

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



Casa abierta al tiempo

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**“Factores sociales y cambios neuroendocrinos asociados
con el inicio de la conducta paterna en el gerbo de
Mongolia (*Meriones unguiculatus*)”**

T E S I S

Para obtener el grado de
Doctora en Ciencias Biológicas y de la Salud

P R E S E N T A

Ana Lilia Martínez Bravo

Comité tutorial:

Dra. Marcela Arteaga Silva

Dra. Juana Alba Luis Díaz

Asesora

Dra. Herlinda Bonilla Jaime

Iztapalapa, Ciudad de México, septiembre de 2020

“El Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93”.

El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de las Unidades Cuajimalpa, Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó

Ana Lilia Martínez Bravo

El día 10 de septiembre del 2020



Cotutora

Dra. Marcela Arteaga Silva

UAM Iztapalapa



Cotutora

Dra. Juana Alba Luis Díaz

FES Iztacala UNAM



Vocal

Dra. Herlinda Bonilla Jaime

UAM Iztapalapa



Vocal

Dra. Rosa María Viguera Villaseñor

Instituto Nacional de Pediatría



Vocal

Dr. Julio César Rojas Castañeda

Instituto Nacional de Pediatría

Agradecimientos

Agradezco primero al Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud, UAM Iztapalapa, a la FES Iztacala UNAM y al Laboratorio de Biología de la Reproducción del INP por darme la oportunidad de realizar mi Doctorado en sus instalaciones.

Así mismo, agradezco a CONACYT (261812) y a PAPIIT (IN213317) porque gracias a sus becas pude concluir este trabajo.

Agradezco profundamente a la Dra. Juana A. Luis Díaz, Dra. Marcela Arteaga Silva, Dra. Herlinda Bonilla Jaime, Dra. Rosa María Viguera Villaseñor y al Dr. Julio Rojas Castañeda, por brindarme la oportunidad de realizar el presente trabajo bajo su dirección, por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo y por sus acertadas sugerencias y aportaciones, que sin duda, mejoraron y enriquecieron este proyecto de tesis, por su apoyo, esfuerzo, por su infinita paciencia y calidad humana, que fueron elementos determinantes para concluir esta tesis. No hay palabras para agradecerles todo lo que aprendí de ustedes.

También manifiesto mi gratitud al Dr. Mario Cárdenas, por su apoyo en la realización de la técnica de RIA, al laboratorista Pedro Medina Granados, a la MBRA Tábata Nelva Mendoza Mendoza y a la Dra. Ofelia Limón Morales quienes fueron mi guía en la técnica Inmunohistoquímica.

Dedicatoria

Les dedico con todo mi amor este trabajo a esas dos personas que siempre me han alentado a luchar por mis sueños hasta volverlos realidad, sin importar que tan difícil parezca conseguirlos, por haberme dado la vida, porque gracias a ustedes he llegado a concluir una ilusión, por su gran apoyo cariño y comprensión que me han brindado en todo momento, por ser un ejemplo a seguir, por creer siempre en mí, porque son y serán parte de mi vida siempre. Gracias, papás.

A mis hermanos Daniel y Enrique, por soportarme, apoyarme, tolerarme y por ser mi ejemplo a seguir. Una forma de decirles cuanto los quiero y admiro es dedicándoles este trabajo.

También le dedico este trabajo a mi esposo Daniel, quien ha estado apoyándome incondicionalmente, por motivarme a seguir adelante, por su comprensión, por soportarme y estar siempre conmigo en las buenas y en las malas, por brindarme su amor y compartir conmigo todos esos momentos maravillosos. Te agradezco enormemente todo lo que has hecho por mí. Te amo.

A mis mascotas, quienes fueron mi inspiración para estudiar esta carrera, en especial a Mina mi gatita, quien fue mi compañera, durante todas esas desveladas.

A todos mis amigos, por todos esos momentos de locuras, tristezas y enojos que pasamos, gracias por permitirme ser parte de su vida, Los quiero mucho.

Resumen

La mayoría de los machos de especies biparentales tienen que inhibir su conducta infanticida y convertirse en paternales antes del nacimiento de sus crías; factores sociales como la cópula, cohabitación con la hembra preñada y presencia de las crías facilitan el inicio de la conducta paterna, aunque se desconocen los cambios neuroendocrinos que subyacen a este evento. En los machos biparentales ocurren cambios hormonales que no se presentan en los machos de especies uniparentales, entre estos cambios se asocia la testosterona (T). Esta hormona a nivel neuronal puede ser metabolizada a estradiol (E_2) o dihidrotestosterona (DHT), que al unirse a sus receptores en diferentes áreas del cerebro, como el bulbo olfatorio (OB), área preóptica medial (mPOA) y la amígdala medial (MeA), regulan diversas conductas sociales. Entre los receptores del E_2 , el tipo alfa ($ER\alpha$), tiene un papel clave en los mecanismos neuroendocrinos que regulan la conducta materna, y también ha sido asociado con la regulación de la conducta paterna. Aunque el receptor androgénico (AR) no ha sido referido que participe en la regulación de la conducta paterna, en roedores como el gerbo de Mongolia (*Meriones unguiculatus*) y el ratón de los volcanes (*Neotomodon alstoni*) se sugiere que este receptor es parte de los mecanismos neuroendocrinos que regulan la conducta paterna, debido a que la administración de DHT (andrógeno no aromatizable) induce la exhibición de cuidados paternos en machos vírgenes, que antes de la administración de esta hormona fueron agresivos hacia las crías de la especie. El objetivo de este estudio fue determinar la función que desempeña la cópula, la cohabitación con la hembra

preñada, el nacimiento de las crías y la presencia de éstas en el postparto en el inicio de la conducta paterna, así como establecer si el inicio de esta conducta está asociada a un incremento en la concentración de T y la presencia de los ER α y los AR en el OB, el mPOA y la MeA, en el gerbo de Mongolia (*Meriones unguiculatus*). A través de pruebas de conducta paterna fueron seleccionados 36 machos sin experiencia sexual, no paternas, que fueron apareados con hembras vírgenes. Estos gerbos fueron organizados en 4 grupos de 7 parejas cada uno. Todos los machos fueron sometidos a pruebas de conducta paterna: Grupo 1, después de la cópula, los del Grupo 2, entre 10 y 8 días antes del nacimiento de las crías, los del Grupo 3, de 6 a 8 horas después del nacimiento de las crías y los del Grupo 4, a los 6 días después del nacimiento de las crías. Otro Grupo, con 14 machos en cohabitación macho- macho se utilizó como control, de éstos, dos machos fueron sometidos al mismo tratamiento que los experimentales en cada una de las etapas del ciclo reproductivo explorada. Después de las pruebas de conducta paterna cada macho fue anestesiado profundamente y perfundido enseguida se obtuvieron muestras de sangre para la cuantificación de T por el método de RIA y los cerebros fueron disectados y procesados para inmunohistoquímica del ER α y AR en el OB, mPOA y MeA. Cuatro cortes de cada región cerebral fueron analizados mediante un microscopio óptico cuantificándose las células inmunoreactivas en 10000 μm^2 . Se contrastó la latencia de conducta paterna, el tiempo de abrigo y acicalamiento con la prueba de Kruskal-Wallis. Esta misma prueba se utilizó para las concentraciones de T. El análisis *post hoc* se realizó utilizando la corrección de Bonferroni. Para determinar diferencias significativas en ER α -ir y AR-ir en mPOA, MeA y OB se utilizó

un ANOVA de una vía. Las comparaciones post hoc se realizaron usando la prueba de Tukey. Los resultados mostraron que la cópula, nacimiento de las crías y la presencia de las crías en el postparto facilitaron la exhibición de cuidados paternos en el 100% de los machos. Todos los machos paternos tuvieron concentraciones periféricas de T más altas ($P < 0.005$) y mayor número de células inmunoreactivas a ER α y AR en OB, mPOA y MeA ($P < 0.005$), que los machos no paternos. El inicio de la conducta paterna en el gerbo de Mongolia es facilitado por factores sociales como, la cópula, el nacimiento y la presencia de las crías. Además, el inicio de esta conducta asociado a un incremento en la concentración de T y la significativa presencia de ER α y AR en regiones neurales que participan en la regulación de la conducta paterna, apoyan que esta hormona regula la conducta de este roedor a través de las vías estrogénica y androgénica.

Abstract

The majority of the biparental males have to inhibit their infanticidal behavior and become paternal before the birth of their offspring. Social factors such as copulation, cohabitation with the pregnant female and presence of the offspring facilitate the initiation of paternal behavior, but the neuroendocrine changes that underlie this event are unknown. In addition, in the males of biparental species occur hormonal changes that do not occur in the males of uniparental species, among these hormonal changes is associated with testosterone (T). This hormone at the neural level, can be metabolized to estradiol (E₂) or dihydrotestosterone (DHT), which by binding to its receptors in different areas of the brain, such as the olfactory bulb (OB), medial preoptic area (mPOA) and the medial amygdala (MeA), regulate various social behaviors. Among the E₂ receptors, the alpha type (ER α) plays a key role in the neuroendocrine mechanisms that regulate maternal behavior and has also been associated with the regulation of paternal behavior. Although the androgen receptor (AR) has not been reported to participate in the regulation of parental behavior, rodents such as the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) and the volcano mouse (*Neotomodon alstoni*) suggest that this receptor is part of the mechanisms neuroendocrine that regulate paternal behavior, because the administration of DHT (and non-aromatizable androgen) induces the display of paternal care in virgin males, which before the administration of this hormone were aggressive towards the offspring of the species. The objective of this study was to determine the role played by the copulation, cohabitation with the pregnant female, the birth of the offspring and

the presence of these in the postpartum at the beginning of the paternal behavior, as well as to establish if the beginning of this behavior is associated with an increase in T and the presence of ER α and AR in OB, mPOA and MeA, in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). Through tests of paternal behavior were selected 36 males without sexual experience, not paternal, who were paired with virgin females. These gerbils were organized into 4 groups of 7 couples each. The males of group 1 were subjected to tests of paternal behavior after intercourse, those of group 2, between 10 and 8 days before the birth of the offspring, those of group 3, on the day of the birth of the offspring (from 6 to 8 hours later) and those of group 4, at 6 days after the birth of the offspring. Another group, with 14 males in male-male cohabitation was used as control, of these two males were subjected to the same treatment as the experimental ones, in each stage of the reproductive cycle. After tests of paternal behavior were deeply anesthetized, blood samples were obtained for the quantification of T by the RIA method and the brains were dissected and processed for immunohistochemistry of ER α and AR in OB, mPOA and MeA. Four slices from each site were analyzed by an optical microscope quantifying the immunoreactive cells in 10000 μm^2 . The latency of paternal behavior, the time of huddling over the pups and grooming was contrasted with the Kruskal-Wallis test. This same test was used for T concentrations. For the multiple comparison between these two results a Bonferroni correction followed by a Mann-Whitney U was used. To determine significant differences in ER α -ir and AR-go in mPOA, MeA and OB, one-way ANOVA was used. Post hoc comparisons were made using the Tukey test. The results showed that in the groups of copulation, birth of the offspring and 6 days postpartum 100% of the males displayed paternal

behavior (coat and grooming), no significant differences were found between these groups ($P > 0.005$). All the paternal males had higher peripheral concentration of T ($P < 0.005$) and greater number of cells immunoreactive to ER α and AR in OB, mPOA and MeA ($P < 0.005$), than non-paternal males (virgins and those that cohabited with the female 10- 8 days before the birth of the offspring). The results showed that the initiation of paternal behavior is facilitated by social factors such as copulation, birth and the presence of offspring. In addition, the onset of this behavior was associated with an increase in T. The significant presence of ER α and AR in neural regions that participate in the regulation of paternal behavior suggest the participation of the estrogenic and androgenic pathways in the regulation of this behavior.

Índice

Resumen	I
Abstract.....	IV
Abreviaturas	1
1. Introducción.....	2
1.1 Clasificación de los cuidados paternos en los roedores.....	2
1.2 Evolución de la conducta paterna	4
1.3 Factores que regulan la conducta paterna	6
1.3.1 <i>Factores sociales</i>	6
1.3.2 <i>Factores hormonales</i>	10
1.3.2.1 <i>Prolactina</i>	10
1.3.2.2 <i>Progesterona</i>	11
1.3.2.3 <i>Vasopresina y Oxitocina</i>	12
1.3.2.4 <i>Testosterona y sus metabolitos</i>	15
1.3.2.5 <i>Glucocorticoides</i>	18
1.3.3 <i>Factores Neuroendocrinos</i>	21
1.3.3.1 <i>Área Preóptica Medial (mPOA)</i>	22
1.3.3.2 <i>Amígdala y Sentido del Olfato</i>	24
1.4 Receptores AR y ER	25
1.4.1 Receptores Estrogénicos	25
1.4.1.1 Dominios	25
1.4.1.2 Mecanismo de acción de los ER	26
1.4.2 Receptor andrógeno (AR)	28
1.4.2.1 Dominios	29
1.4.2.2 Mecanismo de acción de los AR	29

1.5 Sensibilización y genes Fos.....	31
2. Antecedentes.....	33
3. Justificación.....	35
4. Preguntas de investigación	37
5. Hipótesis.....	37
6. Objetivos Generales	37
7. Objetivos particulares.....	38
8. Metodología	38
8.1 Animales.....	38
8.2 Pruebas de conducta paterna.....	41
8.3 Extracción de muestras sanguíneas.....	41
8.4 Inmunohistoquímica por flotación.....	42
8.4.1 Técnica de NISSL.....	46
8.5 Análisis estadísticos	46
9. Resultados	47
9.1 Resultados de las pruebas de conducta paterna	48
9.2 Resultados de concentración de T.....	52
9.3 Resultados de Inmunohistoquímica.....	53
10. Discusión.....	59
11. Conclusión	64
12. Referencias.....	66
13. Anexos.....	81
Solución para lavado vascular	81
Paraformaldehído al 4%.....	81
PBS.....	81

Peróxido de Hidrógeno al 3%.....	82
Twin 20 al 0.1%	82
BSA.....	82
Medio de montaje	82
14. Artículo.....	83

Abreviaturas

AON: Núcleo olfativo anterior

AR: Receptor androgénico

AR-ir: Inmunoreactividad del receptor androgénico

AVP: Arginina-vasopresina

DHT: Dihidrotestosterona

E₂: Estradiol

ER α : Receptor alfa estrógeno

ER α -ir: Inmunoreactividad del receptor alfa estrógeno

ER β : Receptor beta estrógeno

MeA: Amígdala Medial

mPOA: Área Preóptica Medial

NMA: N-metil-DL-ácido aspártico

OB: Bulbo Olfatorio

OT: Oxitocina

T: Testosterona

BST: Lecho del núcleo de la estría terminal

LHb: Núcleo lateral habenuar

LS: Septo lateral

1. Introducción

1.1 Clasificación de los cuidados paternos en los roedores

En los mamíferos, en los que la hembra ha desarrollado estrategias reproductivas que le permite cuidar sola a sus crías, los cuidados paternos son poco comunes. Sin embargo, en algunas especies de estos vertebrados los machos permanecen con la hembra después del apareamiento y proporcionan cuidados a sus crías (Dewsbury 1985; Clutton-Brock 1991). Esta conducta ha sido observada en algunos carnívoros, primates y roedores (Kleiman y Malcom 1981).

La conducta paterna se define como el conjunto de actividades que realiza el macho en beneficio de las crías, que pueden aumentar la sobrevivencia de éstas (Clutton-Brock 1991). En los roedores, los cuidados paternos pueden clasificarse en directos e indirectos (Clutton-Brock 1991). Entre los directos, se incluyen aquellas actividades que benefician directamente a las crías como son: el abrigo (el macho reduce la pérdida de calor, colocándose encima de las crías en forma de carpa), acicalamiento de las crías (el macho lame a las crías colaborando con la limpieza del cuerpo y estimulando el área urogenital para eliminar los desechos de las mismas), recuperación de las crías (el macho regresa a las crías al nido), olfateo de las crías (el macho olfatea a las crías y hace contacto con ellas, para reconocerlas y estimularlas), juego y sociabilización de las crías (el macho asiste a las crías en la exploración de su ambiente físico y social) (Fig. 1, 2, 3 y 4). Los cuidados indirectos los constituyen aquellas actividades que no implican interacciones padre-hijo, entre éstos se encuentran la obtención del alimento (el macho almacena alimento que es

consumido por la hembra durante la lactancia, así mismo, este alimento también puede ser consumido por las crías después del destete (en el caso del gerbo de Mongolia ocurre entre la tercera y cuarta semana), construcción del nido (el macho construye o asiste en la construcción de la madriguera, zona de anidación y nido, así como en su mantenimiento, debido a que esto incrementa la sobrevivencia de la progenie), provisión de cuidados a la madre (el macho evita que se acerquen otros machos) y defensa ante depredadores (el macho alerta a la hembra y a las crías de la presencia de los depredadores) (Dewsbury 1985).



Fig. 1 Abrigo: el macho curva el cuerpo haciendo una concavidad en la región ventral, en la cual coloca a las crías.



Fig.2 Acicalamiento: el macho lame todo el cuerpo de las crías, principalmente, la región urogenital.



Fig. 3 Olfateo: el macho aproxima la nariz a la cría mientras mueve rítmicamente las vibrisas, tocando a la cría con la nariz.



Fig. 4. Recuperación de las crías: el macho regresa a las crías al nido.

1.2 Evolución de la conducta paterna

Varios estudios han examinado la importancia del cuidado paterno principalmente en las aves (Bart y Tornes 1989; Mock y Fujioka 1990). En estos vertebrados los machos tienen la misma capacidad que las hembras para incubar a las crías y alimentar a los polluelos, y por lo tanto, una alternativa viable reproductiva a la deserción es que los machos permanezcan en pareja e inviertan en el cuidado

de las crías, en lugar de buscar otras compañeras. En algunas especies de aves la presencia del macho es indispensable para la supervivencia de las crías, mientras que en otras, la presencia del macho no tiene ningún efecto en la supervivencia de éstas (Bart y Tornes 1989).

Considerando que el éxito reproductivo de los mamíferos depende principalmente de la inversión de tiempo y energía dedicada a la crianza por las hembras (Trivers 1972); se podría esperar que el éxito reproductivo de los machos mamíferos sea máximo al aparearse con varias hembras, en lugar de permanecer con una sola pareja. De hecho, ésta parece ser la estrategia en la mayoría de las especies de los mamíferos. No obstante, el 6% de los machos de las especies de estos vertebrados, cambian su estrategia reproductiva, permaneciendo en pareja e invirtiendo en cuidados paternos (Kleiman y Malcolm 1981). Por ejemplo, en los roedores, la participación del macho en el cuidado de las crías ha sido descrita en varias especies tales como, el ratón de California (*Peromyscus californicus*), ratón de las praderas (*Microtus ochrogaster*), hámster enano (*Phodopus campbelli*), gerbo de Mongolia (*Meriones unguiculatus*), entre otros (Elwood 1983).

Se ha sugerido que la conducta paterna evolucionó como una respuesta a condiciones ecológicas locales, por lo cual la presencia de cuidados paternos en los mamíferos ha sido registrada en una variedad de especies que no tienen una relación filogenética, por lo cual no existe ninguna hipótesis del origen evolutivo de

esta conducta. Sin embargo, puede ser una respuesta a condiciones ambientales locales. No obstante, la presencia de cuidados paternos en los mamíferos es una estrategia reproductiva secundaria (Elwood 1983). La presencia del macho durante la lactancia incrementa la posibilidad de sobrevivencia y el crecimiento de las crías (Clutton-Brock 1991; Cantoni y Brown 1997; Wynne-Edwards y Timonin 2007).

1.3 Factores que regulan la conducta paterna

Dewsbury (1985) y Brown (1993) han propuesto que varios factores pueden influir en la presencia de la conducta paterna: sociales, hormonales y neurales.

1.3.1 Factores sociales

La cantidad y el tipo de cuidados paternos en los roedores no sólo están en función de las diferencias entre especies, sino que también pueden verse afectadas por el medio. Por ejemplo, Storey y Snow (1987) observaron que el ratón de las praderas reduce los cuidados paternos, cuando otro macho se aloja cerca de su nido, posiblemente porque la cercanía del otro macho pone en duda su paternidad. Este cambio en la conducta paterna ocasiona una disminución en el peso y la supervivencia de las crías. En el ratón de California, en condiciones de campo, también se ha demostrado que la supervivencia de las crías disminuye cuando el padre está ausente (Gubernick y Teferi 2000).

La presencia de cuidados paternos en los roedores depende de la organización social de la especie, por ejemplo, en los roedores monógamos es más probable que el macho participe en el cuidado de las crías que en las especies

polígamas (Roberts *et al.* 1998). En las especies monógamas, tanto la hembra, como el macho, invierten energía en el cuidado de las crías, en estos mamíferos los cuidados paternos se correlacionan positivamente con la probabilidad de supervivencia de las crías (Trivers 1972; Sheldon 2002; Alonzo 2010).

Algunas especies de roedores, que no son propiamente paternas, se convierten en paternas cuando las condiciones ambientales se tornan difíciles; a esto se le conoce como "conducta paterna facultativa". En el ratón meteorero del prado (*Microtus pennsylvanicus*), los machos permanecen en el nido, con su pareja durante los días cortos, lo cual coincide con los meses más fríos del año, posiblemente para mantener la termorregulación de las crías (Parker y Lee 2002). Durante este periodo abrigan, acicalan y recuperan a sus crías (Parker y Lee 2001). En condiciones de laboratorio, la conducta paterna en este roedor tiene un efecto positivo en el crecimiento de las crías, pero no aumenta la tasa de supervivencia (Storey y Snow 1987). La conducta paterna facultativa del ratón meteorero del prado, parece estar significativamente influida por la hembra, la cual es altamente territorial durante el verano, lo que impide el acercamiento del macho al nido, con el fin de prevenir el infanticidio. No obstante, en el invierno permite que el macho anide con ella y con sus descendientes (Parker y Lee 2002).

La experiencia con las crías puede afectar la conducta paterna, como se muestra con la sensibilización, proceso que consiste en la exposición repetida a las crías para inducir la conducta paterna (Rosenblatt 1967; Rosenblatt y Ceus 1998). Las crías del ratón meteorero del prado al ser cuidadas por ratones de las praderas, los

cuales son más paternas que los del prado, cuando crecen y se reproducen, proporcionan más cuidados a sus hijos, que sus hermanos que fueron criados por sus propios padres (McGuire 1988). Contrariamente, cuando crías del ratón de California, roedor altamente paternal, son criadas por ratones de patas blancas (*Peromyscus leucopus*), que presenta poca frecuencia de recuperación, se observó que al convertirse en padres exhiben un patrón de recuperación similar al de sus padres adoptivos (Bester-Meredith *et al.* 1999). Estas modificaciones de la conducta fueron heredadas a las siguientes generaciones (Marler *et al.* 2005). Actualmente, se conoce que las bases moleculares de estos cambios en la conducta, generados en respuesta al ambiente, implican eventos epigenéticos que pueden ser transmitidos de una generación a la siguiente (James *et al.* 2011).

En el topillo mandarín (*Microtus mandarinus*) el cuidado que proporcionan los hermanos mayores de la primera camada, a los de la segunda camada (conducta alopaterna), durante el desarrollo temprano, aumenta la actividad locomotora, la interacción social y el cuidado materno, cuando alcanzan la edad adulta. Así mismo, los individuos que proporcionan cuidados alopaternos, en la edad adulta también proporcionan más cuidados a sus hijos, a la vez que reducen sus niveles de ansiedad y agresión. Por lo tanto, dar y recibir cuidados aloparentales tiene evidentes beneficios para la especie (Ruiyong *et al.* 2013).

El comportamiento de cuidar a las crías en sistemas cooperativos de crianza, como el de la mangosta (*Herpestidae*) muestra que los cuidados paternos no están restringidos a los padres, debido a que las crías permanecen en el nido de los

machos y hembras subordinados y raras veces en el materno. Los subordinados regularmente son los hijos de la hembra reproductora. En estos sistemas el número de individuos subordinados está relacionada directamente con la supervivencia de las crías (Clutton-Brock *et al.* 1998; Cant 2003). En las suricatas (*Suricata suricatta*) los individuos más pesados se encargan del cuidado de las crías (Clutton-Brock *et al.* 1998), por lo tanto este comportamiento se ha sugerido podría estar mediado por el estado nutricional de los individuos (Cant 2003).

