathetically mediated suckling-induced rapid activation of D-1 deiodinase, which is responsible for transforming T4 to T3 in the mammary glands, is also regulated by ductal mechanoreceptor activation [1]. On the other hand, the existence of this regulatory mechanism may also have important survival value for the species, insofar that by counteracting sympathetic arousal, induced by suckling or in stressful situations, its activation would allow milk removal during suckling by the offspring.

Acknowledgments

Authors gratefully acknowledge Dr. Rae Silver for the critical reading of the manuscript and MC Nilda Navarro for excellent technical assistance.

References

[1] Aceves C, Rojas-Huidoro R, Marina N, Morales MT, Mena F. Mammary gland sympathetic innervation is a major component in type 1 deiodinase regulation. *Endocrine* 1999;11:115-21.

[2] Barowicz T. Changes of blood catecholamine levels in the sheep during machine milking. *J Dairy Res* 1979;46:555-7.

[3] Barowicz T. Inhibitory effect of adrenaline on oxytocin in the ewe during the milk-ejection reflex. *J Dairy Res* 1979b;46:41-6.

[4] Bisset GW, Clarke BJ, Lewis GP. The mechanism of the inhibitory action of adrenaline on the mammary gland. *Br J Pharmacol* 1967;31:550-9.

[5] Chan WY. Mechanisms of epinephrine inhibition of the milk ejecting response to oxytocin. *J Pharmacol Exp Ther* 1965;147:48-53.

[6] Clapp C, Martínez-Escalera G, Morales MT, Shyr SW, Grosvenor CE, Mena F. Release of catecholamines follows suckling or electrical stimulation of mammary nerve in lactating rats. *Endocrinology* 1985;117:2498-504.

[7] Clarke G, Lincoln DW, Van der Schoot P. Neuropharmacological studies on the central inhibition of oxytocin release. *Br J Pharmacol* 1978;62:424.

[8] Cross BA. The hypothalamus and the mechanism of sympathetic-adrenal inhibition of milk ejection. *J Endocrinol* 1955;12:15-28.

[9] Deis RP. The effect of an exteroceptive stimulus on milk ejection in lactating rats. *J Physiol (Lond)* 1968;197:37-46.

[10] Ewy Z, Barowicz T. Interaction of neurohypophysial and adrenal catecholamines and oxytocin hormones in the ewe during the milk ejection reflex. *Adv Physiol Sci* 1981;20:209.

[11] Findlay ALR, Grosvenor CE. The role of mammary gland innervation in the control of the motor apparatus of the mammary gland: a review. *Dairy Sci Abstr* 1969;31:109-16.

[12] Goodman GT, Grosvenor CE. Neuroendocrine control of the milk ejection reflex. *J Dairy Sci* 1983;66:2226-35.

[13] Grosvenor CE, Findlay ALR. Effect of denervation on fluid flow into the mammary gland. *Am J Physiol* 1968;214:820-4.

[14] Grosvenor CE, DeNuccio DJ, King SF, Maiweg H, Mena F. Central and peripheral neural influences on the oxytocin-induced pressure response of the mammary gland of the anesthetized lactating rat. *J Endocrinol* 1972;55:299-309.

[15] Grosvenor CE, Mena F. Regulating mechanisms for oxytocin and prolactin secretion during lactation. In: Muller EE, MacLeod RM, editors. *Neuroendocrine perspectives*, vol.1. New York: Elsevier, 1982: 69-110.

[16] Kuanyshbekova GA. Reflex discharge of catecholamines during milk ejection inhibition in goats. *Akad Nauk SSR (Biol)* 1976;14:62-5.

[17] Lincoln DW, Hill A, Wakerly JB. The milk ejection reflex: an intermittent function not abolished by surgical levels of anesthesia. *J Endocrinol* 1973;57:459-76.

[18] Lincoln DW, Wakerly JB. Factors governing the periodic activation of supraoptic and paraventricular neurosecretory cells during suckling in the rat. *J Physiol (Lond)* 1975;250:443-61.

[19] Linzell JL. Vasomotor nerve fibres to the mammary glands of the cat and dog. *Q J Exp Physiol* 1950;34:295-319.

[20] Linzell JL. Some observations on the contractile tissue of the mammary glands. *J Physiol (Lond)* 1955;130:257-67.

[21] Mena F, Pacheco P, Aguayo D, Martínez G, Grosvenor CE. Reflex regulation of autonomic influences upon the oxytocin-induced contractile response of the mammary gland in the anesthetized rat. *Endocrinology* 1979;104:751-6.

[22] Mena F, Clapp C, Martínez-Escalera G, Pacheco P, Grosvenor CE. Integrative regulation of milk ejection. In: Amico JA, Robinson AG, editors. *Oxytocin: clinical and laboratory studies*. Amsterdam: Elsevier, 1985. pp. 179-99.

[23] Mena F, Clapp C, Aguayo D, Morales MT, Martínez de la Escalera G. Stimulatory and inhibitory effects of suckling on lactation. *Endocr Regul* 1992;25:25-35.

[24] Mena F, Aguayo D, Pacheco P, Morales MT. Central effects of catecholamines upon mammary contractility in rat are neurally mediated. *Neuroendocrinology* 1995;61:722-30.

[25] Moos F, Richard Ph. Rôle de la noradrénaline et de l'acétylcholine dans la libération d'oxytocine induite par des stimulations vaginale, vagale et mammaire. *J Physiol (Paris)* 1975;70:315-32.

[26] Moos F, Richard Ph. The inhibitory role of beta-adrenergic receptors in oxytocin release during suckling. *Brain Res* 1979;169:593-9.

[27] Paxinos G, Watson CH. The rat brain in stereotaxic coordinates. New York: Academic Press, 1982.

[28] Peeters G, Coussens R, Siens G. Physiology of the nerves in the bovine mammary gland. *Arch Int Pharmacodyn Théor* 1949;79:75-82.

[29] Song SL, Crowley WR, Grosvenor CE. Evidence for the involvement of an adrenal catecholamine in the beta-adrenergic inhibition of oxytocin release in lactating rats. *Brain Res* 1988;457:303-9.

[30] Vorherr H. Catecholamine antagonism to oxytocin-induced milk ejection. *Acta Endocrinol Suppl* 1971;154:5-38.

Research report

Suckling-induced activation of neural c-fos expression at lower thoracic rat spinal cord segments

Nephtali Marina, Teresa Morales, Néstor Díaz, Flavio Mena*

Department of Cellular and Molecular Neurobiology, Institute of Neurobiology, National University of Mexico, Campus UNAM, Juriquilla, Queretaro, 76001, Mexico

Accepted 26 July 2002

Abstract

Suckling stimulation is essential for neuroendocrine and sympathetic reflex activation during lactation. In the present study, the induction of c-fos gene expression was used to identify neuronal populations in the spinal cord activated by acute 5 min suckling or by electrical stimulation of the central stump of the first abdominal mammary nerve in lactating rats previously separated from their litters for 6 or 18 h. In addition, to investigate whether spinal sympathetic preganglionic neurons are activated by suckling, dual immunostaining (Fos and choline acetyltransferase) was performed. Fos was expressed at low levels in continuously suckled and 6 h nonsuckled mothers, but no expression was found after 18 h of nonsuckling. On the other hand, in 6 h nonsuckled rats, significant increments in Fos expression occurred in several regions after acute suckling and after electrical stimulation. Also, the pattern of Fos expression in each spinal laminae was different for the two stimuli, i.e. more intense effects of suckling in deep laminae V–X and more intense effects in laminae I–IV with electrical stimulation. Double-labeling after suckling was found only in sympathetic preganglionic neurons from the intermedio-medial cell column, whereas after electrical stimulation, double label was observed only in neurons from the intermedio-lateral cell column. On the other hand, no effect upon Fos protein expression was observed after suckling and only a minor effect after electrical stimulation of mammary nerve in 18 h nonsuckled rats. These results are consistent with previous findings on the sympathetic reflex regulation of the mammary gland, as well as on the importance of the nonsuckling interval for optimal functioning of lactation.

© 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Lactation; Fos; Suckling; Spinal cord; Sympathetic

1. Introduction

Neuroendocrine regulation of lactation results from afferent information provided by the litter through the suckling stimulus, central processing of this information, and neuroendocrine responses. In addition to releasing oxytocin (OT) and other pituitary hormones, accumulated evidence has shown that suckling may also activate the sympathetic nervous system (SNS) and that this, in turn, may antagonize the action of oxytocin at the level of the mammary gland and regulate milk removal. Thus, in addition to the central sympathetically-mediated regulation of ductal tone of the mammary glands [24,36], we and others have shown that suckling in rats and other species reflexly activates both the systemic release of adrenal

catecholamines (CAs) [5,13,64] and the sympathetic innervation of the mammary glands [24,36,70]. Based upon these results it was proposed that milk ejection is prevented during the first min of suckling due to neurally mediated constriction of the mammary ductal system [64,66,70,74] and to inhibition of OT release by circulating CAs acting at the neural lobe of the pituitary gland [4,14,15]. We also reported that following the first minutes of suckling, activation of ductal mechanoreceptors reflexly inhibits sympathetic activation [13,64,74]. OT release is restored [15], and thus, milk ejection is more effectively stimulated, ultimately resulting in much higher amounts of milk for the litter.

Previously, using diverse techniques, many studies have sought to identify the somato-sensory pathways controlling the milk ejection reflex [17,20,22,26,49,58,78,81,90]. However, even though the existence of segmental inhibitory mechanisms that may regulate afferent information from the mammary glands for oxytocin release has been

*Corresponding author. Tel.: +52-55-5623-4070; fax: +52-55-5623-4005.