La hembra también es un factor que influye en los cuidados paternos; por ejemplo, en el ratón Gunther (*Microtus guenteri*), especie en la que ambos padres participan en el cuidado de las crías, tanto la conducta materna, como paterna parecen ser forzados por la pareja. En este roedor cuando el macho o la hembra se alejan del nido son interceptados por su pareja, que arrastra a su compañero o compañera de vuelta al nido, sujetándolo con el hocico, presumiblemente para que permanezca cuidando a las crías. Este comportamiento persiste hasta que la pareja es regresada al nido. Los mecanismos que regulan esta conducta son aún desconocidos (Libhaber y Eilam, 2002).

En un estudio de campo con la ardilla suslik Europea (*Spermophilus citellus*), especie promiscua, que normalmente se espera que no presente conducta paterna, se observó, que algunos machos cavan madrigueras para que sus hijos tengan donde alojarse al ser destetados. Como resultado los hijos de estos machos cavadores tuvieron significativamente mayor peso al salir de la madriguera, que los hijos de los machos no cavadores, debido a que no invirtieron energía en la

construcción de su propia madriguera. El esfuerzo del padre cavador se considera una conducta paterna indirecta (Huber *et al.*, 2002).

1.3.2 Factores hormonales

1.3.2.1 Prolactina

La prolactina (PRL) es una hormona proteica sintetizada en la adenohipófisis, secretada por las células lactotropas, cuya función más conocida es estimular la secreción láctea, aunque también participa en la regulación de otros eventos como la conducta materna, el estrés y los cambios del fotoperiodo (Bridges *et al.* 1997).

En la rata de laboratorio (Sprague-Dawley) esta hormona participa en el inicio de la conducta materna, pero no es necesaria para su mantenimiento (Bridges *et al.* 1997).

Para determinar si la PRL participa en la regulación de la conducta paterna, a machos del ratón de la pradera se les administró bromocriptina, un agonista de la dopamina, para disminuir las concentraciones de esta hormona. Este tratamiento no tuvo efecto sobre la conducta paterna, por lo que se sugiere que la PRL no es esencial en el cuidado paterno de este roedor (Lonstein y De Vries 2000).

En otro estudio, machos y hembras adultos vírgenes del ratón de la pradera, que fueron expuestos diariamente a crías de la especie, se observó que las concentraciones de PRL en plasma y la expresión del RNAm del receptor a esta hormona fueron más altos en los machos expuestos a las crías, que en las hembras

vírgenes. Sin embargo, tanto en los machos, como en las hembras, después de la exposición a las crías se observó un incremento en las concentraciones de PRL y en la expresión del RNAm de su receptor (Khatib *et al.* 2001).

En el ratón de California, Gubernick y Nelson (1989) observaron que hay un aumento del 35% de la PRL en el día 2 después del parto, pero las concentraciones de referencia en este estudio fueron aproximadamente 50 veces mayores que en otros roedores, por lo que ellos concluyen que estos resultados no son confiables. Asimismo, machos del hámster enano, con bajas concentraciones de PRL, no despliegan conducta de recuperación. Estas observaciones sugieren que la PRL podría estar involucrada en la regulación de la conducta paterna. (Gubernick y Nelson 1989; Brown, 1995; Reburn y Wynne-Edwards 1999). No obstante, un primer estudio experimental en el hámster enano, en el cual fue suprimida la secreción de PRL hipofisiaria, antes del nacimiento de las crías, utilizando dos agonistas dopaminérgicos, mesilato de bromocriptina y cabergolina. Se observó que aunque las concentraciones de PRL se redujeron significativamente, ningún parámetro de la conducta paterna fue afectado. Por lo que se concluyó que la PRL de origen hipofisiario no tiene ninguna función en la regulación de esta conducta, aunque no se descarta que la PRL de origen cerebral pudiera estar implicada en la regulación de esta conducta (Brooks *et al.* 2005).

1.3.2.2 Progesterona

La progesterona es una hormona esteroide, que en los roedores machos se sintetiza en las glándulas adrenales. Estudios recientes demuestran que en el ratón

de laboratorio (*Mus musculus*), la progesterona facilita la agresión directa hacia las crías y suprime la conducta paterna (Schneider *et al.* 2003). En el ratón de California las concentraciones de esta hormona son más bajas en los machos que cohabitan con sus hijos que en los vírgenes, lo cual no se había reportado previamente en ningún mamífero bipaterno. Además, las concentraciones de progesterona se correlacionaron negativamente con la actividad de la aromatasa en el área preóptica medial (mPOA). El descenso en las concentraciones de progesterona y el incremento en la actividad de la aromatasa pueden contribuir en la conducta paterna en este roedor (Trainor *et al.* 2003). Sin embargo, en el hámster enano no se encontraron variaciones en las concentraciones de progesterona entre los machos que siempre recuperan a sus crías y los que nunca exhibieron esta conducta. Además, en ambos grupos las concentraciones de esta hormona se incrementaron desde el día 17 del periodo de gestación hasta el día 1 de la lactancia. Estos resultados no apoyan la hipótesis de que los machos que exhiben cuidados paternos tienen concentraciones de progesterona más bajas que los no paternos (Schum y Wynne-Edwards 2005).

1.3.2.3 Vasopresina y Oxitocina

La oxitocina (OT) es un neuropéptido sintetizado por células nerviosas en el núcleo paraventricular y el núcleo supraóptico del hipotálamo, de donde es transportada por los axones de neuronas hipotálamicas hasta sus terminaciones en la porción posterior de la hipófisis (neurohipófisis), esta hormona ha sido relacionada con el establecimiento de la pareja en los roedores monógamos (Young *et al.* 1999).

La vasopresina (AVP) es una hormona peptídica sintetizada en los núcleos hipotalámicos supraóptico, paraventricular y supraquiasmático, y se almacena en la neurohipófisis. Esta hormona desempeña un papel muy importante en el establecimiento de la pareja en aquellas especies naturalmente bipaternas. Por otra parte, se señala que también intervienen en el desarrollo de la conducta paterna (Young 1999).

Utilizando técnicas de autorradiografía, Parker *et al.* (2001) determinaron la distribución de los receptores de AVP y OT en el cerebro de ratones de la pradera, con experiencia sexual y vírgenes con experiencia alopaterna. Los machos con experiencia alopaterna presentaron una mayor cantidad de receptores a AVP en el núcleo olfatorio y el *septum* lateral (LS). Mientras que la expresión de OT fue muy similar entre los grupos, lecho del núcleo de la estría terminal (BST) y la amígdala lateral (Parker *et al.* 2001).

En otro estudio, en el cual se midieron las concentraciones periféricas de OT, en machos con experiencia sexual y vírgenes del ratón de California, a través de su ciclo reproductivo, se encontró que las concentraciones de OT fueron mayores en los machos con experiencia sexual que en los vírgenes, en el día 1 del apareamiento. No obstante, en ambos grupos, las concentraciones de OT disminuyeron, a partir del día 20 de la gestación, permaneciendo sin cambios el resto del ciclo reproductivo. Estos resultados indican que la OT, no está involucrada en la regulación de la conducta paterna de este roedor (Gubernick *et al.* 1995).

Wang *et al.* (2000) señalaron, en su ciclo reproductivo de los machos de los ratones de la pradera y de las montañas, que no ocurre ningún cambio en la expresión de receptores a OT que en el hipotálamo, que pudiera asociarse con la exhibición de cuidados paternos, a diferencia de las hembras de estas especies, en las cuales la expresión de receptores OT aumentó al nacimiento de las crías. Recientemente, en machos del topillo Mandarín, en diferentes condiciones reproductivas: vírgenes, apareados y nuevos padres, que interactuaron con crías recién nacidas de la especie, se cuantificó la inmunoreactividad de OT, tirosina hidroxilasa, y la expresión (ARNm) de los receptores de oxitocina (OTR) y de los receptores a dopamina de tipo 1 (D1R) y tipo 2 (D2R), en regiones neurales como el núcleo acumbens (NAc) y la MeA. Los resultados mostraron que los nuevos padres, quienes tuvieron más interacción con las crías, que los machos apareados y vírgenes, presentaron también una mayor inmunoreactividad de OT y tirosina hidroxilasa. La expresión de ARNm OTR, D1R y D2R, en NAc, también fue mayor comparada con la observada en los machos apareados. Estos resultados muestran que los machos con diferentes experiencias reproductivas, exhiben diferentes respuestas paternas, y que estas diferencias están asociadas con la expresión de OT, tiroxina hidroxilasa, OTR y receptores a dopamina, en regiones específicas del cerebro (Wang *et al.* 2015).

La AVP es otra hormona que ha sido asociada con la regulación de la conducta paterna; en el ratón de las praderas, la administración de AVP en el LS, induce mayor contacto y abrigo de las crías. Estas actividades paternas

disminuyen, cuando se administra un antagonista del receptor V1a (Wang *et al.* 1994). En este mismo roedor, la inmunoreactividad a AVP, en el LS y núcleo lateral habenular (LHb), varía a través del ciclo reproductivo; durante el primer tercio de la gestación de su pareja la inmunoreactividad a AVP es muy baja y alcanza niveles medios de expresión después del nacimiento de las crías, observándose una mayor inmunoreactividad al final de la gestación. Cabe señalar, que los machos vírgenes de este roedor también presentan una alta inmunoreactividad a AVP, en el LS y LHb. La inmunoreactividad de AVP, en estas regiones cerebrales disminuye, sí al macho se le permite cohabitar con una hembra desconocida, pero no con un macho desconocido. Estos resultados sugieren que la AVP está involucrada en la regulación de la conducta paterna, así como en otros comportamientos sociales que cambian después del apareamiento (Bamshad *et al.* 1994).

1.3.2.4 Testosterona y sus metabolitos

La T es una hormona esteroide producida principalmente por el testículo, y las glándulas suprarrenales en pequeñas cantidades. Esta hormona regula una variedad de fenómenos reproductivos en el macho; por ejemplo, la producción de espermatozoides, la competencia en los machos, la conducta de cortejo, la conducta de apareamiento y recientemente ha sido implicada en la conducta paterna (Monaghan y Glickman 1992). Es el principal esteroide que lleva a cabo el proceso de diferenciación sexual del Sistema Nervioso Central. Aunque los esteroides, como la T y sus metabolitos, no siempre actúan en el cerebro en su forma nativa, sino que son metabolizados a otra forma que es la verdaderamente “activa” (Callard 1984).

Las principales enzimas que transforman los esteroides en el cerebro son la aromatasa y la 5 alfa-reductasa (Fig. 5). La T al ser aromatizada se transforma en E₂, mientras que al ser reducida por la 5 alfa-reductasa, se convierte en dihidrotestosterona (DHT) (Torres y Ortega 2003).

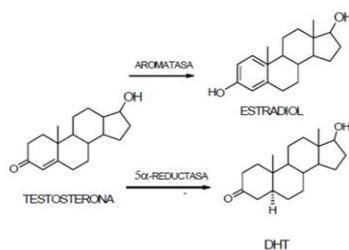


Fig. 5: Vías enzimáticas de la 5alfa-reductasa y aromatasa (Tomado de Torres y Ortega 2003).

Por lo general, se ha establecido que las concentraciones de T se incrementan antes del nacimiento, pero disminuyen drásticamente en el momento del parto en las especies de roedores que muestran el comportamiento paterno (Brown *et al.* 1995; Reburn y Wynne-Edwards 1999). Sin embargo, en el gerbo de Mongolia se ha indicado que las concentraciones de T no disminuyen en el momento del parto, ni cuando proporcionan cuidados paternos (Luis *et al.* 2010).

En los ratones CF-1, la administración de T induce el infanticidio, mientras que la castración lo reduce. Esto llevó a pensar que una disminución de la T periférica evitaba el infanticidio (Perrigo *et al.* 1989). Posteriormente, se observó que en el ratón de California la castración ocasiona una disminución de los cuidados paternos, mientras que el reemplazo con T incrementa el cuidado de las crías (Trainor y Marler

2001). Se concluyó que la T es capaz de estimular la conducta paterna en este ratón. No obstante, se observó que la T ejerce sus efectos a través de su aromatización a E₂ (Trainor y Marler 2002), que a su vez es la hormona que induce el comportamiento paterno cuando se implantan en el área preóptica medial (mPOA) (Rosenblatt y Ceus 1998). De hecho, machos del ratón de California castrados y tratados con un inhibidor de la aromatasa en combinación con T invirtieron menor tiempo en el abrigo y acicalamiento (Trainor y Marler 2002).

El ratón de los volcanes (*Neotomodon alstoni*), roedor endémico de México, en el cautiverio, exhibe altos niveles de cuidados paternos (Luis *et al.* 2000). En este roedor se mostró que concentraciones altas de T facilitan la exhibición de cuidados paternos; machos indiferentes o agresivos hacia crías ajenas de la especie, se convierten en paternales después del reemplazamiento con T, a diferencia de los machos que reciben implantes vacíos (Luis *et al.* 2012).

En el topillo rojo (*Myodes glareolus*), roedor de Gran Bretaña, concentraciones altas de T están asociadas a la exhibición de cuidados paternos, lo cual sugiere que uno de los factores que promueve la respuesta paterna en este roedor, es un aumento en la concentración de T (Gromov y Osadchuck 2013).

En los ratones *knockout* para ER α no inician ataques en pruebas intruso-residente, incluso después de la administración diaria de propionato de T; y en el ratón silvestre la castración, fue capaz de restablecer la agresión. Sin embargo, las tasas de infanticidio fueron significativamente mayores en los ratones *knockout*, en

comparación con sus homólogos de tipo silvestre. Esto condujo a que los investigadores propusieran que la administración de T es capaz de mantener el comportamiento de infanticidio a través los receptores de andrógenos o receptores beta estrogénicos, mientras que la agresión hacia un intruso está probablemente, mediada a través del ER α (Ogawa *et al.* 1998).

Sin embargo, hay autores que señalan que el infanticidio no siempre se correlaciona con las concentraciones de T periférica (Gandelman y Vom Saal 1975). Aunque la administración de E₂ es reconocido por iniciar el comportamiento paterno, la concentración endógena de esta hormona no aumenta en el hámster enano, pero se observó que aumentaba antes del nacimiento y durante el desarrollo postnatal de la descendencia en el hámster Siberiano (especie no parental), con una disminución notable en torno al nacimiento (Rosenblatt y Ceus 1998).

1.3.2.5 Glucocorticoides

Los glucocorticoides son producidos en la corteza de las glándulas suprarrenales, y se sabe que responden a cambios sociales. La formación de parejas en el primate cabeza de algodón, en el ratón de la pradera y en el hámster enano produce en los machos una reducción en la concentración de esta hormona (Ziegler *et al.* 1996; Castro y Matt 1997; Wynne-Edwards y Reburn 2000). Los aumentos en el cortisol del plasma se asocian positivamente con la provisión de cuidados paternos de los suricatos (*Suricata suricatta*) machos subordinados (Carlson *et al.* 2006). Mientras que en el hámster enano, especie biparental, la concentración de corticosterona se reduce significativamente después de la formación de la pareja,

esto no es observado en el hámster Siberiano (especie promiscua). En el hámster enano las concentraciones de corticosterona también aumentan después del nacimiento (Reburn y Wynne-Edwards 1999). Lim *et al.* (2006) citan una distribución muy variable en los receptores del factor liberador de corticosterona entre los ratones monógamos y promiscuos. Empleando la hibridación *in situ* y técnicas de inmunohistoquímica, examinaron la asignación de los dos ligandos endógenos para estos receptores en el cerebro en diferentes especies de roedores. En general, se reportó una distribución altamente conservada en el factor de liberación de la corticosterona y urocortina-1 dentro de las regiones del cerebro, tales como el bulbo olfatorio (OB), núcleo accumbens, área preóptica medial (mPOA) y el lecho del núcleo de la estría terminalis (BST), entre cada especie del ratón, lo que sugiere un papel importante en la disponibilidad del receptor en la vinculación con una pareja y en el cuidado parental (Lim *et al.* 2006).

La administración del factor liberador de corticosterona (DeVries *et al.* 2002), la corticosterona, o la exposición a nado forzado (De Vries *et al.* 1996) en los machos es suficiente para iniciar la vinculación con su pareja después de 3 h de cohabitación con una hembra. Sin embargo, en la hembra estas precondiciones inhiben la vinculación con su pareja (De Vries *et al.* 1996). En el caso del comportamiento de los padres, los glucocorticoides también parecen ser dimórficos sexualmente. Por ejemplo, Bales *et al.* (2006) introdujeron un macho y una hembra del ratón de las praderas con un factor de estrés (prueba de nado forzado) o sin factor de estrés, cuarenta y cinco minutos más tarde, se utilizó una prueba de cuidado parental para

evaluar conductas, como abrigo, acicalamiento, aseo personal y la recuperación de las crías. Después de finalizar la prueba se determinó la concentración de corticosterona en el plasma. En los machos, la exposición al estrés facilitó la conducta paterna y la concentración de corticosterona estuvo directamente relacionada con el número de recuperaciones de las crías, pero se asoció negativamente con el comportamiento de acicalamiento y aseo personal; las hembras no alteraron su conducta materna (Bales *et al.* 2006).

Curiosamente, Samuel *et al.* (2008) observaron que la administración intracerebro-ventricular de urocortina II (proteína estructuralmente relacionada con el gen factor liberador de corticosterona) se relacionó con un aumento en la cantidad de los cuidados paternos como el abrigo, tanto en los ratones de las praderas machos y hembras, sin provocar ansiedad.

La mayoría de los estudios relacionados con péptidos de estrés y la conducta paterna se centran específicamente en las concentraciones endógenas de corticosterona en condiciones parentales, mientras que uno de los primeros estudios de tamarinos (*Saguinus oedipus*), naturalmente paternos, sugiere que esta hormona no altera el comportamiento de los padres (Ziegler *et al.* 2004). Sin embargo, en la rata macho se indica que el aumento de corticosterona junto con la evitación inicial a crías ajenas, disminuye con la sensibilización (Koranyi y Endroczi 1987). En general, estos datos sugieren que los glucocorticoides tienen efectos diferentes entre el sexo y la especie.

1.3.3 Factores Neuroendocrinos

Newman (1999) destacó la complejidad de las superposiciones en los circuitos neurales que regulan los comportamientos sociales en los mamíferos. Estos comportamientos sociales incluyen la conducta sexual masculina y femenina, la agresión ofensiva y la conducta paterna. Las regiones neurales, que posiblemente estén implicadas en la regulación de las conductas sociales son: la mPOA/BST (área preóptica medial/ cama del núcleo de la estría terminalis), MeA (amígdala medial) y LS (septo lateral). Se ha planteado que hay una red central común que regula una variedad de comportamientos sociales, y que cuando un comportamiento se produce puede estar regulado por los estímulos que tienen acceso a ese circuito social (Newman 1999).

Los esteroides, como los estrógenos y la T, pueden ejercer su efecto modulador en los sistemas neurales, por medio de la vía genómica (la cual involucra mecanismos de transcripción de genes) o por efectos de membrana (por acción directa sobre la membrana neuronal), cambiando cualidades del neurotransmisor y/o de sus receptores, lo cuales inciden en la emisión de la conducta inhibiéndola o facilitándola (Mani *et al.* 1997). Varios estudios han señalado que el mPOA, MeA y OB, tienen un papel central en la regulación de la conducta parental (Numan 1994; Morgan *et al.* 1999; Kirkpatrick *et al.* 1994).

La conducta paterna, como la materna, es regulada por factores neurales, endocrinos y sociales. En diversos estudios se menciona que en los mamíferos ocurren cambios hormonales que están asociados con el encendido de la conducta

paterna; hormonas como la testosterona y la prolactina, entre otras, podrían estar implicadas en la regulación de esta conducta (Brown *et al.* 1995; Reburn y Wynne-Edwards 1999; Ziegler y Snowdon 2000; Nunes *et al.* 2001).

1.3.3.1 Área Preóptica Medial (mPOA)

Aunque a la fecha son muy pocos los estudios realizados sobre la regulación neural de la conducta paterna, los resultados de éstos señalan que mPOA, tiene un papel central en la regulación de esta conducta, como ocurre en la materna. Tomando en cuenta la hipótesis que señala que los mecanismos neuroendocrinos que regulan la conducta materna son homólogos a la paterna. Diversos estudios han mostrado que mPOA tiene una función central en la regulación de la conducta materna; Fisher (1956) observó que lesionando el área mPOA e hipotálamo anterior químicamente o con radiofrecuencia, se afecta el inicio y el mantenimiento de la conducta materna en ratas primíparas y multíparas.

El mPOA recibe aferencias de una amplia variedad de sistemas neuronales, así como del sistema vomeronasal, respecto a las proyecciones eferentes, la evidencia experimental ha puesto de manifiesto que las proyecciones laterales que van del centro de este núcleo a la región lateral y al área tegmental ventral, parecen ser las más directamente implicadas en el control neural de la conducta materna, tanto en ratas (Numan 1974; Numan y Callahan 1980; Miceli *et al.* 1983; Numan y Corodimas 1985), como en hámster (Marques *et al.* 1979; Miceli y Malsbury 1982).

Numan y Callahan (1980) al interrumpir las conexiones anteriores, dorsales, posteriores y laterales del mPOA, encontraron que sólo las lesiones laterales afectaron la conducta materna, causando alteraciones en los patrones de construcción del nido y recuperación de las crías. Esta última conducta desapareció permanentemente, esta afectación no se puede atribuir a la afectación de funciones motoras, puesto que las ratas lograban recoger dulces u objetos de peso y tamaño similar al de la cría. Posteriormente, estos investigadores han manifestado que la lesión química del mPOA con N-metil-DL-ácido aspártico (NMA), un aminoácido excitotóxico, suprime el inicio de la conducta materna en la rata (Numan *et al.* 1985). Puesto que NMA destruye selectivamente los cuerpos neuronales dejando intactas las fibras de paso (Olney 1979 y 1987). Estos resultados indican que además de las conexiones eferentes también las neuronas del mPOA son importantes para que la conducta materna se manifieste (Numan *et al.* 1988).

La importancia de mPOA en la regulación de la conducta paterna ha sido mostrada a través de estudios de lesión y utilizando marcadores de actividad neural; cuando el macho del ratón de California es sometido a lesiones en el mPOA, éstos muestran una latencia significativamente mayor en la exhibición de la conducta paterna e invierten menos tiempo en el olfateo y acicalamiento de las crías, con respecto a los ratones controles. Sin embargo, estas lesiones no producen una reducción en el tiempo que los machos invierten en el abrigo de las crías. Estos resultados sugieren que los mecanismos neurales que controlan la conducta paterna

son similares a los de la conducta materna en esta especie (Gubernick y Alberts 1987).

Por otra parte, cuando a machos de la rata de laboratorio se les colocan implantes de estrógeno y progesterona en mPOA se induce la exhibición de cuidados muestran paterno, aun cuando estos roedores no paternales de manera natural (Rosenblatt y Ceus 1998).

1.3.3.2 Amígdala y Sentido del Olfato

El género *Microtus* está integrado por ratones promiscuos y monógamos que difieren en la localización neuronal de los receptores a la arginina-vasopresina (AVP) y a la oxitocina (OT); en las especies monógamas estos receptores se distribuyen en la amígdala, un órgano neural asociado con la conducta bipaterna. Mediante la autorradiografía se ha examinado si la distribución de los receptores a AVP y OT está asociada con la conducta paterna facultativa en los machos de *Microtus pennsylvanicus*, con o sin experiencia sexual y paterna. Los ratones con experiencia sexual y paterna en contraste con los inexpertos tienen menos receptores a AVP en el LS y más en el núcleo olfativo anterior (AON). Contrariamente la cantidad de receptores a la OT es mayor en el AON, en el BST, en el LS y en la amígdala lateral. Sin embargo, este patrón de receptores a AVP que se presenta en los ratones machos con cuidados paternos naturales, cuando están participando en el cuidado de sus crías, también puede ser observado en los machos que no presentan cuidados paternos de manera natural, cuando se les induce a exhibir conducta paterna (Bamshad *et al.* 1994).

1.4 Receptores AR y ER

1.4.1 Receptores Estrogénicos

Los ER pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares (RN), los cuales son factores de transcripción que regulan la expresión génica de manera dependiente de su unión al ligando y en respuesta específica a señales fisiológicas y/o patológicas. Los ER α y ER β son codificados por diferentes genes localizados en los cromosomas 6q25.1 y 14q23-24.1, respectivamente, y su expresión varía dependiendo del tipo de tejido. El ER α es expresado predominantemente en órganos del sistema reproductor (útero, mama y ovario), sin embargo, también existen reportes de su expresión en hígado y el sistema nervioso central; en tanto el ER β se expresa mayoritariamente en otros tejidos como hueso, endotelio, pulmones, tracto urogenital, ovario, sistema nervioso central y próstata (Raj *et al.* 2011).

1.4.1.1 Dominios

El ER α está formado por 595 aminoácidos, compuesto por 6 dominios designados de la A a la F. El dominio N-terminal (región A-B) tiene una función de activación transcripcional independiente del ligando (TAF-1) participa tanto en interacciones intra e inter moleculares, así como en la transcripción de genes. Los dominios de unión al DNA (DBD o región C) contienen dos dedos de zinc que son altamente conservados en todos los receptores a hormonas esteroideas. El dominio bisagra (región D) tiene un papel importante en la dimerización de estos receptores y en la unión de proteínas de choque térmico. Por su parte, el dominio de unión a

hormonas (HBD, regiones E/F y C-terminal), tiene la función de activación transcripcional dependiente de hormonas (Raj *et al.* 2011). El dominio F es una región variable que incluye la secuencia para la hélice 12 de la molécula, la cual es probablemente importante para la diferencia en la respuesta de los ERs al E₂ y a los moduladores selectivos para los receptores a estrógenos. Los ER contienen dos regiones llamadas funciones de activación (AFs) que son importantes para la actividad transcripcional dependiente del ligando. Las regiones AF-1 y AF-2, interaccionan con coactivadores transcripcionales. El AF-1, podría ser activado de forma independiente del ligando, dependiendo del estado de fosforilación del ER. Los residuos ser118 en la región AF-1 del ER α , así como de los residuos ser106 y ser124 en la región AF-1 del ER β , son sitios de fosforilación esenciales para la activación independiente del ligando de los ER a través de la cascada de señalización de la proteína cinasa activada por mitógeno (Raj *et al.* 2011, Fig. 6).

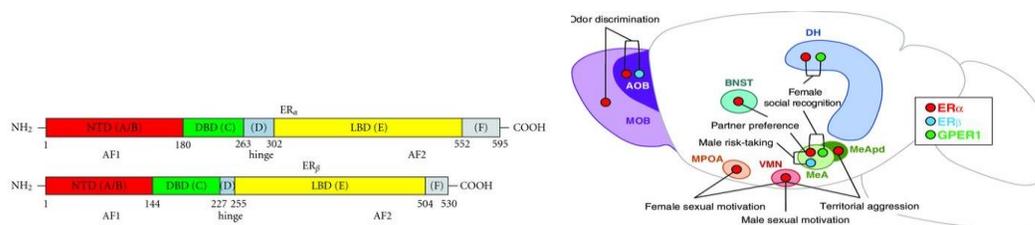


Fig. 6. Estructura y sitios de ubicación de ER α y ER β (tomado de Raj *et al.* 2011 y Ervin *et al.* 2015).

1.4.1.2 Mecanismo de acción de los ER

El mecanismo genómico clásico de acción del ER ocurre normalmente en horas, resultando en la activación o represión de los genes blanco. En la vía de

señalización clásica, la unión del ligando al ER provoca un cambio conformacional y la disociación de las proteínas de choque térmico, promoviéndose la homodimerización y la unión con una alta afinidad a los elementos de respuesta a estrógenos, los cuales son secuencias palindrómicas en un promotor de un gen (Gogos, *et al.* 2015).

Después de la unión con el ligando los ER interactúan con cofactores (coactivadores o correpresores) para regular la expresión génica, y dependiendo de los corre reguladores presentes en la célula, el complejo estrógeno-ER puede tener diversos efectos. El reclutamiento de corre reguladores depende de la unión del ligando probablemente atribuible a las diferentes conformaciones con los diferentes ligandos (Gogos, *et al.* 2015).

Los ER también pueden actuar de forma independiente (mecanismo no genómico) del ligando para alterar la transcripción de genes, pueden ser fosforilados directamente permitiendo la unión a ER o la unión al DNA indirectamente vía factores de transcripción, y así modular la transcripción en ausencia de la unión al ligando. Así, se ha reportado que la activación del factor de crecimiento epidérmico requiere del ER y este factor puede estimular la proliferación. Por otra parte, la fosforilación en sitios específicos de serina como ser104 y ser106 son importantes para la activación de la transcripción independiente del ligando. También, se ha demostrado que la activación de la vía de las cinasas dependiente de cAMP o MAPK son activadas por la fosforilación en el ER α , y se ha reportado que puede ser fosforilado en tirosina (Gogos, *et al.* 2015).

Las acciones del ER relacionados al metabolismo energético son los ER extranucleares, que modulan directamente la expresión de genes o que actúan indirectamente con eventos nucleares. El E₂ puede activar directamente vías de señalización rápidas produciéndose efectos en minutos o segundos vía ER asociados a membrana. Los ER α y ER β están localizados en caveolas donde se asocian con otras moléculas, como proteínas G, receptores a factores de crecimiento, tirosina cinasas y receptores acoplados a proteínas G, facilitando la interacción y la rápida señalización. Los estrógenos que se unen a receptores acoplados a proteínas G pueden activar una vía de señalización rápida por cinasas como, PI3K, MAPK y la movilización de calcio intracelular (Gogos, *et al.* 2015, Fig. 7).

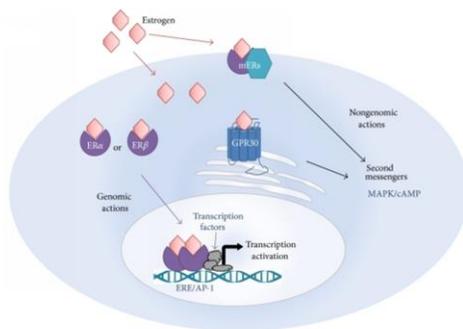


Fig. 7. Mecanismos de acción de los ER's (tomado de Gogos, *et al.* 2015).

1.4.2 Receptor andrógeno (AR)

El AR, también conocido como NR3C4, es un tipo de receptor nuclear que se activa mediante la unión de la T o DHT en el citoplasma y la translocación en el núcleo. La función principal del AR es la unión al ADN factor de transcripción que regula la expresión génica, sin embargo, el AR tiene otras funciones también. Los

genes regulados por el AR son críticos para el desarrollo y mantenimiento del fenotipo sexual masculino (Eileen *et al.*, 2014).

1.4.2.1 Dominios

Al igual que otros receptores nucleares, el AR es de estructura modular y se compone de los siguientes dominios funcionales etiquetados de A a la F: A/B- N-terminal de dominio regulador tiene la función de interactuar con la región LBD, de la cabeza a la cola hay una interacción intramolecular, C es el dominio de unión al ADN, D es la región Hinge (región flexible que conecta el DBD con el LBD), junto con DBD, contiene una señal de localización nuclear dependiente del ligando, LBD es el dominio de unión al ligando y realiza la función de activación, responsable de la actividad inducida por un agonista y por último F es el dominio C-terminal (Eileen *et al.*, 2014, Fig. 8).

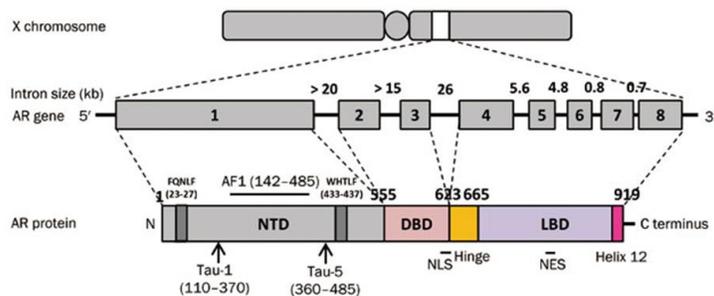


Fig. 8. Estructura de AR (tomado de Eileen *et al.*, 2014)

1.4.2.2 Mecanismo de acción de los AR

El principal mecanismo de acción de los AR es la regulación directa de la transcripción de genes (genómica). La unión de un andrógeno a un cambio

conformacional en el receptor que, a su vez, provoca la disociación de las proteínas de choque térmico, el transporte desde el citosol al núcleo celular, y su dimerización. El dímero de AR se une a una secuencia específica de ADN conocido como un elemento de respuesta hormonal. Los AR interactúan con otras proteínas en el núcleo, lo que resulta en una regulación con un aumento o disminución de la transcripción de genes específicos. La regulación o activación de la transcripción de la síntesis del ARN mensajero, se traduce por los ribosomas para producir proteínas específicas (Durdiaková *et al.* 2011).

Una función de AR que es independiente de la unión directa a su secuencia de ADN diana, se ve facilitada por el reclutamiento a través de otras proteínas de unión al ADN. Un ejemplo, es el factor de respuesta sérica, una proteína que activa varios genes que causan el crecimiento muscular.

Más recientemente, los AR se han demostrado tener un segundo modo de acción (no genómico), como también se ha encontrado para otros receptores de hormonas esteroideas tales como, los ER. Los AR pueden tener acciones que son independientes de sus interacciones con el ADN al interactuar con ciertas proteínas de transducción de señales en el citoplasma. La unión de los andrógenos a AR citoplasmático puede causar cambios rápidos en la función de células independientes de la transcripción de genes, tales como cambios en el transporte de iones (Durdiaková *et al.* 2011, Fig. 9).

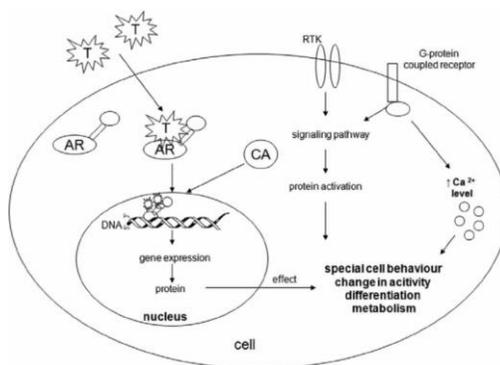


Fig. 9. Mecanismos de acción de AR (tomado de Durdiaková *et al.* 2011)

1.5 Sensibilización y genes Fos

Aunque los estudios de los mecanismos neuroendocrinos que regulan la conducta materna han determinado que el estado fisiológico asociado a la gestación y el parto, es una condición indispensable para el inicio de la conducta materna. Tanto en hembras, como en machos vírgenes, se puede inducir conducta parental (con excepción de la lactancia), al ser alojados durante varios días con crías de temprana edad. A este procedimiento de inducción de conducta parental, basado en una cohabitación forzada con las crías se le denominó, en un principio, "concavitation" (Wiesner y Sheard 1933). Posteriormente, Leblond y Nelson (1937) y Leblond (1940) confirmaron la validez de este modelo experimental al que denominaron "sensibilización". Los ratones de laboratorio vírgenes, comúnmente evitan o atacan a las crías desconocidas, pero después de un periodo de cohabitación con éstas, pueden ser sensibilizados y participar en el cuidado de las crías. Los mecanismos que subyacen a la sensibilización aún se están investigando, pero la exhibición de cuidados parentales por sensibilización ocasiona el encendido

de los genes fos, en las áreas neurales que regulan la conducta parental (Kumi *et al.* 2007).

La proteína Fos, es uno de los factores de transcripción que se expresan rápidamente en respuesta a la estimulación neuronal. Aunque la función precisa de esta proteína aún no se encuentra totalmente establecida, se ha demostrado que puede servir como un marcador para la activación de un estímulo específico en diversas áreas del cerebro y por lo tanto puede ser útil para el mapeo de las vías neurales funcionales (Hunt *et al.* 1987; Sagar *et al.* 1988).

Varios estudios han reportado que c-Fos es un marcador importante de la actividad neural, asociada a la exhibición de conducta materna. Similarmente, la expresión de FosB, también está relacionada con el despliegue de esta conducta. El protooncogen FosB es un homólogo de c-Fos, el cual tiene un patrón de expresión similar, en las neuronas del mPOA, al de c-Fos, durante el periodo de crianza (Brown *et al.* 1996; Kalinichev *et al.* 2000). Se ha sugerido que los genes c-Fos y FosB se activan en las neuronas del mPOA, y sus proteínas actúan como factores de transcripción, regulando la expresión de otros genes necesarios para la exhibición de la conducta paterna. Aunque aún no se conoce bien la vía de transducción, se sabe que estos genes se activan en el mPOA, MeA y OB por estímulos sensoriales provenientes de las crías. En ratones de laboratorio la ausencia del gen FosB produce una deficiencia tanto en la conducta paterna, como la materna (Brown *et al.* 1996).

2. Antecedentes

El gerbo de Mongolia es originario del Medio Oriente y regiones áridas de Asia Central, también se les puede ubicar en África y Europa Oriental. Este roedor llega a medir de 18 a 24 cm, se desplaza por medio de sus extremidades posteriores dando saltos erguidos y tiene una vida promedio de 3 años. Es un roedor monógamo con cuidados biparentales. Los gerbos alcanzan la madurez sexual alrededor de los tres meses de edad, a partir de entonces la hembra presentará celo cada 4 ó 6 días (Elwood 1983). La gestación dura de 21 a 25 días en condiciones normales, pero si la hembra está preñada y cuida a otra camada, el parto se retrasará hasta que la primera camada sea independiente. El número promedio de crías por camada es de 4 ó 5, pero pueden nacer hasta diez. La hembra entra en estro inmediatamente después del parto. Las crías no tienen pelo al nacer, son sordas y ciegas y no miden más de 3 cm y pesan alrededor de 2,5 g. A partir de los 10 días de vida las crías comienzan a salir del nido, a las 3 semanas ingieren alimentos sólidos y a las 4 semanas son independientes (Elwood 1983).

En el gerbo de Mongolia machos y hembras vírgenes suelen ser infanticidas en la edad adulta; los machos son menos infanticidas 2 semanas antes del parto, pero este cambio requiere de la exposición directa a la hembra. En condiciones en las que el macho tiene la libertad de abandonar el nido, cuando nace su primera camada se aleja de la hembra y las crías, pero retornan a los tres días y les proporcionan cuidados a sus hijos. Se ha demostrado que esta ausencia no se debe

al comportamiento de la hembra, sino a una evitación activa de las crías (Clark y Galef 1999).

En la mayoría de los machos de las especies biparentales los machos tienen que convertirse en paternos antes del nacimiento de las crías para evitar dañar a su descendencia. Se ha propuesto que factores sociales, como la cópula, la cohabitación con la hembra preñada y la presencia de las crías inhiben el infanticidio y facilitan la exhibición de la conducta paterna (Brown 1993). En el gerbo de Mongolia, la cópula y la cohabitación con la hembra preñada son factores que promueven el despliegue de cuidados paternos (Elwood 1980). Estos factores, así como la presencia de las crías pueden ocasionar cambios neuroendocrinos que activan la conducta paterna. Entre esos cambios, posiblemente se encuentren incrementos en la concentración de hormonas, por ejemplo, la prolactina y la T, así como cambios en la presencia de los receptores de esas hormonas, en las áreas neurales que regulan la conducta paterna.

El gerbo de Mongolia fue uno de los primeros roedores, en el cual se correlacionaron las concentraciones periféricas de T y la presencia de cuidados paternos. En este roedor fue señalado que las concentraciones plasmáticas de esta hormona se mantenían elevadas en los machos que cohabitan con la hembra desde el apareamiento hasta el día 20 de la gestación, pero que descendían significativamente 3 días después del nacimiento de sus crías, permaneciendo bajos durante el resto del periodo de lactancia (Brown *et al.* 1995).

En el ratón de California, la castración reduce significativamente la exhibición de la conducta paterna, mientras que los machos castrados que son implantados con T despliegan altos niveles de cuidados paternos (Trainor y Marler 2001). En este roedor, los machos castrados con experiencia sexual, tratados con T o E₂ exhiben un alto nivel de cuidados paternos, en comparación con aquellos machos tratados con DHT o con implantes vacíos. Además, la inhibición de la aromatasa, enzima que convierte la T en E₂, bloquea el efecto positivo de la T en la conducta paterna (Trainor y Marler 2002). En el ratón de California la actividad de la aromatasa se incrementa en

3. Justificación

El primer estudio de manipulación hormonal enfocado a establecer el papel que desempeña la T en la regulación de la conducta paterna del gerbo de Mongolia fue realizado por Clark y Galef (1999). En este estudio se analizó el efecto de la castración y la administración de T en la regulación de la conducta paterna de este roedor, señalándose que la castración aumentaba los cuidados paternos, mientras que la administración de T los disminuye. Los resultados de este estudio indicaron que en el gerbo de Mongolia, la T tenía una función inhibitoria de la conducta paterna. Sin embargo, en nuestro laboratorio, utilizando el modelo de castración y remplazo hormonal en machos vírgenes, modelo que también usó Rosenblatt *et al.* (1988) para establecer las bases hormonales de la conducta materna, se ha demostrado de manera contundente que la administración de T, E₂ o DHT a machos vírgenes castrados del gerbo de Mongolia, inhibe la conducta infanticida y promueve

la exhibición de cuidados paternos; el 100% de los machos vírgenes castrados que recibieron implantes de T, E₂ y DHT desplegaron conducta paterna, a pesar de que antes de este tratamiento, todos exhibieron conducta infanticida. Cabe señalar, que los machos vírgenes castrados y aquellos en los que se simuló el procedimiento (castración simulada, con implantes vacíos) no cambiaron su conducta después de este tratamiento, es decir, antes y después de este tratamiento continuaron mostrando conducta infanticida. La conducta paterna inducida por T y E₂ que exhibieron los machos vírgenes del gerbo de Mongolia estuvo integrada por el abrigo, acicalamiento y olfateo. La DHT indujo conducta paterna parcial debido a que los gerbos vírgenes tratados con esta hormona sólo desplegaron acicalamiento y olfateo (Martínez *et al.*2015).

El hecho de que machos vírgenes agresivos con las crías transiten a paternas después de la administración de T, E₂ o DHT, sugiere fuertemente que en el gerbo de Mongolia, la conducta paterna puede estar regulada, a nivel neural, a través de la vía estrogénica y androgénica, lo cual implica a los receptores ER α y AR. Entre los receptores de E₂ fue elegido ER α , debido a la función tan relevante que tiene en la regulación neuroendocrina de la conducta materna (Lonstein *et al.* 2015). En este contexto el presente estudio tiene como finalidad contribuir al conocimiento de los factores sociales que facilitan la transición de machos agresivos con las crías a paternas, así como determinar si a esta transición están asociados cambios en la concentración de T y la presencia de ER α y AR en OB, mPOA y MeA .

4. Preguntas de investigación

¿Qué estímulo social y hormonal en el gerbo de Mongolia facilitará la transición de macho agresivo a paternal, durante su ciclo reproductivo?

¿Habrá una asociación entre la exhibición de la conducta paterna, la concentración de T y la presencia del ER α y AR, en OB, mPOA y MeA?

5. Hipótesis

Sí los factores sociales a los que está expuesto el gerbo de Mongolia durante su ciclo reproductivo, causan un incremento en la concentración periférica de testosterona, entonces este incremento de T facilitará la transición de machos agresivos a paternos.

Sí en el gerbo de Mongolia la conducta paterna es regulada a través de las vías estrogénica y androgénica, entonces se espera que haya una asociación entre la exhibición de la conducta paterna y la presencia de ER α y AR en el OB, mPOA y MeA.

6. Objetivos Generales

Determinar que factores sociales facilitan la transición de machos agresivos a paternos en el gerbo de Mongolia (*Meriones unguiculatus*), y sí esta transición se asocia a un incremento en la concentración periférica de testosterona.

Determinar sí en la regulación de la conducta paterna del gerbo de Mongolia participan las vías estrogénica y androgénica, a través de la asociación entre la exhibición de esta conducta y la presencia de ER α y AR en OB, mPOA y MeA.

7. Objetivos particulares

Determinar que factores sociales facilitan la transición de machos agresivos a paternos.

Asociar la presencia de cuidados paternos con las concentraciones periféricas de testosterona.

Determinar cambios en la presencia de ER α y AR en OB, mPOA y MeA en la transición de machos agresivos a paternos.

8. Metodología

8.1 Animales

En este estudio se utilizaron 36 gerbos machos y 20 hembras, sin experiencia sexual, con una edad de 120-200 días, procedentes de una colonia establecida en el Laboratorio de Biología de la Reproducción, FES Iztacala, UNAM. Estos animales se mantuvieron bajo un fotoperiodo invertido de 12:12 h luz-oscuridad, a una temperatura y humedad ambiental. Se les proporcionó como alimento pellets para roedores (Lab Chow 5001, Nutrimentos Purina, México) y agua potable *ad libitum*. Los animales fueron trabajados apegándonos a la norma mexicana de uso y cuidado de animales de laboratorio (Norma Oficial Mexicana Nom-062-Zoo-1999). Los gerbos

machos que se utilizaron en este estudio fueron seleccionados por su agresión hacia las crías. Los machos sin experiencia sexual del gerbo de Mongolia, como los del ratón de California, pueden ser agresivos, indiferentes o paternales hacia crías de la especie (De Yong *et al.*, 2012). Criterio de clasificación; machos agresivos: olfatean y atacan a las crías, machos paternales: olfatean, acicalan y abrigan a las crías.

Durante las pruebas de selección de conducta paterna cada macho fue colocado en una jaula de policarbonato (32 x 23 x15 cm), con rejilla de acero y con aserrín limpio, después de 10 minutos de adecuación, fueron introducidas 3 crías de la misma especie (de 3 a 5 días de nacidas). Los gerbos que presentaron conducta paterna no fueron incluidos en el estudio. A través de este método fueron seleccionados 26 gerbos agresivos hacia las crías, de los cuales 20 fueron apareados con hembras vírgenes, para registrar la transición de machos agresivos a paternales durante un ciclo reproductivo (desde el apareamiento hasta el día 6 del postparto). Los 6 machos restantes fueron mantenidos en pares, dos machos por jaula, simulando el tiempo del ciclo reproductivo (Grupo control).

Para registrar cambios en la conducta de los machos hacia las crías (de agresivos a paternales) durante el ciclo reproductivo, 28 gerbos fueron distribuidos en 4 grupos, de 7 animales cada uno. Los machos de cada grupo fueron sometidos a pruebas de conducta paterna en los siguientes tiempos:

Grupo 1. Después de la cópula, la cual fue determinada conductualmente a través de las videograbaciones (Fig. 10) y corroborada por la presencia de espermatozoides en el frotis vaginal.

Grupo 2. Antes del nacimiento (cohabitación con la hembra preñada), entre 8 y 10 días de la preñez de su pareja, el día en que el macho y la hembra se aparean, se tomará como el día 1 de la preñez.

Grupo 3. En el día del nacimiento de las crías (de 6 a 12 h postparto).

Grupo 4. En el día 6 del postparto, cuando los machos de este roedor proporcionan más cuidados paternos (Brown *et al.* 1995).

En el momento en el que se cumplió la condición requerida, cada gerbo fue sometido a pruebas de conducta paterna. Después de las pruebas de conducta paterna se extrajo una muestra sanguínea y fue sacrificado para la obtención del cerebro.

Los machos del grupo control se sometieron a pruebas de conducta paterna, después de 34 días, periodo equivalente entre la cópula y 6 días del post- parto.



Fig. 10: videograbadora circuito cerrado.

8.2 Pruebas de conducta paterna

Cada macho fue colocado en una jaula de policarbonato de acuerdo con el procedimiento descrito arriba. Cuando los machos transitaron de agresivos a paternos, se observó durante 30 minutos, si se mantenían siendo agresivos se daba por terminada la prueba en el momento de la agresión. Se registraron las latencias de olfateo, acicalamiento y abrigo, así como el tiempo invertido en acicalamiento y abrigo. Las conductas fueron videograbadas con cámaras bullet infrarroja de alta definición, en el periodo de luz-oscuridad (12:00-12:00 horas).