E-mail address: fmena@servidor.unam.mx (F. Mena).

suggested [78,96], most of these studies were designed to define the neuroendocrine mechanisms controlling oxytocin release; the influence of the sympathetic system on milk ejection has been considered of little physiological importance [52]. Among the few previous anatomical studies are those of Haller [42] showing that afferent innervation from the mammary glands may establish contact synapses with spinal sympathetic regions, and more recently, the study made by Gerendai et al. [29] focused on the morphological localization of central nervous system (CNS) structures connected with preganglionic neurons of the sympathetic motor system innervating the mammary glands. At present, clear evidence exists showing that sympathetic influences regulate functioning of many endocrine organs, including the mammary gland [24,29,36,66] adrenal gland [9,45,53,87,88,92], pancreas [46,54,55], ovary [27], testis [28] and thyroid gland [47].

In the present study, as a follow-up of previous findings, we sought to identify the neuronal groups at the lower thoracic spinal cord level activated by either acute suckling in conscious rats, or by electrical stimulation of the cut central-end of a mammary nerve (ESMN) in anesthetized rats. For this purpose, the induction of Fos protein as an activation marker was used, as well as double immunostaining (Fos and choline acetyltransferase) to determine whether sympathetic spinal neurons are activated by either suckling or ESMN.

Additionally, we analyzed the effect that short or long intervals of nonsuckling may have upon suckling or ESMN-induced Fos activation. Previously [13], ESMN had been shown to cause similar neuroendocrine effects to those of suckling.

2. Material and methods

2.1. Animals

Primiparous rats of the Wistar strain were housed in individual cages in a room maintained at 23–25 °C with 14 h of light and 10 h of darkness (lights on 07:00–21:00 h). Animals were given Purina Lab Chow and water ad libitum. The litters were adjusted to 8–10 young on postpartum days 2–4. Care was taken to minimize the number of animals used and their suffering. All protocols were approved by the Institutional Animal Care at the Institute of Neurobiology.

2.2. Experimental design

All the experiments were made on postpartum days 7–14. Nine groups of rats, each composed of five animals, were used in this study. The first group of control rats were unseparated from their pups, i.e. the continuously suckled (CS) group. The next five groups were separated from their pups for 6 h, one of which had her pups replaced at

the end of the nonsuckling (NS) period and suckled (S) for 5 min. As control for this group, there was a group of NS rats that were killed without previous suckling, i.e. 6 h NS group. The next three groups of 6 h NS rats were used to determine the effect of applying a 5-min period of electrical stimulation to the cut central-end of the segmental nerve innervating the first abdominal abdominal mammary gland, i.e. mammary nerve. There were two control groups for this experiment: one group was anesthetized with urethane (ethyl carbamate, Sigma; 115–130 mg/100 g BW) and the rats composing this group were killed 1.5 h after the onset of anesthesia; the other group of sham-stimulated rats were treated similarly to the ESMN group, i.e. had the mammary nerve dissected and mounted in the stimulating electrode, but no current was applied, and these rats were killed 1 h after sham stimulation.

Finally, the last three groups of rats were separated from their pups for 18 h and consisted of a nonsuckled group, i.e. 18 h NS; a group suckled by their pups for 5 min, i.e. 18 h NS+S, and a group subjected to ESMN for 5 min, i.e. 18 h NS+ESMN.

The procedure for dissecting and electrically-stimulating the mammary nerve has been described previously [63]. Briefly, it was as follows: the segmental nerve of the first left abdominal mammary gland was dissected free near the point where it emerges from the vertebral column, cut at its peripheral end near the lateral border of the mammary parenchyma and placed upon bipolar silver hook electrodes coated with melted paraffin. The source of nerve stimulation was a Grass stimulator (model S 44 Grass instruments, Quincy, MA, USA) which was connected to an isolation unit (model SIU 5). In each experiment, the stimulation was composed of 1 ms biphasic pulses, 10/s at 20 V for 5 min. Pulses of 20 V were used because many studies have shown that C fibers and Aδ fibers both require high intensity of stimulation [42, 94], and they are among the most important fibers carrying afferent signals to the spinal cord during suckling. The effectiveness of the mammary nerve stimulation was determined in each rat by the increased respiration rate, which occurs during stimulation [63].

The mothers were perfused at the end of the nonsuckling period or 1 h after either suckling or ESMN. During the 6 h separation from their mothers, the pups were kept warm in a different room. However, the pups separated for 18 h were placed with foster mothers for the first 12 h of the period.

2.3. Tissue preparation

At the end of the experiments, the rats were deeply anesthetized with 20% urethane administered intraperitoneally and perfused via the ascending aorta with saline followed by 750 ml of 4% paraformaldehyde (pH 9.5, 10 °C). Their spinal cords were carefully removed and were then postfixed for 3 h and cryoprotected in 10%

sucrose in 0.1 M phosphate buffered saline (PBS) overnight at 4 °C. The spinal cord was notched at the level of the 10th thoracic segment, and a caudal 1 cm long piece was excised. Coronal sections (40 µm thick) throughout the T13 to L1 level of the cord were collected and stored in cryoprotectant (30% ethylene glycol and 20% glycerol in 0.05 M PBS) at -20 °C until sectioning. The 13th thoracic segment (T13) was selected because previous studies have shown that the first abdominal mammary nerve enters the spinal cord at this level [90, 94]. Furthermore, electrical stimulation of this mammary nerve has been shown to induce effects similar to those of suckling upon OT and prolactin (PRL) release, as well as on sympathetic activation [13, 63, 65].

In other experimental groups, similar manipulations were performed to study the sympathetic preganglionic cell columns of the spinal cord. For this, a portion of the spinal cord corresponding to T10–L5 segments was serially sectioned in the longitudinal plane. Twenty-five µm thick sections were collected and stored in cryoprotectant.

2.4. Localization of responsive immunoreactive neurons

The degree of Fos expression was visualized by using the conventional avidin–biotin–immunoperoxidase technique [85]. All series of tissue sections from all animals in the same experimental condition (20–30 spinal sections/animal) were processed together in the same assay to ensure uniformity of immunostaining. The primary antibody was a polyclonal antiserum raised in rabbits against a synthetic N-terminal fragment of human Fos protein (Santa Cruz Biotechnology). Free floating sections were first pretreated with hydrogen peroxide for 10 min to quench endogenous peroxidase activity, followed by two rinses in PBS, and then in 1.0% sodium borohydride to reduce free aldehydes. Sections were incubated with the primary antiserum at a dilution 1:5000 at 4 °C for 48 h. The primary antiserum was detected with the avidin–DH–biotinylated horseradish peroxidase–H complex (Vectastain Elite ABC kit, Vector Labs., Burlingame, CA, USA), and the diaminobenzidine reaction product was developed using a nickel-enhanced glucose oxidase method. Control experiments, in which the primary antiserum was omitted or preabsorbed overnight, showed no specific nuclear labeling in sections from either control or experimental animals.

2.5. Histochemical characterization of sympathetic preganglionic neurons

2.5.1. Dual immunoperoxidase staining

Dual labeling for Fos and choline acetyltransferase was performed by first localizing Fos immunoreactive cells (Fos-ir) using a standard nickel enhancement protocol (black reaction product), as described above. This was followed by incubation in rabbit anti-ChAT serum

(1:5000; Chemicon) and identification of ChAT-immunoreactive cells (ChAT-ir) without enhancement (brown). Specific staining with the primary antisera was abolished by preincubation (overnight at 4 °C) with 50 µM of the synthetic peptide. Cells displaying nuclear staining for Fos and cytoplasmic immunoreactivity labeling for ChAT were identified.

2.6. Cell counts and statistical analysis

The relative extent of Fos induction as a function of treatment status was assessed in all members of each group (CS, NS, S and ESMN) by an observer who was blind to the status of the animals. Five sections from T13–L1 determined by qualitative examination to contain the greatest number of labeled cells were selected from each rat. The number of labeled cells was counted and the average number of labeled cells was recorded. All cells exhibiting Fos-like immunoreactivity were counted as labeled regardless of label intensity. The spinal cord subdivisions used were those defined by others [41, 79] as follows: (a) the superficial dorsal horn (SDH; laminae I and II), (b) the nucleus proprius (NP; laminae III and IV), (c) the dorsal horn neck (DHN; laminae V and VI) and (d) the ventral horn [VH; laminae VII, VIII, IX, X, dorsal nucleus (D) intermedio medial (IMM) and intermedio lateral (IML) columns].

Significant differences between the suckled and the mammary nerve electrically stimulated groups after 6 or 18 h of nonsuckling vs. CS (control) or nonsuckled animals; were determined by one-way analysis of variance and Scheffe's multiple comparison test. A *P* value of less than 0.05 was considered to be statistically significant.

2.7. Figure preparation

Images of tissue sections were captured by a Pentium-III Hewlett-Packard computer with an Optronics digital analysis system using an Olympus microscope at 100× magnification. Digital images were minimally adjusted for brightness and contrast and appropriately cropped in Adobe PHOTOSHOP 6.0 using a PowerMac G4. Images were imported into ADOBE ILLUSTRATOR 8.0, where groups of images were assembled and labeled. Composite figures were printed on a Tektronix Phaser 750 printer.