8.3 Extracción de muestras sanguíneas

Al término de las pruebas de conducta paterna a cada uno de los machos, se les extrajeron muestras sanguíneas por vía retro-orbital, antes de este procedimiento los machos fueron anestesiados profundamente con pentobarbital (80 mg/kg). La sangre obtenida se centrifugo a 10000 rpm, durante 5 minutos y el plasma colectado

se almacenó a -40°C , hasta la cuantificación de T por la técnica de RIA. El RIA fue realizado por duplicado con un kit Siemens para T (Siemens 06615588 Testosterone Coat-A- Count® Kit), con una sensibilidad de 4 pg/ml. La radioactividad fue medida con un contador gamma modelo 1282 Compugamma (LKB-Wallac, Turku, Finland).

8.4 Inmunohistoquímica por flotación

Enseguida de la extracción de sangre los animales fueron perfundidos con una solución de paraformaldehído al 4%. Los cerebros fueron disectados de la cavidad craneal, y posijados en el mismo tipo de solución fijadora durante 24 horas. Al término de este período los cerebros fueron crioprotectados en soluciones graduales de sacarosa al 10%, 20% y 30% en PBS, 24 horas en cada una. Posteriormente, fueron incluidos en tissu-tek (SAKURA Finetek USA) y fueron almacenados a -70°C hasta que fueron utilizados. Posteriormente, se realizaron cortes seriados de 40 μm de grosor, en el plano coronal, utilizando un criostato (CM1850, Leica Microsystems, Nussloch GmbH, Alemania). Se tomaron secciones de tejido alternadas, que se colectaron de manera separada en PBS. El OB, mPOA y MeA se localizaron tomando como base el atlas estereotáxico del gerbo de Mongolia (Radtke *et al.* 2016). Cada serie de cortes histológicos fue procesada para la inmunodetección de ER α , AR o tinción de Nissl.

La localización de OB, mPOA y MeA se realizó basándose en el atlas del gerbo de Mongolia (Radtke *et al.*, 2016).

En la Figura 11 se muestra el área definida para la ubicación del OB. Este corte corresponde a las coordenadas de Bregma 2, 55 del estereotático del gerbo de Mongolia (Radtke *et al.* 2016).

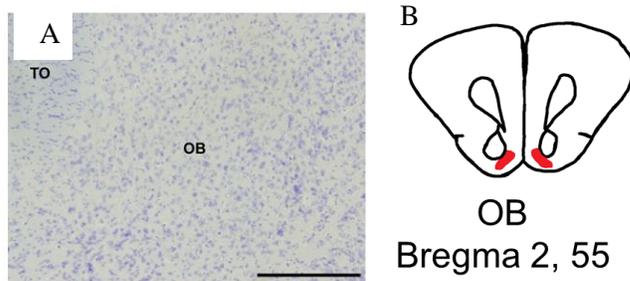


Fig. 11. Límite del área seleccionada para realizar las mediciones del bulbo olfatorio (OB). (A) sección de OB teñida con violeta de cresilo y tracto olfatorio (TO) (tinción de NISSL). (B) Diagrama del gerbo de Mongolia (Radtke *et al.*, 2016) donde se muestra definida en color rojo el área que compone el OB.

En la Figura 12 se muestra el área definida para la ubicación del área preóptica medial (mPOA). Este corte corresponde a las coordenadas -0, 25 del estereotático del gerbo de Mongolia (Radtke *et al.* 2016).

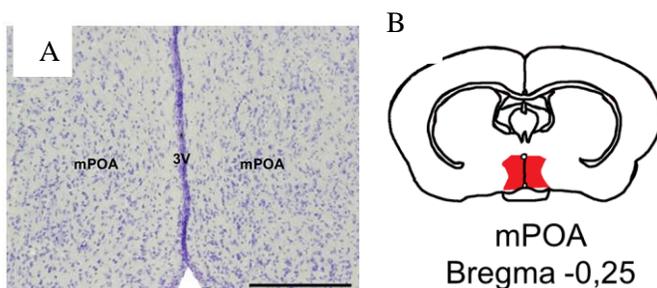


Fig. 12. Límite del área seleccionada para realizar las mediciones del área preóptica medial (mPOA). (A) sección del mPOA y tercer ventrículo (3V) teñida con

violeta de cresilo. (B) diagrama del gerbo de Mongolia (Radtke *et al.*, 2016), donde se muestra definida en color rojo el área que compone el mPOA, página 45, coordenadas Bregma -0, 25.

En la Figura 13 se muestra el área definida para la ubicación de la amígdala medial (MeA). Este corte corresponde a las coordenadas Bregma -1, 30 del estereotáxico del gerbo de Mongolia (Radtke *et al.*, 2016).

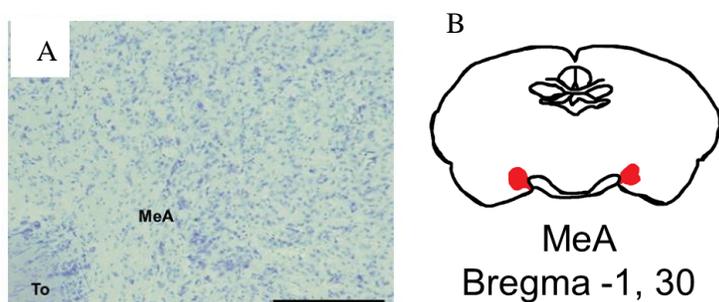


Fig. 13. Límite del área seleccionada para realizar las mediciones de amígdala medial (MeA). (A) sección del MeA y tracto óptico (To) teñida con violeta de cresilo (tinción de NISSL). (B) Diagrama del gerbo de Mongolia (Radtke *et al.*, 2016) donde se muestra definida en color rojo el área que compone la MeA.

Las secciones histológicas alternadas en libre flotación de cada animal fueron tratadas con una solución de peróxido de hidrógeno al 0.3% (Merck, Alemania) por 10 minutos, para inhibir la actividad de la peroxidasa endógena. Enseguida, fueron permeadas con una solución de PBS/Twin 20 al 0.1%, por 10 minutos a temperatura ambiente. Después fueron enjuagadas con PBS, durante 10 minutos. Los sitios de unión inespecíficos fueron bloqueados con albúmina de suero bovino al 5% (BSA; Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Reino Unido) y PBS/Twin 20 al 1% por 2

h a temperatura ambiente. Las secciones de tejido fueron incubadas con anticuerpos policlonales de conejo para la inmunodetección de ER α (rabbit polyclonal IgG, MC-20, sc-542, Santa Cruz Biotechnology, USA) o AR (rabbit polyclonal IgG, N-20, sc-816, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) a una dilución de 1:500 en BSA PBS/Twin 20 al 1% por 72 h a 4°C.

Después de este periodo se realizaron 3 lavados con PBS/Twin 20 al 0.1% por 5 minutos cada uno. Enseguida se agregó el anticuerpo secundario anticonejo biotinilado (Vector BA-1000) 5 μ l en 1ml de PBS/Twin 20 al 1%, dos horas después, se incubaron con un conjugado de avidina- HRP y biotina (AB) durante 1h. Se hicieron 3 lavados con PBS/Twin 20 al 0.1% de 5 minutos cada uno. Se reveló con diaminobencidina (DAB, vector), el tiempo de revelado fue de 5 minutos. Al finalizar se detuvo la reacción con agua destilada (cuando los cortes tomaron un color paja). Los cortes fueron montados en portaobjetos cubiertos con gelatina, se secaron a temperatura ambiente y finalmente se colocaron en xilol durante 5 minutos. Se montaron con Entellan (OB467707, MERCK, Alemania).

La cuantificación de células inmunoreactivas fue realizada en forma manual a 10x y la densidad óptica de ER α y AR fue determinada mediante un analizador de imágenes Metamorph (versión 4.5; Molecular Devices, Downingtown, PA, USA), acoplado a un microscopio Leica y una cámara Leica DFC300 FX. Para ello, se localizó el área de estudio y se sobrepuso un rectángulo con las siguientes dimensiones: OB (295 \times 192 μ m), mPOA (551 \times 508 μ m) y MeA (362 \times 333 μ m) los datos se expresaron como el número de células inmunorreactivas /10.000 μ m².

8.4.1 Técnica de NISSL

Con la finalidad de obtener el porcentaje del número de células inmunoreactivas una serie de cortes fue montada en portaobjetos. Posteriormente, se tiñeron con violeta de cresilo (Sigma, St. Louis, MO, Estados Unidos) durante 20 minutos. Finalmente, se enjuagaron con agua destilada y se dejaron secar al aire. Una vez secas, las secciones histológicas se aclararon con xilol y se montaron con Entellan, colocando un cubreobjetos. Se realizó una cuantificación de neuronas teñidas de la misma forma que las células inmunoreactivas.

8.5 Análisis estadísticos

Los parámetros conductuales: latencia de abrigo, acicalamiento y olfateo, así como el tiempo invertido en el acicalamiento y el abrigo que fueron obtenidos de los machos en las diferentes condiciones reproductivas fueron contrastados a través de la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Las comparaciones múltiples se realizaron mediante la corrección de Bonferroni.

Los datos obtenidos de la cuantificación de células inmunoreactivas al ER α y AR y densidad óptica de los machos que exhibieron conducta paterna después de la cópula, nacimiento de las crías y 6 días después del nacimiento y los no paternales, vírgenes y 10 días antes del nacimiento de las crías, fueron analizados aplicando un análisis de varianza de un solo factor. La normalidad de estos datos fue corroborada aplicando la prueba de Shapiro- Wilk. El análisis *post hoc* fue realizado a través de la prueba de Tukey. El valor de p utilizado para determinar la significancia fue de 0.05.

En el caso de los resultados conductuales y de concentraciones de T los datos fueron representados en medianas, Los resultados de la inmunohistoquímica fueron representados en medias \pm error estandar

9. Resultados

La selección de los animales utilizados en este estudio se realizó mediante pruebas de conducta paterna. Sólo se incluyeron los gerbos que fueron agresivos hacia las crías, que al inicio de esta investigación fueron colocados en parejas, ya sea con una hembra o con otro macho. En la Tabla 1 se muestran los datos registrados durante las pruebas de selección de conducta paterna.

Tabla 1: Datos registrados durante las pruebas de selección de conducta paterna en el gerbo de Mongolia.

Gerbo de Mongolia No. de animal	Latencia de ataque (seg)
1	5
2	10
3	Paternal (acicaló)
4	30
5	Paternal (acicaló)
6	2
7	2
8	3
9	Paternal (acicaló)
10	10
11	2
12	5
13	7
14	3
15	7
16	10
17	12
18	4
19	2
20	5
21	6
22	3
23	3

24	2
25	5
26	7
27	4
28	7
29	2
30	11
31	3
32	15
33	4
34	6
35	6
36	2
37	5
38	3
39	2
40	1
41	14
42	9
43	2

9.1 Resultados de las pruebas de conducta paterna

En la Tabla 2 se muestra que el 100% de los machos sin experiencia sexual, que fueron agresivos hacia las crías durante las pruebas de selección, transitaron a paternales después de la cópula, a diferencia de los machos vírgenes, que continuaron siendo agresivos. Cuando las pruebas de conducta paterna se realizaron durante la preñez (7 a 8 días antes del parto), todos los machos volvieron a mostrar agresión. En el día del nacimiento, nuevamente el 100% de los machos fueron paternales. Así mismo, en el día 6 del nacimiento todos los gerbos proporcionaron cuidados a las crías. La conducta paterna observada en estas pruebas estuvo integrada por el abrigo, acicalamiento y el olfateo. Cabe indicar, que la cópula fue un fuerte inductor de la conducta paterna, debido a que el 100% de los machos exhibieron abrigo, acicalamiento y olfateo, lo cual no fue observado en el día del nacimiento y en el día 6 postparto.

Tabla 2. Cambios en la conducta de machos del gerbo de Mongolia hacia crías en diferentes condiciones reproductivas.

Primera prueba de conducta paterna	Grupo	Segunda prueba de conducta paterna			
		Agresivos	Abrigo	Acicalamiento	Olfateo
100% (n=5)	Machos vírgenes (n=5)	100% (n=5)	0%	0%	0%
100% (n=5)	Machos en el día de la cópula (n=5)	0%	100% (n=5)	100% (n=5)	100% (n=5)
100% (n=5)	Machos 10 días Antes del nacimiento (n=5)	100% (n=5)	0%	0%	0%
100% (n=5)	Machos día del nacimiento de las crías (n=5)	0%	80% (n=4)	40% (n=2)	100% (n=5)
100% (n=5)	Machos 6 días después del nacimiento de las crías (n=5)	0%	80% (n=4)	60% (n=3)	100% (n=5)

El contraste entre las latencias de inicio de la conducta paterna ($H = 18.8$, $gl = 4$, $p < 0.05$, Fig. 14) que exhibieron los machos en las pruebas de conducta paterna mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los grupos. Los machos vírgenes y en cohabitación con la hembra preñada no exhibieron ninguna actividad de la conducta paterna, por lo cual la corrección de Bonferroni mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) entre estos grupos y los que sí exhibieron conducta paterna. No obstante, no se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los machos que

desplegaron conducta paterna después de la cópula, nacimiento de las crías y en el día 6 del postparto para ninguna de estas actividades.

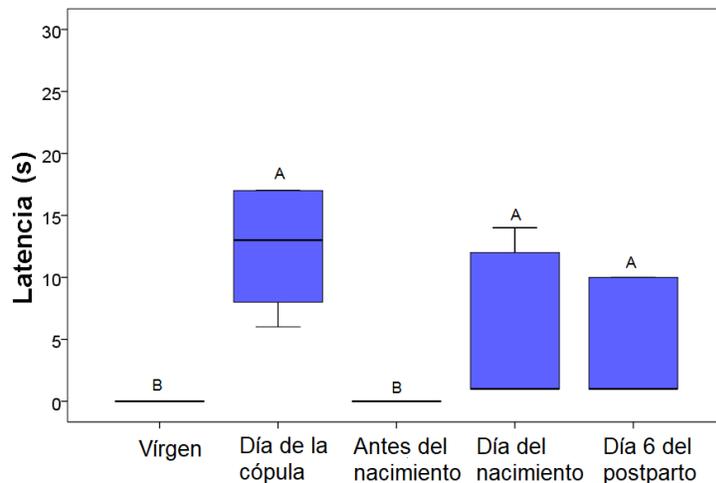


Fig. 14. Latencia de conducta paterna en los machos del gerbo de Mongolia en diferentes condiciones del ciclo reproductivo. Las diferentes letras indican que hay diferencia significativa ($p < 0.05$) entre esos grupos y las letras iguales indican que no hay diferencia significativa entre esos grupos ($p > 0.05$). Los datos se representan en medianas ($N=7$).

El tiempo que los machos invirtieron en el abrigo ($H = 14.15$, $gl = 4$, $p < 0.05$, Fig. 15) y acicalamiento ($H = 13.23$, $gl = 4$, $p < 0.05$, Fig. 16) difirió significativamente, debido a que los machos vírgenes y los que cohabitaron con la hembra preñada no desplegaron esta conducta. Sin embargo, la corrección de Bonferroni mostró que el tiempo invertido en el abrigo y el acicalamiento después de la cópula, día del nacimiento y 6 días después del nacimiento de las crías, no difirió significativamente ($p > 0.05$).

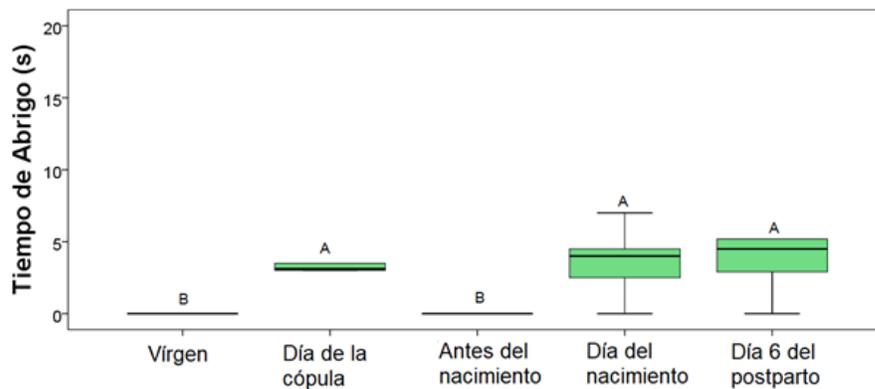


Fig. 15. Tiempo invertido en el abrigo del macho del gerbo de Mongolia en diferentes condiciones reproductivas. Las diferentes letras indican que hay diferencia significativa ($p < 0.05$) entre esos grupos y las letras iguales indican que no hay diferencia significativa entre esos grupos ($p > 0.05$). Los datos se representan en medianas (N=7).

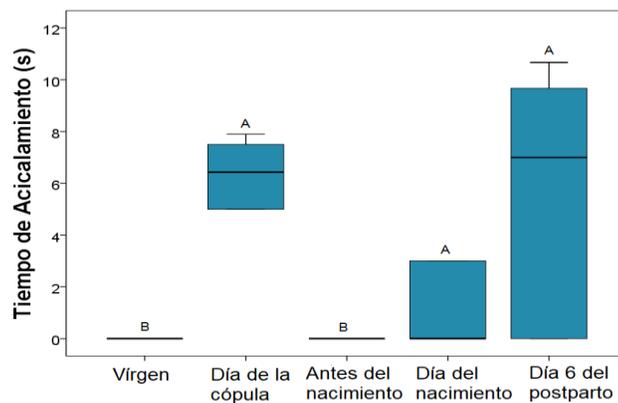


Fig. 16. Tiempo invertido en el acicalamiento del macho del gerbo de Mongolia en diferentes condiciones reproductivas. Las diferentes letras indican que hay diferencia significativa ($p < 0.05$) entre esos grupos y las letras iguales indican que no hay diferencia significativa entre esos grupos ($p > 0.05$). Los datos se representan en medianas (N=7).

9.2 Resultados de concentración de T

En el macho del gerbo de Mongolia las concentraciones de T variaron significativamente a través de su ciclo reproductivo; en el día de la cópula, día del nacimiento y en el día 6 del postparto las concentraciones periféricas de T se incrementaron significativamente sin tener diferencia significativa entre estos grupos ($p > 0.05$). Sin embargo, comparadas con las registradas en machos vírgenes y en cohabitación con la hembra preñada si presentaron diferencias significativas ($H = 21.93$, $gl = 4$, $p < 0.05$, Fig. 17). Por lo tanto, las concentraciones más altas de T están asociadas a la cópula y a la presencia de cuidados paternos.

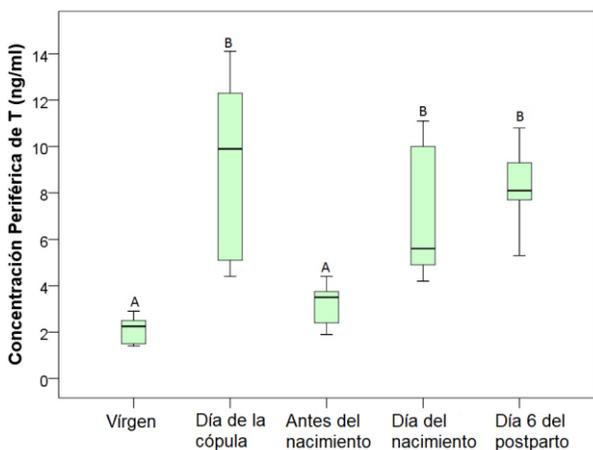


Fig. 17. Concentración periférica de la T en el macho del gerbo de Mongolia en diferentes condiciones reproductivas. Las diferentes letras indican que hay diferencia significativa ($p < 0.05$) entre esos grupos y las letras iguales indican que no hay diferencia significativa entre esos grupos ($p > 0.05$). Los datos se representan como la media \pm E.S.M. (N=7).

9.3 Resultados de Inmunohistoquímica

Para comprobar que los anticuerpos utilizados para la inmunohistoquímica de ER α y AR, podían cruzarse con los antígenos del gerbo de Mongolia, se utilizó como control positivo la próstata, teniendo en cuenta que en este órgano se puede encontrar ER α y AR (Lopes *et al.* 2013).

La inmunoreactividad ER α en OB y mPOA fue significativamente diferente entre los machos de las distintas condiciones reproductivas ($F = 91.51$, $gl = 19$, $P < 0.05$, Fig. 19). La prueba de Tukey mostró que los machos que exhibieron conducta paterna (después de la cópula, del nacimiento de las crías y 6 días después del nacimiento de las crías) tuvieron significativamente mayor número de células inmunoreactivas ER α ($P < 0.005$), que los machos que no presentaron esta conducta (vírgenes y antes del nacimiento). ER α -ir no fue significativamente diferente entre los grupos de machos que exhibieron conducta paterna, independientemente de las condiciones de su ciclo reproductivo ($P > 0.05$).

Así mismo, el análisis de varianza mostró diferencias significativas en el número de células ER α -ir en mPOA, entre los machos en distintas condiciones reproductivas; ($F = 81.66$, $gl = 19$, $P < 0.05$, Fig. 19). La prueba de Tukey mostró que los machos que fueron paternos (después de cópula, nacimiento de las crías y 6 días después) tuvieron mayor ER α -ir que los machos no paternos (vírgenes y antes del nacimiento) ($P < 0.005$).

La inmunoreactividad en MeA fue significativamente diferente entre los machos de las distintas condiciones reproductivas ($F= 377.32$, $gl = 19$, $P < 0.05$, Fig. 19). El análisis múltiple de medias indicó que la inmunorreactividad al ER α en el MeA, en los machos que fueron paternos después de la cópula, el nacimiento de las crías y a los 6 días del postparto fue significativamente más alto que en los machos vírgenes, y 10 días antes del nacimiento ($P < 0.05$). No obstante, no se encontraron diferencias en la ER α -ir en el día de la cópula, comparada con el nacimiento de las crías ($P > 0.05$) y el día 6 del postparto. Sin embargo, la ER α -ir en MeA en el nacimiento y el día 6 del postparto fue significativamente diferente ($P < 0.05$).

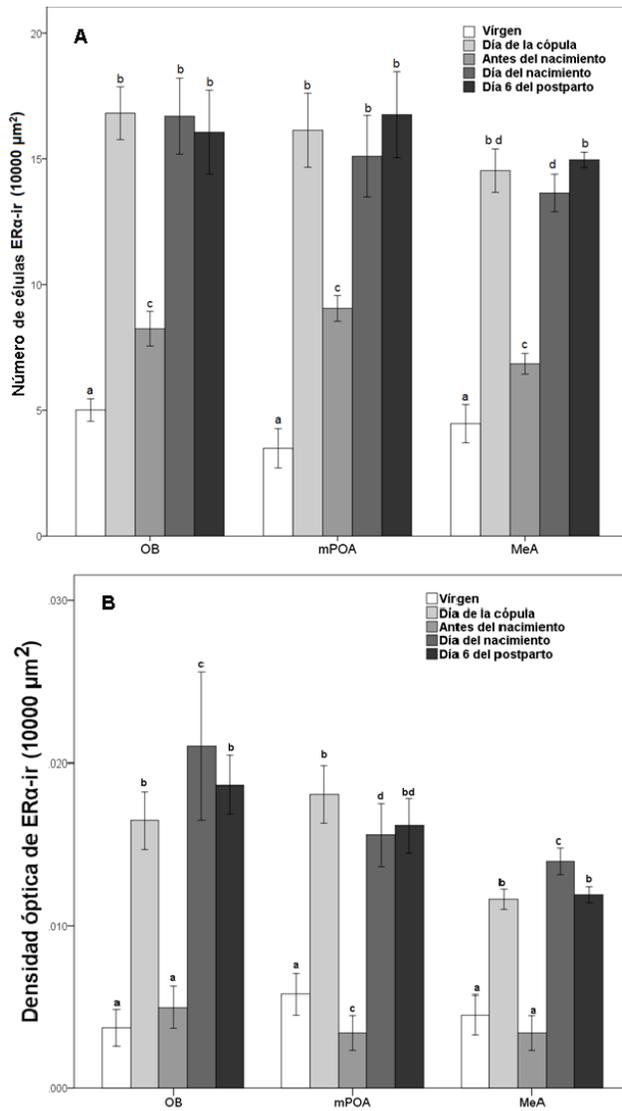


Fig. 19. Número de células (A) y densidad óptica ER α -ir (B). Los machos paternos tuvieron mayor ER α -ir en OB, mPOA y MeA que los no paternos del gerbo de Mongolia. Las diferentes letras indican que hay diferencia significativa ($p < 0.05$) entre esos grupos y las letras iguales indican que no hay diferencia significativa entre esos grupos ($p > 0.05$). Los datos se representan como la media \pm E.S.M. (N=7).

El análisis de varianza mostró que la AR-ir en el OB, entre machos vírgenes, machos después de la cópula, antes del nacimiento de las crías, así como en el día del nacimiento de las crías y 6 días después del nacimiento de éstas, difirieron significativamente ($F = 95.39$, $gl = 19$, $P < 0.05$, Fig. 20). El análisis múltiple de medias indicó que la AR-ir en el OB en los machos que exhibieron conducta paterna, después de la cópula y el nacimiento de las crías fue significativamente más alto que en los machos que no presentaron conducta paterna (vírgenes y 10 días antes del nacimiento) ($P < 0.05$). No obstante, no se encontraron diferencias en la AR-ir entre los machos que desplegaron conducta paterna ($p > 0.05$).

Así mismo, el análisis de varianza mostró diferencias significativas en el número de células AR-ir en el mPOA, entre los machos en distintas condiciones reproductivas; ($F = 79.68$ $gl = 19$, $P < 0.05$, Fig. 20). La prueba de Tukey mostró que los machos que fueron paternos (después de cópula, nacimiento de las crías y 6 días después) tuvieron mayor AR-ir que los machos no paternos (vírgenes y antes del nacimiento).

La inmunoreactividad AR en MeA difirió significativamente entre todos los grupos ($F = 81.92$, $P < 0.05$, $gl = 19$, Fig. 19). La prueba de Tukey mostró que en los machos paternos (cópula, nacimiento de las crías y 6 días después) tuvieron mayor número de células inmunoreactivas AR que los machos no paternos (vírgenes y antes del nacimiento) ($P < 0.005$). No obstante no se encontraron diferencias en AR-ir en el día de la cópula, comparada con el nacimiento de las crías ($P > 0.05$) y el día

6 del postparto. Sin embargo, la AR-ir en la MeA en el nacimiento y el día 6 del postparto fue significativamente diferente ($P < 0.05$).

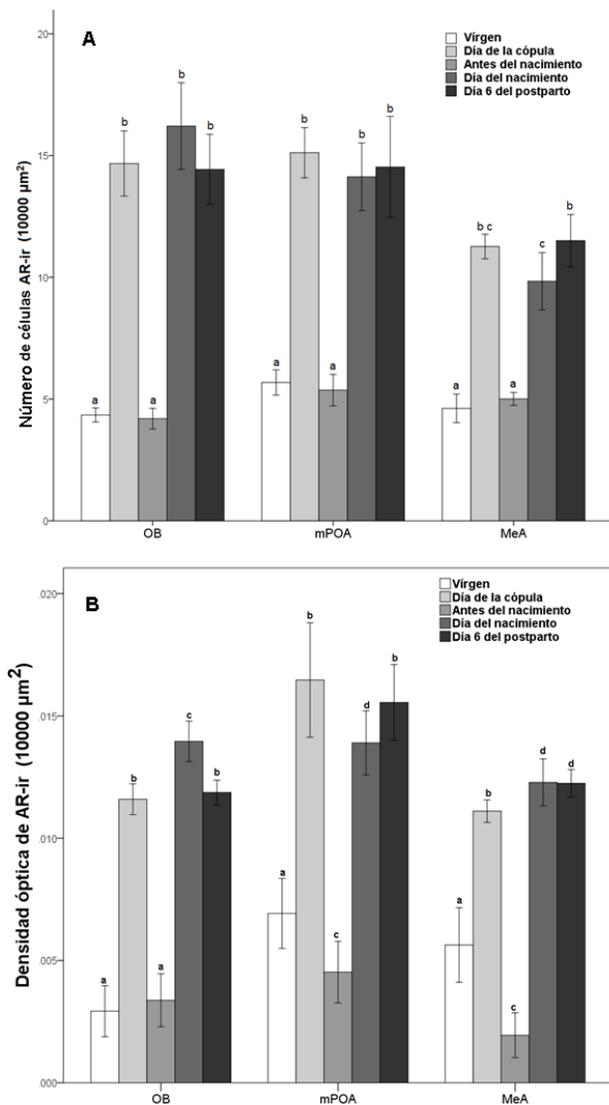


Fig. 19. Número de células (A) y densidad óptica ER α -ir (B). Los machos paternos tuvieron mayor AR-ir en OB, mPOA y MeA que los no paternos del gerbo de Mongolia. Las diferentes letras indican que hay diferencia significativa ($p < 0.05$) entre

esos grupos y las letras iguales indican que no hay diferencia significativa entre esos grupos ($p > 0.05$). Los datos están representados en medias y error estándar ($N=7$).

La Fig. 20 muestra la microfotografía de ER α y AR en OB, mPOA y MeA del gerbo de Mongolia en machos paternales y no paternales en un aumento de 10x y 40x.

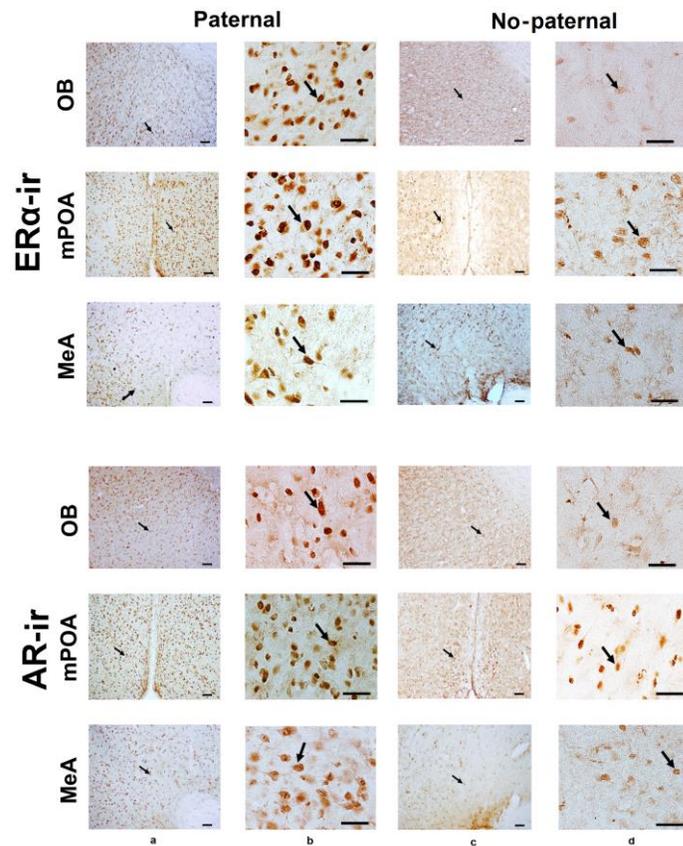


Fig. 20: Microfotografía representativas que muestran células ER α -ir y AR-ir en machos paternos (columnas a y b) y no paternos (columnas c y d) en OB, mPOA y MeA. Las imágenes se tomaron a 10x (columnas a y c) y 40x (columnas b y d). Barra de escala = 100 μ m

10. Discusión

En este estudio la latencia de inicio de la conducta paterna y el tiempo invertido en el abrigo, acicalamiento y el olfateo proporcionado por los machos paternos no difirieron significativamente, independientemente del factor social que facilitó la exhibición de esta conducta, lo cual sugiere que estos factores sociales tienen un efecto similar en la inducción de la conducta paterna en el gerbo de Mongolia.

Todos los machos del gerbo de Mongolia que mostraron agresividad hacia las crías, al inicio del estudio mostraron conducta paterna después de la cópula, mientras que los machos en cohabitación con una hembra preñada exhibieron agresión hacia las crías. Esto indica que la cópula es un factor social que naturalmente desencadena el comportamiento paterno en este roedor. Resultados similares fueron reportados en ratones CF-1, que en cohabitación con una hembra preñada sin cópula previa, fallan en inhibir tanto el infanticidio, así como en facilitar la conducta paterna (Perrigo *et al.* 1991). Kennedy y Elwood (1988) informaron que la cópula *per se* reduce el infanticidio y aumenta el comportamiento paterno en los ratones de laboratorio. Asimismo, los machos infanticidas de ratones (CF1) y de ratas de laboratorio cambiaron a una conducta paterna, cuando se aparearon durante tres horas con una hembra en estro de su especie (Vom Saal y Howard, 1982, Mennella y Moltz, 1988). En el ratón doméstico, la cópula inhibe el infanticidio y promueve la exhibición del cuidado paterno (Vom Saal y Howard, 1982).

Sin embargo, la conducta paterna facilitada por la cópula en el gerbo de Mongolia fue temporal porque todos los machos que cohabitaron con las hembras preñadas hasta los 10 a 8 días antes del nacimiento mostraron agresión hacia las crías. Brown (1995) mostró que en este roedor, la cópula y la cohabitación con una hembra preñada son estímulos que facilitan el inicio de la conducta paterna. Aunque a diferencia del estudio de Brown (1995), los machos en cohabitación con la hembra preñada fueron paternos hacia las crías. En el ratón de California, la mayoría de los machos que habitan con la hembra preñada no son paternos con crías desconocidas, mientras que el 34,0% de ellos muestran conducta paterna 24 horas después de la cópula (Gubernick *et al.*, 1994).

En este estudio en el día del nacimiento, el 100% de los machos proporcionaron cuidados paternos, en las pruebas de conducta paterna. La presentación de este comportamiento también se asoció con la cópula en el postparto (Marston y Chang, 1965, Gilbert, 1984). Sin embargo, los recién nacidos no fueron atacados por sus padres porque ninguno tenía rastros de agresión. Además, se observó que dos machos abrigaron a sus crías recién nacidas. Este resultado sugiere que además de la cópula, otros estímulos de las hembras indujeron la transición de machos agresivos a paternos. Incrementos en la T parecen estar involucrados en esta transición, como veremos más adelante. Es posible que días u horas antes del día de nacimiento de las crías, las hembras liberen señales químicas que indican a los machos la proximidad del parto postparto, a su vez esto podría

causar un aumento en T, y consecuentemente que los machos se vuelvan paternales.

En el día 6 posparto, el 100% de los machos continuaron siendo paternales, lo que sugiere que la presencia de las crías mantiene el comportamiento paterno en el gerbo de Mongolia. Esto es apoyado por el hecho de que los machos en cohabitación con la hembra preñada mostraron agresión hacia las crías, aunque copularon con su pareja para preñarla. Entonces, la presencia de sus hijos podría ser un estímulo crítico en el mantenimiento del comportamiento paterno. En la rata de laboratorio se conoce que el inicio de la conducta materna depende de los cambios en las concentraciones de E₂ y progesterona, que ocurren al final de la preñez, pero la presencia de las crías mantiene este comportamiento porque la ovariectomía no afecta el comportamiento materno en el postparto (Numan *et al.* 2006).

La exhibición del comportamiento paterno en el gerbo de Mongolia estuvo asociada con concentraciones significativamente altas de T en el plasma, comparado con los machos agresivos (vírgenes) con las crías y los machos en cohabitación con la hembra preñada. Este resultado indica que un aumento de T está implicado en la transición natural de los machos agresivos con las crías a paternales. Martínez, *et al.*, (2015), mostraron que los machos vírgenes del gerbo de Mongolia dejaron de ser agresivos y se convirtieron en paternales, cuando las concentraciones de T aumentaron después de recibir los implantes de esta hormona. En el ratón de los volcanes, un aumento en T también está involucrado en el mecanismo que inhibe el comportamiento infanticida y promueve el comportamiento paterno (Luis *et al.* 2012).

Brown (1993) señaló que la cópula facilita la conducta paterna porque induce cambios neuroendocrinos que alteran las respuestas a las crías. Estos resultados sugieren que esos cambios neuroendocrinos son desencadenados por un aumento de T. Sin embargo, aquí, además de la cópula, la presencia de crías también fue un estímulo que causó un aumento en las concentraciones de T.

Los machos del gerbo de Mongolia que exhibieron conducta paterna tuvieron significativamente mayor número de ER α -ir y AR-ir y mayor densidad óptica en OB, mPOA y MeA que los machos que mostraron agresión hacia las crías. Estos resultados apoyan que ambos receptores están involucrados en la regulación neuroendocrina de la conducta paterna de este roedor. La participación de los ER α en los mecanismos neuroendocrinos que regulan el comportamiento paterno, ya ha sido reportada, en el topillo mandarín la experiencia paterna incrementa la cantidad de células ER α -ir, en el núcleo arqueado del hipotálamo. Así mismo, en este roedor, los machos con alta respuesta paterna tuvieron más ER α -ir en el mPOA, BST y MeA que los machos con baja respuesta (Li *et al.* 2015). Los ratones *knockout* del gen ER α muestran un alto porcentaje de comportamiento infanticida, comparado con ratones silvestres, lo que denota la importancia de este receptor en la regulación del comportamiento paterno (Ogawa, *et al.*, 1998). La presencia significativa de AR-ir en las áreas neurales que regulan la conducta paterna en los machos que proporcionaron cuidado paterno a las crías ajenas de la misma especie, muestra que la vía androgénica es parte de los mecanismos de regulación de la conducta paterna en el gerbo de Mongolia. Sin embargo, el aumento en la T y la presencia de ER α y

AR en estas regiones neurales también se asocia con la regulación del comportamiento copulatorio (Hull y Domínguez, 2015). No obstante, la presencia de estos receptores en el día 6 del posparto, cuando los machos ya no copulan, porque las hembras quedan preñadas durante el estro posparto (Marston y Chang, 1965; Meckley y Ginther, 1973), sugiere su participación en la regulación del comportamiento paterno. En el hámster enano Wynne-Edwards y Timonin (2007) no encontraron diferencias en el número de células inmunoreactivas de ER α en mPOA y MeA, entre machos paternales y vírgenes. Sin embargo, un estudio posterior menciona que en este roedor, los machos paternales tienen significativamente mayor presencia de ER α en mPOA que los no paternales (Romero-Morales *et al.* 2020).

Estos resultados muestran que la transición del comportamiento agresivo al paterno en el gerbo de Mongolia es facilitado por la cópula, probablemente a través de un incremento en la concentración de T en el plasma. Por otra parte, la presencia de células ER α -ir y AR-ir en el OB, mPOA y MeA, áreas que participan en la regulación neural del comportamiento paterno, sugiere que las vías estrogénicas y androgénicas pueden participar en la regulación de esta conducta. Esto es reforzado debido a que los machos que estuvieron con hembras preñadas entre 10 y 8 días antes del nacimiento, que fueron agresivos con las crías, tuvieron niveles bajos de T, así como de ER α y AR. Sería importante conocer el mecanismo a través del cual, durante la preñez, los gerbos de Mongolia machos conservan los niveles bajos de T, así como de ER α y RA para conservar la agresividad. La utilización de marcadores moleculares ha permitido la identificación de subnúcleos neuronales en mPOA; en el

ratón de laboratorio un subnúcleo de neuronas que expresan galanina, este grupo de neuronas es activado cuando los machos interaccionan paternalmente con las crías. Además, la ablación genética de este subnúcleo causa dramáticas alteraciones en la respuesta paterna (Wu *et al.* 2014). Interesantemente, ha sido observado que del 70-90% de esas neuronas presentan una significativa presencia de ER α and AR (Tsuneoka 2015; Horrell *et al.* 2018).

Estudios futuros que asocien la presencia de células ER α -ir y AR-ir en OB, mPOA y MeA, con la conducta paterna, en machos sin experiencia sexual, proporcionarán más evidencia de la participación de las vías estrogénicas y androgénicas en la regulación del comportamiento paterno en los gerbos de Mongolia.

Estos resultados sugieren que el circuito neural de regulación de la conducta paterna se superpone con la regulación del circuito neuronal del comportamiento sexual, lo que está de acuerdo con Newman (1999, 2002), que enfatizó la superposición en circuitos neuronales que regulan una variedad de comportamientos sociales en los mamíferos, tales como la conducta sexual masculina, la agresión entre machos y la conducta paterna.

11. Conclusión

Estos resultados mostraron que el inicio de la conducta paterna en el gerbo de Mongolia es facilitado por las interacciones sexuales que causan un aumento en la concentración de T, y que la presencia de las crías parece ser un estímulo crítico en

el mantenimiento de este comportamiento. Por otra parte, la presencia de ER α y AR en las regiones que participan en la regulación neural de la conducta paterna, apoya que las vías estrogénica y androgénica están involucrados en la regulación de la conducta paterna.

Estudios futuros mediante la disminución de intervalos de muestro durante su ciclo reproductivo podría ayudarnos a determinar el tiempo exacto en que el macho hace la transición de agresivo a paterno, al mismo tiempo se podría hacer la cuantificación de T en estos mismos intervalos para verificar si está asociada a la conducta paterna. Así mismo, se podrían utilizar animales *knockout* del gen ER α y AR para determinar de manera concluyente la participación de la vía estrogénica y androgénica en la regulación de la conducta paterna. Para determinar que OB, mPOA y MeA están implicadas en la regulación neural de la conducta paterna se podría hacer una doble inmunohistoquímica con proteínas FOS, marcadores de actividad neural.

La Figura 21 es un modelo esquemático de la posible vía de inicio de la conducta paterna, así mismo, se muestran los posibles proyectos que ayudarían a verificar que tanto la T, E₂ y DHT, sus receptores, así como las áreas que se estudiaron en este trabajo están involucradas en el inicio y mantenimiento de la conducta paterna.

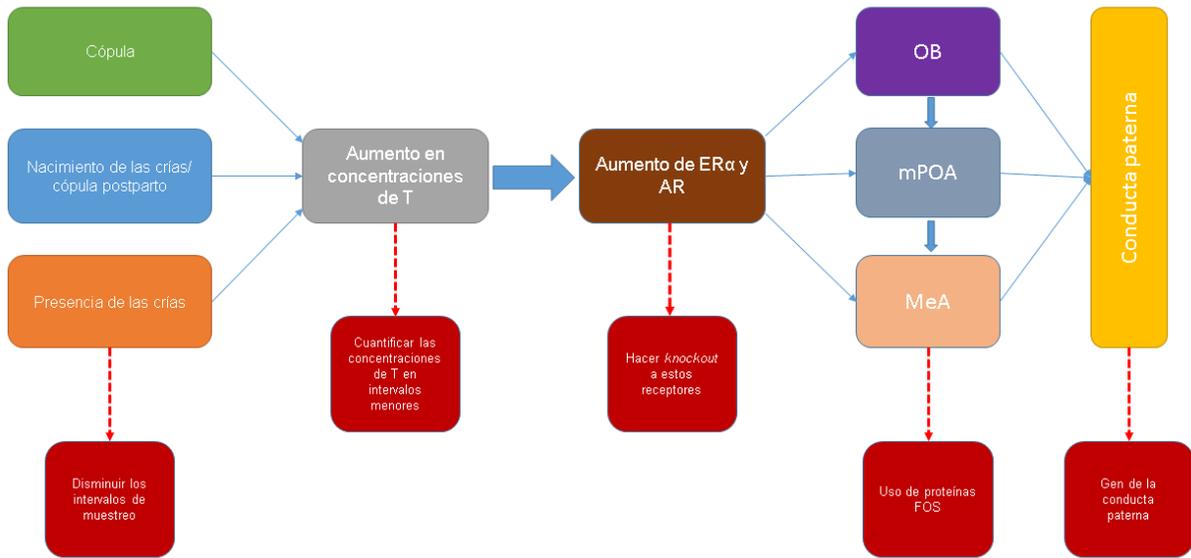


Fig. 21: Modelo esquemático de los resultados. Las flechas azules muestran la posible vía que regula el inicio de la conducta paterna. Las flechas rojas muestran posibles proyectos que ayudarían a verificar la vía de inicio de la conducta paterna.

12. Referencias

- Bales, K.L., Kramer, K.M., Lewis-Reese, A.D., Carter, C.S., 2006. Effects of stress on parental care are sexually dimorphic in prairie voles. *Physiol. Behav.* 87, 424–429.
- Bamshad, M., Novak, M., De Vries, G., 1994. Cohabitation alters vasopressin innervations and paternal behavior in prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Physiol. Behav.* 56, 751–758.
- Bart, J., Tornes, A., 1989. Importance of monogamous male birds in determining reproductive success. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 24, 109-116.

- Bester-Meredith, J.K., Young, L.J., Marler, C.A., 1999. Species differences in paternal behavior and aggression in *Peromyscus* and their associations with vasopressin immunoreactivity and receptors. *Horm. Behav.* 36, 25–38.
- Blumer, L.S., 1982. A bibliography and categorization of bony fishes exhibiting parental care. *Zool. J. Linn. Soc.* 76:1–22.
- Bridges, R.S., Robertson, M.C., Shiu, R.P.C., Sturgis, J.D., Henriquez, B.M., Mann, P.E., 1997. Central lactogenic regulation of maternal behavior in rats: steroid dependence, hormone specificity, and behavioral potencies of rat prolactin and rat placental lactogen I. *Endocrinology* 138,756–763.
- Brooks, P.L., Vella, E.T., Wynne-Edwards, K.E., 2005. Dopamine agonist treatment before and after the birth reduces prolactin concentration but does not impair paternal responsiveness in Djungarian hamsters *Phodopus campbelli*. *Horm. Behav.* 47, 358–366.
- Brown, R.E., 1993. Hormonal and experiential factors influencing parental behaviour in male rodents: an integrative approach. *Behav. Processes* 30,1–28.
- Brown, R.E., Murdoch, T., Murphy, P.R., Moger, W.H., 1995. Hormonal Responses of male gerbils to stimuli from their mate and pups. *Horm. Behav.* 29, 474-491.
- Brown, J.R., Ye H, Bronson, R.T., Dikkes, P. Greenberg, M.E., 1996. A defect in nurturing in mice lacking the immediate early gene *fosB*. *Cell* 86, 297–309.

- Callard, G.V., 1984. Aromatization in brain and pituitary. In metabolism of hormonal steroids in the neuroendocrine structures. Edited by F. Celotti, F. Naffolin and L. Martini. Raven press, New York, pp. 79-102.
- Cant, M.A., 2003. Patterns of helping effort in co-operatively breeding banded mongooses (*Mungos mungo*). *J. Zool., Lond.* 259, 115–121.
- Cantoni, D., Brown R.E., 1997. Parental investment and reproductive success in the California mouse *Peromyscus californicus*. *Animal Behaviour* 54, 377-386.
- Carlson, A.A., Manser, M.B., Young, A.J., Russell, A.F., Jordan, N.R., McNeilly, A.S., Clutton-Brock, T., 2006. Cortisol levels are positively associated with pupfeeding rates in male meerkats. *P. Biol. Sci.* 273, 571–577.
- Castro, W.L.R., Matt, K.S., 1997. The importance of social condition in the hormonal and behavioral responses to an acute social stressor in the male Siberian dwarf hamster (*Phodopus sungorus*). *Horm. Behav.* 32, 209-216.
- Clark, M.M., Galef, B.G., 1999. A testosterone-mediated trade-off between parental and sexual effort in male mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *J. Comp. Psychol.* 113, 388–395.
- Clutton-Brock, T.H., 1991. The evolution of parental care. Princeton, NJ: Princeton University Press.
- Clutton-Brock, T.H., Gaynor, D., Kinsky, R., MacColl, A.D.C., McIlrath, G., Chadwick, P., Brotherton, P.N.M., O’Riain, J.M., Manser, M., Skinner, J.D., 1998. Costs of

cooperative behaviour in suricates (*Suricata suricatta*). *Pro. Roy. Soc. Lond B.* 265, 185–190.

DeVries, A.C., DeVries, M.B., Taymans, S.E., Carter, C.S., 1996. The effects of stress on social preferences are sexually dimorphic in prairie voles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 11980–11984.

DeVries, A.C., Gupta, T., Cardillo, S., Cho, M., Carter, C.S., 2002. Corticotropin-releasing factor induces social preferences in male prairie voles. *Psychoneuroendocrinology* 27, 705–714.

Dewsbury, D.A., 1985. Paternal behavior in rodents. *Am. Zool.* 25, 841–852.

Durdiaková, J., Ostatníková, D., Celec, P., 2011. Testosterone and its metabolites - modulators of brain functions. *Acta neurobiologiae experimentalis* 71, 434-54.

Ellen, D. y Ketterson Val Nolan Jr., 1994. *Annual Review of Ecology and Systematics* 25, 601-628.