3. Results

Fos induction was quantified in the different regions of the gray substance of the spinal cord as a function of treatment status and is summarized in Fig. 1. Fos-ir cells were observed bilaterally in most of the conditions studied. However, due to the fact that induction of Fos-ir cells occurred exclusively in the ipsilateral side in ESMN experiments, for purposes of comparison with the other

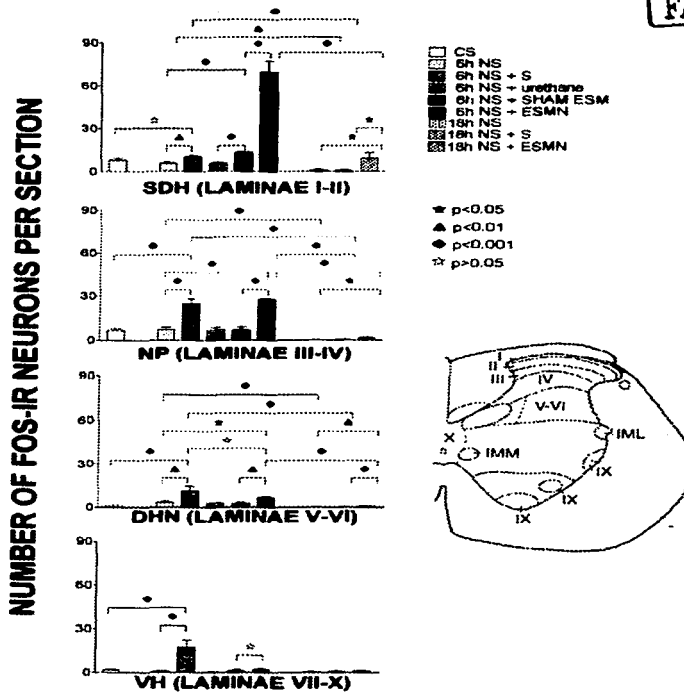


Fig. 1. Bar charts show the distribution of Fos-labeled cells in the left side of the 13th thoracic spinal segment. Positive cells were counted in four regions: the superficial dorsal horn (SDH), the nucleus propius (NP), the dorsal horn neck (DHN) and the ventral horn (VH). Each group was composed of five rats. CS, continuously suckled; 6 h NS, 6 h nonsuckled; 6 h NS+S, suckled 5 min after 6 h of nonsuckling; 6 h NS+urethane, urethane administration after 6 h of nonsuckling; 6 h NS+SHAM ESMN, sham electrical stimulation of the central stump of an abdominal mammary nerve for 5 min, after 6 h NS; 6 h NS+ESMN, electrical stimulation of the central stump of an abdominal mammary nerve for 5 min, after 6 h NS; 18 h NS, 18 h nonsuckled; 18 h NS+S, suckled 5 min after 18 h of nonsuckling; 18 h NS+ESMN, electrical stimulation of the central stump of an abdominal mammary nerve for 5 min, after 18 h NS. Inset: hemisection of the 13th thoracic spinal cord segment depicting these four regions. Levels of statistical significance between groups at each spinal region are shown at the side of the figure.

groups, positive neurons in all other groups were counted unilaterally.

3.1. Distribution of Fos-ir neurons in the spinal cord

A low number of Fos-ir cells was observed both in control, i.e. conscious mothers who remained with their

litters (CS), as well as in mothers separated from their pups for 6 h (NS). Even lower numbers of Fos-ir cells were found in 18 h NS rats. The anatomical localization of Fos-ir neurons in one of the sections at the 13th thoracic spinal cord segment of CS is shown in Fig. 2. Fos-ir neurons in these rats were localized mainly in the SDH (8 ± 1.4) and the NP (6.75 ± 1.43). However, significantly

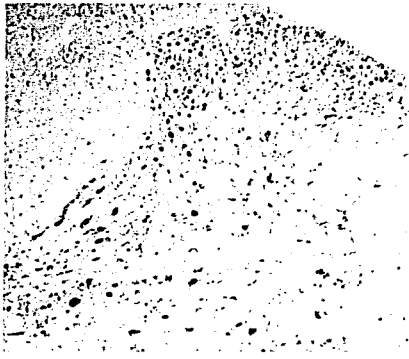


Fig. 2. Photomicrograph showing Fos-ir neurons on the left side of a coronal section in the 13th thoracic spinal segment in CS lactating rats. Fos expression in these rats is low, and it is bilaterally distributed mostly in the SDH and DHN (100 \times).

lower amounts ($P > 0.05$) of these neurons were seen in the DHN (1.33 \pm 0.28) and the VH (2 \pm 0.5).

The number and distribution of Fos-ir neurons in 6 h NS rats were not significantly different from those observed in CS rats, i.e. SDH (5.6 \pm 0.98); NP (7.33 \pm 1.36); DHN (3.33 \pm 0.98); VH (1 \pm 0.5) (Figs. 1 and 3A).

On the other hand, as compared to the CS and 6 h NS groups, when suckling was applied for 5 min to 6 h NS rats (Figs. 1 and 3B), a significant increase of Fos-ir cells occurred in the SDH (8.15 \pm 0.85), NP (24.5 \pm 3.6), DHN (11.25 \pm 3.4) and VH (17.5 \pm 4.9). Thus, Fos-ir neurons in each spinal region of suckled rats were increased 1.8, 3.3, 3.4 and 17.5 times more, i.e. 3.3 \times , etc., than Fos-ir neurons in the respective spinal regions of 6 h NS rats.

Control animals for the ESMN experiments were urethane-anesthetized without further treatment and ESMN-Sham animals. Spinal cords from these animals were processed as those of the other groups. The results obtained showed that the number and location of Fos-ir neurons in the anesthetized control group did not differ from those of conscious 6 h NS rats: SDH (5.36 \pm 0.72); NP (7.12 \pm 1.67), DHN (3.1 \pm 0.42) and VH (0.8 \pm 0.2). However, in the ESMN Sham group, a small collection of Fos-ir neurons was observed in the ipsilateral SDH (12.92 \pm 0.13), that was significantly higher than control 6 h NS Fos-ir cells, and that may have occurred in response to handling and dissection of the nerve. The values in the rest of the areas were not different from those of 6 h NS rats: NP (6.9 \pm 1.89), DHN (2.5 \pm 0.73) and VH (1.2 \pm 0.7).

In anesthetized, 6 h NS rats submitted to ESMN, a large number of Fos-ir neurons was found in the ipsilateral dorsal root entry zone in the SDH (69 \pm 8, i.e. 10 \times), and to a lesser extent in the NP (27.5 \pm 0.5, i.e. 3.7 \times) (Figs. 1 and 3C). In fact, similar values of Fos expression to those of rats suckled by their pups after 6 h NS were observed in NP after ESMN. A much lower but significant effect ($P < 0.01$, i.e. 1.9 \times) of ESMN was found in the ipsilateral DHN (6.5 \pm 0.5) but no significant differences were found in VH (2 \pm 0.6). No Fos-ir neurons were found on the contralateral side.

In sharp contrast to the experimental 6 h NS group, a decrease in Fos-ir neurons in all spinal regions analyzed was observed in the 18 h NS rats (Figs. 1 and 4A). Thus, Fos-ir cells were very scarce in this group and significantly fewer than in CS and 6 h NS rats (Fig. 1): SDH (0.8 \pm 0.6), NP (0.2 \pm 0.13), DHN (0.2 \pm 0.18) and VH (0.5 \pm 0.4). When suckling was applied to these animals, there was no induction of Fos-ir, (Fig. 4B) and the number of positive neurons remained very low, almost identical to 18 h NS rats: SDH (0.9 \pm 0.5), NP (0.4 \pm 0.2), DHN (0.3 \pm 0.27) and VH (1 \pm 0.6) (Fig. 1). Finally, although the number of Fos-ir cells in 18 h NS rats after ESMN was also low (Figs. 1 and 4C), it was significantly higher in SDH (9.3 \pm 3.7, i.e. 11.6 \times), NP (1.5 \pm 0.4, i.e. 7 \times) and DHN (1 \pm 0.2, i.e. 5 \times), but not in VH (1.3 \pm 0.4), than in corresponding sections of 18 h NS rats.

3.2. Identification of sympathetic preganglionic neurons

Longitudinal sections along the 13th thoracic spinal segment of the spinal cord were immunostained for choline acetyltransferase (ChAT-ir, brown cytoplasm) and Fos (dark nuclei) in 6 h NS, 6 h NS+S and 6 h NS+ESMN rats to determine which type of neuron (interneuron or sympathetic preganglionic neuron) was activated in response to suckling in the IMM or IML cell columns. ChAT immunostaining allowed a clear identification of IMM and IML cell columns, which were localized near the central canal or at the peripheral limits of the gray substance, respectively.

In the 6 h NS group, groups of ChAT-labeled neurons from the IMM and IML cell columns were observed whose nuclei were not Fos-ir (Figs. 5A and 6A). However, 6 h NS rats that received a 5 min suckling period by their pups showed bilateral clusters of three to five ChAT-ir neurons co-expressing Fos in the IMM (Fig. 5B), whereas cells from the IML were not Fos-ir (Fig. 6B).

Interestingly, in the group of 6 h NS rats that received ESMN for 5 min, clusters were observed of two to three ChAT-ir neurons co-expressing Fos in the IML ipsilateral to the side of stimulation (Fig. 6C). However, ChAT-ir cells from the IMM were not Fos-ir in these rats (Fig. 5C).

In addition, in the 6 h NS-S and 6 h NS-ESMN, a few Fos-ir neurons were detected around the central canal,

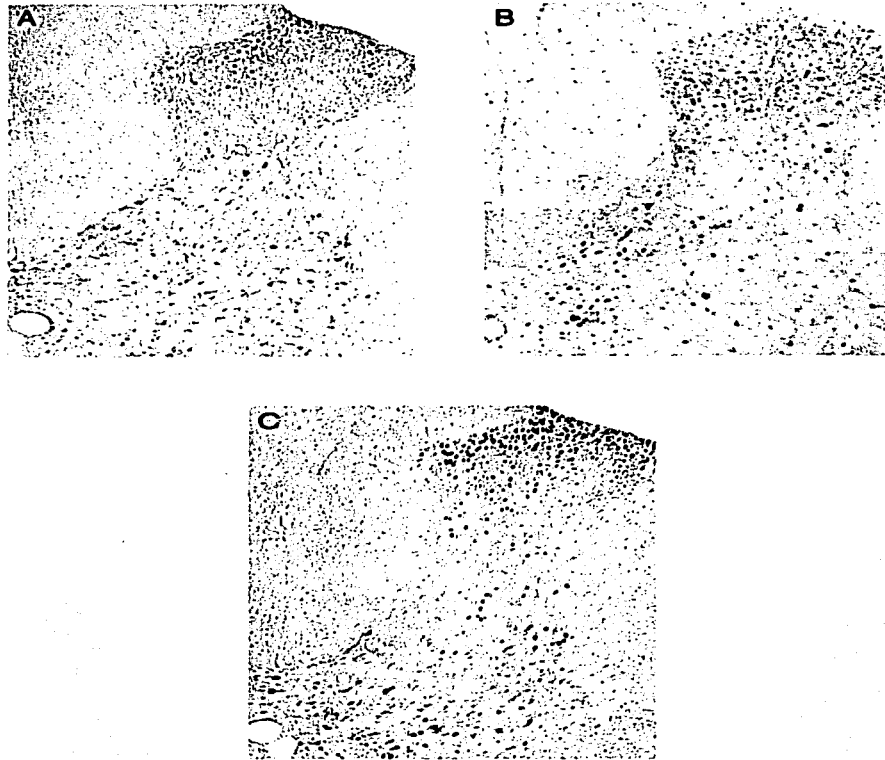


Fig. 3. Photomicrograph showing Fos expression on the left side of a cross section at the 13th thoracic spinal segment in lactating rats perfused after 6 h of non-suckling (A), or after receiving either 5 min suckling (B) or ESMN (C) after the non-suckling period. Fos expression in the 6 h NS group is low and it was localized mainly in the SDH and NP. Suckling provoked a significant increase in the number of Fos-ir neurons in both sides of the gray matter of the spinal cord. Regions showing suckling-related increments in Fos expression include the superficial dorsal horn (SDH), the nucleus propius (NP), the dorsal horn neck (DHN) and the ventral horn (VH). On the other hand, ESMN induced strong Fos expression in the SDH and NP regions, that was limited to the side of stimulation (100 \times).

which were ChAT negative. Fos-ir cells were not found in the ventral horn motoneurons.

4. Discussion

During lactation, homeostatic and behavioral adaptations in the lactating mother resulting from neural and neuroen-

doctrine changes are due in most part to stimuli that the mother receives during suckling. This stimulation activates specific rapidly-adapting receptors located in and around the nipple, i.e. touch, pressure, stretch, temperature [23,78] and exteroceptive stimuli from the offspring which are perceived by her special organ senses [59,60,101]. Such stimuli reflexly activate the release of adeno-[31,34,37,72,101], and neurohypophyseal [16] hormones

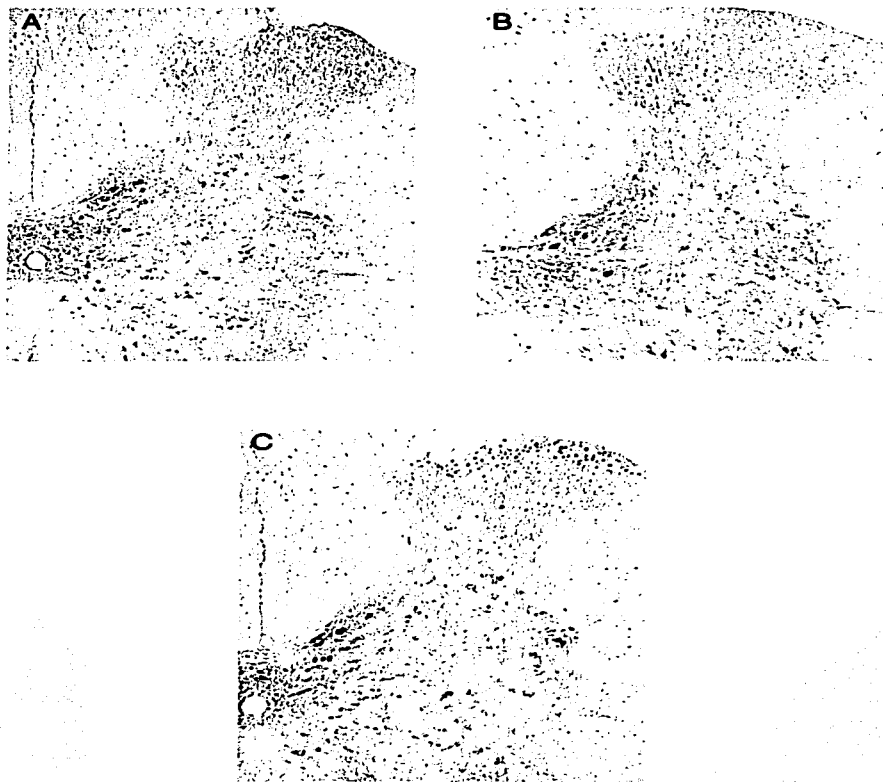


Fig. 4. Photomicrograph showing Fos expression on the left side of a coronal section at the 13th thoracic spinal segment of lactating rats perfused after 18 h nonsuckling (A), or after receiving either 5 min suckling (B) or ESMN (C) at the end of the nonsuckling period. Fos-ir neurons in the 18 h NS group are very scarce. Suckling had no significant effect on the number of Fos-ir neurons on either side of the gray matter of the spinal cord. However, some Fos expression, ipsilateral to the side of stimulation in the SDH and NP regions, was observed in the ESMN group (100 \times).

into the circulation. Catecholamines are also released, both in tonic [38,66] and suckling-activated phasic fashion [13,66] from the sympatho-adrenal and mammary gland sympathetic innervation, and in general the catecholamines antagonize the effects of the hormones on milk secretion and ejection [39,61,68,69].

As indicated in the Introduction, the main objective of the present study was to determine which neural structures at the spinal cord level are activated by suckling or ESMN

and may thus account for the influence of the sympathetic system in the reflex inhibition of milk ejection. The expression of the early gene product c-fos is a useful marker for acute neuronal activity since this gene is rapidly and transiently activated in response to a wide variety of stimuli, acting as a transcription factor that may influence the expression of other genes [76]. Thus, in order to determine which neural populations within the spinal cord may be activated by suckling or electrical stimulation of a

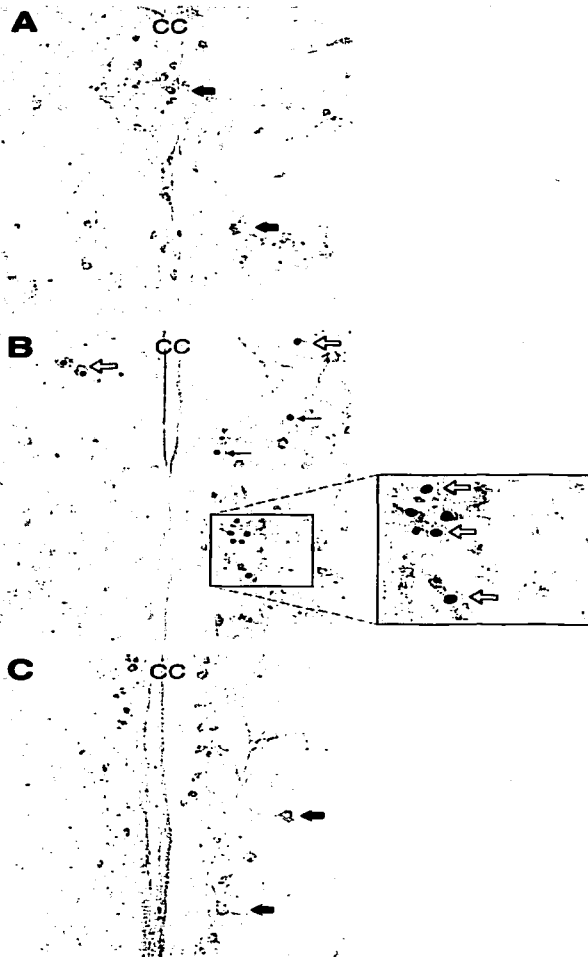


Fig. 5. Dual immunolocalization of Fos-ir (dark nuclei) and ChAT-ir (brown cytoplasm) neurons in the spinal IMM cell column in rats nonsuckled for 6 h (A), and in 6 h nonsuckled rats that received either 5 min suckling (B) or ESMN (C). Open arrows indicate co-localization of both antigens; thin arrows denote Fos-ir nuclei, and thick arrows ChAT-ir cells. No Fos was observed on ChAT-labeled neurons in 6 h NS and ESMN rats (200 \times). However, the rats that received 5 min suckling after 6 h NS showed bilateral clusters of 3–5 ChAT-ir neurons co-expressing Fos. The inset shows this image at higher amplification (400 \times). CC, central canal.