Elwood R.W. 1983. Paternal care in rodents. In R.W. Elwood (eds.), *Parental Behaviour of Rodents*. Chichester. John Wiley. 235-257.

Ervin K.S.J 2015. Estrogen involvement in social behavior in rodents: Rapid and long-term actions. *Horm Behav.* 74, 53-76.

Fisher, A.E., 1956. Maternal and sexual behavior induced by intracranial chemical stimulation. *Science* 124, 228–229.

- Gandelman, R., Vom Saal, F.S., 1975. Pup-killing in mice: the effects of gonadectomy and testosterone administration. *Physiol. Behav.* 15, 647–651.
- Gogos, A., Sbisa, A.M., Sun, J., Gibbons, A., Udawela, M., Dean, B.A., 2015. Role for estrogen in schizophrenia: clinical and preclinical findings. *Int. J. Endocrinol.* 16 p.
- Gubernick, D.J., Alberts, J.R., 1987. The biparental care system of the California mouse, *Peromyscus californicus*. *J. Comp. Psychol.* 101, 169–177.
- Gubernick, D.J., Nelson, R.J., 1989. Prolactin and paternal behavior in the biparental California mouse, *Peromyscus californicus*. *Horm Behav.* 23, 203–210.
- Gubernick, D.J., Sengelaub, D.R., Kurz, E.M., 1993. A neuroanatomical correlate of paternal and maternal behavior in the biparental California mouse (*Peromyscus californicus*). *Behav. Neurosci.* 107, 194–201.
- Gubernick, D.J., Teferi, T., 2000. Adaptive significance of male parental care in a monogamous mammal. *P. Biol. Sci.* 267, 147–150.
- Gubernick, D.J., Winslow, J.T., Jensen, P., Jeanotte, L., Bowen, J., 1995. Oxytocin changes in males over the reproductive cycle in the monogamous, biparental California mouse, *Peromyscus californicus*. *Horm. Behav.* 29, 59–73.
- Gromov, V.S., Osadchuk L.V., 2013. Parental care and testosterone in males of the bank vole (*Myodes glareolus*): Sensitization and androgenic stimulation of paternal behavior. *Biol. Bull.* 40 (1), 114–118.

- Huber, S., Millesi, E., Dittami, J.P., 2002. Paternal effort and its relation to mating success in the European ground squirrel. *Anim. Behav.* 63, 157–164.
- Hunt, S.P., Pini, A. Evan, G., 1987. Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation, *Nature.* 328, 632-634.
- Horrel, D.N., Hickmott W.P., Saltzman W., 2019. Neural regulation of paternal behavior in mammals: sensory, neuroendocrine, and experiential influences on the paternal brain. *Curr. Top .Behav. Neurosci.* 4, 111-160.
- James, P.C., Rahia, M. Frances, A.C., 2011. Epigenetics and the origins of paternal effects. *Horm. Behav.* 59, 306-314.
- Kalinichev, M., Rosenblatt, J.S., Nakabeppu, Y. Morrell, J.I., 2000. Induction of c-fos-like and fosB-like immunoreactivity reveals forebrain neuronal populations involved differentially in pup-mediated maternal behavior in juvenile and adult rats. *J. Comp. Neurol.* 416, 45–78.
- Khatib, S., Insel, T.R., Young, L.J., 2001. The effects of pup exposure on parental responsiveness, serum prolactin, and prolactin receptor gene expression in the biparental prairie vole. *Soc.Neurosci.Abstr.*27, 746-4.
- Kirkpatrick, B., Williams, I.R., Slotnick, M., Carter, C.S., 1994. Olfactory bulbectomy decreases social behavior in male prairie voles (*M. ochrogaster*), *Physiol. Behav.*, 55, 885- 889.

- Kleiman, D.G. y Malcolm J., 1981. The evolution of male parental investment in mammals. In: Parental care in mammals (Gubernick DJ, Klopfer PH, eds), pp 347–387. New York: Plenum Press.
- Koranyi, L., Endroczi, E., 1987. Changes in serum corticosterone and testosterone during induced maternal behavior in rats. *Acta. Physiol. Hungary* 69, 33–42.
- Kumi, O.K., Michael, J.M., Noriko, U., Yannick, F., André, P., Tadafumi, K., 2007. ERK-FosB signaling in dorsal MPOA neurons plays a major role in the initiation of parental behavior in mice. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 36,121-131.
- Leblond, C.P., 1940. Nervous and hormonal factors in the maternal behavior of the mouse. *J. Genet. Psychol.* 57:327-344.
- Leblond, C.P., Nelson, W.O., 1937. Maternal behavior in hypophysectomized male and female mice. *Am. J. Physiol.* 120, 167-172.
- Libhaber, N., Eilam, D., 2002. Social vole parents force their mates to baby-sit. *Dev. Psychobiol.* 41, 236–240.
- Lim, M.M., Tsivkovskaia, N.O., Bai, Y., Young, L.J., Ryabinin, A.E., 2006. Distribution of corticotropin-releasing factor and urocortin 1 in the vole brain. *Brain Behav. Evol.* 68, 229–240.
- Lopes, D.A., Zanatelli, M., Zardini, F., Goes, R.M., Alcántara, F.C., Leite, F.C., Taboga, S.R. 2013. Effects of exposure to estradiol and estradiol plus testosterone on the

mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) female prostate. *Micro. Res. Tech.* 76 (5), 486-495.

Lonstein, J.S., De Vries, G.J., 2000. Influence of gonadal hormones on the development of parental behavior in adult virgin prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Behav. Brain Res.* 114, 79–87.

Loskota, W.J., Lomax, P. Verity, M.A., 1974. A Stereotaxic Atlas of the Mongolian Gerbil Brain. Los Angeles California. Ann arbor science publishers inc.

Luis, J., Cadena C., Zedillo B., Reyes J., Ramos G., Martínez M., 2012. Testosterone, replacement induced paternal behaviour in the Mexican volcano mouse *Neotomodon alstoni* (Rodentia Muridae) *Ethology, Ecology & Evolution.* 24(3), 275-283.

Luis, J., Carmona, A., Delgado, J., Cervantes, F.A., Cárdenas, R., 2000. Parental behavior of the volcano mouse, *Neotomodon alstoni* (Rodentia:Muridae), in captivity. *J Mammal.* 81, 600-605.

Luis, J., Vázquez, G.B., Martínez, M., Carmona, A., Ramos, G., Ortiz, G., 2010. Neither testosterone levels nor aggression decrease when the male Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) displays paternal behavior, *Horm. Behav.* 57 (3), 271-275.

Mani, S.K., Blaustein, J.D., O'Malley, B.W., 1997. Progesterone receptor function from a behavioral perspective. *Horm Behav.* 31, 244–255.

Marler, C., Trainor, B.C., Davis, E., 2005. Paternal behavior and offspring aggression. *Curr. Dir. Psych. Sci.* 14, 163–166.

- Marques, D.M., 1979. Roles of main olfactory and vomeronasal systems in the response of the female hamster to young. *Behav. Neural Biol.* 26:311–329.
- Martínez, A.L., 2013. Conducta paterna y testosterona en el gerbo de Mongolia (*Meriones unguiculatus*). Tesis de maestría no publicada. Universidad Autónoma de Tlaxcala.
- McGuire, B., 1988. Effects of cross-fostering on parental behavior of meadow voles (*Microtus pennsylvanicus*). *J. Mammalogy* 69, 332–341.
- Miceli, M.O., Fleming, A.S., Malsbury, C.W., 1983. Disruption of maternal behaviour in virgin and postparturient rats following sagittal plane knife cuts in the preoptica area hypothalamus. *Behav. Brain. Res.* 9,337–360.
- Miceli, M.O., Malbury, C.W., 1982. Sagittal knife cuts in the near and far lateral preoptic area-hypothalamus disrupt maternal behaviour in female hamsters. *Physiol. Behav.* 28: 857–867.
- Mock, D. W. y Fujioka, M., 1990. Monogamy and long-term pair bonding in vertebrates. *Trends Ecol. Evol.* 5,39-43.
- Monaghan, E.P., Glickman, S.E., 1992. Hormones and aggressive behavior. In J. B. Becker, S. M. Breedlove y D. Crews (eds.), *Behavioral endocrinology*. Cambridge MA MIT Press. Pp 261-286.
- Morgan, H.D., Watchus, J.A., Milgram, N.W., Fleming, A.S., 1999. The long lasting effects of electrical stimulation of the medial preoptic area and medial amygdala on maternal behavior in female rats. *Behav. Brain Res.* 99, 61–73.

- Newman, S.W., 1999. The medial extended amygdala in male reproductive behavior. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 877, 242–257.
- Numan, M., 1974. Medial preoptic area and maternal behavior in the female rat. *J Comp Physiol. Psychol.* 87, 746–759.
- Numan, M., 1994. Maternal behavior, In: Knobil, E., Neill, J.D. (Eds.), *The Physiology of Reproduction*, 2nd edition. Raven, New York, pp. 221–302.
- Numan, M., Callahan, E.C., 1980. The connections of the medial preoptic region and maternal behavior in the rat. *Physiol. Behav.* 25, 653–665.
- Numan, M., Corodimas, K.P., Fardo, E.M., 1985. The effects of paraventricular hypothalamic lesions on maternal behavior in rats. *Physiol. Behav.* 35, 417–425.
- Numan, M., Corodimas, K.P., Numan, M.J., Piers, W.D., 1988. Axon-sparing lesion of the preoptic region and substantia innominata disrupt maternal behavior in rats. *Behav. Neurosci.* 102, 381–396.
- Nunes, S., Fite, J.E., Patera, J., French, J.A., 2001. Interactions among paternal behavior, steroid hormones, and parental experience in male marmosets (*Callithrix kuhilii*). *Horm. Behav.* 39, 70-82.
- Ogawa, S., Washburn, T., Taylor, J., Lebahn, D.B., Korach, K.S., Pfaff, D.W., 1998. Modifications of testosterone-dependent behaviors by estrogen receptor- α gene disruption in male mice. *Endocrinology* 139, 5058–5068.

- Olney, J.W., Rhee, V., Ho, O.L., 1979. Kainic acid: a powerful neurotoxic analogue of glutamate, *Brain Research* 77, 507-512.
- Olney, J., Price, M., Salles, K.S., Labruyere, J., Friedrich, G., 1987. MK-801 powerfully protects against N- methyl-D-aspartate toxicity, *Eur. J. Pharmacol.* 141, 357-361.
- Parker, K.J., Lee, T.M., 2001. Social and environmental factors influence the suppression of pup-directed aggression and development of the paternal behavior in captive meadow voles (*Microtus pennsylvanicus*). *J. Compar. Psychol.* 115, 331–336.
- Parker, K.J., Lee, T.M., 2002. Interaction of photoperiod and testes development is associated with paternal care in *Microtus pennsylvanicus* (meadow voles). *Physiol. Behav.* 75, 91–95.
- Perrigo, G., Bryant, W.C., vom Saal, F.S., 1989. Fetal, hormonal, and experiential factors influencing the mating-induced regulation of infanticide in male house mice. *Physiol. Behav.* 46, 121–128.
- Kumar, R., Zakharov, M.N., Khan, S.H., Miki, R., Jang, H., Toraldo, G., Singh, R., Bhasin, S., Jasuja, R., 2012. The dynamic structure of the estrogen receptor. *J. Amino. Acids.* 81, 25-40.
- Reburn, C.J., Wynne-Edwards, K.E., 1999. Hormonal changes in males of a naturally biparental and a uniparenta mammal. *Horm. Behav.* 35,163-176.

- Roberts, R.L., Miller, A.K., Taymans, S.E., Carter, C.S., 1998. Role of social and endocrine factors in alloparental behavior of prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Can. J. Zool.* 76,1862–1868.
- Romero-Morales L., Cárdenas M., Martínez-Torres M., Cárdenas R., Rodríguez-Álvarez C., Luis J., 2020. Estradiol and estrogen receptor α in the mPOA and MeA in dwarf hamster (*Phodopus campbelli*) fathers. *Horm. Behav.* 119, 104653.
- Rosenblatt, J.S., 1967. Nonhormonal basis of maternal behavior in the rat. *Science* 156, 1512–1514.
- Rosenblatt, J.S., Ceus, K., 1998. Estrogen implants in the medial preoptic area stimulated maternal behavior in male rats. *Horm. Behav.* 33, 23–30.
- Rosenblatt, J.S., Mayer, A.D., Giordano, A.L., 1988. Hormonal basis during pregnancy for the onset of maternal behavior in the rat. *Psychoneuroendocrinology.* 13, 29-46.
- Ruiyong, W., Zhenzhen, S., Fadao T., Lu, W., Lingzhe, K., Jianli, W., 2013. Post- weaning living with parents during juvenile period alters locomotor activity, social and parental behaviors in mandarin voles. *Behav. Processes.* 98, 78-84.
- Samuel, P.A., Hostetler, C.M., Bales, K.L., 2008. Urocortin II increases spontaneous parental behavior in prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Behav. Brain Res.* 186, 284–288.
- Sagar, S.M., Sharp, R.E. Curran, T., 1988. Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level, *Science.* 240, 1328-1331.

- Schneider, J.S., Stone, M.K., Wynne-Edwards, K.E., Horton, T.H., Lydon, J. O'Malley, B., Levine, J.E., 2003. Progesterone receptors mediate male aggression toward infants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 2951–2956.
- Schum, J.E., Wynne-Edwards, K.E., 2005. Estradiol and progesterone in paternal and non-paternal hamsters (*Phodopus*) becoming fathers: conflict with hypothesized roles. *Horm. Behav.* 47, 410–418.
- Sheldon, B.C., 2002. Relating paternity to paternal care. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 357, 341–350.
- Storey, A.E., Snow, D.T., 1987. Male identity and enclosure size affect paternal attendance of meadow voles, *Microtus pennsylvanicus*. *Anim. Behav.* 35, 411–419.
- Tan, M.H., Li, J., Xu, H.E., Melcher, K., Yong, E.L., 2015. Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacol. Sin.* 36:3-23.
- Torres, J.M., Ortega, E., 2003. Differential regulation of steroid 5alpha-reductase isozymes expression by androgens in the adult rat brain. *FASEB J.* 17(11), 1428-33.
- Tsuneoka, Y., Tokita K., Yoshihara C., Taiju A., Tokita K., Yoshihara C., Taiju A., Huang J., Yu M.L., Odaka Y., 2015. Distinct preoptic-BST nuclei dissociate paternal and infanticidal behavior in mice. *EMBO J.* 34, 2652-2670.
- Trainor, B.C., Marler, C.A., 2001. Testosterone, paternal behavior, and aggression in the monogamous California mouse (*Peromyscus californicus*). *R. Soc. Lond.* 269, 823-829.

- Trainor, B.C., Marler, C.A., 2002. Testosterone promotes paternal behaviour in a monogamous mammal via conversion to oestrogen. *Proc. R. Soc. London. B.* 269, 823829.
- Trainor, B.C., Bird, I.M., Alday, N.A., Schlinger, B.A., Marler, C.A., 2003. Variation in aromatase activity in the medial preoptic area and plasma progesterone is associated with the onset of paternal behavior. *Neuroendocrinology* 78, 36-44.
- Trivers, R., 1972. Parental investment and sexual selection. In: *Sexual selection and the descent of man, 1871–1971* (Campbell BG, ed), pp 136–179. Chicago: Aldine.
- Wang, Z., Ferris, C.F., De Vries, G.J., 1994. Role of septal vasopressin innervation in paternal behavior in prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 400–404.
- Wu, Z., Autry E.A., Bergan F.J., Watabe-Uchida M., Dulac G.C., 2014. Galanin neurons in the medial preoptic area govern paternal behavior. *Nature* 509(7500), 325–330.
- Katherine E. Wynne-Edwards, E.K., Timonin E.M., 2007. Paternal care in rodents: Weakening support for hormonal regulation of the transition to behavioral fatherhood in rodent animal models of biparental care. *Horm. Behav.* 52, 114-121.
- Wang, Z.X., Liu, Y., Young, L.J., Insel, T.R., 2000. Hypothalamic vasopressin gene expression increases in both males and females postpartum in a biparental rodent. *J. Neuroendocrinol.* 12, 111–120.

- Wang, B., Li, Y., Wu, R., Zhang, S. Tai, F., 2015. Behavioral responses to pups in males with different reproductive experiences are associated with changes in central OT, TH and OTR, D1R, D2R mRNA expression in mandarin voles. *Horm. Behav.* 67, 73-82.
- Wynne-Edwards, K.E., Reburn, C.J., 2000. Behavioural endocrinology of mammalian fatherhood. *Trends. Ecol. Evol.* 15, 464-468.
- Wynne-Edwards, K.E. y Timonin, M.E., 2007. Paternal care in rodents: Weakening support for hormonal regulation of the transition to behavioral fatherhood in rodent animal models of biparental care. *Hormones and Behavior* 52, 114-121.
- Wiesner, B.P., Sheard, N.M., 1933. *Maternal Behaviour in the Rat.* Oliver and Boyd, Edinburgh.
- Young L., Nilsen R., Waymire K., MacGregor G. y Insel T. 1999. Increased affiliative response to vasopressin in mice expressing the V1a receptor from a monogamous vole. *Nature* 400, 766–768.
- Ziegler, T.E., Jacoris, S., Snowdon, C.T., 2004. Sexual communication between breeding male and female cotton-top tamarins (*Saguinus oedipus*), and its relationship to infant care. *Am. J. Primatol.* 64, 57–69.
- Ziegler, T.E., Snowdon, C.T., 2000. Preparental hormone levels and parenting experience in male cotton-top tamarins, *Saguinus Oedipus*. *Horm. Behav.* 38(3), 159-167.

Ziegler, T.E., Wegner, F.H., Snowdon, C.T., 1996. Hormonal responses to parental and non-parental conditions in male cotton-top tamarins, *Sanguinus Oedipus*, a New World primate. *Horm. Behav.* 30, 287-297.

13. Anexos

Solución para lavado vascular

50 ml de PB 0.2M + 950 ml H₂O destilada + 0. NaHCO₃ (carbonato de sodio) + 0.25g KCL + 8.5g NaCl ajustar pH a 7.4

Paraformaldehído al 4%

Calentar 500 ml de H₂O destilada a 55-58 °C. En agitación agregar 40 g de paraformaldehído + unas 6 gotas (240 µl aprox.) de NaOH 0.1N esto con la finalidad de facilitar la disolución del paraformaldehído, hasta que sea transparente la solución. Enfriar a 15 °C agregar 500 ml de PB 0.2M. Ajustar pH a 7.4 con ac. Clorhidrico 0.1N. Almacenar a 4 °C.

PBS

Preparar solución PB 0.2 M

A) 5.5g fosfato de sodio monobásico 200 ml

B) 25.4 fosfato de sodio dibásico 900ml

190 ml de A + 810 ml de B= 1000 ml

Ajustar el pH a 7.4 con ac. Clorhidrico 0.1N. Esta solución se puede almacenar a temperatura ambiente.

Para preparar PBS 0.1 M

50 ml de PB 0.2 M + 50 ml de agua destilada= 100 ml + 0.85 g de NaCl. Ajustar pH de 7.4. Almacenar a 4°C.

Peróxido de Hidrógeno al 3%

Diluir 300 µl de peróxido de hidrógeno en 10 ml de agua destilada.

Twin 20 al 0.1%

Diluir 200 µl de Twin 20 en 200 ml de PBS.

BSA

10 ml de PBS- Twin 20 al 0.1% + 0.5g de BSA.

Medio de montaje

Mezclar 500 ml de agua destilada y 500 ml de etanol al 80% y calentar a 55°C. Posteriormente agregar 1 gramo de gelatina y mezclar con agitación continua. Enfriar a 4°C.

14. Artículo

Physiology & Behavior 199 (2019) 351–358



Contents lists available at ScienceDirect

Physiology & Behavior

journal homepage: www.elsevier.com/locate/physbeh



Paternal behavior in the Mongolian gerbil, and its regulation by social factors, T, ER α , and AR



Ana Martínez^a, Marcela Arteaga-Silva^b, Herlinda Bonilla-Jaime^b, Mario Cárdenas^c, Julio Rojas-Castañeda^d, Rosa Viguera-Villaseñor^d, Ofelia Limón-Morales^b, Juana Luis^{a,*}

^aLaboratorio de Biología de la Reproducción, UMF, FES Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. de los Barrios No. 1, Tlalnepantla, Edo. de México, México

^bDepartamento de Biología de la Reproducción, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Apartado Postal 55 535, C.P. 09340, D.F., México

^cInstituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán, México

^dLaboratorio de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de Pediatría, Ciudad de México, México

ARTICLE INFO

Keywords

Paternal
Testosterone
Copulation
Nonpaternal

ABSTRACT

The present study evaluates the role of social factors in the transition from infanticidal to paternal male behavior and its association with T concentration, presence of estrogen receptor alpha (ER α) and androgen receptor (AR) in the olfactory bulb (OB), medial preoptic area (mPOA) and medial amygdala (MeA) of Mongolian gerbils (*Melomys unguiculatus*). This study included thirty-six sexually inexperienced males displaying aggressive behavior toward foreign pups. The selected animals were mated and organized into four groups. The paternal behavior tests were performed on the day of copulation (DCOPUL), during cohabitation with a pregnant female (CPREG), on the day of birth (DBIRTH), and on day 6 postpartum (DPP6). Eight sexually inexperienced males (CTL (male-male cohabitation)) were used as control. After paternal behavior tests, blood samples were obtained to quantify T by radioimmunoassay; the brains were removed and analyzed for immunoreactivity (ir) of ER α and AR. All males of the DCOPUL, DBIRTH, and DPP6 groups exhibited paternal behavior, whereas the males of CPREG and CTL groups were aggressive with the pups. Paternal behavior was associated with high T concentrations, and the presence of ER α ir and ARir in the OB, MeA, and mPOA. These results suggest that the transition from aggressive to paternal response to pups is facilitated by copulation, and that in this transition is involved an increase in T concentration. Moreover, the presence of ER α ir and ARir in the OB, mPOA, and MeA could indicate that estrogenic and androgenic pathways participate in the regulation of paternal behavior of the Mongolian gerbils.

1. Introduction

Paternal care is relatively rare among mammals, occurring only in approximately 5% of species in these vertebrates [1]. Regardless, some male mammals are known to crouch over the pups, perform pup retrieval, provide grooming, and socialize with their offspring. Furthermore, they also participate in the construction, maintenance, and vigilance of the nest, as well as in food provision [2].

Most male rodents of biparental species must inhibit their infanticidal behavior before parturition and become paternal to avoid hurting their own offspring [3,4,5]. Unlike females, infanticidal males of these rodents become paternal in the absence of hormonal changes associated with pregnancy and parturition; it is known that social factors such as copulation, cohabitation with a pregnant female, and the

presence of pups may activate hormonal changes underlying paternal behavior [6,7,8,9].

Hormones such as prolactin, oxytocin, testosterone (T), estradiol, dihydrotestosterone, and progesterone have been previously associated with the regulation of paternal behavior [10,11,12,13,14]. In the California mouse (*Peromyscus californicus*), castration in paternal males reduces the degree of paternal care, whereas that castrated males that receive exogenous T replacement display more paternal care [15]. In this rodent, the effects of T on paternal behavior are mediated through its conversion to estradiol; castrated males with sexual experience treated with T or estradiol provide more paternal care than males that received dihydrotestosterone, a non-aromatizable androgen. Further, the inhibition of aromatase, an enzyme that converts T into estradiol, blocked the positive effect of estradiol on paternal behavior [16].

* Corresponding author at: Av. de los Barrios No. 1, Col. Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo. México c.p. 05490, México.
E-mail addresses: bjh@xanum.uam.mx (H. Bonilla-Jaime), marcar@unam.mx (M. Cárdenas), luisdc@unam.mx (J. Luis).

<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2018.12.001>

Received 6 July 2018; Received in revised form 30 November 2018; Accepted 1 December 2018

Available online 04 December 2018

0031-9384/ © 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

Furthermore, increased aromatase activity in the medial preoptic area (mPOA), a critical region in the neural regulation of parental behavior, has been observed in males after they become fathers [17]. In the Mexican volcano mouse (*Neotomodon alstoni*), castration followed by T replacement triggers the onset of parental care in males that were nonpaternal before treatment [18].

Parental behavior is regulated by complex mechanisms integrating social, hormonal, and neural factors. The neural circuit regulating the maternal behavior consists mainly of the mPOA, the bed nucleus of the stria terminalis, the anterior hypothalamic area and ventromedial hypothalamic nucleus. In addition, other regions with multiple anatomical connections such as the medial amygdala (MeA), which receives projections from the olfactory bulb, are also part of this neural circuit (OB) [19,20,21,13]. Research on the neural regulation of paternal behavior remains scarce; however, the reported results so far show that several regions of the neural circuitry of maternal behavior also play an important role in the regulation of paternal behavior. In California mouse, lesions in the mPOA and the basolateral amygdala cause alterations in retrieval, crouching, grooming, and sniffing [22,23]. In prairie voles (*Microtus ochrogaster*), lesions in the basolateral nucleus of the amygdala or the corticomedial amygdala decrease the time spent in grooming and sniffing of pups [24]. Male Mongolian gerbils are monogamous rodents that with exception of suckling, provide their pups the same care as females [25,26,27]. In this rodent, copulation, cohabitation with a pregnant female, and the presence of pups facilitate paternal behavior [7,8]; further, sexually inexperienced males that displayed aggression toward the pups became paternal after being treated with T, estradiol, or dihydrotestosterone replacement. These results indicate that paternal behavior in the Mongolian gerbil may be regulated by T through estrogenic and androgenic pathways. Therefore, estrogen receptors, specifically the alpha (ER α) and the androgen receptor (AR), could be implicated in neuroendocrine mechanisms regulating paternal behavior. ER α plays a key role in regulating maternal behavior and has also been involved in the neuroendocrine mechanism that underlies paternal behavior in the mandarin voles (*Microtus mandchuricus*) [28,29]. Studies addressing the involvement of AR in the mechanisms regulating paternal behavior in mammals are novel, but the fact that the administration of dihydrotestosterone in Mongolian gerbil inhibits infanticidal behavior and triggers paternal behavior justifies further research in this regard. The present study had the following aims: (1) determine the role of copulation, cohabitation with a pregnant female, birth of pups, and the presence of the pups in the transition from aggressive to paternal response; (2) determine whether the onset of paternal behavior is associated with increased T levels; and (3) provide evidence that estrogenic and androgenic pathways are involved in the regulation of paternal behavior through the association between this behavior and the presence of ER α and AR immunoreactive cells in OB, mPOA, and MeA. In this study we used virgin aggressive males with the pups to determine the effect of social factors from aggressive to paternal response to pups as well as neuroendocrine changes associated with this transition.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Young adult males Mongolian gerbils (100 to 180 days old) were used in this study. The animals were obtained from a breeding colony kept at the Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. The gerbils were maintained under an inverted photoperiod of 12:12 h light-dark cycle (light onset at 18:00 h) and an ambient temperature between 17 °C and 21 °C. The animals were fed with Lab Chow 5001 pellets (Nutrimentos Purina, México) and tap water *ad libitum*. From weaning (between 21 and 25 days of age) to the beginning of the study, all gerbil males were housed in pairs a polycarbonate cage (27 × 21 × 14 cm) with sawdust bedding.

2.2. Selection of aggressive males with the pups

Male gerbils were submitted to screen tests of paternal behavior to characterize their behavior toward pups as paternal, indifferent or aggressive. As prairie voles and the California mouse, virgin male of Mongolian gerbils may be aggressive, paternal, or indifferent toward foreign pups of the same species [12,30,31,32]. The classification criteria for male behavior were as follows: indifferent males displayed sniffing of the pups and then moving away; aggressive males showed sniffing and attacked the pups by biting; and paternal males exhibited sniffing, grooming and crouching over the pups. Selection tests of paternal behavior were performed 12 to 20 days before the beginning of the experiment. During the tests, each male was placed in a polycarbonate cage (48 × 32 × 15 cm) with clean sawdust bedding; after 10 min of acclimatization, three pups with an aged 2–4 days old were introduced into the cage. When males attacked the pup, the cage was tapped immediately to disrupt the aggression, followed by immediate removal of the pups. Seven pups were slightly bitten; their wounds were treated with sulfathiazole powder, and they were returned to their parents afterwards. When the males displayed aggression toward pups screen test lasted between 30 and 40 s, and 5 min when they were paternal. The pups used in the paternal behavior tests were obtained from seven litters in the gerbil breeding colony. Forty-five virgin males were subjected to screen tests of paternal behavior, resulting in 36 (80.0%) aggressive males and 9 (20.0%) paternal males. The proportion of paternal vs. aggressive males toward pups was similar to the previously reported by Martínez et al. [12].

This study was not reviewed by the Ethics Commission of the FES Iztacala, UNAM because this Commission was just formed. However, the experiments were performed in accordance with the ethical guidelines and technical specifications of the Mexican Official Norm for the Production, Care and Use of Laboratory Animals [33] and the ethical guidelines of the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publication No. 8023).

2.3. Experimental conditions

Aggressive gerbils were paired with sexually inexperienced females and randomly organized in four groups of seven pairs each. The males of these groups were subject to paternal behavior tests on the day of copulation (DCOPUL), between days 14–16 of pregnancy of their mates (CPREG), on the birth day of their pups (DBIRTH), and on day 6 postpartum (DPP6). Pregnancy was determined by body weight increment. Further, the day of pregnancy was established by counting the days elapsed from the day of copulation to day of birth ($\bar{x} = 26.14 \pm 1.0$). The effect of these social factors on the behavior of males toward the pups was analyzed in different groups to avoid “sensitization”, induction of parental behavior by repeated exposure to pups [18,34]. Paternal behavior tests were conducted with foreign pups of the same species even on the days of birth and postpartum, when the males were already fathers. The experimental pairs were videotaped during 24 h beginning at the time of pairing, with a high-definition infrared camera (IR Bullet camera, 2.1 megapixels), and the videos were analyzed daily in both morning and night. Copulation was determined by the observation of copulatory series, in which the males perform mounts and hit with the hind-legs the floor of the cage “thumping” [35]; copulation occurred between six and eight days after the males and females were housed together. The remaining eight sexually inexperienced males (CTL) group, who displayed aggressiveness toward the pups, were maintained in male-male cohabitation under the same conditions indicated for the mated gerbils. Two males of the CTL group were subjected to paternal behavior tests at each of the same stages as the males of experimental groups (Fig. 1).

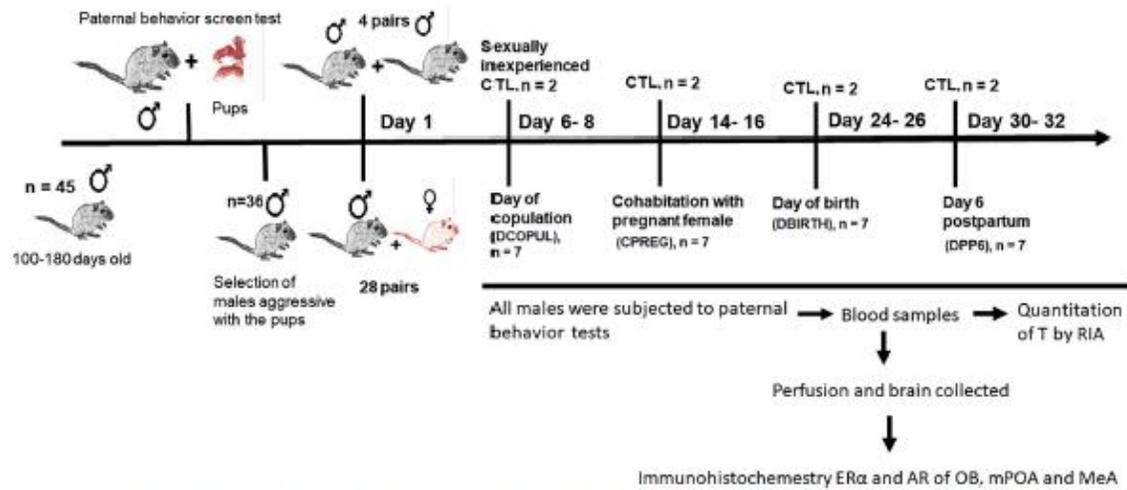


Fig. 1. Timeline illustrating the temporal sequence of events in the experimental design from sexually inexperienced status to postpartum day 6.

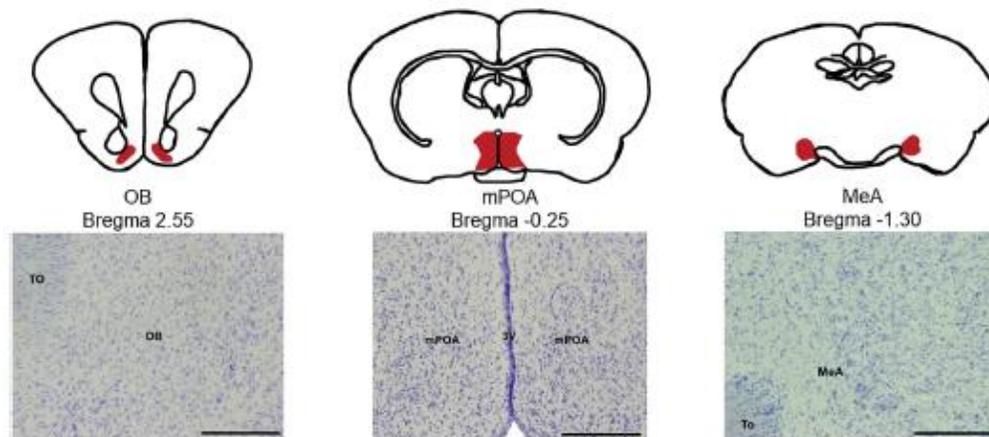


Fig. 2. Identification of study areas in coronal sections stained with Nissl; olfactory tract (To), olfactory bulb (OB), medial preoptic area (mPOA), third ventricle (3V), optic tract (To), and medial amygdala (MeA). Scale bar = 200 μm. Adapted from Radtke et al. (2016).

2.4. Paternal behavior test

Paternal behavior tests were performed following the method described above; approximately 10 pups were used during each session, tested once and then returned to their parents. Paternal behavior was videotaped for 30 min. A single observer recorded the onset latency of paternal behavior (the length of time until the male contacted the pups), and the time spent grooming and crouching over the pups. In addition, sniffing and contact time with the pups was also recorded (usually, the male sniffs and touches the pup after approaching it). Behavioral observations were carried out for between 11 and 14 h during the dark period, under red light illumination.

2.5. Hormone assay

Immediately after the paternal behavior test was performed, the male gerbils were anesthetized with sodium pentobarbital (90 mg/kg, im). When the gerbils became unresponsive, blood samples (250 μl) were collected from the retro-orbital sinus using heparinized capillary

tubes, the plasma was separated by centrifugation and stored at -70 °C. Each sample was taken for one minute. The hormonal analysis was conducted with a radioimmunoassay (RIA); T concentration was determined using a Siemens kit with ¹²⁵I testosterone (Coat-A-Count; Siemens Medical Solutions Diagnostics, Los Angeles, CA, USA) and a sensitivity threshold of 4 ng/dl [12]. The intra- and inter-assay coefficients of variation were of 2.7% and 5.6%, respectively. The T assay was validated, and it demonstrated a correlation between the dilutions of serum from Mongolian gerbils and the standard curve. The recovery rate for T was 87.0% (r = 1.0). Radioactivity was measured using a Gamma Counter 1282 Compugamma (LKB-Wallac, Turku, Finland).

2.6. Tissue collection and immunohistochemistry

After blood collection, the gerbils were intracardially perfused with physiological saline solution (0.9% NaCl) followed by 4% paraformaldehyde in sodium phosphate buffer (0.1 M PB; pH 7.6). The brains were removed and post-fixed overnight in the same fixative solution at 4 °C. The following day, the brains were cryoprotected in 30% sucrose

Table 1

Main activities observed in tests of paternal behavior in Mongolian gerbil. Latency to onset of paternal behavior and time spent in crouching and grooming by male Mongolian gerbils in the DCOPUL, DBIRTH, and DPP6 groups was not significantly different.

Aggressive males toward pups			Latency to onset of paternal behavior			Duration (s)			
N	%	Groups	Paternal behavior test	Latency to onset of paternal behavior		Crouching		Grooming	
				Median	Range	Median	Range	Median	Range
7	100	CTL	100% Aggressive	–	–	–	–	–	–
7	100	DCOPUL	100% Paternal	10	6–17	3.1	3–5.4	5.4	5–7.9
7	100	CPREG	100% Aggressive	–	–	–	–	–	–
7	100	DBIRTH	100% Paternal	11	1–14	4.0	2.5–7	2.1	0–7.7
7	100	DPP6	100% Paternal	2	1–10	4.5	0–6.1	6	0–10.7
Kruskal-Wallis				P > .05		P > .05		P > .05	

(0.2 M PBS) solution for at least 3 days (4 °C), embedded in Tissue-Tek (SAKURA Finetek USA) and stored at –80 °C. The brains were sectioned into 40 µm coronal sections on a freezing slide microtome (CM1850; Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Germany). Study areas were located using a stereotaxic atlas of the Mongolian gerbil brain (Fig. 2. OB: Bregma 2,55; mPOA: Bregma –0,25; MeA: Bregma –1,30) [36]. Six consecutive sections of each area were collected per gerbil brain and placed in vials containing 0.2 M PBS in the following order: vial 1, first and fourth sections; vial 2, second and fifth sections; and in vial 3, the third and sixth sections. The sections from vial 1 were used for the immunohistochemical analysis of ER α , those of vial 2 for AR, and those from vial 3 for Nissl technique (which involved staining with Cresyl Violet acetate). A set of Nissl-stained brain sections from each animal were used to identify the brain areas (Fig. 2).

Briefly, floating sections were incubated for 10 min with 3% H₂O₂ and then washed three times for 5 min with PBS. The sections were pre-incubated for 120 min with bovine serum albumin (BSA; Amersham Biosciences, Buckinghamshire, United Kingdom) and incubated at 4 °C for 2 days with the respective primary antibody (rabbit polyclonal antibodies for ER α MG-20, sc-542 or AR N-20, sc-816 Santa Cruz Biotechnology) solution (1:50) diluted by antibody diluent (0.2 M PBS solution containing 20% BSA and 1.7% Tween 20). The third day, the sections were washed three times for 5 min with PBS/Tween20 (0.1%) and incubated for 120 min at 37 °C with biotinylated goat anti-rabbit antibody (Vector BA-1000), followed by another round of washing three times for 5 min with PBS/Tween20 (0.1%). Afterwards, the sections were incubated with avidin-biotin complex (Vectastain ABC kit; Vector Laboratories) for 60 min, and after additional rinses, the immunoreactivity was visualized using diaminobenzidine (DAB kit, Vector Laboratories), running the reaction for 5 min. All immunohistochemistry procedures included a negative control in which the primary antibody was omitted. ER α antibody has previously been used in Mongolian gerbil [37], whereas the specificity of the AR antibody was validated utilizing prostate and kidney as positive and negative control, respectively (data not shown). The sections were mounted on gelatin-coated microscope slides and coverslipped.

2.7. Immunoreactivity quantitation

The quantitation of ER α (ER α -ir) and AR (AR-ir) immunoreactivity was performed manually using a digital image analysis system (Metamorph, version 4.5; Molecular Devices, Downingtown, PA, USA) attached to a light microscope (DMLS; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). To this purpose, the area of study was located and a box adjusted to the OB (295 × 192 µm), mPOA (551 × 508 µm), and MeA (362 × 333 µm). Bilateral quantitation of ER α -ir and AR-ir was done in each area in two brain sections per male of the DCOPUL, CPREG, DBIRTH, DPP6 and CTL groups. The number of immunoreactive cells in the neural area was counted at 10×. The obtained data were expressed as the number of immunoreactive cells/10,000 µm².

2.8. Statistical analyses

Data were checked for normality using one-sample Kolmogorov–Smirnov test. Behavioral data; onset latency for paternal behavior, time spent crouching over the pups, and grooming by the paternal males of the DCOPUL, DBIRTH and DPP6 groups (no males behaved paternally in the CPREG and CTL groups) were analyzed using Kruskal–Wallis. This same test was used to compare T concentrations in the males of the DCOPUL, CPREG, DBIRTH DPP6, and CTL groups due to the non-normality of the data. Pairwise comparisons were performed using Mann–Whitney U test with Bonferroni correction. We used one-way ANOVA to determine significant differences in ER α -ir and AR-ir cell count in OB, mPOA, and MeA among the males of the previously mentioned groups. *Post hoc* comparisons were made using Tukey test. All males of the CTL group were aggressive with the pups at each of time point in which the males of the other groups were tested for paternal behavior. Based on this, data from T concentrations were pooled for statistical analysis. This was also done with the data from number ER α -ir and AR-ir cells.

Statistical analyses were performed using the software SPSS 21.0 (IBM SPSS, Armonk, NY).

3. Results

3.1. Paternal behavior

The paternal behavior tests showed that 100% of males in the DCOPUL group exhibited paternal behavior despite their previous aggressiveness before copulation (Table 1). All males in the CPREG group displayed aggressive behavior toward the pups. Likewise, 100% of males of the DBIRTH group showed paternal behavior in the performed tests. The males of this group copulated again between 6 and 8 h after the birth of their pups. In similar manner, 100% of the males in the DPP6 group provided care to the pups by crouching over them (the male held a pup with its forelimbs and placed it under its curved body) and grooming (the male took a pup with its forelimbs and licked it, mainly in the genital region). The onset latency of paternal behavior ($H = 1.64$, $df = 2$, $P > .05$), the time that the males spent crouching over the pups ($H = 0.76$, $df = 2$, $P > .05$) and grooming ($H = 2.48$; $df = 2$, $P > .05$) among the males of the DCOPUL, DBIRTH and DPP6 groups was not significantly different. Males of the CTL group were aggressive with pups during all the experimental period (Table 1).

3.2. Testosterone quantitation

T concentrations varied significantly between the males of the CTL, DCOPUL, CPREG, DBIRTH, and DPP6 groups ($H = 21.93$, $df = 4/19$, $P < .05$, Fig. 3). Bonferroni correction indicated that the levels of this hormone in plasma were significantly higher in paternal males of the DCOPUL group than aggressive males with the pups of the CTL ($W = 21.00$, $P = .002$), and CPREG ($W = 21.50$, $P = .002$) groups.

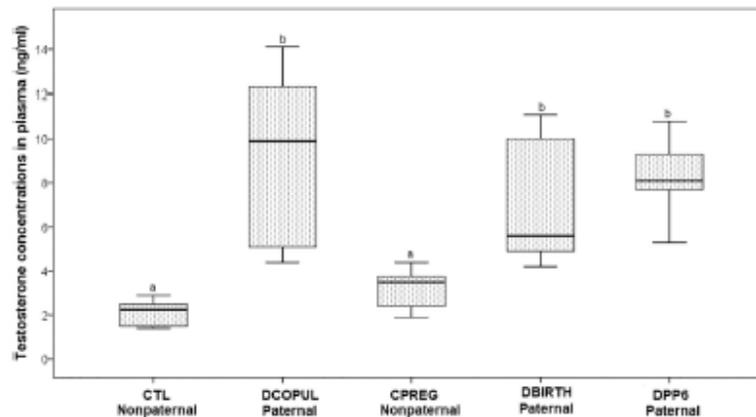


Fig. 3. The presence of paternal behavior in male Mongolian gerbils in the DCOPUL, DBIRTH, and DPP6 groups was associated with high T concentrations in plasma. Data are represented in medians, SE and interquartile range.

Paternal males of the DBIRTH group had significantly higher T concentrations than aggressive males with the pups of the CTL ($W = 21.00$, $P = .002$), and CPREG ($W = 22$, $P = .004$) groups. Likewise, T concentrations in paternal males of the DPP6 group were significantly higher than aggressive males with pups of the CTL ($W = 21$, $P = .004$), and CPREG ($W = 21.00$, $P = .004$) groups. However, T concentrations were not significantly different between paternal males of the DCOPUL, DBIRTH and DPP6 groups ($W = 32$, $P = .31$; $W = 27$, $P = .66$; $W = 30$, $P = .33$, Bonferroni adjusted $P = .005$).

3.3. Immunohistochemistry

3.3.1. ER α -ir cell count

The number of ER α -ir cells in the OB ($F = 89.91$, $df = 4/95$, $P < .05$), mPOA ($F = 75.75$, $df = 4/95$, $P < .05$), and MeA ($F = 221.77$, $df = 4/19$, $P < .05$, Figs. 4A and 5) varied significantly between males of the different groups. The Tukey test showed that males exhibiting paternal behavior (DCOPUL, DBIRTH, and DPP6) had significantly higher ($P < .05$) number of ER α -ir cells in the OB, mPOA,

and MeA than males lacking such behavior (i.e. CTL and CPREG). Males in the DPP6 group had significantly higher number of ER α -ir cells in MeA than males of the DBIRTH group.

3.3.2. AR-ir cell count

In similar manner, the number of AR-ir cells in OB ($F = 97.82$, $df = 4/19$, $P < .05$), mPOA ($F = 62.11$, $df = 4/19$, $P < .05$), and MeA ($F = 71.41$, $df = 4/19$, $P < .05$, Figs. 4B and 5) also varied significantly between Mongolian gerbil males of the different groups. Tukey test indicated that the number of AR-ir cells in OB, mPOA, and MeA of males displaying paternal behavior (DCOPUL, DBIRTH, and DPP6 groups) was significantly higher than in males lacking this behavior (CTL and CPREG groups); further, males in the 6 group had a significantly higher AR-ir cell count in MeA than the males from the DBIRTH group.

4. Discussion

All Mongolian gerbil males in the DCOPUL group, who were

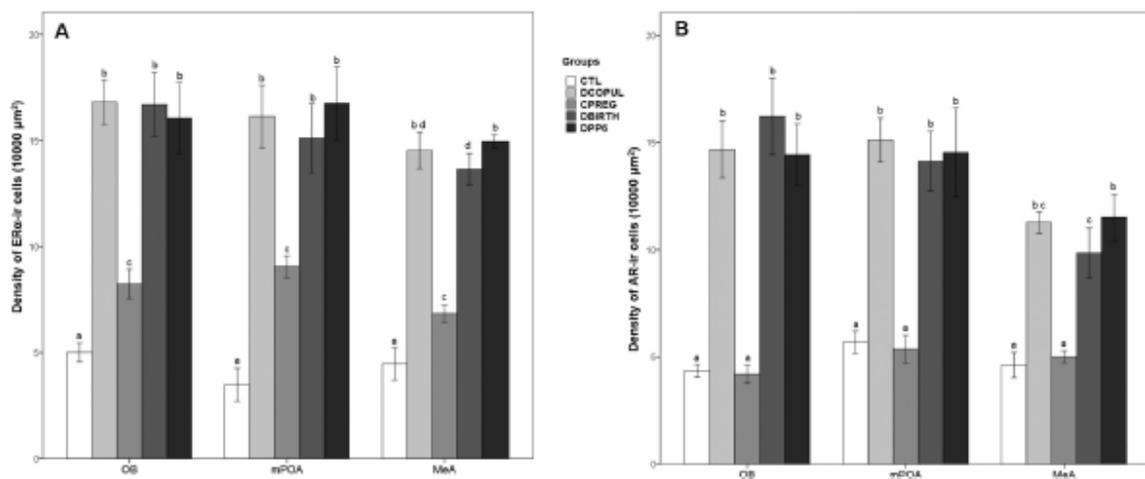


Fig. 4. Males displaying paternal behavior (DCOPUL, DBIRTH, and DPP6) had a greater density of ER α -ir (A) and AR-ir cells (B) in OB, mPOA and MeA than nonpaternal males (CTL and CPREG). Data are represented as mean \pm SE. Bars with different letters differ significantly, whereas bars sharing the same letter do not differ.

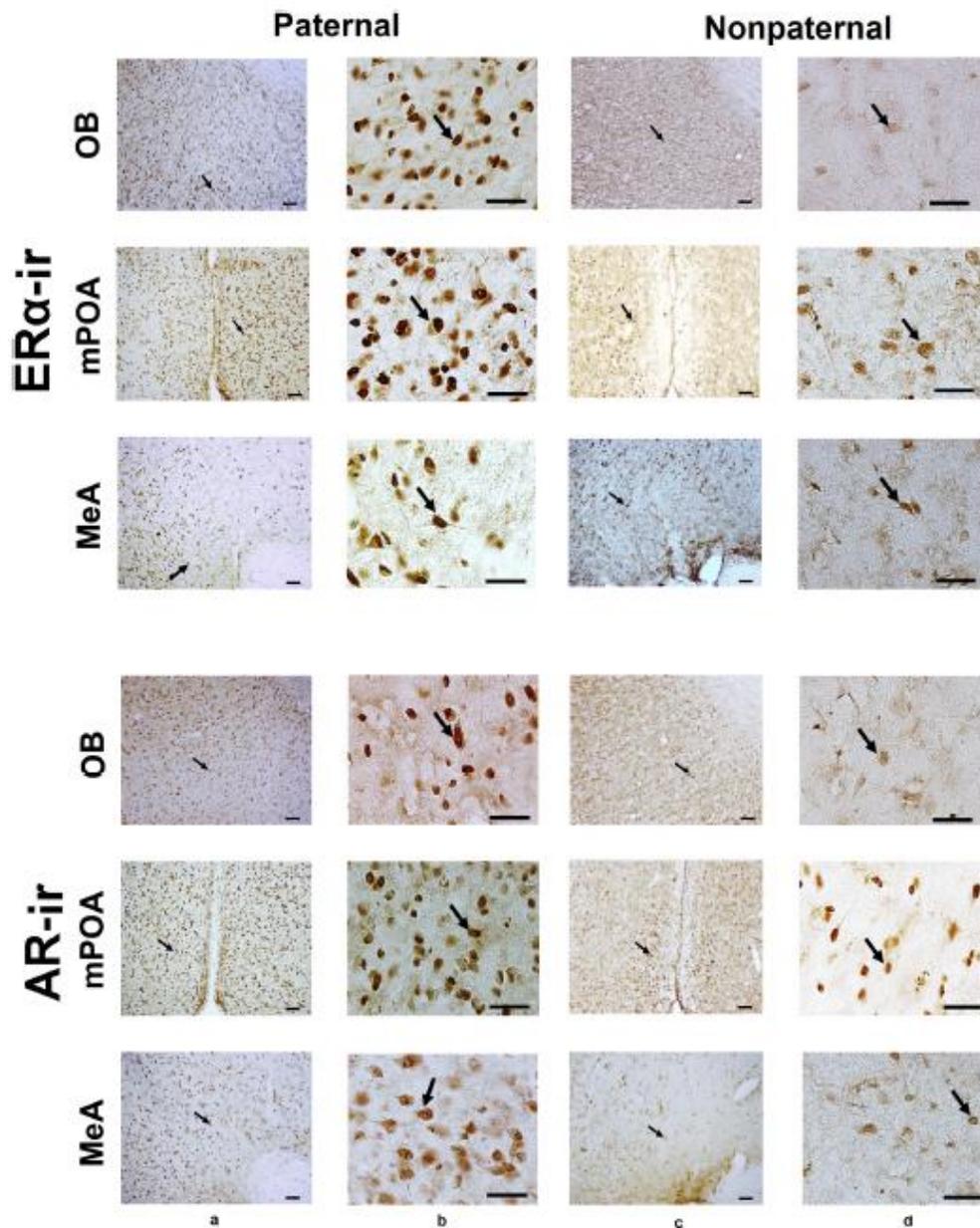


Fig. 5. Representative photomicrographs showing ER α -ir and AR-ir cells in paternal (columns a and b) and nonpaternal males (columns c and d) in OB, mPOA, and MeA. Images were taken at 10 \times (columns a and c) and 40 \times (columns b and d). Scale bar = 100 μ m.

aggressive with pups at the beginning of study, showed paternal behavior after copulation. On the other hand, males of the CTL and CPREG groups remained aggressive toward the pups. This result indicates that copulation is a social factor that naturally triggers the paternal behavior in this rodent. Brown et al. [8] similarly reported that copulation facilitates the onset of paternal behavior in this species. Further, in male CF-1 mice the cohabitation with a pregnant female, without prior copulation with the same, failed to inhibit infanticidal

behavior and to induce paternal behavior [38]. Kennedy & Elwood [39] reported that copulation *per se* reduces infanticide and increases paternal behavior in male CSI mouse. Likewise, infanticidal males of the CF1 mice and the laboratory rat became paternal when paired for 3 h with a female in estrous [40,41]. In the Mongolian gerbil paternal behavior induced by copulation was apparently temporary because all males of the CPREG group displayed aggressiveness toward the pups despite having copulated during the first 8 days of the mating period. In

the California mouse, most males in cohabitation with a pregnant female were non-paternal with foreign pups, and only 34.0% of them displayed paternal behavior 24 h after copulation [42]. de Jong et al. [43] reported that in this rodent the males in cohabitation with their pregnant mates displayed paternal behavior toward foreign pups, but in this study, the behavior of males toward pups was not determined prior to the start of the investigation. In prairie vole *Microtus ochrogaster*, paternal responsiveness was increased by cohabitation with the pregnant female [44]. In the DBIRTH group, 100% of males provided paternal care to foreign pups; this behavior was also associated with copulation in the postpartum period [45,47]. Nevertheless, the new-born pups were not attacked by their fathers because none had any traces of abuse. These results suggest that in addition to copulation, other stimuli from the females and/or pups around the time of partum and postpartum estrus may cause endocrinological changes in males, and consequently in their response toward pups.

Regarding the DPP6 group, 100% of males displayed paternal behavior, whereas the males cohabitating with their pregnant females (CPREG group) displayed aggressiveness toward the pups despite the fact that they copulated with their mates to impregnate them. This suggests that the presence of the pups is by itself enough stimulus for the maintenance of paternal behavior. In laboratory rat, the presence of pups is essential for maternal behavior [19]. However, further research is needed to analyze the role of pups in the maintenance of paternal behavior.

Paternal males of the DCOPUL, DBIRTH, and DPP6 groups had significantly higher T concentrations in the plasma than males of the CTL and CPREG groups, who were aggressive with the pups, this could indicate that an increase in T concentration is involved in the natural transition from non-paternal to paternal behavior in the Mongolian gerbil. In a previous study, we showed that sexually inexperienced males of this rodent ceased their aggressive behavior toward pups and became paternal after being treated with high concentrations of T [12]. However, it is possible that the differences in T concentrations between paternal and aggressive males are due to the stress experienced by the aggressive males, when interacting with the pups. Recently, Romero-Morales et al. [46] reported that in the Mongolian gerbil, virgin infanticidal males that exposed to pups had significantly lower T concentrations than the males that interacted with candy, but the males of both groups had lower T concentrations than paternal males that interacted with the pups [46]. In Mexican volcano mouse, an increased T concentration is also involved in the onset of paternal behavior [18]. Brown [7] highlighted that copulation facilitates the paternal behavior in rodents because it induces neuroendocrine changes altering their response to pups; however, these changes have not been described yet. Regardless, these results suggest that these neuroendocrine changes may be triggered by increased T concentration. It is known that copulation increases T level in the plasma of several mammal species [48,49,50,51,52]. Likewise, paternal males of the Mongolian gerbil had significantly higher.

ER α -ir and AR-ir cell count in OB, mPOA, and MeA than aggressive males with the pups; therefore, these receptors could be involved in the neuroendocrine regulation of paternal behavior, especially since the participation of ER α in the neuroendocrine mechanisms regulating paternal behavior has already been reported; in male mandarin voles the experience of paternity increases the ER α -ir cell count in the arcuate nucleus of the hypothalamus. In this same rodent, males with high paternal responsiveness had more ER α -ir cells in mPOA, bed nucleus of the stria terminalis, and MeA than males with low responsiveness. In the California mouse although the E $_2$ facilitates the paternal behavior [16], ER α mRNA expression in the MPOA, MeA, and BNST does not differ between fathers and virgin male [28,53].

The presence of AR-ir cells in the neural areas regulating paternal behavior in the males providing paternal care to foreign pups of the same species suggests that androgenic pathway might play an important role in the regulation of paternal behavior in the Mongolian

gerbil. However, the presence of AR-ir and ER α -ir cells in mPOA and MeA can also be associated with copulatory behavior [54].

The significant presence of AR-ir cells in the males of the DPP6 group in OB, mPOA, and mainly in MeA, when they have not recently copulated [45,55], supports the assumption that AR are involved in the regulation of paternal behavior. Further, sexually inexperienced males of the Mongolian gerbil displaying aggressive behavior toward pups exhibited paternal behavior when receiving dihydrotestosterone implants after castration [12]. In 21-day old male prairie voles, the administration of flutamide, an androgen receptor antagonist, resulted in a significantly reduced alloparental behavior (care given by juveniles to their younger siblings) [55].

Copulation and paternal behavior seem to be closely interrelated because the males displaying aggressive behavior toward the pups became paternal after copulation. Both behaviors are associated with increased peripheral T levels. Further, mPOA and estrogenic and androgenic pathways are involved in the regulation of copulatory behavior; therefore, it is plausible that both behaviors, copulatory and paternal, share some of the neuroendocrine pathways. In this regard, Newman [56,57,58] highlighted the overlap in neural circuits regulating a variety of social behaviors in mammals.

These results show that the transition from aggressive to paternal behavior in Mongolian gerbils is facilitated by copulation, probably through an increased T concentration in plasma. Moreover, the presence of ER α -ir and AR-ir cells in the OB, mPOA, and MeA, regions that participate in the neural regulation of paternal behavior suggests that the estrogenic and androgenic pathways may be involved in the regulation of this behavior.

Future studies addressing the presence of ER α -ir and AR-ir cells in OB, mPOA, and MeA in sexually inexperienced males with spontaneous parental behavior should provide more evidence of the participation of estrogenic and androgenic pathways in the regulation of paternal behavior in Mongolian gerbils.

Acknowledgments

The authors thank the PhD degree program in Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana (Iztapalapa). The authors are grateful to Pedro Medina and Carmen Álvarez for their technical assistance. We thank Dr. Daniel Díaz, PhD for his assistance in English language revision. We express our gratitude to the anonymous reviewers.

Funding

This project was supported by CONACyT (CVU 419615) and Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (IN213317), Universidad Nacional Autónoma de México.

References

- [1] D.G. Kleiman, J.R. Malcolm, The evolution of male parental investment in mammals, in: D.J. Gubernick, P.H. Klopfer (Eds.), *Parental Care in Mammals*, Plenum Press, New York, 1981, pp. 347–387.
- [2] T.H. Clutton-Brock, *The Evolution of Parental Care*, Princeton University Press, Princeton, NJ, 1991.
- [3] S.B. Hrdy, Infanticide among animals: a review, classification and examination of the implications for the reproductive strategies of females, *Ethol. Sociobiol.* 1 (1979) 13–40.
- [4] G. Hausfater, S.B. Hrdy, (Eds.), *Infanticide: Comparative and Evolutionary Perspectives*, Aldine/de Gruyter, Hawthorne, NY, 1984.
- [5] F.S. Vom Saal, Time-contingent change induced by ejaculation in male mice, *Physiol. Behav.* 34 (1985) 7–15.
- [6] G. Perrigo, W.C. Bryant, F.S. Vom Saal, A unique neural timing system prevents male mice from harming their own offspring, *Anim. Behav.* 39 (1990) 535–539.
- [7] R.E. Brown, Hormonal and experiential factors influencing parental behaviour in male rodents: an integrative approach, *Behav. Proc.* 30 (1993) 1–28.
- [8] R.E. Brown, T. Murdoch, P.R. Murphy, W.H. Moger, Hormonal responses of male gerbils to stimuli from their mate and pups, *Horm. Behav.* 29 (1995) 474–491.
- [9] C.I. Neburn, K.E. Wynne-Edwards, Hormonal changes in males of a naturally

- biparental and a uniparental mammal, *Horm. Behav.* 35 (1999) 163–176.
- [10] K.E. Wynne-Edwards, M.E. Timonin, Paternal care in rodents: weakening support for hormonal regulation of the transition to behavioral fatherhood in rodent animal models of biparental care, *Horm. Behav.* 52 (2007) 114–121.
- [11] K.E. Wynne-Edwards, Parental behavior and hormones in mammals in: D.M. Breed, J. Moore (Eds.), *Encyclopedia of Animal Behavior*, Academic Press, New York, 2010, pp. 657–663 Eds.
- [12] A. Martínez, G. Ramos, M. Martínez, L. Nicolás, A. Carmona, M. Cádiznas, J. Luis, Paternal behavior in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*): estrogenic and androgenic regulation, *Horm. Behav.* 71 (2015) 91–95.
- [13] J.S. Lonstein, M. Pereira, C.A. Marler, J.I. Morrell, T.M. Plant, A.J. Zdzienik, D.F. Albertini, R.L. Goodman, A.E. Herbison, M.M. McCarthy, L.J. Muglia, D.H. Richards (Eds.), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, Elsevier, Amsterdam, 2015, pp. 2211–2274.
- [14] N.D. Horrell, P.W. Hickmott, W. Saltzman, Neural regulation of paternal behavior in mammals: sensory, neuroendocrine, and experiential influences on the paternal brain, *Curr. Top. Behav. Neurosci.* 55 (2018) 1–50.
- [15] B.C. Trainor, C.A. Marler, Testosterone, paternal behavior and aggression in the monogamous California mouse (*Peromyscus californicus*), *Horm. Behav.* 40 (2001) 33–42.
- [16] B.C. Trainor, C.A. Marler, Testosterone promotes paternal behaviour via conversion to oestrogen in a monogamous mammal, *Proc. R. Soc. Lond. B* 269 (2002) 823–829.
- [17] B.C. Trainor, I.M. Bird, N.A. Alday, B.A. Schlinger, C.A. Marler, Variation in aromatase activity in medial preoptic area and plasma progesterone is associated with the onset of paternal behavior, *Neuroendocrinology* 78 (1) (2003) 36–44.
- [18] J. Luis, C. Cadena, B. Zedillo, J. Reyes, G. Ramos, M. Martínez, Testosterone replacement induced paternal behavior in the Mexican Volcano mouse *Neotomodon oltus* (Rodentia: Muridae), *Evol. Ecol. Evol.* 24 (3) (2012) 275–283.
- [19] M. Numan, A.S. Fleming, F. Levy, Maternal behavior, in: E. Knobil, J. Neill, L. Ewing, G. Greenwald, C. Markert, D. Pfaff (Eds.), *The Physiology of Reproduction*, Academic Press, New York, 2006, pp. 1569–1654.
- [20] J.K. Rilling, The neural and hormonal bases of human parental care, *Neuropsychologia* 51 (2013) 731–747.
- [21] C. Dula, L.A. O'Connell, Z. Wu, Neural control of maternal and paternal behavior, *Science* 345 (6198) (2014) 765–770.
- [22] A.W. Lee, R.E. Brown, Medial preoptic lesions disrupt parental behavior in both male and female California mice (*Peromyscus californicus*), *Behav. Neurosci.* 116 (2002) 968–975.
- [23] A.W. Lee, R.E. Brown, Comparison of medial preoptic, amygdala, and nucleus accumbens lesions on parental behavior in California mice (*Peromyscus californicus*), *Physiol. Behav.* 92 (2007) 617–628.
- [24] B. Kirkpatrick, C.S. Carter, S.W. Newman, T.R. Insel, Axon-sparing lesions of the medial nucleus of the amygdala decrease affiliative behaviors in the prairie vole (*Microtus ochrogaster*) behavioral and anatomical specificity, *Behav. Neurosci.* 108 (1994) 501–513.
- [25] R.W. Elwood, Paternal and maternal behaviour in the Mongolian gerbil, *Anim. Behav.* 23 (1975) 766–772.
- [26] D.A. Dewsbury, An exercise in the prediction of monogamy in the field from laboratory data on 42 species of murid rodents, *Biologist* 63 (1981) 138–162.
- [27] R.W. Elwood, The development, inhibition and disinhibition of pup-cannibalism in the Mongolian gerbil, *Anim. Behav.* 28 (1980) 1188–1194.
- [28] Z.Z. Song, F.D. Tai, C.J. Yu, R.Y. Wu, X. Zhang, H. Broders, F.Q. He, R. Guo, Sexual or paternal experiences alter alloparental behavior and the central expression of ER α and OT in male mandarin voles (*Microtus mandchuricus*), *Behav. Brain Res.* 214 (2010) 290–300.
- [29] Y. Li, Z. Lian, B. Wang, F. Tai, R. Wu, P. Hao, X. Quiso, Natural variation in paternal behavior is associated with central estrogen receptor alpha and oxytocin levels, *J. Comp. Physiol.* 201 (2015) 285–293.
- [30] J.S. Lonstein, G.J. De Vries, Sex differences in the parental behaviour of adult virgin prairie voles: independence from gonadal hormones and vasopressin, *J. Neuroendocrinol.* 11 (6) (1999) 441–449.
- [31] T.R. De Jong, A. Korosi, N.B. Harris, J.P. Perea-Rodríguez, W. Saltzman, Individual variation in paternal responses of virgin male California mice (*Peromyscus californicus*), *Physiol. Biochem. Zool.* 85 (6) (2012) 740–751.
- [32] R.W. Elwood, Changes in the responses of male and female gerbils towards test pups during the pregnancy of the female, *Anim. Behav.* 25 (1977) 46–51.
- [33] R.S. Sikes, The Animal Care and Use Committee of the American Society of Mammalogists, 2016 Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research and education, *J. Mammal.* 97 (2016) 663–688 (3).
- [34] K.O. Kuroda, M.J. Meaney, N. Vettan, Y. Fortin, A. Ponton, T. Kato, ERK-FosB signaling in dorsal MPOA neurons plays a major role in the initiation of parental behavior in mice, *Mol. Cell. Neurosci.* 36 (2007) 121–131.
- [35] R.E. Kuehn, I. Zucker, Reproductive behavior of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*), *J. Comp. Physiol.* 66 (3) (1968) 747–752.
- [36] S. Radtke-Schuller, G. Schuller, F. Angenstein, O.S. Grosor, J. Goldschmidt, E. Budinger, Brain atlas of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) in CT/MRI-aided stereotaxic coordinates, *Brain Struct. Funct.* 221 (2016) 1–27.
- [37] M. Saqui-Sales, T. Neri-Gómez, A. Gamboa-Domínguez, G. Ruiz-Palacios, I. Camacho-Arroyo, Estrogen and progesterone receptor isoforms expression in the stomach of Mongolian gerbils, *World J. Gastroenterol.* 14 (37) (2008) 5701–5706.
- [38] G. Ferrigo, I. Belvin, F.S. Vom Saal, Individual variation in the neural timing of infanticide and parental behavior in male house mice, *Physiol. Behav.* 50 (1991) 287–296.
- [39] H.P. Kennedy, R.W. Elwood, Strain differences in the inhibition of infanticide in male mice (*Mus musculus*), *Behav. Neur. Biol.* 50 (1988) 349–353.
- [40] F.S. Vom Saal, L.S. Howard, The regulation of infanticide and parental behavior: Implications for reproductive success in male mice, *Science* 215 (1982) 1270–1272.
- [41] J.A. Mennella, H. Molz, Infanticide in rats: male strategy and female counter-strategy, *Physiol. Behav.* 42 (1988) 19–28.
- [42] D.J. Gubernick, A.K. Schneider, A.L. Jeannotte, Individual differences in the mechanism underlying the onset and maintenance of parental behaviour and the inhibition of infanticide in the monogamous biparental California mouse *Peromyscus californicus*, *Behav. Ecol. Sociol.* 34 (1994) 225–231.
- [43] T.R. de Jong, M. Chamke, B.N. Harris, W. Saltzman, From here to paternity: neural correlates of the onset of paternal behavior in California mice (*Peromyscus californicus*), *Horm. Behav.* 56 (2009) 220–231.
- [44] M. Bamsdad, M.A. Novak, G.J. De Vries, Cohabitation alters vasopressin innervation and paternal behavior in prairie voles, *Microtus ochrogaster*, *Physiol. Behav.* 56 (4) (1994) 751–758.
- [45] J.H. Marston, M.C. Chang, The breeding, management and reproductive physiology of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*), *Lab. Anim. Care* 15 (1965) 34–48.
- [46] A.N. Gilbert, Postpartum and lactational estrus: a comparative analysis on Rodentia, *J. Comp. Psycho.* 98 (1984) 232–245.
- [47] I. Romero-Morales, M. Girdenas, M. Martínez-Torres, B. García-Saucedo, A. Carmona, J. Luis, Neuronal activation associated with paternal and aversive interactions toward pups in the Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*), *Horm. Behav.* 105 (2018) 47–57.
- [48] E. Frijalme, W.W. Mock, L.A. Frankel, Alterations in plasma concentrations, LH and prolactin associated with mating in the male rat, *Horm. Behav.* 6 (1975) 277–288.
- [49] J.A. Mamniak, F.A. Bronson, Gonadotropin responses of male mice to female urine, *Endocrinology* 99 (1976) 963–969.
- [50] A. Coquelin, F.H. Bronson, Release of luteinizing hormone in male mice during exposure to females: habituation of the response, *Science* 206 (1979) 1094–1101.
- [51] J. Bonilla, G. Vázquez-Palacios, M. Arriaga-Silva, S. Retana-Mirquez, Hormonal responses to different sexually related conditions in male rats, *Horm. Behav.* 49 (2006) 376–382.
- [52] J.R. Roney, A.W. Lukaszewski, Z.J. Simmons, Rapid endocrine responses of young men to social interactions with young women, *Horm. Behav.* 52 (2007) 326–333.
- [53] J.P. Perea-Rodríguez, E.Y. Takahashi, T.M. Amador, R.C. Hao, W. Saltzman, R.C. Trainor, Effects of reproductive experience on central expression of progesterone, oestrogen receptor (alpha), oxytocin, and vasopressin (V1a) receptor mRNA in the male California mouse (*Peromyscus californicus*), *J. Neuroendocrinol.* 27 (2015) 245–252.
- [54] M.E. Hull, J.M. Domínguez, Male sexual behavior, in: T.M. Plant, A.J. Zdzienik, D.F. Albertini, R.L. Goodman, A.E. Herbison, M.M. McCarthy, L.J. Muglia, D.H. Richards (Eds.), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, Elsevier, Amsterdam, 2015, pp. 2211–2274.
- [55] P.E. Medkley, O.J. Günther, Relationship of the vaginal smear to ovarian follicles and the uterus in postpartum Mongolian gerbils, *Lab. Anim. Sci.* 23 (1973) 221–225.
- [56] K.M. Kramer, A.N. Perry, D. Golbin, B.S. Cushing, Sex steroids are necessary in the second postnatal week for the expression of male alloparental behavior in prairie voles (*Microtus ochrogaster*), *Behav. Neurosci.* 123 (5) (2009) 958–963.
- [57] S.W. Newman, The medial extended amygdala in male reproductive behavior, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 877 (1999) 242–257.
- [58] S.W. Newman, Pheromonal signals across the medial amygdala: one node in a proposed social behavior network, in: D.W. Pfaff, A.P. Arnold, A. Etgen, S.E. Fährbach, R.T. Rubin (Eds.), *Hormones, Brain and Behavior*, Vol. 1 Academic Press, San Diego, 2002(17–3).



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 0000
Matrícula: 214380384

Factores sociales y cambios neuroendocrinos asociados con el inicio de la conducta paterna en el gerbo de Mongolia (*Meriones unguiculatus*)



ANA LILIA MARTINEZ BRAVO
ALUMNA

REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA

DRA. MARCELA ARTEAGA SILVA

VOCAL

DRA. HERLINDA BONILLA JAIME

VOCAL

DRA. ROSA MARIA VIGUERAS VILLASEÑOR

VOCAL

DR. JULIO CESAR ROJAS CASTAÑEDA

SECRETARIA

DRA. JUANA ALBA LUIS DIAZ

Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 10:00 horas del día 10 del mes de septiembre del año 2020 POR VIA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

DRA. MARCELA ARTEAGA SILVA
DRA. HERLINDA BONILLA JAIME
DRA. ROSA MARIA VIGUERAS VILLASEÑOR
DR. JULIO CESAR ROJAS CASTAÑEDA
DRA. JUANA ALBA LUIS DIAZ

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DE: ANA LILIA MARTINEZ BRAVO

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

aprobar

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

El presente documento cuenta con la firma -autógrafa, escaneada o digital, según corresponda- del funcionario universitario competente, que certifica que las firmas que aparecen en esta acta - Temporal, digital o dictamen- son auténticas y las mismas que usan los c.c. profesores mencionados en ella