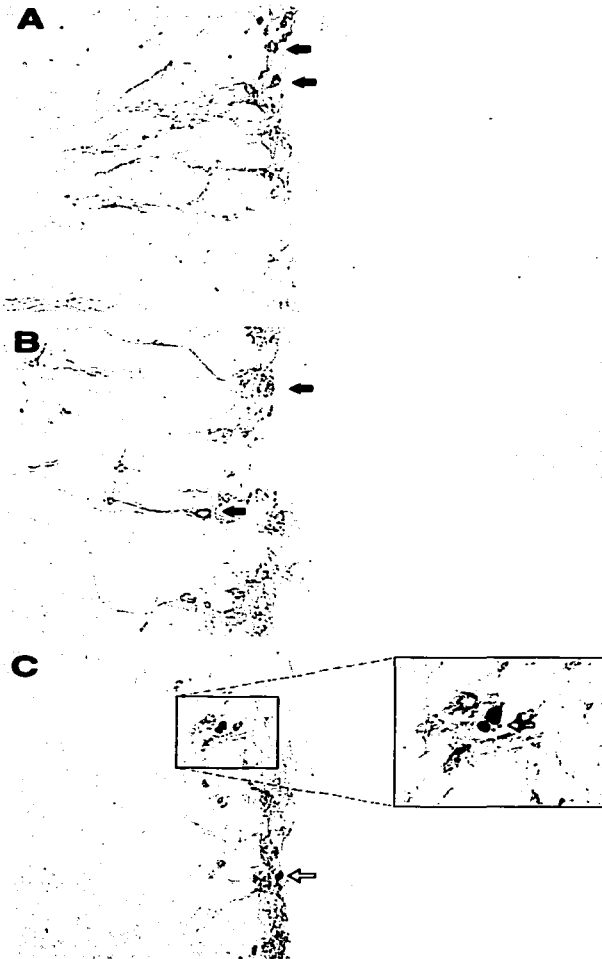


Fig. 6. Dual immunolocalization of Fos-ir (dark nuclei) and ChAT-ir (brown cytoplasm) neurons in the spinal IML cell column in rats nonsuckled for 6 h (A), and in 6 h nonsuckled rats that received either 5 min suckling (B) or ESMN (C). Open arrows indicate colocalization of both antigens and thick arrows ChAT-ir cells. No Fos was observed on ChAT-labeled neurons in 6 h NS and S rats (200 \times). However, the rats that received 5 min ESMN after 6 h NS showed ipsilateral clusters of 2–3 ChAT-ir neurons co-expressing Fos. The inset shows this image at higher amplification (400 \times). CC, central canal.

mammary nerve in lactating mothers, we followed the induction of Fos expression.

Our results showed that there were low levels of Fos expression in the dorsal horn, i.e. laminae I–IV, of the spinal cord of control mothers, and that the levels of Fos were even lower in deeper spinal laminae V–X and in rats separated from their pups for 18 h. Previous studies on the paraventricular nucleus (PVN) of the hypothalamus have shown that very little or no Fos activity in the magnocellular neurons is observed in continuously suckled, lactating rats [21,22]. Since nursing occurs every 1 to 2 h in the rat [51,95,96], one possible explanation for the low level of Fos expression in the 6 h NS rats in our study may be that c-fos transcription would be repressed by its own product [84], after several days of lactation. In support of this are several reports showing a striking reduction in Fos activation of several structures of the CNS in response to chronic or long-lasting stimulation [11,75,86]. On the other hand, it has also been shown that 24 h after parturition, a high level of Fos activity is observed in numerous structures of the brain involved in the expression of maternal behavior and the neuroendocrine reflex of milk ejection [50]. According to these authors, Fos expression in lactating mothers apparently is induced by suckling stimulation, because it was eliminated in animals whose litters had been removed immediately after delivery. Remaining to be determined, though, is the time course during which Fos expression in the CNS decreases due to continuous suckling. However, the facts that in our study the basal levels of Fos in the control rats decreased from the superficial to the deeper laminae of the spinal cord, and that after 18 h of nonsuckling, Fos levels were drastically reduced, indicate that the absence of suckling indeed leads to decreased levels of Fos activity. Therefore, to determine whether an acute period of suckling would increase the number of Fos-ir neurons, a separation–resuckling experimental model was used in the present study. A similar paradigm of applying suckling after a 4-h NS period was used by Eriksson et al. [21] and showed Fos induction in the PVN of lactating rats by resuckling.

This model of removing the pups for 4–12 h and then applying 5–30 min of acute suckling has been employed extensively in previous studies demonstrating the neuroendocrine effects of suckling in rats [13,25,40,63,77]. Thus, our finding that acute 5 min suckling after 6 h NS significantly increased Fos expression in the dorsal horn up to layers VII–X of the spinal cord demonstrates that in 6 hNS rats, suckling exerted a clear effect. These results are consistent with previous anatomical [90] and electrophysiological [78] experiments showing that afferent connections from the glands may reach similar spinal regions found in this study and that they may be activated following suckling or afferent electrical stimulation from the nipples in anesthetized rats. These changes in activity at the spinal cord originate during suckling, which, as shown previously, is a complex type of stimulation,

involving different types of receptors at the level of the mammary gland. Thus, activation by either touching, grasping the nipple between two fingers, applying a gentle traction, electrically stimulating the nipple and suckling by a pup in rats [78,94] or rabbits [23], provoked action potentials of different size and frequency in the mammary nerve [23,94] and both cord dorsum and evoked potentials in the surface or at different depths of the spinal cord ([78], see also [96] for Refs.). Whereas a 2-h period of suckling was applied in the study of Eriksson et al. [21] we used only 5 min suckling because the objective of our study was mainly to investigate whether structures in addition to Fos within the spinal cord were activated as well, particularly those related with preganglionic sympathetic neurons; this design was based upon previous findings showing that suckling-induced sympathetic arousal lasts only a few minutes before it is blocked by activation of ductal mechanoreceptors [13,64,74]. However, such short periods of suckling are sufficient to activate central neuroendocrine processes as well [13,25,40,63].

In the present study, we analyzed Fos expression in rats receiving ESMN after 6 h NS to determine whether the same structures of the spinal cord were activated by this type of stimulation and by suckling. As a result of applying ESMN, a large activation of neurons located in the SDH and NP was found. These results are consistent with previous studies in which tracers were injected subdermally in an abdominal nipple, showing that the fine sensory fibres (C and Aδ) from the mammary nerve [42,94] send their projections towards laminae I and II and occasionally to deeper regions of the dorsal horn [81,90]. On the other hand, a clear quantitative discrepancy was found in our study in the number and distribution of Fos-ir neurons induced by ESMN and suckling. In the former, activated neurons were located mainly in the SDH and NP and then gradually decreased in deeper regions, i.e. laminae V–X. In contrast, suckling-activated Fos-ir cells were found in small numbers in laminae I–II, higher numbers in laminae III–IV, and the highest levels in laminae VII–X, as compared to NS rats. The quality and intensity of stimulation, i.e. one mammary nerve electrically stimulated vs. suckling by ten pups, are obviously different. However, a similar level of Fos expression in the neurons located in the NP was seen in both groups, suggesting that this is a very important region in the transmission of afferent signals from the mammary gland. Also, the larger number of Fos-ir neurons in the VH induced by suckling and the absence of an effect of ESMN in this region may indicate that ESMN does not fully mimic the effect of suckling stimulation beyond the level of NP or convergence and summation of afferent stimuli for oxytocin release at the spinal level has been shown to occur both by anatomical [90] and electrophysiological [78] studies. Also, we showed recently that in parallel with milk ejection, mammary deiodinase type I (D1), responsible for deiodination

of T4 to T3, is activated through reflex activation of mammary sympathetic innervation by suckling, and that this regulation involves the existence of both segmental and local nervous arrangements [3]. Thus, it was found that suckling of six glands was as effective as suckling of all glands to restore mammary D1 mRNA content and enzyme activity. However, when three glands were suckled, full restoration of the enzyme was observed in the glands that were suckled, but only partial restoration occurred in the rest of the glands. Furthermore, when only one or two glands were suckled, enzyme restoration was found in the same gland and no effect was observed in the rest of the glands. These data support the hypothesis [78,90] that afferent information from suckling at the spinal level is exerted through segmental arrangements; that a certain threshold, however, exists for these effects, between suckling by three and six pups; and that in addition to their involvement in the segmental effects, mammary neural afferents exert a local regulatory mechanism capable of regulating mammary D1 activity on each suckled gland [3].

Taken together, the results of this study suggest that using Fos expression was adequate to identify the suckling-activated neural populations in the spinal cord involved in the milk ejection reflex and in the neurally-mediated sympathetic reflex activation [70] of the mammary glands. Our results on Fos expression in both suckled and ESMN 6 h NS rats are consistent with previous results demonstrating that the first layers of the dorsal horn are characterized by the presence of wide dynamic range neurons which are activated by low and high intensity mechanical stimulation [71], such as suckling. Some of these neurons are located mainly in laminae II and project towards the lateral cervical nucleus [30], which is an important relay in the milk ejection pathway [17]. Also, laminae III and IV contain cells sensitive only to light mechanical stimulation and wide dynamic range cells, which also project towards the lateral cervical nucleus [30].

On the other hand, a remarkably high Fos expression was found in the VH in response to suckling stimulation. This region, especially laminae VII, is particularly important due to the presence of sympathetic preganglionic neurons, which might be regulating the sympathetic tone of the mammary gland. Since it is known that in rats, suckling and ESMN trigger a sympathetic reflex activation which provokes the release of adrenal and neural CAS [5,13,70], we sought to determine the phenotype of neurons activated by either suckling or electrical stimulation i.e. interneuron vs. sympathetic preganglionic. The results obtained showed that suckling and ESMN activated different ChAT-ir populations: whereas suckling activated neurons from the IMM cell column, ESMN stimulated cells from the IML. In agreement with these results, tracing techniques have also shown that numerous fibers from the mammary nerve project directly to the IMM cell column [42], whereas Gerendai et al. [29] have recently

shown that several structures, which may integrate the neuronal circuitry involved in the control of the sympathetic motor innervation of the mammary glands, are connected with preganglionic neurons from the IML column. The anatomical link [42] of the mammary gland with the IMM cell column suggests that it is through such pathways that suckling reflexly and segmentally increases the activity of preganglionic sympathetic neurons. This activation could be involved in the regulation of the sympathetic ductal tone of the mammary glands during acute suckling [64,70] and the suckling-dependent activation of type I deiodinase in the mammary glands [2, 3]. On the other hand, the connection of central sympathetic influences with the IML cell column [29] may constitute the route through which central sympathetic tone [24,36,38,66] is exerted upon the mammary glands.

It is worth mentioning that a pattern of Fos activation similar to the one presented here following acute suckling in 6 h NS rats has been reported to occur in rats after vaginal stimulation (VS) [12] and in rats subjected to pain stimulation [44]. Thus, Fos activation following VS has been shown to correlate with release of spinal oxytocin [83], which in turn mediates activation of sympathetic preganglionic neurons in VH of the spinal cord [82]. Although it is known that acute or chronic pain activate Fos at all spinal laminae [1, 44], chronic pain produced by adjuvant-induced arthritis (AIA), after the 2nd and up to the 11th week after treatment, is associated with increased Fos levels in DHN and VH [1]. These similarities may suggest that the chronic nature of suckling, which is applied throughout lactation by the pups every 1-2 h [51,95,96], involves spinal structures similar to those activated during pain stimulation. Further support for the similarity of these two physiological conditions is the fact that when pharmacological agents that may induce analgesia such as noradrenaline [10,48,100], morphine sulfate [7] and oxytocin [56,80] are administered i.c.v. or i.t. in lactating animals ([73], and unpublished data), the sympathetic tone of the mammary glands increases and results in decreased responsiveness of the glands to oxytocin. The excitatory amino acid glutamate, along with substance P, is an important neurotransmitter of pain stimulation [18,89,99] particularly at spinal layers I and II [6]. In the case of chronic pain, the presence and internalization of substance P receptors in spinal layers up to layer V has been demonstrated [6,19]. It is likely that these receptors may be involved in transmission of afferent impulses for oxytocin release within the milk-ejection pathway [91,93].

Finally, we found that the high Fos expression within the spinal cord induced by suckling or ESMN after 6 h of separation did not occur after suckling, and only in low degree after ESMN, when stimulation was given after an 18-h separation. This suggests that suppression of afferent stimulation for such a long period somehow prevented the transmission of signals from the mammary glands to the spinal cord. These results are consistent with previous

studies in which, within the physiological context of the lactating animal, a decrease in the frequency of stimulation of the mammary gland i.e. extending the nonsuckling period from 8 to 16 h or more, was associated with a lack of suckling-induced responses at the hypothalamic [8,43,62,97,98], pituitary [32,67] and mammary gland levels [2,33]. Moreover, the importance of maintaining suckling within the limit of 8 h was further supported by the fact that suckling-induced neuroendocrine effects that were irreversible in 16 h NS rats could in fact be reversed by applying a short 5–30 min period of suckling midway in the 16 h period of nonsuckling [62,67]. Therefore, when we analyzed the effect of suckling and ESMN upon Fos in 18 h NS rats, it was with the purpose of exploring whether Fos expression, as indicator of neuronal activation, still occurred in 18 h NS rats; and also because, to our knowledge, no previous electrophysiological, or neuro-anatomical studies have been made using 18 h NS rats. Our present results are in apparent disagreement with those from Li et al. [49] who reported that suckling-induced Fos activation of a number of forebrain and brainstem structures, including hypothalamic-neuroendocrine areas, occurred after 90 min of suckling in rats previously nonsuckled for 48 h. Unfortunately, no indicators other than those of suckling-induced Fos activation, such as adeno and/or neurohypophysal hormone release or milk ejection, were included by the authors in their experiments and therefore, comparison of their results with ours is very difficult. Thus, although it has long been known that recurrence of estrous cycles in lactating rats occurs 2 to 4 days after removal of suckling, these changes can be reversed by restoring suckling with foster litters due to the suckling-induced inhibition of gonadotropins (see [57] for Refs.); this may suggest that by 2 days, the 18-h period of refractoriness to suckling that was found in this and previous studies, has disappeared.

Within the context of lactation, the occurrence of refractory periods when the interval between suckling is extended beyond 16 h [33,67] is important insofar as the effectiveness of transmission of afferent signals within the spinal cord is concerned. Such a mechanism may operate long-term throughout the period of lactation in which, as previously shown [35], the frequency of suckling tends to decrease from early to late lactation. Both the precise time course and the factors that may account for the impairment of all these mechanisms, which ultimately may lead to cessation of lactation, remain to be determined. However, it is clear that the chain of events activated by suckling, i.e. neural, neuroendocrine and the mammary gland, is highly dependent upon the frequency of afferent stimulation from the mammary glands.

In conclusion, the results of the present study provide the first evidence showing Fos expression in spinal neurons in response to suckling or ESMN after 6 or 18 h of nonsuckling. The activation of preganglionic neurons that presumably belong to the neural circuitry involved in the

acute, suckling-activated reflex sympathetic arousal, which may account for the lack of milk removal during the first minutes of suckling.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge Drs. Dorothy D. Pless, Jorge Larriva and Miguel Condés for the critical reading and correcting of the manuscript; to MCs. Nilda Navarro and Martín García for excellent technical assistance and animal care; to MCs Lourdes Lara and Leopoldo González for expert photographic assistance. The investigations were supported by PAPIIT-UNAM IN-226599 grant. NM was supported by CONACyT fellowship for doctoral studies 138879.

References

- [1] C. Abbadie, J.M. Besson, C-fos expression in rat lumbar spinal cord following peripheral stimulation in adjuvant-induced arthritic and normal rats, *Brain Res.* 607 (1993) 195–204.
- [2] C. Aceves, O. Pineda, I. Ramirez, M. de la Luz Navarro, C. Valverde, Mammary type 1 deiodinase is dependent on the suckling stimulus: differential role of norepinephrine and prolactin, *Endocrinology* 140 (1999) 2948–2953.
- [3] C. Aceves, R. Rojas-Huidobro, N. Marina, M.T. Morales, F. Mena, Mammary gland sympathetic innervation is a major component in type 1 deiodinase regulation, *Endocrine* 11 (1999) 115–121.
- [4] T. Barowicz, Inhibitory effect of adrenaline on oxytocin release in the ewe during the milk-ejection reflex, *J. Dairy Res.* 46 (1979) 41–46.
- [5] T. Barowicz, Changes of blood catecholamine levels in the sheep during machine milking, *J. Dairy Res.* 46 (1979) 555–557.
- [6] A.I. Basbaum, Spinal mechanisms of acute and persistent pain, *Reg. Anesth. Pain Med.* 24 (1999) 59–67.
- [7] S. Benyhe, Morphine: new aspects in the study of an ancient compound, *Life Sci.* 13 (1994) 969–979.
- [8] K.A. Berghom, W.W. Le, T.G. Sherman, G.E. Hoffman, Suckling stimulus suppresses messenger RNA for tyrosine hydroxylase in arcuate neurons during lactation, *J. Comp. Neurol.* 438 (2001) 423–432.
- [9] R.M. Buijs, J. Wortel, J.J. van Heerikhuizen, M.G. Feenstra, G.J. Ter Horst, H.J. Romijn, A. Kalsbeek, Anatomical and functional demonstration of a multisynaptic suprachiasmatic nucleus adrenal (cortex) pathway, *Eur. J. Neurosci.* 11 (1999) 1535–1544.
- [10] W.T. Chance, The role of brain and spinal cord norepinephrine in autoanalgesia, *Ann. NY Acad. Sci.* 467 (1986) 309–330.
- [11] X. Chen, J. Herbert, Regional changes in c-fos expression in the basal forebrain and brainstem during adaptation to repeated stress: correlations with cardiovascular, hypothalamic and endocrine responses, *Neuroscience* 64 (1995) 675–685.
- [12] S. Chinapen, J.M. Swann, J.L. Steinman, B.R. Komisaruk, Expression of c-fos protein in lumbosacral spinal cord in response to vaginocervical stimulation in rats, *Neurosci. Lett.* 145 (1992) 93–96.
- [13] C. Clapp, G. Martínez, M.T. Morales, S.W. Shyr, C.E. Grosvenor, F. Mena, Release of catecholamines follows suckling or electrical stimulation of mammary nerve in lactating rats, *Endocrinology* 117 (1985) 2498–2504.
- [14] W.R. Crowley, S.W. Shyr, B. Kacksoh, C.E. Grosvenor, Evidence for stimulatory noradrenergic and inhibitory dopaminergic regula-

- tion of oxytocin release in the lactating rat, *Endocrinology* 121 (1987) 14–20.
- [15] W.R. Crowley, W.E. Armstrong, Neurochemical regulation of oxytocin secretion in lactation, *Endocr. Rev.* 13 (1992) 33–65.
- [16] R.P. Deis, The effect of an exteroceptive stimulus on milk ejection in lactating rats, *J. Physiol.* 197 (1968) 37–46.
- [17] M. Dubois-Dauphin, W.E. Armstrong, E. Tribollet, J.J. Dreifuss, Somatosensory systems and the milk-ejection reflex in the rat. II. The effects of lesions in the ventro-posterior thalamic complex, dorsal columns and lateral cervical nucleus-dorsolateral funiculus, *Neuroscience* 15 (1985) 1131–1140.
- [18] A.W. Duggan, I.A. Hendry, C.R. Morton, W.D. Hutchison, Z.Q. Zhao, Cutaneous stimuli releasing immunoreactive substance P in the dorsal horn of the cat, *Brain Res.* 451 (1988) 261–273.
- [19] A.W. Duggan, P.J. Hope, B. Jarrot, H.G. Schaible, S.M. Fleetwood-Walker, Release, spread and persistence of immunoreactive neurokinin A in the dorsal horn of the cat following noxious cutaneous stimulation. Studies with antibody microprobes, *Neuroscience* 35 (1990) 195–202.
- [20] J.T. Eayrs, R.M. Balledeley, Neural pathways in lactation, *J. Anat.* 90 (1956) 161–171.
- [21] M. Eriksson, S. Ceccatelli, K. Uvnäs-Moberg, M. Iadarola, T. Hokfelt, Expression of Fos-related antigens, oxytocin, dynorphin and galanin in the paraventricular and supraoptic nuclei of lactating rats, *Neuroendocrinology* 63 (1996) 356–367.
- [22] V.S. Fénelon, D.A. Poulain, D.T. Theodosis, Oxytocin neuron activation and Fos expression: a quantitative immunocytochemical analysis of the effect of lactation, parturition, osmotic and cardiovascular stimulation, *Neuroscience* 53 (1993) 77–89.
- [23] A.L. Findlay, Sensory discharges from lactating mammary glands, *Nature* 211 (1966) 1183–1184.
- [24] A.L. Findlay, C.E. Grosvenor, The role of mammary gland innervation in the control of the motor apparatus of the mammary gland: a review, *Dairy Sci. Abstr.* 31 (1969) 109–116.
- [25] A.R. Fauch, L. Cubile, M.Y. Dawood, F.S. Jorgensen, Release of oxytocin and prolactin by suckling in rabbits throughout lactation, *Endocrinology* 114 (1984) 462–469.
- [26] T. Fukuoaka, H. Negoro, K. Honda, T. Higuchi, E. Nishida, Spinal pathway of the milk-ejection reflex in the rat, *Biol. Reprod.* 30 (1984) 74–81.
- [27] I. Gerendai, I.E. Tóth, Z. Boldogkői, I. Medveczky, B. Halász, Neuronal labelling in the rat brain and spinal cord from the ovary using viral transneuronal tracing technique, *Neuroendocrinology* 68 (1998) 244–256.
- [28] I. Gerendai, I.E. Tóth, Z. Boldogkői, I. Medveczky, B. Halász, Central nervous system structures labelled from the testis using the transsynaptic viral tracing technique, *J. Neuroendocrinol.* 12 (2000) 1087–1095.
- [29] I. Gerendai, I.E. Tóth, K. Kocsis, Z. Boldogkői, I. Medveczky, B. Halász, Transneuronal labeling of nerve cells in the CNS of female rat from the mammary gland by viral tracing technique, *Neuroscience* 108 (2001) 103–118.
- [30] G.J. Giesler, J.T. Cannon, G. Urea, J.C. Liebeskind, Long ascending projections from substantia gelatinosa Rolandi and the subject dorsal horn in the rat, *Science* 202 (1978) 984–986.
- [31] C.E. Grosvenor, Evidence that exteroceptive stimuli can release prolactin from the pituitary gland of the lactating rat, *Endocrinology* 30 (1965) 195–200.
- [32] C.E. Grosvenor, F. Mena, D.A. Schaeffgen, Effect of nonsuckling interval and duration of suckling on the suckling-induced fall in pituitary prolactin concentration in the rat, *Endocrinology* 81 (1967) 449–453.
- [33] C.E. Grosvenor, H. Maiweg, F. Mena, Effect of nonsuckling interval on ability of prolactin to stimulate milk secretion in rats, *Am. J. Physiol.* 219 (1970) 403–408.
- [34] C.E. Grosvenor, H. Maiweg, F. Mena, A study of factors involved in the development of the exteroceptive release of prolactin in the lactating rat, *Horm. Behav.* 1 (1970) 111–120.
- [35] C.E. Grosvenor, F. Mena, Effect of suckling upon the secretion and release of prolactin from the pituitary of the lactating rat, *J. Anim. Sci.* 32 (1971) 115–136.
- [36] C.E. Grosvenor, D.J. DeNuccio, S.F. King, H. Maiweg, F. Mena, Central and peripheral neural influences on the oxytocin-inducing pressure response of the mammary gland of the anesthetized lactating rat, *J. Endocrinol.* 55 (1972) 299–309.
- [37] C.E. Grosvenor, F. Mena, Evidence that suckling pups, through an exteroceptive mechanism, inhibit the milk stimulatory effects of prolactin in the rat during late lactation, *Horm. Behav.* 4 (1973) 209–222.
- [38] C. Grosvenor, F. Mena, Neural and hormonal control of milk secretion and milk ejection, in: B.L. Larson, V.R. Smith (Eds.), *Lactation: A Comprehensive Treatise*, Academic Press, London, 1974, pp. 227–267.
- [39] C.E. Grosvenor, F. Mena, N.S. Whitworth, Sensory stimuli from pups involved in inhibition of milk secretion in rats during late lactation, *Horm. Behav.* 8 (1977) 287–296.
- [40] C.E. Grosvenor, S.W. Shyr, G.T. Goodman, F. Mena, Comparison of plasma profiles of oxytocin and prolactin following suckling in the rat, *Neuroendocrinology* 43 (1986) 679–685.
- [41] S. Hagiwara, N. Teraoka, I. Yoshiya, Inhalation anesthetics suppress the expression of c-Fos protein evoked by noxious somatic stimulation in the deeper layer of the spinal cord in the rat, *Brain Res.* 751 (1997) 124–130.
- [42] E.W. Huller, Neural and anatomic characteristics of peripheral afferent fibres in the milk ejection reflex, *Brain Res. Bull.* 15 (1985) 563–567.
- [43] G.E. Hoffman, W.W. Le, R. Abbud, W.S. Lee, M.S. Smith, Use of Fos-related antigens (FRAs) as markers of neuronal activity: FRA changes in dopamine neurons during proestrus, pregnancy and lactation, *Brain Res.* 654 (1994) 207–215.
- [44] S.P. Hunt, A. Pini, G. Evan, Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation, *Nature* 328 (1987) 632–634.
- [45] A.S.P. Jansen, X.V. Nguyen, V. Karpitsky, T.C. Mettenleiter, A.D. Loewy, Central command neurons of the sympathetic nervous system: basis of the fight-or-flight response, *Science* 270 (1995) 644–646.
- [46] A.S.P. Jansen, J.L. Hoffman, A.D. Loewy, CNS sites involved in sympathetic and parasympathetic control on the pancreas: A viral tracing study, *Brain Res.* 766 (1997) 29–38.
- [47] A. Kulsbeek, E. Fliers, A.N. Franke, J. Wortel, M. Buijs, Functional connections between the suprachiasmatic nucleus and the thyroid gland as revealed by lesioning and viral tracing techniques in the rat, *Endocrinology* 141 (2000) 3832–3841.
- [48] Y. Kunitani, M. Satoh, H. Takagi, The descending noradrenergic system and analgesia, *Pain Headache* 9 (1987) 101–128.
- [49] C. Li, P. Chen, M.S. Smith, Neural populations in the rat forebrain and brainstem activated by the suckling stimulus as demonstrated by c-Fos expression, *Neuroscience* 94 (1999) 117–129.
- [50] S.H. Lin, S. Miyata, W. Matsumaga, T. Kawarabayashi, T. Nakashima, T. Kiyohara, Metabolic mapping of the brain in pregnant, parturient and lactating rats using Fos immunohistochemistry, *Brain Res.* 787 (1998) 226–236.
- [51] D.W. Lincoln, A. Hill, J.R. Wakerley, The milk-ejection reflex of the rat: an intermittent function not abolished by surgical levels of anaesthesia, *J. Endocrinol.* 57 (1973) 459–476.
- [52] D.W. Lincoln, A.C. Paisley, Neuroendocrine control of milk ejection, *J. Reprod. Fertil.* 65 (1982) 571–586.
- [53] A.D. Loewy, P.C. Bridgman, T.C. Mettenleiter, β -Galactosidase expressing recombinant pseudorabies virus for light and electron microscopic study of transneurally labelled CNS neurons, *Brain Res.* 555 (1991) 346–352.
- [54] A.D. Loewy, M.A. Haxhiu, CNS cell groups projecting to pancreatic parasympathetic preganglionic neurons, *Brain Res.* 620 (1993) 323–330.

- [55] A.D. Loewy, M.F. Franklin, M.A. Hashiu, CNS monoamine cell groups projecting to paraventricular vagal motor neurons: a transneuronal labelling study using pseudorabies virus, *Brain Res.* 638 (1994) 248–260.
- [56] T. Lundberg, K. Uvnäs-Moberg, G. Agren, G. Bruzelius, Antinociceptive effects of oxytocin in rats and mice, *Neurosci Lett.* 170 (1994) 153–157.
- [57] A. McNeilly, Suckling and the control of gonadotropin secretion, in: E. Knobil, J. Neill (Eds.), *The Physiology of Reproduction*, Vol. 2, Raven Press, New York, 1994, pp. 1179–1212.
- [58] F. Mena, C. Beyer, Effect of spinal cord lesions on milk ejection in the rabbit, *Endocrinology* 83 (1968) 615–617.
- [59] F. Mena, C.E. Grosvenor, Release of prolactin in rats by exteroceptive stimulation: sensory stimuli involved, *Horm. Behav.* 2 (1971) 107–116.
- [60] F. Mena, C.E. Grosvenor, Effect of suckling and of exteroceptive stimulation upon prolactin release in the rat during late lactation, *J. Endocrinol.* 52 (1972) 11–22.
- [61] F. Mena, G. Reyes, D. Aguayo, C.E. Grosvenor, Effect of acute reduction in milk removal from some glands upon the ability of a single rabbit mammary gland to secrete milk, *J. Endocrinol.* 62 (1974) 431–438.
- [62] F. Mena, A. Enjalbert, L. Carbonell, M. Priam, C. Kordon, Effect of suckling on plasma prolactin and hypodalaemic monoamine levels in the rat, *Endocrinology* 99 (1976) 445–451.
- [63] F. Mena, P. Pacheco, D. Aguayo, C. Clapp, C.E. Grosvenor, A rise in intramammary pressure follows electrical stimulation of mammary nerve in anesthetized rats, *Endocrinology* 103 (1978) 1929–1936.
- [64] F. Mena, P. Pacheco, D. Aguayo, C. Clapp, G. Martínez, C.E. Grosvenor, Reflex regulation of autonomic influences upon the oxytocin-induced contractile response of the mammary gland in the anesthetized rat, *Endocrinology* 104 (1979) 751–756.
- [65] F. Mena, P. Pacheco, C.E. Grosvenor, Effect of electrical stimulation of mammary nerve upon pituitary and plasma prolactin concentrations in anesthetized lactating rat, *Endocrinology* 106 (1980) 458–462.
- [66] F. Mena, C. Clapp, G. Martínez, Integrative regulation of milk ejection, in: J.A. Amico, A.G. Robinson (Eds.), *Oxytocin: Clinical and Laboratory Studies*, Excerpta Medica, New York, 1985, pp. 179–199.
- [67] F. Mena, G. Martínez-Escalera, C. Clapp, D. Aguayo, M.T. Morales, C.E. Grosvenor, Investigation into the role of dopamine and lysosomes in the impairment of prolactin transformation and release imposed by long periods of nonsuckling in the rat, *Acta Endocrinol. (Copenh.)* 114 (1987) 371–378.
- [68] F. Mena, C. Clapp, D. Aguayo, G. Martínez de la Escalera, Prolactin and propranolol prevent the suckling-induced inhibition of lactation in rabbits, *Physiol. Behav.* 48 (1990) 311–315.
- [69] F. Mena, C. Clapp, G. Martínez de la Escalera, Age-related stimulatory and inhibitory effects of suckling regulate lactation in rabbits, *Physiol. Behav.* 48 (1990) 307–310.
- [70] F. Mena, D. Aguayo, P. Pacheco, M.T. Morales, Central effects of catecholamines on mammary contractility in rats are neurally-mediated, *Neuroendocrinology* 61 (1995) 722–730.
- [71] C. Molander, G. Grant, Spinal cord cytoarchitecture, in: G. Paxinos (Ed.), *The Rat Nervous System*, Academic Press, Australia, 1995, pp. 39–46.
- [72] H. Moltz, R. Levin, M. Leon, Prolactin in the postpartum rat: synthesis and release in the absence of suckling stimulation, *Science* 163 (1969) 1083–1084.
- [73] T. Morales, E. Shapiro, F. Mena, Central effects of morphine, serotonin and acetylcholine upon milk ejection in rats, 3rd International Congress of Neuroendocrinology, Budapest, Hungary, 1994, P4.22.
- [74] T. Morales, E. Shapiro, N. Marina, F. Mena, Sympathetic innervation of mammary glands mediates suckling-induced reflex inhibition of milk yield in rats, *Physiol. Behav.* 74 (2001) 37–43.
- [75] J.L. Morgan, D.R. Cohen, J.L. Hempstead, T. Curran, Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure, *Science* 237 (1987) 192–197.
- [76] J.L. Morgan, T. Curran, Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun, *Annu. Rev. Neurosci.* 14 (1991) 421–451.
- [77] M.J. Paape, C. Desjardins, Nursing duration and suckling intensity: effects on plasma corticosterone, circulating leukocytes, and mammary nucleic acids, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 138 (1971) 12–17.
- [78] D.A. Poulin, J.B. Wakerley, Afferent projections from the mammary glands to the spinal cord in the lactating rat-II. Electrophysiological responses of spinal neurons during stimulation of the nipples, including suckling, *Neuroscience* 19 (1986) 511–521.
- [79] R.W. Presley, D. Menetrey, J.D. Levine, A.I. Basbaum, Systemic morphine suppresses noxious stimulus-evoked Fos protein-like immunoreactivity in the rat spinal cord, *J. Neurosci.* 10 (1990) 323–335.
- [80] D.A. Robinson, F. Wei, G.D. Wang, P. Li, S.J. Kim, S.K. Vogt, L.J. Muglia, M. Zhuo, Oxytocin mediates stress-induced analgesia in adult mice, *J. Physiol.* 540 (2002) 593–606.
- [81] P. Rousselot, D.A. Poulin, D.T. Theodosis, Ultrastructural visualization and neurochemical characterization of spinal projections of primary sensory afferents from the nipple: combined use of transganglionic transport of HP-WGA and glutamate immunocytochemistry, *J. Histochem. Cytochem.* 42 (1994) 115–123.
- [82] G.R. Sansone, B.R. Komisaruk, Evidence that oxytocin is an endogenous stimulator of autonomic sympathetic preganglionic: the papillary dilatation response to vaginocervical stimulation in the rat, *Brain Res.* 898 (2001) 265–271.
- [83] G.R. Sansone, C.A. Gerdes, J.L. Steinman, J.T. Winslow, J.E. Ottenweller, B.R. Komisaruk, T.R. Insel, Vaginocervical stimulation releases oxytocin within the spinal cord in rats, *Neuroendocrinology* 75 (2002) 306–315.
- [84] P. Sassone-Corsi, L.J. Ransone, W.W. Lamph, I.M. Verma, Direct interaction between fos and jun nuclear oncoproteins: role of the 'leucine zipper' domain, *Nature* 336 (1988) 692–695.
- [85] P.E. Sawchenko, C. Arias, J. Bittencourt, Inhibin-, β somatostatin- and enkephalin-immunoreactivities coexist in caudal medullary neurons that project to the paraventricular nucleus of the hypothalamus, *J. Comp. Neurol.* 291 (1990) 269–280.
- [86] F.R. Sharp, S.M. Sagar, K. Hicks, D. Lowenstein, K. Hisanaga, c-fos mRNA, Fos, and Fos-related antigen induction by hypertonic saline and stress, *J. Neurosci.* 11 (1991) 2321–2331.
- [87] A.M. Struck, A.D. Loewy, Pseudorabies virus: a highly specific transneuronal cell body marker in the sympathetic nervous system, *J. Neurosci.* 10 (1990) 2139–2147.
- [88] A.M. Struck, W.B. Sawyer, K.B. Platt, A.D. Loewy, CNS cell groups regulating the sympathetic outflow to adrenal gland as revealed by transneuronal cell body labelling with pseudorabies virus, *Brain Res.* 491 (1989) 274–296.
- [89] Y.O. Taiwo, L.K. Bjerkes, E.J. Goetzl, J.D. Levine, Mediation of primary afferent peripheral hyperalgesia by the cAMP second messenger system, *Neuroscience* 32 (1989) 577–580.
- [90] J.G. Tasker, D.T. Theodosis, D.A. Poulin, Afferent projections from the mammary glands to the spinal cord in the lactating rat-I. A neuroanatomical study using the transganglionic transport of horseradish peroxidase-wheatgerm agglutinin, *Neuroscience* 19 (1986) 495–509.
- [91] J.G. Tasker, D.T. Theodosis, D.A. Poulin, The effect of neonatal capsaicin treatment on the sensory innervation of the nipple and on the milk ejection reflex in the rat, *Exp. Brain Res.* 73 (1988) 32–38.
- [92] I.E. Tóth, Transneuronal labelling of CNS neurons involved in the innervation of the adrenal gland, *Horm. Metab. Res.* 30 (1998) 329–333.
- [93] H. Traurig, R.E. Papka, A. Saria, F. Lembeck, Substance P immunoreactivity in the rat mammary nipple and the effects of capsaicin treatment on lactation, *Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* 328 (1984) 1–8.

- [94] L.M. Voloschin, E. Decima, J.H. Tramezzani, Electronmicroscopic and electrophysiological studies of the test branch of the XIII thomacic nerve: relationship with lactation in the rat, *J. Endocrinol.* 118 (1988) 471–483.
- [95] J.H. Wakerley, R.F. Drewett, Pattern of sucking in the infant rat during spontaneous milk ejection, *Physiol. Behav.* 15 (1975) 277–281.
- [96] J. Wakerley, G. Clarke, A. Summerlee, Milk ejection and its control, in: E. Knobil, J. Neill (Eds.), *The Physiology of Reproduction*, Vol. 2, Raven Press, New York, 1994, pp. 1131–1177.
- [97] N. Wintrip, D.M. Nance, M. Wilkinson, The effect of lactation on induced Fos-like immunoreactivity in the rat hypothalamic paraventricular nucleus, *Brain Res.* 754 (1997) 113–120.
- [98] B. Woodside, S. Amir, Lactation reduces Fos induction in the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus after urethane administration in rats, *Brain Res.* 752 (1997) 319–323.
- [99] T.L. Yaksh, T.M. Jessell, R. Ganse, A.W. Mudge, S.E. Leeman, Intrathecal morphine inhibits substance P release from mammalian spinal cord in vivo, *Nature* 286 (1980) 155–157.
- [100] T.L. Yaksh, Pharmacology of spinal adrenergic systems which modulate spinal nociceptive processing, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 22 (1985) 845–858.
- [101] M.X. Zarrow, P.A. Schlein, V.H. Denenberg, H.A. Cohen, Sustained corticosterone release in lactating rats following olfactory stimulation from the pups, *Endocrinology* 91 (1972) 191–196.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN