



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO DE *JET-LAG* EXPERIMENTAL EN LA
CONDUCTA AGRESIVA DE MACHOS DE
Neotodomodon alstoni

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G A
P R E S E N T A:

BRENDA MORALES PEREZ



DIRECTORA DE TESIS:
DRA. MARÍA DEL CARMEN MIÑANA SOLIS
2015

Ciudad Universitaria, D. F.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del alumno
Morales
Pérez
Brenda
56118261
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
306266609

2. Datos del tutor
Dra.
María del Carmen
Miñana
Solis

3. Datos del sinodal 1
Dr.
Manuel
Miranda
Anaya

4. Datos del sinodal 2
M. en C.
Agustín
Carmona
Castro

5. Datos del sinodal 3
Dra.
Elsa Guadalupe
Escamilla
Chimal

6. Datos del sinodal 4
Dra.
Pilar
Durán
Hernández

A mis padres

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Ciencias por permitir mi formación como bióloga.

A mi asesora Mary por ser tan comprometida con la realización de éste proyecto, por los consejos, la orientación y el tiempo dedicado.

Al Dr. Manuel Miranda por el tiempo para revisar éste trabajo y por las explicaciones sobre cualquier duda.

Al M. en C. Agustín Carmona, por facilitarme el acceso a los ratones, por explicarme sobre su manejo y por revisar mi tesis.

A la Dra. Pilar Durán por las atenciones tan consideradas, y las observaciones acertadas como su alumna y como tesista.

A la Dra. Elsa Escamilla por el tiempo dedicado y las observaciones hechas a éste proyecto.

A mis padres por demostrarme que la responsabilidad es indispensable para desempeñarse con éxito y hacerme su prioridad junto con mi hermano, a quien reconozco todas las atenciones para que yo esté bien. Específicamente gracias Guadalupe por el interés en ayudarme cada que surgían obstáculos y a ti Enrique por ser tan paciente y comprensivo.

A Carlos (*mon ami*), Uva, Sam, Mariana y Sergio por ser la mejor compañía para todo lo que me gusta hacer.

A mis amigos de la facultad por hacer de mi paso por Ciencias una gran experiencia, por todos los lugares visitados y las fiestas compartidas; incluyendo a mis compañeros y amigos del taller pues gracias a ellos el tiempo en el laboratorio fue ameno, además de la ayuda para manejar los programas y conseguir grabar a los ratones.

A Luis Alonso por la paciencia, la compañía y hacer posible que se vieran los videos.

A mis amigos del museo por hacer de mi estancia en dicho lugar una temporada divertida.

Índice

Resumen	9
1. Introducción	10
1. 1. Definición de agresividad.....	10
1. 2. Tipos de agresión	11
1. 3. Causas, consecuencias y características conductuales de la agresión intraespecífica	12
1. 4. Caracterización del comportamiento agresivo intraespecífico.....	13
1. 4. 1. Señales ritualizadas	14
1. 4. 2. Efecto ganador y perdedor	15
1. 5. Características fisiológicas del comportamiento agresivo	14
1. 5. 1. Hormonas involucradas en la conducta agresiva	18
1. 5. 2. Testosterona.....	19
1. 5. 2. 1. Metabolismo de la testosterona.....	20
1. 5. 2. 2. Hipótesis de desafío	20
1. 5. 2. 3. Testosterona y conducta	21
1. 5. 2. 4. Secreción diaria de testosterona	23
1. 6. Influencia del ciclo estral en la fisiología y comportamiento de los machos	24
1. 7. Ritmos biológicos	26
1. 7. 1. Propiedades de los ritmos circadianos	28
1. 7. 2. Fotoperiodo	29
1. 7. 3. Sistema circadiano	29

1. 7. 4. Núcleo Supraquiasmático.....	30
1. 8. Vías de sincronización del sistema circadiano	31
1. 8. 1. Alteraciones de los ritmos circadianos debidas al fotoperiodo	32
1. 8. 1. 1. Descompensación horaria debida a vuelos transmeridionales (<i>jet-lag</i>)	33
1. 8. 1. 2. Modelos experimentales de <i>jet-lag</i>	35
1. 9. Relación entre la agresividad, testosterona y ritmos biológicos	37
1. 9. 1. Modelos utilizados en el estudio de la agresividad y testosterona	38
1. 10. El ratón de los volcanes <i>Neotomodon alstoni</i> (Rodentia: Cricetidae).....	38
1. 10. 1. Características morfofisiológicas	39
1. 10. 2. Aspectos generales del comportamiento agresivo del ratón de los volcanes (<i>Neotomodon alstoni</i>)	40
1. 10. 3. Estudios realizados en <i>Neotomodon alstoni</i>	41
2. Justificación	42
3. Hipótesis general	43
3.1. Hipótesis particulares	43
4. Objetivo general	44
4. 1. Objetivos particulares	44
5. Métodos	45
5. 1. Animales experimentales.....	45
5. 2. Registro de actividad locomotora	45
5. 3. Elaboración del etograma para enfrentamientos entre machos de <i>Neotomodon alstoni</i>	46

5. 4. Enfrentamientos	47
5. 4. 1. Enfrentamientos control.....	48
5. 4. 2. Enfrentamientos durante <i>jet-lag</i> experimental	49
5. 5. Obtención de sangre para la evaluación de la concentración de testosterona (diaría y post-enfrentamiento).....	50
5. 6. Análisis de la concentración plasmática diaria de testosterona.....	51
6. Resultados	52
6. 1. Actividad locomotora en la semana base	52
6. 2. Actividad locomotora durante <i>jet-lag</i> experimental	52
6. 3. Etograma de los enfrentamientos entre machos de <i>Neotomodon alstoni</i>	52
6. 4. Conducta agresiva durante los enfrentamientos control.....	52
6. 5. Conducta agresiva durante <i>jet-lag</i> experimental	53
6. 6. Ritmo diario de concentración de testosterona	55
6. 7. Concentración de testosterona post-enfrentamientos control	58
6. 8. Concentración de testosterona post-enfrentamiento durante <i>jet-lag</i> experimental.....	59
7. Discusión.....	60
7. 1. Actividad locomotora en la semana base y durante <i>jet-lag</i> experimental	60
7. 2. Conducta agresiva registrada en el etograma y en los enfrentamientos control	60
7. 3. Conducta agresiva durante el protocolo de <i>jet-lag</i>	61
7. 4. Conducta agresiva en toda la fase experimental	62
7. 5. Concentración plasmática diaria de testosterona	63

7. 6. Comparación de la concentración plasmática de testosterona post-enfrentamiento control con los niveles diarios	63
7. 7. Concentración plasmática de testosterona después de un enfrentamiento durante <i>jet-lag</i> experimental	64
7. 8. Influencia del estrés en la conducta y fisiología de los animales experimentales	65
8. Conclusiones.....	67
8. 1. Perspectivas	68
9. Anexos.....	69
9. 1. Etograma.....	69
9. 2. Tabla para obtener los índices de conducta.....	79
9. 3. Análisis de ELISA para cuantificar testosterona	80
10. Literatura citada	82

Resumen

Las sociedades actuales poseen rasgos importantes como la agresividad, la cual es un comportamiento cada vez más frecuente, y los viajes transmeridionales en poco tiempo que generan el llamado síndrome de *jet-lag*, éste se caracteriza por alteraciones desfavorables en los patrones circadianos fisiológicos y conductuales de los individuos.

El presente trabajo se enfocó en los efectos que el *jet-lag* ejerce sobre la conducta agresiva, la actividad locomotora y la secreción de testosterona en machos del ratón de los volcanes *Neotomodon alstoni*. Se registró la actividad locomotora de los individuos durante toda la fase experimental y se realizó el etograma de los encuentros agresivos. Posteriormente se evaluó la concentración de testosterona: a lo largo de un ciclo LO 12:12 ZT0 a las 07:00, post-enfrentamiento bajo el mismo ciclo LO, y post-enfrentamiento bajo *jet-lag* experimental, que consistió en el adelanto de 6h en el inicio de la fotofase. Los enfrentamientos de ésta etapa se realizaron al inicio de la escotofase por siete días. Se observó que la actividad de los organismos se concentró principalmente en la escotofase, el ritmo diario de secreción de testosterona presenta el valor máximo entre ZT8 (03:00) y ZT12 (19:00), cuando están por iniciar su actividad; algunos de los organismos presentan siempre mayores concentraciones de ésta hormona con respecto a los demás y mostraron tendencia a expresar conductas ofensivas o defensivas en los enfrentamientos control. Finalmente, se observó un desajuste en las variables medidas en los ratones; ya que, durante los siete días del *jet-lag* experimental: se observaron transitorios en el ritmo de actividad; exhibieron dos bloques, uno al comienzo de la nueva escotofase y otro de mayor duración que iniciaba unos minutos antes cada día, la conducta agresiva no aumentó debido a que todos los ratones exhibieron conductas defensivas en varios enfrentamientos y los valores de la concentración de la hormona post-enfrentamiento presentaron variaciones los siete días y fueron menores que los obtenidos antes de adelantar el horario de luz.

1. Introducción

La secreción de diversas hormonas, entre ellas la melatonina y la testosterona puede ser modificada por el fotoperiodo (Deacon y Arendt, 1996; Esquifino, *et al.*, 2004), Ésta última es un andrógeno gonadal involucrado en varios aspectos del comportamiento social en los mamíferos machos como la conducta sexual y es fundamental para desencadenar el comportamiento agresivo (Albert, *et al.*, 1987; Hart, 1974). Los viajes transmeridionales realizados en los medios de transporte actuales (avión) generan alteraciones en el fotoperiodo al cruzar varias zonas horarias (Collado, *et al.*, 2001), con ello se genera lo que se ha denominado “síndrome de *jet-lag*”, el cual consiste en la desorganización circadiana endógena, como la secreción de hormonas incluida la melatonina. Debido a ello se manifiestan varios problemas fisiológicos y conductuales dado que el organismo se ajusta lentamente a las nuevas señales de tiempo que brindan las condiciones ambientales (Deacon y Arendt, 1996).

1. 1. Definición de agresividad

La agresión es un comportamiento ancestral y complejo desplegado por casi todos los organismos, al menos todos los vertebrados (Giammanco, *et al.*, 2005; Scotti, *et al.*, 2009). Sin embargo también se ha descrito en insectos tales como hormigas (Knaden y Wehner, 2004) y abejas (Alaux, *et al.*, 2009). Cumple con varias funciones adaptativas, como defender el territorio, conseguir reproducirse y brindar protección a sus crías (Scotti, *et al.*, 2009), preservar y proteger al individuo debido a que puede incrementar su dominancia en el medio social (Jianghong, 2004). La agresión abarca desde la ejecución de gestos amenazantes hasta ataques reales (Giammanco, *et al.*, 2005). En términos generales esta conducta se ha definido como “la respuesta de un sujeto que genera estímulos nocivos hacia otro” (Fedigan, 1992; Jianghong, 2004; Olivier y Young, 2002; Simpson, 2001; Soma, *et al.*, 2008).

La agresividad puede designarse como la frecuencia y/o la intensidad de la conducta agresiva en el animal. Puede ser evaluada mediante pruebas repetidas de ésta

conducta al confrontar al animal en varias ocasiones bajo condiciones constantes con otro u otros de la misma especie y género (Lagerspetz, 1964).

El comportamiento agresivo en la sociedad es un serio problema y la creciente prevalencia de conductas violentas que ha contribuido para incrementar el interés y atención en el tema de agresión y sus víctimas (Muñoz, *et al.*, 2010; Simpson, 2001).

En humanos, el comportamiento que incluye cierto grado de agresión y dominancia es útil para facilitar el compromiso en las actividades cooperativas y competitivas con los propios compañeros. Canalizado en la dirección apropiada, permite que una persona sea saludablemente auto-assertiva, dominante e independiente, que logre manejarse y también a su entorno (Jianghong, 2004).

El concepto de agresión ha sido dividido en diferentes tipos basados en las diferencias de las condiciones sociales en que tal comportamiento ha sido observado (Soma, *et al.*, 2008). El comportamiento agresivo o agonístico es intraespecífico, y se refiere al conjunto de los elementos de comportamiento ofensivos y defensivos que abarcan todas aquellas conductas que implican conflicto incluidos el apaciguamiento, la conducta de evitación y pelea (Olivier y Mos, 1992).

1. 2. Tipos de agresión

En general ésta conducta en mamíferos presenta cinco variedades:

- a) Agresión como juego; actividades realizadas por individuos prepúberes
- b) ofensiva; presente en interacciones de machos postpuberales y cuando defienden su territorio.
- c) defensiva; se observa en respuesta al ataque de un depredador o conespecífico.
- d) materna; dirigida a intrusos que llegan al área de la hembra después del parto o que atacan a las crías.
- e) predatoria; ataque hacia un animal que será comido (Blanchard, *et al.*, 2003; Soma, *et al.*, 2008).

La agresión se caracteriza por ser de tipo inter o intraespecífica. Cuando ésta es interespecífica, suele ser dirigida del depredador a su presa, mientras que en la

intraespecífica las causas son mostrar dominancia respecto a otro individuo dentro del grupo y el acceso a los recursos, por ejemplo: alimento, pareja reproductiva y refugio (Coon, 2005; Maier, 2001). Cuando se presenta entre machos, suele ser estimulada por la presencia de un nuevo macho conespecífico en un área neutral (Jianghong, 2004).

1. 3. Causas, consecuencias y características conductuales de la agresión intraespecífica

La competencia por acceder a recursos limitados, como compañero sexual, alimento o cobijo es la causa principal de ésta forma de agresión (Maier, 2001). Otra de las causas es conseguir el rango dominante dentro del grupo y como consecuencia acceder fácilmente a los recursos antes mencionados, para ello se presentan enfrentamientos, y las relaciones de dominancia entre los animales suelen ser determinadas por el comportamiento agresivo o sumiso, esto se ha observado en investigaciones cuyos modelos son roedores, primates no humanos y humanos (Craig, 1986). Cuanto mayor sea el beneficio obtenido al conseguir los recursos, más violenta será la confrontación (Maier, 2001). Por ejemplo: cuando dos ratas macho son puestas en la misma jaula, la jerarquía se establece de manera inmediata debido a que una de ellas mostrará actitudes de supremacía como amenazar, atacar al otro tomar siempre la comida primero, mientras que el animal subordinado asume actitud defensiva. Sin embargo, si dos animales que han mostrado actitud dominante ante otras ratas son puestas en la misma jaula, es posible que la jerarquía no sea establecida. En éste caso, ambos animales constantemente tratarán de ser los dominantes, y no se atreverán a tomar primero la comida. Como resultado es probable que bajo ésta evidente condición de estrés crónico, la situación ocasione pérdida de peso en los dos animales y la muerte de uno de ellos (Giammanco, *et al.*, 2005).

Sin embargo, en la especie de ratones *Mus musculus* se ha reportado que la intensidad de los encuentros agresivos disminuye cuando se llevan a cabo

diariamente (Welch y Welch, 1969). Así para su análisis, la agresión intraespecífica o el comportamiento agonístico puede dividirse, como ya se mencionó en conductas ofensivas y defensivas.

1. 4. Caracterización del comportamiento agresivo intraespecífico

Las conductas con iniciativa para el ataque son referidas como ofensivas, mientras que la agresión defensiva no involucra la aproximación activa al oponente, es decir, no hay iniciativa para atacar (Olivier y Mos, 1992; Olivier y Young, 2002; Soma, *et al.*, 2008). En roedores, el comportamiento defensivo puede consistir en mordeduras de desquite y defensa de las partes más vulnerables del cuerpo como el abdomen (Olivier y Mos, 1992).

Existe marcada diferencia entre conducta agresiva y dominante. Quien expresa la conducta agresiva pretende causar daño a su oponente, mientras que la dominante implica rango elevado dentro del grupo. De tal manera que existen organismos que pueden ser agresivos, pero no necesariamente dominantes y viceversa. El estatus dominante puede ser determinado al analizar la frecuencia y dirección de conductas sutiles tales como amenazas para desplazar al otro individuo, y también al utilizar ataques directos. En varias especies animales la conducta agresiva ayuda a conseguir estatus dominante, lo que facilita acceso a los recursos. Sin embargo, las jerarquías de dominancia son construidas al emplear diferentes intensidades de conductas agresivas hacia los rivales (Honesty y Marin, 2006).

Un sólo encuentro agresivo se puede incrementar la intensidad de esta conducta en confrontaciones futuras independientemente de que se haya identificado claramente al ganador. La intensidad en la agresión puede expresarse como la breve latencia de ataque, aumento en la frecuencia de iniciar los ataques o en la duración de la agresión. Como consecuencia del incremento en la agresión después de las confrontaciones o de una sola experiencia ganadora se acrecenta la probabilidad de ganar futuros encuentros agresivos. Lo anterior debido a que se generan cambios neuronales involucrados en el aprendizaje que pueden contribuir a la motivación

para iniciar el encuentro agresivo (Oyegbile y Marler, 2005), esto se ha demostrado en varias especies como humanos (Simpson, 2001), peces macho de la especie *Betta splendens* (Thompson y Sturm, 1965) y en ratas (Van Hemel, 1972). También se ha demostrado que la agresión puede disminuir al sancionar dicho comportamiento, por ejemplo, las ratas que mostraron ataques mortales hacia ratones los redujeron después de haber sido castigadas con choques eléctricos. Roberts y Blase, en 1971, demostraron que el grado de supresión de la agresión depende de la intensidad de los choques eléctricos aplicados como castigo (citado en Baisinger y Roberts, 1972).

Enfrentarse para adquirir posición dentro del grupo y así acceder a los recursos mencionados anteriormente, también implica costos pues el gasto energético y el riesgo de resultar herido incrementan, lo que conlleva a ser vulnerable a depredadores (Rutte, *et al.*, 2006). Por ello los animales muestran lo que se ha denominado señales ritualizadas.

1. 4. 1. Señales ritualizadas

Cuando el animal dirige el ataque intenso contra otro individuo implica desventajas; ya que el rival podría ser consanguíneo, y si lo mata se reduciría indirectamente su propia eficacia biológica, es decir, su éxito reproductivo es afectado (Bernal, 2011; Maier, 2001), además de que luchar violentamente podría provocar en el agresor heridas graves o la muerte. Es por ello que la mayoría de las luchas entre conespecíficos están ritualizadas, en otras palabras, los animales deciden sólo mostrar y no utilizar ciertos atributos como lo son grandes dientes, garras o pelaje erizado, para parecer peligrosos (Maier, 2001).

Después del enfrentamiento inicial, los encuentros posteriores originarán expresiones de sumisión o dominancia, las primeras inhiben la agresión entre conespecíficos. En la mayoría de los casos, una señal de sumisión (o apaciguamiento) permite que el perdedor se retire sin recibir más ataques por parte del vencedor (Maier, 2001). Las relaciones dominante-subordinado una vez

establecidas persisten ya que son reforzadas por la tendencia de los animales a emitir señales ritualizadas que indican su rango respecto al otro. Entonces se presentan los efectos ganador y perdedor (Rutte, *et al.*, 2006).

1. 4. 2. Efecto ganador y perdedor

La experiencia previa de cada animal influye en la predisposición que tienen para participar en conflictos (Rutte, *et al.*, 2006). Existen factores extrínsecos que pueden tener efecto en las interacciones agresivas entre dos individuos, así como en las estructuras jerárquicas de dominancia. Esos factores extrínsecos incluyen efecto ganador y perdedor (Dugatkin y Dugatkin, 2007). Tales efectos son útiles para obtener explicaciones adaptativas sobre el comportamiento (Rutte, *et al.*, 2006). El efecto ganador, se define como el incremento significativo en la probabilidad de ganar los siguientes enfrentamientos después de una experiencia victoriosa (Dugatkin y Dugatkin, 2007; Fuxjager, *et al.*, 2009; Oyegbile y Marler, 2005; Rutte, *et al.*, 2006), mientras que el efecto perdedor implica lo opuesto, las probabilidades de ganar disminuyen (Dugatkin y Dugatkin, 2007; Rutte, *et al.*, 2006). Por lo tanto, los ganadores son más propensos a ganar y los perdedores lo serán a perder, contra diferentes oponentes (Rutte, *et al.*, 2006).

A continuación se muestran algunas propuestas que ayudan a comprender los efectos ganador y perdedor, como la “hipótesis de la señal social”. Ésta asume que la victoria y derrota dejan rastros que afectan las decisiones subsecuentes de los oponentes, y la “hipótesis de la auto-evaluación” donde se asume que los ganadores y perdedores gracias a su experiencia previa obtienen información acerca de la propia habilidad para pelear en la población (Rutte, *et al.*, 2006). Debido al efecto ganador, los animales victoriosos logran ser mejores peleadores posiblemente por aprendizaje de detectar cómo ganar más eficientemente porque utilizan mejores estrategias. La duración de éste efecto puede variar, ya que algunos experimentos demuestran que en peces el efecto ganador puede durar desde unos segundos hasta tres días (revisado en Oyegbile y Marler, 2005).

Existen diferencias específicas en la ocurrencia y relativa importancia del efecto ganador, aunque algunas de ellas pueden tener base metodológica tal como la asignación no aleatoria de los individuos para que ganen o pierdan y el tiempo transcurrido entre cada encuentro agresivo, la organización social, las diferencias entre los sistemas de apareamiento y especialmente la incidencia de territorialidad, tenga efecto significativo en la conducta ganadora (Oyegbile y Marler, 2005). Se ha demostrado que ser residente es para un individuo el determinante contextual del resultado de la pelea, es decir, cuando el individuo participa en un enfrentamiento en su territorio es muy probable que gane (Fuxjager, *et al.*, 2009).

Aquellas especies cuyo sistema ecológico es territorial y agresivo podrían ser más propensas a mostrar clara evidencia del efecto ganador. Se sabe que en los ratones machos de *Peromyscus californicus*, especie que cuenta con un sistema social muy agresivo, territorial, monógamo y paternal a lo largo de todo el año se presenta el efecto ganador; contrario a lo que sucede con la especie *Peromyscus leucopus*, cuya organización reproductiva es poligínica, sin cuidado parental, son generalmente menos agresivos y territoriales que *P. californicus*. Algunas interacciones de *P. leucopus* parecen ser resueltas pacíficamente, y es por ello que no se presenta el efecto ganador de modo significativo.

En algunas especies, para que exista el efecto ganador es necesario que se presente el efecto perdedor, sin embargo éste último puede mostrarse aunque el efecto ganador esté ausente. En *P. californicus* haber ganado un encuentro tiene influencias en el comportamiento ganador que duran mínimo dos días, porque se ha demostrado que es necesario tener tres victorias previas (cada dos días) para influenciar significativamente la habilidad para ganar (Oyegbile y Marler, 2005).

Una explicación adaptativa para los efectos ganador y perdedor es, que el ganador obtiene acceso a ciertos bienes e incrementa su “capacidad para retener recursos” y un perdedor cuya habilidad para pelear decae debido al gasto en sus reservas energéticas o a las heridas, podría beneficiarse de evitar participar en los siguientes encuentros porque sus posibilidades de ganar son reducidas y el riesgo de resultar lesionado aumenta. Mientras que los mecanismos no adaptativos no involucran decisiones estratégicas y se presentan cuando gracias a la decisión de no pelear se

obtiene ganancia energética, así el efecto ganador podría ser subproducto de éste aumento en la fuerza o reservas corporales y el efecto perdedor podría ser causado por la reducida habilidad de pelear, debido simplemente al cansancio o heridas infringidas en los enfrentamientos previos.

Existe evidencia teórica y empírica que revela que los efectos ganador y perdedor son cruciales para la formación de la jerarquía en los grupos (Rutte, *et al.*, 2006).

Se ha demostrado en la especie de ratón *P. californicus* que existe relación directa entre el incremento transitorio en los niveles de testosterona después de un enfrentamiento, la agresión que expresarán en futuros encuentros y resultar victoriosos en ellos. Cuando no se presenta el aumento transitorio de esta hormona, tal es el caso de los machos castrados, tampoco incrementa la agresión en enfrentamientos posteriores (Oyegbile y Marler, 2005).

La “hipótesis de auto-evaluación”, como ya se mencionó propone que la experiencia previa es utilizada para determinar la propia habilidad para pelear en relación con la misma de otros individuos en la población. La probabilidad de ganar depende de cuántos y cuáles son los individuos débiles y fuertes dentro de la población. Conocer únicamente la propia habilidad para pelear podría no ser una predicción confiable del resultado de la pelea ya que un individuo que se considera fuerte podría ser inferior si hay individuos aún más fuertes en el grupo. Por ello la experiencia obtenida de los enfrentamientos previos y sucesivos es importante al momento de decidir sobre participar en un encuentro (Rutte, *et al.*, 2006).

La fisiología de los organismos está ligada a la expresión del comportamiento agresivo. De acuerdo con el hecho de que los efectos ganador y perdedor pueden ser subproductos de mecanismos hormonales que regulan la conducta agonística durante los encuentros; los enfrentamientos intensificados resultan en cambios de niveles de hormonas circulantes que persisten por algún tiempo y después regresan a valores basales (Rutte, *et al.*, 2006). Además, se cree que la expresión del efecto ganador poco notable, como el que ocurre en la especie *P. leucopus* la cual es menos agresiva y territorial comparada con *P. californicus*, está asociado con el cambio en la función de las hormonas, como cuando la testosterona ejerce escasa influencia sobre el comportamiento agresivo (Oyegbile y Marler, 2005).

1. 5. Características fisiológicas del comportamiento agresivo

En todos los vertebrados los machos generalmente son más agresivos que las hembras y los mecanismos neurofisiológicos que regulan ésta conducta son similares en todas estas especies. Por ello las investigaciones sobre la conducta agresiva se enfocan en los efectos de las hormonas gonadales (Giammanco, *et al.*, 2005). Diversos estudios indican que los factores ambientales, sociales y procesos biológicos como: la deficiencia en el funcionamiento de algunas áreas cerebrales, influyen directamente en la conducta agresiva debido a variaciones en los niveles de hormonas como la testosterona (Alock, 2005; Jianghong, 2004; Rutte, *et al.*, 2006; Simpson, 2001).

1. 5. 1. Hormonas involucradas en la conducta agresiva

Es sabido que las hormonas esteroideas modulan el comportamiento a través de acciones indirectas sobre los neurotransmisores en el sistema nervioso central (SNC) (Simpson, 2001). Por ejemplo: los receptores de testosterona en el SNC están localizados sobre todo en neuronas pertenecientes al área preóptica medial frente al hipotálamo, el cual está involucrado en la conducta agresiva. El efecto de ésta hormona se relaciona con la influencia que ejerce sobre los niveles de algunos neurotransmisores y neuromoduladores, así como sus propios receptores. En particular, existe una relación inversa entre los elevados niveles de testosterona presente en el plasma sanguíneo y en el fluido cerebroespinal con los de serotonina presentes en el cerebro lo que conlleva al incremento de la agresión en varias especies (Giammanco, *et al.*, 2005).

En varias especies de roedores la melatonina es una hormona que ejerce influencia sobre el despliegue del comportamiento agresivo. Ésta hormona es secretada por la glándula pineal durante la noche y su secreción es suprimida en presencia de luz, cuando es administrada de manera exógena, incrementa la agresión en los ratones de la especie *Mus musculus* y los hámsteres de las especies *Phodopus sungorus* y *Mesocricetus auratus*. El incremento en la agresión inducido por ésta hormona es

bloqueado por la remoción bilateral de las glándulas adrenales en *P. sungorus*. Esto sugiere que en adición a la testosterona; la melatonina y las hormonas adrenocorticales, como la dehidroepiandrosterona (DHEA) regulan la agresión en estos organismos (Scotti, *et al.*, 2009).

Todas las formas de comportamiento agresivo que comparten características conductuales. Sin embargo, los factores ambientales que promueven tales conductas y los sustratos biológicos difieren marcadamente, por ejemplo, la regulación endócrina de la agresión es distinta cuando los días tienen diferentes duraciones. Estudios recientes indican que algunas hormonas, tanto esteroideas y no esteroideas, intervienen en la expresión de la agresión, independientemente o en conjunto con la testosterona. Tales mecanismos podrían ser particularmente importantes para las hembras y los machos que aún no se reproducen (Soma, *et al.*, 2008).

1. 5. 2. Testosterona

En los machos los andrógenos se sintetizan en el tejido intersticial de los testículos, en las células de Leyding (Justel, *et al.*, 2009; Scotti, *et al.*, 2009). La testosterona es la principal hormona que se produce a nivel testicular (Jensen, 1976; Molina, 2006) e induce modificaciones tanto en la fisiología como en la conducta de los organismos (Guyton y Hall, 2007; Justel, *et al.*, 2009). La presencia de ésta hormona y otros andrógenos participan en la producción y mantenimiento de los caracteres sexuales secundarios masculinos (Guyton y Hall, 2007; Jensen, 1976). Por otro lado, ésta hormona se relaciona con el rango social y la conducta de agresión en varias especies que incluyen: ratas, ratón, monos, hámsteres, perros y venados (Rada, *et al.*, 1976; Russo, *et al.*, 2012).

1. 5. 2. 1. Metabolismo de la testosterona

La testosterona, es una hormona esteroidea cuya fórmula química es 17 beta-hidroxiado, C-19. La mayor parte de ésta hormona es producida en los machos por las células de Leyding en los testículos (Jensen, 1976; Molina, 2006; Yen y Jaffe, 1991), dónde se encuentra unida a la proteína de unión a andrógeno, que tiene gran similitud con la globulina de unión a hormonas sexuales (Molina, 2006), una vez que es secretada se transporta en el plasma mediante a la globulina de unión a hormonas sexuales. Se estima que cerca del 97 al 99% de la testosterona circulante está ligada a ésta proteína (Jensen, 1976; Molina, 2006; Yen y Jaffe, 1991) y se asume que la fracción restante es la porción metabólicamente activa del nivel total de la hormona, que cuando alcanza las células de sus glándulas diana como la próstata, la enzima 5-alfa-reductasa transforma la testosterona a dihidrotestosterona y es separada en varios metabolitos conjugados con ácido sulfúrico y glucurónico, los cuales son excretados en la orina (Jensen, 1976). Ésta hormona al ser secretada tiene una vida media de 20.2 ± 1.4 min y de 20.2 ± 1.7 en ratones jóvenes y maduros respectivamente (Coquelin y Desjardins, 1982) y su inactivación ocurre principalmente en el hígado, el cuál es el principal tejido que remueve esteroides de la sangre (Jensen, 1976; Yen y Jaffe, 1991).

La testosterona muestra un ritmo de secreción a lo largo de 24h en el humano y en machos de varias especies de primates no humanos, hámsteres, ratas y ratones con cierta diferencia especie-específica en la hora en que se presentan las concentraciones máximas y mínimas (Thorpe, *et al.*, 2012). La secreción de ésta y otras hormonas es afectada como resultado de un encuentro agresivo o competitivo, sin importar que el resultado sea victoria o derrota y es una causa de estrés (Suay, *et al.*, 1999), debido a lo cual se genera la hipótesis de desafío.

1. 5. 2. 2. Hipótesis de desafío

En general, la secreción de testosterona puede variar de manera casi inmediata y depende del contexto en que se encuentre el organismo. Por ello ésta hipótesis, establece que los niveles de testosterona circulantes se incrementan en los machos

después de un sólo encuentro agresivo, así se ha sugerido que ésta hormona puede funcionar para sostener, pero no para iniciar respuestas agresivas apropiadas durante y después de la confrontación, refuerza el aprendizaje de los individuos y los prepara para encuentros posteriores (Gleason, *et al.*, 2009; Oyegbile y Marler, 2005; Scotti, *et al.*, 2009). En observaciones llevadas a cabo en la especie *P. californicus*, los encuentros agresivos en los que resultan victoriosos son seguidos por el incremento en la testosterona, éste aumento se encuentra asociado al efecto ganador, ya que favorece la habilidad para ganar encuentros futuros y estimula la competitividad de los organismos (Oyegbile y Marler, 2005; Trainor, *et al.*, 2004); mientras que los machos de otras especies como los peces cíclidos, peces sapo, lémures de cola anillada y gorriones de corona blanca presentan niveles circulantes de andrógenos más altos en época reproductiva que en la temporada de no apareamiento y se elevan aún más como consecuencia de alguna interacción agresiva. Sin embargo, en las especies con altos niveles basales de testosterona es poco probable que presenten un aumento significativo después del evento agresivo (Oyegbile y Marler, 2005).

Se ha demostrado en roedores que varias derrotas ocasionan la disminución de los niveles de testosterona y prolactina, además de la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA), como consecuencia los niveles de corticosterona se incrementan 10 minutos después de la derrota y los basales son recuperados hasta 240 minutos más tarde. La explicación adaptativa para esto es que se reduce la probabilidad resultar herido a causa de actuar defensivamente. Por lo tanto, los cambios hormonales que resultan de las interacciones sociales pueden modificar el comportamiento futuro para maximizar las posibilidades de sobrevivir de los animales (Honeess y Marin, 2006; Suay, *et al.*, 1999).

1. 5. 2. 3. Testosterona y conducta

El comportamiento de los individuos puede ser alterado debido a variaciones en los niveles de ésta hormona y responder de manera óptima al medio (Gleason, *et al.*, 2009), por ejemplo, se ha demostrado que la testosterona además de ser

determinante para el inicio del comportamiento agresivo también promueve el cuidado parental, mediante inyecciones de ésta hormona en el cerebro de ratas macho (Giammanco, *et al.*, 2005).

Existe relación entre la presencia de ésta hormona en el plasma sanguíneo con la agresión en gran número de especies. Los estudios realizados con monos *Rhesus* indican que la presencia de la testosterona en los primeros años de vida del animal es importante para establecer la disposición biológica para la conducta agresiva en los machos maduros, aunado a esto, los factores sociales y el aprendizaje influyen la expresión de la agresión en la edad adulta (Rada, *et al.*, 1976).

Los niveles de dicha hormona pueden ser afectados experimentalmente debido a la administración exógena de ésta o la gonadectomía (Giammanco, *et al.*, 2005). Cuando la eliminación de la producción testicular de testosterona disminuye la agresión y la dominancia, las inyecciones de testosterona o implantes con ésta hormona restauran ésta conducta (Albert, *et al.*, 1987; Scotti, *et al.*, 2009; Simpson, 2001). De tal manera que las jerarquías establecidas entre ratas machos pueden ser invertidas por medio de la administración crónica de testosterona a los subordinados; los animales que hayan resultado perdedores en las pruebas, se volverán ganadores. Lo cual demuestra que los animales subordinados presentan los niveles más bajos de testosterona. La dominancia inducida por administración de testosterona es reversible si los animales que fueron dominantes son tratados con drogas serotoninérgicas, debido a que éstas reducen la agresividad (Giammanco, *et al.*, 2005).

Mazur en 1976, propuso un modelo para explicar la interacción compleja de la testosterona, dominancia y agresión en machos. Donde el incremento en la actitud dominante desencadenará el ascenso en los niveles de testosterona, que facilitará aún más el comportamiento agresivo y, a la inversa, la disminución en la actitud dominante reducirá los niveles de testosterona, y por lo tanto inhibirá también la conducta agresiva (citado en Honess y Marin, 2006).

En algunas especies de roedores la agresión puede no estar relacionada o ser inversamente proporcional con los niveles de testosterona circulantes. Por ejemplo, en los machos de hámster siberiano la gonadectomía, que como consecuencia

implica bajos niveles de la hormona, no tiene efecto en la conducta agresiva, y la administración exógena de testosterona ocasiona que la agresión disminuya, por ello se ha propuesto a la DHEA como una hormona involucrada en desencadenar ésta conducta, ya que es precursor de andrógenos. En contraste los hámsteres sirios machos gonadectomizados muestran incremento en los niveles plasmáticos de DHEA-S, lo cual sugiere la relación inversa entre la testosterona gonadal y la DHEA adrenal. Las interacciones agresivas rápidamente incrementan la conversión de DHEA a testosterona durante la noche, pero no durante el día (Scotti, *et al.*, 2009). Aunque puede ser afectada por el contexto social, la secreción de testosterona se presenta diariamente de manera diferencial.

1. 5. 2. 4. Secreción diaria de testosterona

La secreción de ésta hormona en los mamíferos presenta un ritmo que dura alrededor de 24h, se conoce como “circadiano” (del latín *circa* cerca y *diano* día) (Pittendrigh, 1981) y es diferente en todas las especies. En los roedores la función hipófisis-testicular presenta variación circadiana (Esquifino, *et al.*, 2004). En hámsteres machos, la testosterona alcanza los valores máximos por la tarde justo antes al inicio de actividad y los mínimos se presentan por la mañana (Hoffmann y Nieschlag, 1977).

La secreción diaria de ésta hormona puede ser modificada por el contexto social. En un experimento realizado con ratas macho agrupadas y aisladas, expuestas a 12h de luz y 12h de oscuridad, tal relación entre las horas de luz y las de oscuridad se denomina fotoperiodo y se representa (LO 12:12), las horas de luz y oscuridad son conocidas como fotofase y escotofase respectivamente, con encendido de luces a las 06:00h, las ratas que se mantuvieron agrupadas presentaron el máximo valor de secreción de testosterona durante la fotofase a las 17:00h. Éste resultó ser mayor y en diferente hora que en aquellas que se mantuvieron aisladas, en ellas el pico máximo de secreción de la hormona se alcanzó a las 22:00h, en la escotofase del ciclo (Esquifino, *et al.*, 2004).

Como se mencionó anteriormente la secreción de testosterona y la conducta de agresividad guardan estrecha relación en diversas especies. La evidencia experimental indica que en roedores el estrógeno y la testosterona pueden alargar el periodo y alterar el inicio y cantidad de la actividad locomotora (Iwahana, *et al.*, 2008). Debido a que la gonadectomía en ratones de la especie *Mus musculus* en condiciones de libre curso (OO) ocasiona la disminución de la actividad en su rueda en el inicio de la fase en que son activos. Simultáneamente, el periodo del ritmo en libre curso aumenta. Ambos efectos son eliminados con la implantación de una cápsula Silástica la cual libera una dosis de testosterona constantemente (Daan, *et al.*, 1975). En la especie *Octodon degus* la presencia de hormonas gonadales en los machos y hembras durante el estro, cuando los niveles de estrógeno son elevados, estimula la actividad en la rueda, mientras que la gonadectomía atenúa tal efecto en ambos sexos. Se ha propuesto que la testosterona que es convertida a estrógeno estimula la actividad locomotora, pues a pesar de que los niveles de ésta hormona incrementan significativamente la actividad, el estradiol es 100 veces más eficaz que la testosterona (Jechura, *et al.*, 2000).

Los niveles de testosterona de los machos pueden ser afectados por el ciclo estral de las hembras a su alrededor (Achiraman, *et al.*, 2014).

1. 6. Influencia del ciclo estral en la fisiología y comportamiento de los machos

El estado funcional del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal de las hembras es evidente gracias a los cambios cíclicos que ocurren en el epitelio vaginal, los cuales involucran la presencia de tipos celulares distintivos como resultado de la acción de los niveles de hormonas sexuales circulantes. Esos cambios cíclicos se conocen como ciclo estral y están asociados también con modificaciones en la mayoría de los sistemas del organismo y la conducta (Byers, *et al.*, 2012; Sepúlveda, *et al.*, 2012), como lo son: actividad locomotora, cognición, conducta reproductiva, ingesta de alimentos y líquidos, los cuales varían marcadamente al depender de la fase del

ciclo estral. En los roedores el periodo de éste ciclo en general abarca cuatro días, presenta cuatro fases: proestro, estro, metaestro y diestro. Cada una de éstas fases tiene duración y características citológicas que hacen evidente el estadio de referencia (Goldman, *et al.*, 2007; Sepúlveda, *et al.*, 2012), el proceso de senescencia reproductiva se conoce cómo estropausia y se caracteriza por un estado acíclico o anestro (Sepúlveda, *et al.*, 2012).

En animales sociales como los roedores es posible sincronizar el ciclo estral, de tal manera que las diferentes fases del ciclo ovárico de las hembras ocurren al mismo tiempo, esto se conoce como sincronía reproductiva o efecto Whitten (Jemiolo, *et al.*, 1986; McClintock, 1983; Wilmer, *et al.*, 2005) y como consecuencia hay variaciones en la secreción de testosterona de los machos, debido a que la presencia de una hembra receptiva produce la activación del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal en los machos que tienen experiencia sexual. Lo anterior se encuentra relacionado con el aumento en el plasma sanguíneo de testosterona y hormona luteinizante (HL). Los machos muestran preferencia por una hembra en estro sobre aquella que no se encuentra en esta fase del ciclo. En machos con experiencia sexual, la presencia de la hembra receptiva logra aumentar los niveles de testosterona sin necesidad de llegar a la eyaculación. Es decir los niveles hormonales en los machos se encuentran influenciados por la presencia de la hembra y la fase del ciclo estral en el que se encuentre ésta (Justel, *et al.*, 2009).

Como se mencionó anteriormente, varios procesos conductuales y fisiológicos, se presentan con cierta ciclicidad en todos los sistemas vivientes, constituyen una adaptación evolutiva a los cambios temporales presentes en el medio ambiente y son conocidos como ritmos biológicos (Cardinali, *et al.*, 1994), la secreción de testosterona y el ciclo estral de los roedores son ejemplos de ritmos biológicos ya que se presenta con determinada periodicidad.

1. 7. Ritmos biológicos

Los ritmos biológicos son procesos vitales en los organismos que ocurren con un ciclicidad característica, es decir, se presentan como variaciones regulares a través del tiempo (revisado en Meijer, *et al.*, 2010), y se caracterizan por presentar diversos parámetros que se describen a continuación (fig. 1).

- El periodo se define como el tiempo transcurrido para que se lleve a cabo una oscilación completa o ciclo. Se denomina como T (periodo del sincronizador) y ζ (periodo del ritmo endógeno manifestado en la conducta).
- La frecuencia indica el número de veces que ocurre un fenómeno específico dentro de un determinado intervalo de tiempo.
- El mesor es una estimación de tendencia central de la distribución de valores de una variable oscilante, es decir, el valor medio alrededor del cual oscila la variable.
- La amplitud es la diferencia entre el valor mínimo o el valor máximo alcanzado por la variable durante el periodo determinado y el valor medio de la oscilación.
- La acrofase y la batifase son los puntos dentro de un periodo en los que se encuentran el valor máximo y mínimo del ritmo respectivamente (Refinetti, 2005)
- La fase indica la localización en el tiempo para un valor dado dentro del ritmo (Koukkari y Sothorn, 2006).

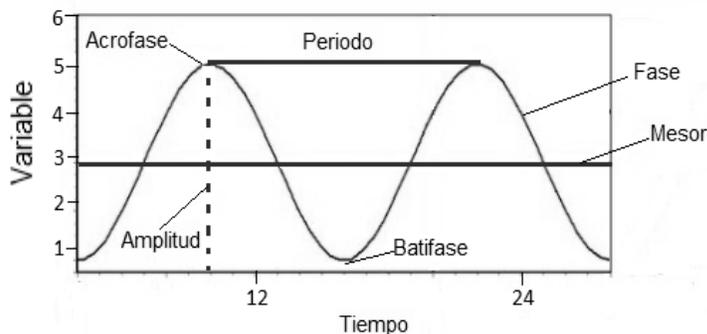


Fig. 1. Representación gráfica de un ritmo biológico y sus componentes a lo largo de un ciclo (modificado de Gruart, *et al.*, 2003)

Los ritmos biológicos se presentan en un amplio intervalo en frecuencias de oscilación, desde ciclos por segundo, como la actividad de los genes, hasta meses como las migraciones y la reproducción (Collado, *et al.*, 2001; Salazar, *et al.*, 2006). Mientras que, el ambiente geofísico se caracteriza también por la existencia de ciclos

derivados del movimiento de la Tierra y la Luna en relación con el Sol. Estos ciclos geofísicos, son la alternación del día y la noche, las mareas, las fases lunares y las estaciones del año (Salazar, *et al.*, 2006). Los ritmos que se aproximan a la periodicidad con la que ocurren ciertos fenómenos geofísicos, se nombran con el prefijo *-circa*, seguido del fenómeno con el que coinciden, por ejemplo: los ritmos circamareales, circadianos, circalunares y circanuales; el periodo de dichos ritmos es cercano al de las mareas, a la duración de un día, un ciclo lunar, y un año, respectivamente (Gruart, *et al.*, 2003; Salazar, *et al.*, 2006). Asimismo los ritmos circadianos se pueden clasificar según su frecuencia de recurrencia en: ultradianos, los que ocurren más de una vez durante un día e infradianos, los que requieren más de un día para que se repitan (Gruart, *et al.*, 2003).

Debido a lo anterior los ciclos externos de luz imponen periodicidad en los procesos cíclicos de los organismos, quienes como consecuencia han desarrollado un reloj interno, también conocido como reloj maestro, que brinda a los sistemas biológicos cierta organización temporal, y les permite anticiparse a las modificaciones en el medio (revisado en Meijer, *et al.*, 2010); o bien, hacer lo correcto a la hora correcta (Aschoff, 1965).

Aquellos ritmos biológicos que son el resultado de la adaptación del organismo a las variaciones cíclicas en el ambiente se caracterizan porque en condiciones naturales la frecuencia del ritmo endógeno es igual a la de los ciclos geofísicos con los que se relacionan (Gruart, *et al.*, 2003). Esto se denomina sincronización, donde $\zeta = T$ (Salazar, *et al.*, 2006).

El comportamiento de los animales suele presentarse con cierta ritmicidad circadiana, es decir, sucede cada 24h aproximadamente, así puede analizarse como un sistema integrado que inicia con la expresión de genes y finaliza en salidas de comportamiento, como actividad locomotora (revisado en Mohawk, *et al.*, 2012).

Cualquier señal ambiental periódica capaz de imponer fase y periodo a un ritmo (sincronizar) se conoce como “*zeitgeber*” (del vocablo alemán “dador de tiempo”) o sincronizador (Aschoff, 1965), el modo usual para abreviar la hora del *zeitgeber* es “ZT”, es una hora del tiempo estándar basada en el periodo del sincronizador cuya unidad de medida es en horas. Por ejemplo: bajo el ciclo LO 12:12, la hora en que

inicia la fotofase usualmente se define como la hora cero del sincronizador, se simboliza ZT0 y la hora en que inicia la escotofase se define como hora doce del sincronizador, es decir, ZT12 (Refinetti, 2005).

El sincronizador más importante es el transcurso del día y la noche (Aschoff, 1965; Pittendrigh, 1967). Otros *zeitgebers* capaces de sincronizar el “reloj biológico” son: las señales sociales, cambios en la temperatura ambiental y la disponibilidad de alimento (Escobar, *et al.*, 1997). Un sincronizador proporciona relaciones de fase especie-específicas entre la periodicidad del organismo y la del medio ambiente. Todas las funciones rítmicas en un organismo, mantienen relaciones de fase más o menos fijas entre sí (Aschoff, 1965), como el ciclo diario de sueño-vigilia, el cual está acompañado por varios ritmos fisiológicos y conductuales. Todos esos ritmos se llevan a cabo en un tiempo exacto para proveer al organismo la máxima adaptación al medio (Moore, 1992). Para que un sincronizador actúe como tal, debe ser una señal o estímulo con la intensidad necesaria a la que el organismo sea lo suficientemente sensible (Ramírez, 2002). La sincronización del reloj biológico proporciona al medio interno un estimado del tiempo externo (Salazar, *et al.*, 2006).

1. 7. 1. Propiedades de los ritmos circadianos

En condiciones constantes de oscuridad y temperatura, es decir, cuando éstas no presentan variaciones, un organismo puede expresar uno más ritmos circadianos tales como, locomoción, sensibilidad a drogas (cocaína y morfina), entre otros; el periodo de esos ritmos se mantiene cercano a 24h (Aschoff, 1965; Gruart, *et al.*, 2003; Marinelli, *et al.*, 1994; Pittendrigh, 1967). Esto indica que los ritmos circadianos son verdaderamente endógenos y no impuestos por el medio ambiente, éste fenómeno se denomina oscilación espontánea o libre curso (Aschoff, 1965; Pittendrigh, *et al.*, 1958). Por el contrario, cuando los organismos son expuestos a un régimen cíclico de luz-oscuridad de 24h (por ejemplo, LO 12:12) se ajustan al ciclo impuesto (Ramírez, 2002). Los ritmos circadianos presentan compensación de la

temperatura, esto significa que su periodo no es afectado a causa de variaciones en la temperatura (Bass, 2012).

El periodo de los ritmos circadianos, es resultado de bases genéticas, y manejado por los osciladores periféricos que constituyen el llamado sistema circadiano, dentro del cual se encuentran estructuras receptoras de información sensorial, la procesan y envían la señal de salida del mismo (Goldman, 1999). Gracias a éste sistema el organismo es capaz de integrar las señales externas que recibe, como el ciclo LO (revisado en Mohawk, *et al.*, 2012).

1. 7. 2. Fotoperiodo

El fotoperiodo es una señal ambiental capaz de afectar la fisiología y el comportamiento de algunas especies (revisado en Alcock, 2005), consiste en el periodo de iluminación durante el día, que abarca el tiempo que transcurre entre la salida y la puesta del sol, es decir, la relación de las horas de luz con las horas de oscuridad en un lapso de 24h (revisado en Arguedas, 2000). Está constituido por la fotofase y la escotofase (revisado en Vasicek, *et al.*, 2005). Mediante ésta señal los organismos pueden predecir cambios en el medio como disponibilidad de alimento y temperatura (Trainor, *et al.*, 2010). La información obtenida del fotoperiodo es integrada en el sistema circadiano (Moore-Ede, *et al.*, 1982).

1. 7. 3. Sistema circadiano

El sistema circadiano consiste en un conjunto de elementos que participan en la organización y manifestación de los ritmos circadianos en un organismo. En mamíferos éste sistema está constituido por receptores sensoriales y vías aferentes al reloj maestro, las vías eferentes regulan el proceso de transmisión de la ritmicidad a los sistemas efectores (More-Ede, *et al.*, 1982).

La organización de éste sistema requiere la combinación de la inervación autónoma de tejidos periféricos y de la señalización endócrina para responder a las señales

exógenas como luz y alimento. Diversas hormonas influyen en la organización circadiana de los mamíferos, como la liberación rítmica de glucocorticoides, que es resultado de la inervación simpática de la glándula adrenal, así se modula la sensibilidad a la hormona adrenocorticotrópica (HACT) e influye directamente en el ritmo de secreción de hormona liberadora de corticotropina (HLC) (revisado en Mohawk, *et al.*, 2012).

Se ha identificado al Núcleo Supraquiasmático (NSQ) cómo el principal marcapasos circadiano o reloj maestro en los mamíferos (revisado en Butler, *et al.*, 2012; Mohawk, *et al.*, 2012), es un oscilador capaz de dirigir varios subsistemas fisiológicos y así permite a los individuos organizar temporalmente el curso de sus procesos internos y su comportamiento, lo cual resulta en la manifestación de ritmos, para anticipar cambios en el entorno como el ciclo LO (Pittendrigh, 1967).

1. 7. 4. Núcleo Supraquiasmático

El NSQ es una estructura descrita en 1917 por Spiegel y Zweig, quienes reconocieron en roedores, carnívoros y primates una masa dorsal al quiasma óptico dentro del área conformada por las neuronas presentes en las paredes del tercer ventrículo (citado en Suburo y Pellegrino, 1969). Las neuronas que conforman el NSQ generan oscilaciones auto sostenidas en su actividad eléctrica cuyo periodo es de aproximadamente 24h (Welsh, *et al.*, 1995). Al extirparlo se pierden los ritmos circadianos de alimentación y actividad locomotora, esto indica que ésta estructura es el principal marcapasos en el sistema circadiano (revisado en Kishi y Sunagawa, 2011; Mohawk, *et al.*, 2012; Moore, 1992) y acopla a los osciladores periféricos, los cuales son órganos y tejidos, como la corteza cerebral, la retina, el hígado, el riñón y el páncreas (Kiessling, *et al.*, 2010), los cuales tienden a mantener oscilaciones de duración característica sin la influencia del NSQ, el cual los coordina para generar ritmos con un periodo adecuado según las necesidades del organismo (Garaulet y Madrid, 2010).

El NSQ, una estructura de 20 mil neuronas aproximadamente, en el hipotálamo ventral. Se cree que cada una de ellas contiene un oscilador circadiano autónomo, de tal modo que están acopladas entre sí y oscilan de manera coherente.

El NSQ responde a estímulos de luz y funciona como un cronómetro del tiempo ambiental. Para poder integrar las señales externas el organismo necesita las vías de sincronización (revisado en Meijer, *et al.*, 2010; Mohawk, *et al.*, 2012)

1. 8. Vías de sincronización del sistema circadiano

En los mamíferos los ritmos circadianos son generados gracias a los sistemas neurales osciladores sincronizados con el ciclo LO por rutas visuales específicas, éstas requieren la presencia de elementos fotorreceptores que se acoplen al marcapasos. Tales rutas visuales transmiten la información al NSQ de acuerdo con el ciclo LO y se han descrito dos. La primera es la vía directa de la retina al NSQ, que se conoce como tracto retinohipotalámico (TRH), el cual está constituido por las fibras que parten de las células ganglionares que pertenecen al grupo de las células W y responden predominantemente a cambios en la luminosidad. La segunda ruta de sincronización es la proyección del complejo llamado hojuela intergeniculada lateral (IGL) hacia el NSQ, dicho complejo es un pequeño grupo de células intercaladas entre el núcleo geniculado lateral dorsal y el núcleo geniculado lateral ventral, que recibe una proyección bilateral de la retina, aparentemente de las mismas células ganglionares que extienden hacia el NSQ (Moore, 1992).

No se sabe con exactitud dónde se integran las señales internas del organismo con las fóticas del exterior, pero un *locus* potencial es la población de receptores de andrógenos (RA), expresados en casi la mitad de las neuronas del NSQ, éstos receptores responden directamente a pulsos agudos de luz y consecuentemente expresan FOS (Butler, *et al.*, 2012) una proteína producto del gen c-fos utilizada como un marcador de la actividad neuronal inducida por un estímulo ya que la activación y transcripción del gen ocurren justo después de la activación de la neurona (Debru, 2009; Salazar, *et al.*, 2007).

Se han hecho experimentos en los que conductualmente, la gonadectomía alarga el periodo en libre corrimiento e incrementa la variabilidad en el inicio de la actividad cada día, debido a que éste procedimiento reduce la expresión de RA en el NSQ. El tratamiento con propionato de testosterona en esos animales restaura la expresión de RA. Esto indica que los andrógenos alteran la respuesta del reloj circadiano ante estímulos fóticos al mantener el periodo en libre corrimiento más largo en animales gonadectomizados comparados con los intactos o con reemplazo de testosterona. Este efecto en el periodo se manifiesta en LL pero no en OO. Con elevadas concentraciones de testosterona en circulación, el inicio y la duración de la actividad de los organismos es más precisa (Butler, *et al.*, 2012).

Como se ha mencionado en los ejemplos anteriores, el fotoperiodo es una señal que consigue modificar los ritmos circadianos.

1. 8. 1. Alteraciones de los ritmos circadianos debidas al fotoperiodo

Se ha observado que diversas especies de roedores, como: hámsteres sirios (*Mesocricetus auratus*), hámsteres siberianos (*Phodopus sungorus*), el ratón de playa (*Peromyscus polionotus*), y el ratón ciervo (*Peromyscus maniculatus*) se muestran más agresivas en pruebas residente-intruso durante días cortos (LO 8:16), y presentan regresión testicular, lo que corresponde con la disminución en la secreción de testosterona (Trainor, *et al.*, 2008).

Por otro lado, existen diferentes situaciones relacionadas con variaciones en el fotoperiodo en las que los organismos responden de manera desfavorable, por ejemplo, las sociedades industrializadas se caracterizan por la exposición a luz artificial a cualquier hora, sujetos con menos horas de sueño, trabajo por turnos rotatorios y viajes transmeridionales en avión, esto resulta en la desincronización de los periodos del ciclo externo LO y del reloj maestro (Bass, 2012), lo cual tiene como consecuencia una variedad de enfermedades de salud física y mental (Kishi y

Sunagawa, 2011; Yan, 2011). Sin embargo, los mecanismos subyacentes para tales patologías no son bien entendidos (Yan, 2011).

El *shift-work* o trabajo por turnos rotatorios, es asociado con hipertensión, síndrome metabólico, cáncer y otras enfermedades. Se ha propuesto que la causa de esas enfermedades es la desorganización entre las señales temporales del reloj biológico y el horario sueño-vigilia de quienes trabajan de este modo. En un experimento con dos grupos de ratas, donde el control tuvo un horario de comida durante la fase en que están activas normalmente y el experimental, en el que las ratas fueron sujetas a horarios con 8h de actividad y alimento disponible durante su fase de descanso, se observaron alteraciones considerables en el segundo grupo, en el cual los ritmos de actividad locomotora y glucosa fueron atenuados, además se desarrolló obesidad abdominal. Cambiar la ingesta de comida a la fase normal de actividad ayudó a prevenir el incremento de masa corporal y revirtió las perturbaciones metabólicas de los animales experimentales (*shift-workers*) a los rangos control. Por lo tanto, los hábitos de alimentación pueden prevenir o inducir desincronización en los ritmos y obesidad (Salgado, *et al.*, 2010).

Los patrones circadianos normales también pueden ser afectados debido al *jet-lag* (Collado, *et al.*, 2001; Kiessling, *et al.*, 2010; Mohawk, *et al.*, 2004; Refinetti, 2005)

1. 8. 1. 1. Descompensación horaria debida a vuelos transmeridionales (*jet-lag*)

El *jet-lag* es la descompensación horaria en los humanos y está asociada con viajes transmeridionales en avión o "*jets*" en los que se atraviesan varios husos horarios, ésta descompensación y es el resultado de la diferencia de fase entre los ritmos corporales y el medio local al que llegan los sujetos, de tal manera que se encuentran desincronizados (revisado en Collado, *et al.*, 2001; Kiessling, *et al.*, 2010; Mohawk, *et al.*, 2004; Refinetti, 2005).

Los síntomas que surgen como consecuencia de la descompensación horaria abarcan perturbaciones fisiológicas, algunas de ellas son: pérdida de apetito,

disminución de la coordinación psicomotora y del rendimiento en general (Kießling, *et al.*, 2010), irregularidad en la secreción de algunas hormonas como melatonina y cortisol (Katz, 2011), irritabilidad, ansiedad, desórdenes de sueño, disminución de la eficiencia mental, fatiga, molestias gastrointestinales (Katz, 2011; Manfredini, *et al.*, 1998; Refinetti, 2005), depresión y angustia (revisado en Mohawk, *et al.*, 2004).

La severidad y duración de los síntomas depende de la dirección, rapidez y del número de zonas horarias que se crucen durante el viaje (Kießling, *et al.*, 2010). Suelen durar sólo unos cuantos días, poco más de una semana, si se cruzan muchas zonas horarias (revisado en Katz, 2011; en Mohawk, *et al.*, 2004; Refinetti, 2005).

Se han hecho experimentos con ratones en los que se simula ésta condición y se ha demostrado que debido a la alteración del sistema circadiano de los organismos bajo *jet-lag* crónico, que consistió 8h de adelanto en el encendido de las luces cada dos días, el crecimiento de tumores se aceleró. Mientras que, la exposición a la luz constante u oscuridad no tuvo efecto (Filipski, *et al.*, 2004).

El ajuste del reloj al nuevo horario no es inmediato, requiere varios días. En ratas se han realizado registros de la actividad de los impulsos eléctricos en las neuronas del NSQ después del adelanto de 6h en el ciclo LO y se ha mostrado que dos subpoblaciones celulares en el NSQ cambian asincrónicamente. La porción ventral exhibe un rápido ajuste al nuevo ciclo LO, mientras que la porción dorsal requiere más de seis días para reajustarse (Albus, *et al.*, 2005).

En ratones se ha demostrado que los relojes periféricos varían en su rango de ajuste al *jet-lag* y traducen la hora del reloj a señales fisiológicamente significativas, vía activación rítmica de genes controlados por el reloj maestro. Por mencionar un ejemplo; el NSQ y la glándula suprarrenal o reloj adrenal, se adaptan con rapidez a los nuevos horarios de luz en comparación con otras estructuras como la corteza cerebral, la retina, el hígado y el riñón por eso se ha propuesto que el reloj adrenal contribuye para alcanzar la resincronización. Los glucocorticoides adrenales (GCs) pueden reajustar los relojes periféricos, y el reloj circadiano adrenal regula el ritmo de liberación de GCs hacia la sangre. Al generar un cambio de fase en el ritmo de

liberación de los glucocorticoides suprarrenales se demostró que tal ritmicidad influye en la sincronización fótica de la actividad locomotora (Kiehl, *et al.*, 2010). En adición a la relación entre glucocorticoides y ritmos circadianos bajo condiciones sincronizadas, existe evidencia de que el estrés en un animal puede influir sobre la resincronización en el ritmo de actividad locomotora que resulta del cambio de fase en el ciclo LO (Mohawk, *et al.*, 2004).

1. 8. 1. 2. Modelos experimentales de *jet-lag*

El sistema circadiano de los mamíferos puede adaptarse a cambios abruptos en el fotoperiodo pero se requieren varios ciclos transitorios para conseguir sincronizarse, es decir, alcanzar la relación de fase estable del medio ambiente con la organización interna de las innumerables oscilaciones fisiológicas y a nivel molecular dentro del organismo. La desorganización que se genera durante la resincronización en humanos es considerada como factor subyacente del *jet-lag*, lo que a su vez tiene entre sus efectos la sensación de incomodidad y fatiga (Davidson, *et al.*, 2009).

Se han llevado a cabo simulaciones de *jet-lag* en condiciones de laboratorio cuyos modelos animales son roedores. Se han observado casos de resincronización instantánea. Sin embargo, lo más probable es que sea un reflejo de la influencia del “enmascaramiento fótico”, así son denominados aquellos cambios en los ritmos conductuales que son efecto de la luz y que permiten que un organismo responda inmediatamente de modo apropiado con los cambios en el ambiente (Rietveld, *et al.*, 1993) pero no necesariamente reflejan cambios en el NSQ (Meerlo, *et al.*, 2002). El enmascaramiento fótico, de acuerdo con la modificación en la actividad locomotora de los organismos puede ser positivo o negativo, el primero es cuando la exposición a la luz incrementa la actividad en animales diurnos y el segundo la disminuye en los nocturnos (Phillips, *et al.*, 2013).

En la mayoría de los estudios, la resincronización al nuevo horario del ciclo LO requiere aproximadamente un día por cada hora de cambio en el fotoperiodo (zona horaria) (Refinetti, 2005).

El *jet-lag*, a través de la desincronización de ritmos circadianos y probablemente por privación de sueño puede llevar a la exacerbación de condiciones psicóticas existentes (Katz, 2011), y también causa problemas crónicos de salud (Reddy, *et al.*, 2002) como alteraciones en la temperatura corporal y la secreción urinaria (Siegel, *et al.*, 1969).

El modelo de *jet-lag* implica la respuesta molecular del sistema circadiano ante el cambio de horario de luz. Se ha observado en ratones bajo el ciclo LO 12:12 sometidos a un avance de 6h en el inicio de la fotofase, que existe notable heterogeneidad en la sincronización en diferentes órganos, y también dentro de la maquinaria molecular de cada tejido (Katz, 2011), como la corteza somatosensorial, el hígado, riñón y páncreas (Kießling, *et al.*, 2010).

En otra investigación sobre los efectos del *jet-lag*, se utilizaron ratas juveniles y de edad avanzada, después del avance de 6h en el ciclo LO los organismos de mayor edad murieron. En contraste, no hubo organismos muertos cuando el ciclo de luz fue retrasado (Davidson, *et al.*, 2006).

Goel y Lee reportaron en 1995 que las hembras de *Octodon degus* sincronizadas a un horario LO 12:12 con encendido de luces 06:00h y apagado 18:00h, colocadas en la misma jaula que una hembra sincronizada a un ciclo LO con un adelanto de 6h con respecto al antes mencionado ejerció como donadora de señales, ya que las hembras resincronizaron más rápido a tal adelanto de fase en el ciclo de luz que las que estaban solas, mientras que los machos no lo hicieron. De esta manera se mostró que las señales sociales en la presencia de un ciclo de luz pueden influenciar la resincronización de las hembras pero no la de los machos, y también se observó que las señales olfatorias proporcionan información de sincronización, debido a que la extracción del bulbo olfatorio impide que un donador, es decir, aquel ratón sincronizado al horario con adelanto de 6h promueva la resincronización de una hembra a un cambio de fase (revisado en Jechura y Lee, 2004).

Además de los modelos animales existen varios trabajos hechos con humanos en los que se ha demostrado que algunos efectos del *jet-lag* crónico son: disminución en la agudeza mental e incremento en el riesgo para adquirir patologías como cáncer, enfermedades digestivas, úlceras, desordenes de sueño. Algunos de esos

efectos pueden llegar a ser más severos con el número de años con viajes transmeridionales, el resultado puede ser un daño acumulativo con la edad de los animales (Davidson, *et al.*, 2006).

La desincronización circadiana es más grave durante la adaptación a avances en la hora local porque el reloj circadiano requiere más días para resincronizarse que para los retrasos, los cuales cuentan una rápida recuperación (Collado, *et al.*, 2001; Manfredini, *et al.*, 1998; Reddy, *et al.*, 2002), el restablecimiento en el ciclo reposo-actividad es gradual y toma varios días (Reddy, *et al.*, 2002).

Se ha demostrado que los cambios de fase con efectos más severos en la desincronización son los avances de 6h (Davidson, *et al.*, 2009). Wegmann calculó que son necesarios tres días para resincronizar los ritmos psicomotores después de un vuelo hacia el oeste, de Alemania a Estado Unidos, mientras que se requieren ocho días si el vuelo es en la dirección opuesta (revisado en Manfredini, *et al.*, 1998). El mecanismo subyacente de los efectos deletéreos de los avances de fase en el ciclo LO no son claros (Davidson, *et al.*, 2006).

1. 9. Relación entre la agresividad, testosterona y ritmos biológicos.

Se ha reportado para varias especies tales como hámsteres *Phodopus sungorus* y ratas *Rattus norvegicus* de la cepa Wistar, que la secreción de testosterona presenta un ritmo circadiano (Esquifino, *et al.*, 2004; Hoffmann y Nieschlag, 1977) y que se relaciona directamente con la agresividad que expresan los organismos (Rada, *et al.*, 1976). Por ser un ritmo biológico, la secreción de testosterona puede ser influenciada por factores externos tales como el fotoperiodo y el contexto social (Esquifino, *et al.*, 2004).

Lo anterior consigue relacionar la hora del día en que los animales son más agresivos con la máxima y mínima secreción hormonal. Los roedores, al ser nocturnos suelen ser más agresivos por la noche que durante el día (Soma, *et al.*, 2008).

1. 9. 1. Modelos utilizados en el estudio de la agresividad y testosterona

En las investigaciones realizadas sobre agresividad y su relación con la testosterona se encuentran trabajos con roedores de la especie *Peromyscus californicus*, que presenta relación directa entre los niveles de testosterona y el cuidado parental. A pesar de que la castración disminuye los niveles de ésta hormona, no tiene efecto en la conducta agresiva de ésta especie (Trainor y Marler, 2001). En ratas, se encontró que tal conducta aumenta en los machos tratados con implantes de testosterona en el hipotálamo, esto sugiere que tal estructura o el tejido cercano a ella contiene circuitos neurales sensibles a la hormona que modulan la agresión entre machos (Albert, *et al.*, 1987; Giammanco, *et al.*, 2005). En primates no humanos, se sabe que la conducta agresiva indica cierto grado de estrés y éste incrementa los niveles de cortisol el cual influye en el aumento en los niveles de testosterona (Honesty y Marin, 2006).

Aunque existen varias investigaciones sobre los efectos del *jet-lag* en la fisiología de los organismos, no se ha hecho algún trabajo dónde se den a conocer los efectos del *jet-lag* sobre la conducta agresiva y la secreción de testosterona.

En el presente trabajo se eligió trabajar con la especie *Neotomodon alstoni* para ampliar el conocimiento que se posee a cerca de ella en cuanto a fisiología y conducta.

1. 10. El ratón de los volcanes *Neotomodon alstoni* (Rodentia: Cricetidae)

El ratón de los volcanes, *N. alstoni*, es un roedor endémico de México, que pertenece al orden Rodentia y a la familia Cricetidae (fig. 2). Esta especie presenta distribución restringida al Eje Neovolcánico Transversal de México, situado entre los 18° y 22° latitud Norte 2,600 y los 4,500 metros sobre el nivel del mar (Revisado en Granados, *et al.*, 1996; Luis, *et al.*, 2004, 2009). Éste roedor es muy dócil y capaz de

reproducirse en condiciones de cautiverio durante todo el año (Luis, *et al.*, 2004; Oliviera, *et al.*, 1986), al igual que en su hábitat natural, su tasa de natalidad es más elevada de abril a septiembre. Las hembras presentan varios ciclos estrales al año, con duración promedio de cuatro a cinco días y períodos de gestación de 25 a 35 días, después del cual paren una camada de tres crías en promedio. Estudios de éste animal en el laboratorio señalan que puede tratarse de una especie monógama en la cual los machos exhiben cuidado parental (Luis, *et al.*, 2004).

Habita en las partes bajas de bosques mixtos de pino-encino y en las partes altas en los bosques de pino y oyamel, siempre está asociado a gramíneas conocidas comúnmente como “zacatón” (Oliviera, *et al.*, 1986).

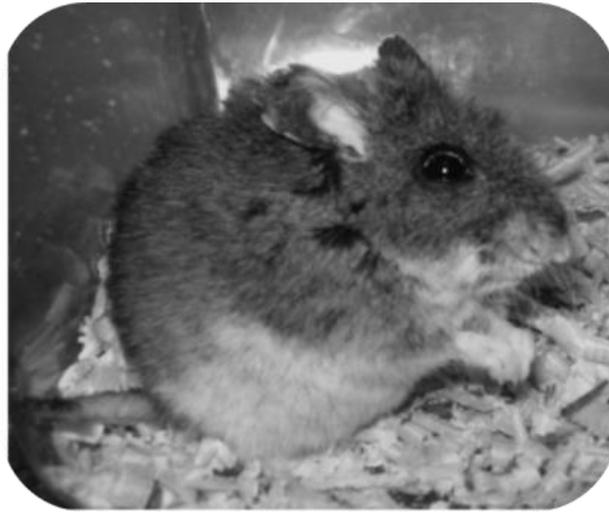


Fig. 2. Macho de *Neotomodon alstoni* adulto

1. 10. 1. Características morfofisiológicas

Una cualidad biológica importante de la especie *N. alstoni* es su capacidad para reproducirse en condiciones de cautiverio durante todo el año. Mientras que los registros en vida libre indican que la temporada reproductiva en vida libre cuya duración es de cuatro meses inicia en junio y la tasa de natalidad más elevada se presenta de abril a septiembre (Luis, *et al.*, 2004, 2009; Oliviera, *et al.*, 1986). Se ha observado que durante la época de reproducción lo machos agrandan sus testículos, alcanzan medidas entre 10-18mm de largo y 7mm de ancho. La madurez

reproductiva en hembras y machos se presenta alrededor de los 174 días, se sabe que presenta cuidado biparental y los machos son monógamos (Luis, *et al.*, 2000). Estos organismos son nocturnos y su actividad se concentra principalmente a mitad de la noche (Oliviera, *et al.*, 1986).

Se han realizado diversos trabajos con ésta especie en la Facultad de Ciencias. Sin embargo, no existe algún trabajo que describa los efectos debidos al *jet-lag* experimental en la fisiología y la conducta.

1. 10. 2. Aspectos generales del comportamiento agresivo del ratón de los volcanes (*Neotomodon alstoni*)

El comportamiento agresivo, en esta especie como en otros roedores en los que se ha descrito comprende posturas de defensa, ceremoniales de combate y la lucha misma entre los individuos. Se ha propuesto que la existencia de relaciones jerárquicas podría ocasionar el comportamiento agresivo en *N. alstoni* (Granados, *et al.*, 1996).

Algunos patrones del comportamiento agresivo del ratón de los volcanes son:

- 1.- Lucha: el dominante brinca sobre su oponente y cae sobre el piso de la jaula, ambos organismos ruedan abrazados, al mismo tiempo que se lanzan mordiscos.
- 2.- Posición vertical ofensiva: el dominante frente a su oponente se mantiene en posición vertical apoyado sobre sus miembros posteriores, con los ojos abiertos, y los miembros anteriores y las orejas levantadas.
- 3.- Danza: el dominante rasca con los miembros anteriores el piso, mientras se balancea lateralmente en forma rítmica.
- 4.- Posición vertical defensiva: el subordinado ante la amenaza del dominante, adopta posición vertical apoyándose en los miembros posteriores pero con la cabeza hacia atrás y los miembros anteriores semi levantados.
- 5.- Piloerección: al inicio de la lucha a los oponentes se les eriza el pelo.
- 6.- Movimientos rítmicos de la cola: el subordinado, ante el acoso del dominante, mueve rítmicamente la cola, tanto lateral como verticalmente.

7.- Posición de sumisión: el subordinado se recarga sobre su dorso, muestra el vientre y permite que el dominante olfatee y lama sus genitales.

8.- Montas: el dominante monta al subordinado como si se tratara de una hembra.

9.- Emisión de sonidos: el subordinado ante el ataque o el acoso del dominante emite chillidos.

10.- Rechinidos de los dientes: el subordinado en respuesta al acoso del dominante rechina los dientes (Granados, *et al.*, 1996).

1. 10. 3. Estudios realizados en *Neotomodon alstoni*

Se han elaborado diversas investigaciones con ésta especie que abarcan diversos aspectos como el ritmo de actividad locomotora y los efectos de la obesidad en dicho ritmo, el patrón de sueño, el cuidado parental, la agresividad intraespecífica y la reproducción (Ayala, *et al.*, 1998; Carmona, *et al.*, 2012; Fuentes, *et al.*, 2010; Granados, *et al.*, 1996; Luis, 1986; Luis, *et al.*, 2009; Olivera, *et al.*, 1986). Algunos otros de los trabajos comprenden su crecimiento y desarrollo en el laboratorio (Oliviera, *et al.*, 1986), los niveles de testosterona plasmática en los machos y su relación con el cuidado parental (Luis, *et al.*, 2009), la morfología y bioquímica de la glándula harderiana (Villalpando, *et al.*, 2005).

2. Justificación

La agresividad entre los individuos es un fenómeno que va en aumento en las sociedades modernas, debido a factores sociales e individuales. Ésta condición trae consigo alteraciones conductuales y fisiológicas que repercuten en la salud de los organismos (Muñoz, *et al.*, 2010). Existen diferencias especie-específicas en el comportamiento agresivo, debido a la organización social que presentan los animales (Oyegbile y Marler, 2005). En varias especies la secreción de testosterona tiene relación directa con la expresión de dicho comportamiento, ya que los niveles plasmáticos de ésta hormona aumentan después de participar en un enfrentamiento (Oyegbile y Marler, 2005). También se ha demostrado que dicha hormona está involucrada en la consolidación del ritmo de actividad (Butler, *et al.*, 2012), y que la secreción hormonal en conjunto con otros ritmos circadianos pueden ser afectados por cambios en el fotoperiodo, tal es el caso del *jet-lag*; el cual es el conjunto de síntomas debidos a la desincronización de los ritmos biológicos en los organismos que generan alteraciones tanto conductuales como fisiológicas, en humanos se presentan como resultado de los viajes transmeridionales en poco tiempo (Katz, 2011; Manfredini, *et al.*, 1998), se ha reportado irritabilidad y disminución del estado de alerta como parte de los síntomas (Esquifino, *et al.*, 2004; Katz, 2011; Refinetti, 2005). Sin embargo, no existe información acerca de la existencia de efectos en la conducta agresiva en conjunto con la fisiología de los organismos sometidos a un protocolo de *jet-lag*. Debido a lo anterior, el presente trabajo plantea abordar algunos efectos del *jet-lag* experimental sobre la conducta agresiva y los niveles plasmáticos de testosterona de los machos. Se utilizará como modelo animal experimental la especie *Neotomodon alstoni*, para ampliar el conocimiento acerca de su etología y fisiología ya que es modelo experimental en diversas investigaciones sobre éstos temas y por ser endémica, los trabajos realizados aún son escasos. Además de que por sus características etológicas es propicio a exhibir episodios agresivos.

3. Hipótesis general

Es sabido que en los machos de varias especies la expresión del comportamiento agresivo y los niveles de testosterona están relacionados. También se ha reportado que la secreción hormonal y otros ritmos circadianos como la actividad locomotora son alterados por ser parte de los síntomas del síndrome de *jet-lag*. Debido a lo anterior, se espera que después de un enfrentamiento agresivo la concentración plasmática de testosterona de los organismos aumente y que después de un adelanto de 6h en el fotoperiodo el ritmo diario de actividad se desfase por varios días hasta sincronizarse al nuevo horario LO; que la concentración plasmática de testosterona se desajuste y por lo tanto también la expresión del comportamiento agresivo.

3.1. Hipótesis particulares

- La actividad locomotora de los ratones mostrará transitorios, es decir, iniciará antes cada día para ajustarse al nuevo ciclo impuesto por el *jet-lag* experimental.
- Los organismos expresarán comportamiento agresivo durante los enfrentamientos control y éste comportamiento se intensificará al participar en confrontaciones diarias durante el *jet-lag* experimental.
- La concentración plasmática de testosterona se encuentra asociada con la conducta agresiva en varias especies, se espera que aumente después de un encuentro agresivo, y se desajuste después de un encuentro bajo *jet-lag* experimental.

4. Objetivo general

Observar el ritmo diario de actividad locomotora en condiciones normales y durante *jet-lag* experimental así como evaluar el comportamiento agresivo y la concentración plasmática de testosterona en machos de *N. alstoni* en condiciones basales, después de los enfrentamientos y después de los enfrentamientos en el protocolo de *jet-lag*.

4. 1. Objetivos particulares

- Observar el ritmo de actividad locomotora de 12 machos de la especie *Neotomodon alstoni* en edad reproductiva (10-22 meses) bajo el fotoperiodo LO 12:12 y cómo se modifica después del adelanto de 6 horas.
- Caracterizar y analizar la conducta agresiva expresada por los machos durante enfrentamientos control en diferentes horarios y compararla con la observada durante el *jet-lag* experimental.
- Obtener y comparar la curva de concentración plasmática diaria de testosterona para machos adultos de *N. alstoni* después del enfrentamiento control y del realizado durante *jet-lag* experimental.

5. Métodos

5. 1. Animales experimentales

Se utilizaron 12 ratones machos de la especie *Neotomodon alstoni* F1 y F2, adultos cuyas edades abarcaron entre 10-22 meses. Proporcionados por el Bioterio de la Facultad de Ciencias.

Todos los machos contaban con experiencia sexual y con pareja reproductiva. Fueron colocados con sus respectivas hembras en peceras de vidrio de 30x18x20cm con una división de acrílico horadada ubicada transversalmente para evitar que se aparearan, sólo tuvieron contacto olfativo y visual. El compartimiento de los machos midió 17x18x20cm.

Los ratones siempre se mantuvieron con agua y alimento *ad libitum* durante toda la fase experimental.

Todos los procedimientos experimentales fueron realizados bajo los principios éticos y metodológicos establecidos por la Norma Oficial Mexicana NOM-ZOO-062-1999 sobre las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

5. 2. Registro de actividad locomotora

Se realizó el registro de la actividad locomotora únicamente de los machos, con frecuencia en el muestreo del valor de la actividad cada cinco minutos mediante el programa *Actibio* que consiste en un haz de luz infrarrojo colocado de manera transversal en su compartimiento. Para analizar los actogramas obtenidos, es decir, las representaciones gráficas del registro de actividad de los ratones, se utilizó el programa *Actiview*.

La captura de datos de actividad locomotora abarcó una semana durante la cual los animales no fueron manipulados y se consideró como la semana base, posteriormente se realizaron los enfrentamientos control, seguidos del inicio del protocolo de *jet-lag* experimental, en el cual el registro de actividad comprendió siete días.

5. 3. Elaboración del etograma para enfrentamientos entre machos de *Neotomodon alstoni*

El etograma es definido como el repertorio conductual o conjunto de actos mutuamente excluyentes referido a un animal o especie. Es la etapa inicial para cualquier estudio sobre comportamiento animal (Lahitte, et al., 2002).

Para conocer las conductas que expresa ésta especie durante un evento agresivo entre machos se utilizaron 14 ratones (diferentes de los 12 machos empleados en el protocolo de *jet-lag*) para llevar a cabo pruebas que consistieron en colocar por 15 minutos a dos ratones de edades similares en un espacio neutro conformado por una caja de acrílico transparente de 35x15x15cm.

Ésta labor ayudó al establecimiento de los candidatos en los enfrentamientos, es decir, que sí presentaran conducta agresiva. Se registraron todas las conductas observadas en cada macho, se eligieron aquellas que se presentaron en todos los enfrentamientos agresivos y se hicieron los esquemas correspondientes, de tal manera que se elaboró el etograma (ver anexo 9.1). Los machos que se enfrentaron en éstas pruebas fueron: juveniles sin experiencia sexual, adultos con crías y su hembra, y adultos únicamente con pareja reproductiva.

Las conductas observadas durante los enfrentamientos agresivos se categorizaron en:

- Ofensivas: aquellas conductas que muestran iniciativa de quién las presenta para dañar a quien son dirigidas (Olivier & Mos, 1992).
- Defensivas: son las conductas que carecen de iniciativa, de aproximación activa hacia el oponente y son dirigidas con la intención de defenderse ante las ofensivas del contrincante. Muestran inferioridad de quien las presenta (Honest & Marin, 2006; Giammanco, *et al.*, 2005; Olivier & Mos, 1992).
- Ambos contrincantes expresan: consisten en aquellas conductas que al participar en un encuentro tienen la finalidad de examinar al oponente y el espacio en el que se encuentran (Moura, *et al.*, 2009).

En observaciones previas se supo que los machos con pareja y los que poseen crías y pareja inician el evento agresivo cada vez que son enfrentados con otro. Sin

embargo, al regresar a sus jaulas atacan a su pareja y crías; mientras que los demás ratones no.

Se decidió trabajar con aquellos ratones que contaran con pareja reproductiva y no tuvieran crías para evitar variaciones hormonales y conductuales en los animales experimentales, ya que en *P. californicus*, una especie con cuidado biparental al igual que *N. alstoni*, se ha reportado que dicho cuidado es influenciado por los niveles de testosterona (Trainor y Marler, 2001). Además, es sabido que la secreción de ésta hormona y es afectada cuando las hembras están en la fase de estro ya que se encuentran receptivas y la conducta de los machos se modifica para competir por ellas (Justel, *et al.*, 2009); por ello el ciclo estral de todas las hembras fue sincronizado al colocar cada dos días en su compartimiento aserrín orinado por un macho con experiencia sexual y sin pareja reproductiva.

Los frotis vaginales para monitorear el ciclo estral se llevaron a cabo cada tres días durante toda la fase experimental y los días en que no se hizo frotis vaginal se generaron predicciones que hicieron posible conocer en qué fase se encontraban de acuerdo con la duración de cada etapa del ciclo según lo reportado por Caligioni en 2009.

5. 4. Enfrentamientos

Todos los enfrentamientos se llevaron a cabo en una superficie neutra, para evitar que alguno de los participantes tuviera predisposición para ganar el encuentro por ser residente (Fuxjager, *et al.*, 2009).

La superficie neutra consistió en una caja de acrílico 35x20x20cm, transparente y limpia cubierta con otra caja de acrílico de las mismas dimensiones. Cada confrontación tuvo duración de 10 minutos, debido a que en las observaciones previas y en los encuentros para hacer el etograma se presentaron conductas agresivas varios minutos después de permanecer frente a otro macho. Al finalizar, las cajas de acrílico fueron limpiadas con papel humedecido con cloro al 10% y se dejaron secar.

Las parejas para las confrontaciones fueron siempre las mismas para todos los enfrentamientos y se formaron de acuerdo con la edad y características físicas de los ratones.

Todos los enfrentamientos fueron videograbados con cámara *HandyCam Sony*. En los que se llevaron a cabo durante la escotofase del ciclo LO la cámara se utilizó en modo “*nightshot*”, el cual permite obtener imágenes nítidas en una grabación realizada con poca luz o en oscuridad total, y posteriormente se analizaron los videos obtenidos.

Se realizó un registro por individuo en cada enfrentamiento. Las conductas evaluadas, cuya descripción se puede consultar en el anexo 9.1, fueron las siguientes:

Ofensivas: posición vertical ofensiva, ataque, perseguir y danza.

Defensivas: posición vertical defensiva, manotazos, dorso hacia atrás y posición de sumisión.

Para analizar el repertorio de conductas expresadas por cada sujeto se utilizaron “índices de conducta” los cuales se consiguieron al asignar un valor arbitrario de acuerdo con la frecuencia con la que se presentaron cierto número de conductas (ver anexo: 9.2) y se obtuvo el promedio de todos los ratones por enfrentamiento.

Los valores de conducta obtenidos en los enfrentamientos control y durante *jet-lag* experimental fueron graficados.

Todas las gráficas que describen los resultados obtenidos en ésta investigación fueron elaboradas mediante el programa *SigmaPlot2001*.

5. 4. 1. Enfrentamientos control

Estos enfrentamientos (n=4) se realizaron bajo el fotoperiodo LO 12:12 en seis puntos temporales (ZT0, ZT4, ZT8, ZT12, ZT16, y ZT20) donde ZT0 fue a las 07:00, para así conseguir los valores de concentración de testosterona y conducta en tres puntos durante la fotofase y tres en la escotofase (fig. 3). Sin embargo, las sesiones no fueron continuas, ya que hubo un intervalo de 16h mínimo entre cada una.



Fig. 3. Esquema que indica con flechas las horas en que se llevaron a cabo los enfrentamientos control. Los mismos horarios fueron utilizados para obtener la curva diaria de secreción de testosterona sin enfrentamientos, que se explica más adelante. Las porciones blanca y negra de la barra simbolizan la fotofase y la escotofase el ciclo LO respectivamente.

Todas las pruebas estadísticas de este proyecto fueron realizadas con el programa *STATISTICA*, dado que los datos obtenidos no presentaron distribución normal, se utilizó la prueba Kruskal-Wallis para saber si había diferencias significativas entre los seis horarios en los índices de conducta ofensiva y defensiva. La gráfica correspondiente muestra los promedios y errores estándar de los índices de conducta que los ratones exhibieron en enfrentamientos.

También se llevó a cabo un enfrentamiento control en ZT6 (n=4) un día antes de iniciar el protocolo de *jet-lag*, se utilizaron ratones diferentes de los que participaron en los enfrentamientos control en seis puntos temporales. Para conocer qué valores de conducta y concentración de la hormona presentan los organismos en ese horario, debido a que los puntos temporales para conocer los parámetros diarios de conducta y testosterona no incluyeron ZT6 (13:00), es decir, el inicio de la escotofase en *jet-lag* experimental el cual se explica a continuación.

5. 4. 2. Enfrentamientos durante *jet-lag* experimental

El *jet-lag* experimental consistió en adelantar 6h del ciclo LO 12:12, es decir, ZT12 cambió a 13:00 y ZT0 a 1:00 como se señala en la barra inferior de la figura 4, la barra superior de la misma figura representa el ciclo LO inicial. Al inicio de la escotofase durante el protocolo de *jet-lag* (13:00) se hicieron los enfrentamientos (n=12) diariamente por siete días.

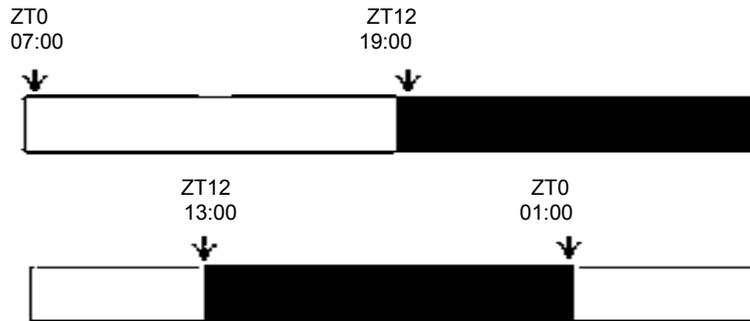


Fig. 4. La barra superior simboliza el horario LO antes de iniciar el protocolo de *jet-lag* y la inferior representa el adelanto de 6h en el horario para simular el *jet-lag*, la flecha que señala 13:00h indica el comienzo de la escotofase y es el horario en el que se realizaron los enfrentamientos diarios por siete días. Las porciones blancas y negras de las barras representan la fotofase y escotofase del ciclo LO respectivamente.

Después de todos los enfrentamientos realizados a lo largo de la fase experimental se extrajo sangre de los sujetos para conocer los valores plasmáticos de testosterona (ver apartado 5.5) y se analizaron los videos para conocer la frecuencia de conductas (ofensivas y defensivas) mostradas por cada ratón.

Para saber si existen diferencias significativas en los valores de concentración de testosterona entre los siete días en que los ratones se enfrentaron durante el nuevo horario, se realizó la prueba estadística ANOVA de una vía.

Mientras que para evaluar el comportamiento, se utilizó la prueba estadística Kruskal-Wallis para saber si las diferencias entre los valores obtenidos para los índices de conducta ofensiva y defensiva durante los siete días resultaron ser significativas.

5. 5. Obtención de sangre para la evaluación de la concentración de testosterona (diaria y post-enfrentamiento)

Se extrajeron muestras de sangre de todos los animales para evaluar la concentración plasmática de testosterona a lo largo del día bajo el fotoperiodo LO 12:12, después de los enfrentamientos control bajo ese horario y posterior a los enfrentamientos durante el protocolo de *jet-lag* (figs. 3 y 4).

Las muestras fueron obtenidas del seno retro-orbital izquierdo (Luis, *et al.*, 2009) con capilares heparinizados de la marca Brand después de anestesiarse a los ratones con éter etílico inhalado en un recipiente de plástico sellado. En cada sesión se colectaron tres capilares por ratón, para posteriormente centrifugarlos 7min a 1000rpm en una centrífuga *Microspin* modelo MS24, se obtuvo el plasma con una jeringa *Hammilton* de 100µl, se colocó en tubos *ependorff* de 1ml, después fue almacenado en un ultracongelador cuya temperatura fue -40 °C hasta la determinación de la concentración de testosterona en cada muestra por medio de la prueba ELISA (anticuerpo policlonal contra testosterona R156/7) (ver anexo 9.3).

En la obtención de las muestras de sangre que se emplearon para establecer el ritmo diario de concentración plasmática de testosterona (n=8 de los cuales 4 fueron utilizados para obtener los valores de testosterona post-enfrentamiento control), los animales experimentales fueron mantenidos en el fotoperiodo LO 12:12 se extrajo sangre en seis puntos temporales (ZT0, ZT4, ZT8, ZT12, ZT16, ZT20) las sesiones de extracción de sangre estuvieron separadas por un intervalo de mínimo 16h, hasta abarcar un ciclo de 24h (Esquifino, *et al.*, 2004) tal como se muestra en la figura 3.

Para saber si había diferencias significativas entre los valores de la concentración plasmática de testosterona a lo largo de un ciclo LO sin enfrentamientos y entre las muestras tomadas después de los enfrentamientos en los mismos horarios, se aplicó una prueba de ANOVA de una vía, en caso de que hubiera diferencias significativas entre las muestras, se aplicaría la prueba post-hoc de Tukey para conocer entre qué muestras se encontrarían tales diferencias.

5. 6. Análisis de la concentración plasmática diaria de testosterona.

Con los valores de concentración testosterona plasmática de cuatro ratones obtenidos en diferentes ZT para abarcar un ciclo de 24h como se muestra en la figura 3, se evaluó la existencia de ritmo en dicha variable a lo largo de un ciclo LO 12:12 con el programa *Ritme* al aplicar un análisis de *cosinor*.

6. Resultados

6. 1. Actividad locomotora en la semana base

Con los actogramas de cada uno de los animales obtenidos mediante el programa *ActiView* se observó que la actividad locomotora que en general se concentró principalmente en la escotofase, con algunos brotes de actividad durante la fotofase (fig. 5 a y b).

6. 2. Actividad locomotora durante *jet-lag* experimental

El ritmo de actividad locomotora de todos los ratones se modificó al adelantar 6h el ciclo LO, se observaron transitorios para alcanzar una nueva fase estable en dicho ritmo durante los siete días que fue registrado. Sin embargo, no lo consiguieron (fig. 5, a y b).

6. 3. Etograma de los enfrentamientos entre machos de

Neotomodon alstoni

Se elaboró el etograma para ésta especie durante encuentros agresivos macho-macho (ver anexo 9.1) con las conductas identificadas como ofensivas, defensivas (Olivier y Mos, 1992) y aquellas que ambos contrincantes expresan (Moura, *et al.*, 2009). Las conductas descritas coinciden con las más representativas reportadas para ésta especie en el trabajo de Granados en 1996.

6. 4. Conducta agresiva durante los enfrentamientos control

Para los enfrentamientos de los ratones a lo largo de un ciclo LO (n=4), la mayor frecuencia en la expresión de éste comportamiento se registró en las confrontaciones de ZT12 y ZT16, que corresponden al inicio y a la mitad de la escotofase respectivamente, cuando son más activos. Se observa también, que en

promedio muestran más conductas ofensivas que defensivas y que éstas últimas no se manifestaron en los enfrentamientos control de ZT8, a la mitad de la fofofase, donde su actividad locomotora es escasa o nula (fig. 6). En estos enfrentamientos control sólo una de las parejas tuvo encuentros agresivos y la relación dominante-sumiso estuvo claramente definida. Mientras que en los encuentros de la otra pareja las conductas predominantes no fueron agresivas y corresponden a: acicalarse, olfatear rostro y olfatear área genital.

En el único enfrentamiento control en ZT6 (n=4) antes de adelantar el fotoperiodo, es decir el horario en que iniciaría la escotofase durante el protocolo de *jet-lag* (fig. 7) ambas parejas mostraron comportamiento agresivo, mostraron predominantemente conductas ofensivas, además la frecuencia de conductas ofensivas y defensivas superó la de los animales que participaron en enfrentamientos control a lo largo del día.

6. 5. Conducta agresiva durante *jet-lag* experimental

El primer día en *jet-lag* se observó la mayor frecuencia de conductas ofensivas, y la relación entre cuál de los oponentes iniciaba y dirigía las conductas ofensivas y defensivas fue fácil de distinguir, pese a que no se mantuvo así durante los siete días que fueron evaluados, ya que del día dos al día siete se presentaron en promedio más conductas defensivas que ofensivas y la frecuencia de ambas categorías disminuyó notablemente del día tres al seis.

La prueba Kruskal-Wallis con $p= 0.25$ para ambos índices de conducta arrojó que no existen diferencias significativas entre los siete días de los enfrentamientos durante *jet-lag* experimental.

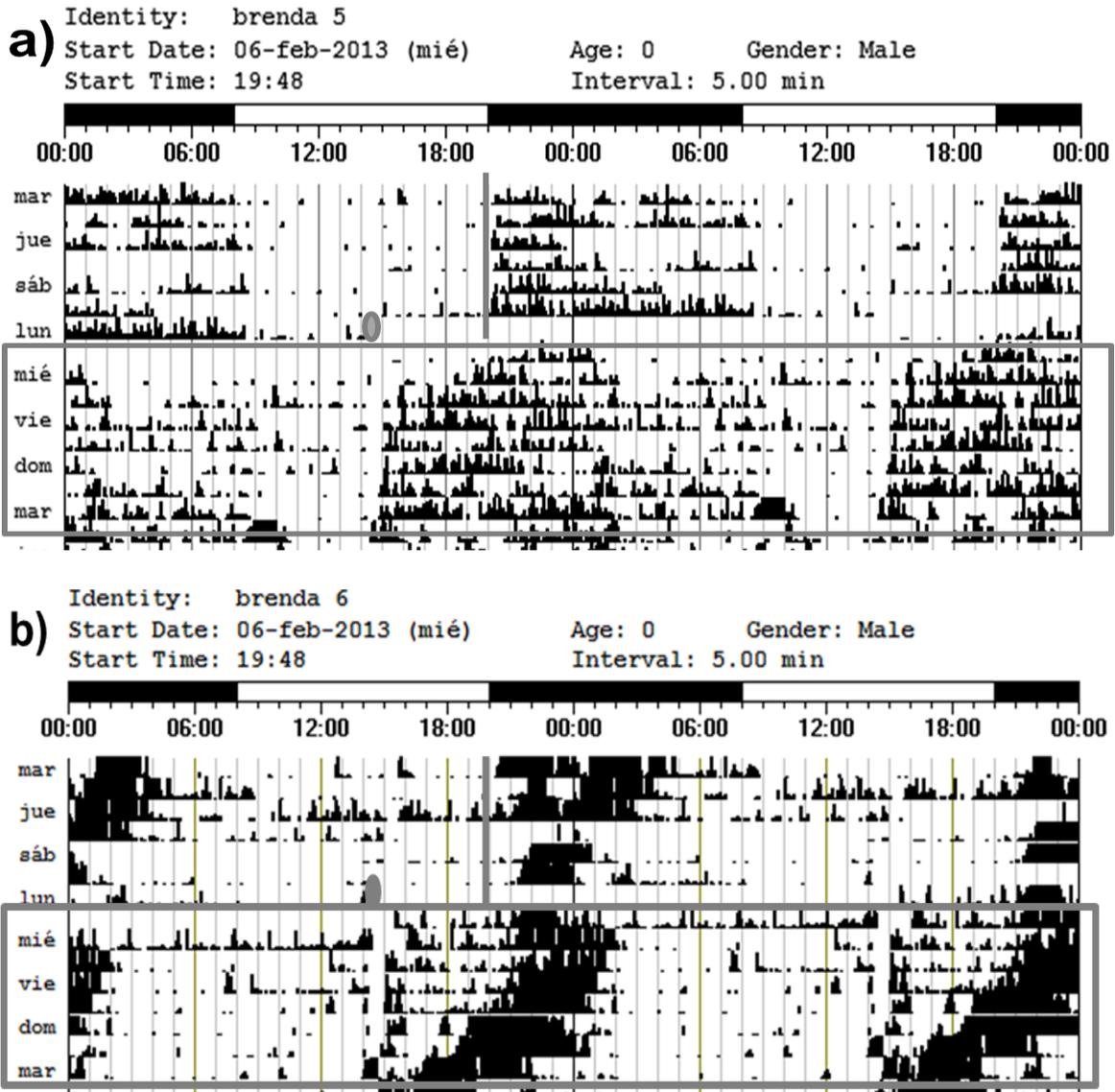


Fig. 5. a) y b). Actogramas representativos de la actividad locomotora en doble plot, cada renglón representa un día de registro de la actividad locomotora. En la parte superior, las barras blancas y negras indican la fotofase y escotofase respectivamente del ciclo LO en el que se mantuvieron los ratones en la semana que antecede al inicio de *jet-lag* experimental el cual está señalado con una flecha, el rectángulo indica los siete días en los que se hicieron enfrentamientos. El óvalo gris sobre el rectángulo muestra el horario en el que éstos se llevaron a cabo. En los días registrados durante el protocolo de *jet-lag* se observan transitorios en los que el principal componente de la actividad diaria de los ratones inició unos minutos antes cada día.

Índices de conducta ofensiva y defensiva durante los enfrentamientos control

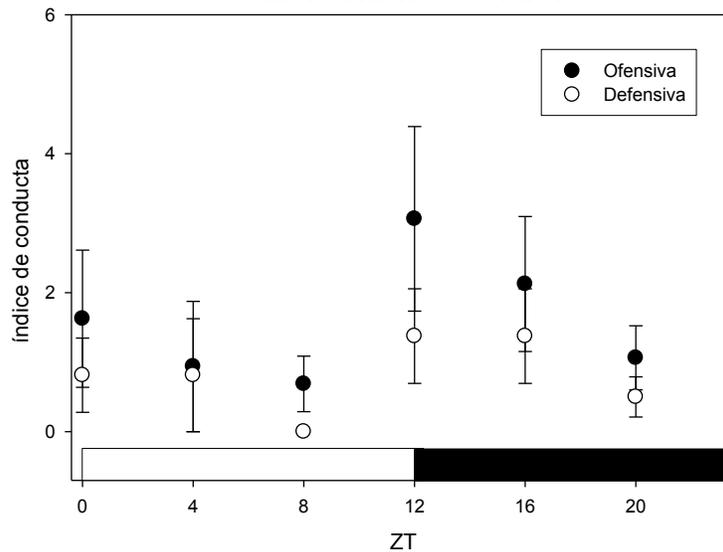


Fig. 6. Promedio de los índices de conducta ofensiva y defensiva de cuatro ratones enfrentados en diferentes horarios para abarcar un ciclo LO 12:12 antes de iniciar el protocolo de *jet-lag*. Se observa la tendencia a los valores más altos para ambos índices al inicio de la escotofase. En el eje de las Y están los valores de cada índice, para las conductas ofensivas están señalados con puntos negros y para las defensivas con puntos blancos. En el eje de las X se muestra el horario en el que se hicieron los enfrentamientos. La barra inferior representa el ciclo LO, la porción blanca simboliza la fotofase y la negra la escotofase.

6. 6. Ritmo diario de concentración de testosterona

Los ratones presentaron variaciones en la concentración de la hormona a lo largo del día. Se obtuvieron los valores más altos en la fotofase y los más bajos en la escotofase. El análisis de ANOVA de una vía $F = (5,42) = 3.76$ con $p = 0.006$ arrojó que existen diferencias significativas entre las muestras y la prueba post-hoc de Tukey indicó que la diferencia de los valores obtenidos en ZT8 es significativa con respecto al resto de los horarios, a excepción de ZT12 (fig. 8). Posteriormente, con el programa *Ritme* se realizó un análisis de Cosinor para conocer si los valores obtenidos representaban realmente un ritmo diario. Dicha prueba con $p = 0.23$, reveló que no existen diferencias significativas entre los valores. Sin embargo, la posible acrofase se distingue poco después de ZT9, esto coincide con el valor más alto obtenido, el cual se presentó en ZT8 (fig. 9).

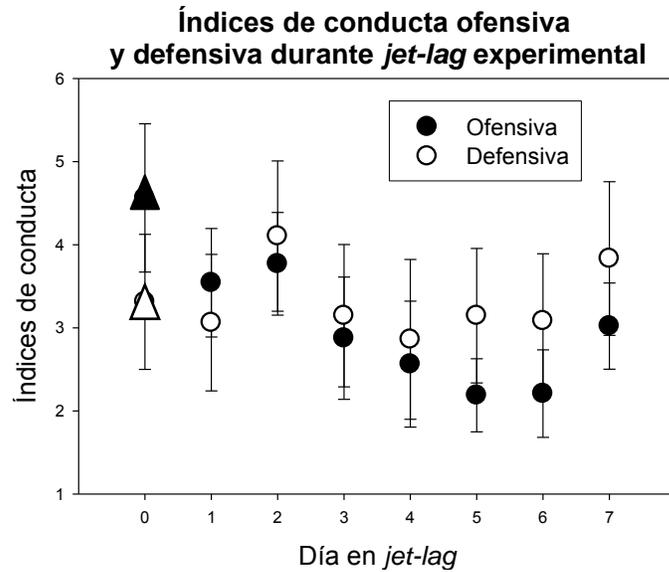


Fig. 7. Índices de conducta ofensiva y defensiva representados con figuras negras y blancas respectivamente. Los valores obtenidos en el enfrentamiento control de ZT6 que se realizó antes de iniciar el protocolo de *jet-lag* (n=4) están simbolizados con triángulos y los días de *jet-lag* experimental (n=12) con círculos. Se observa la tendencia de los índices de conducta defensiva a superar los de ofensiva. El valor de ambos índices presenta un patrón similar con la disminución del día 3 al 6. La prueba estadística Kruskal-Wallis con $p=0.25$ para ambas categorías de conductas indica que no existen diferencias significativas en la frecuencia con que fueron expresadas durante el protocolo de *jet-lag*.

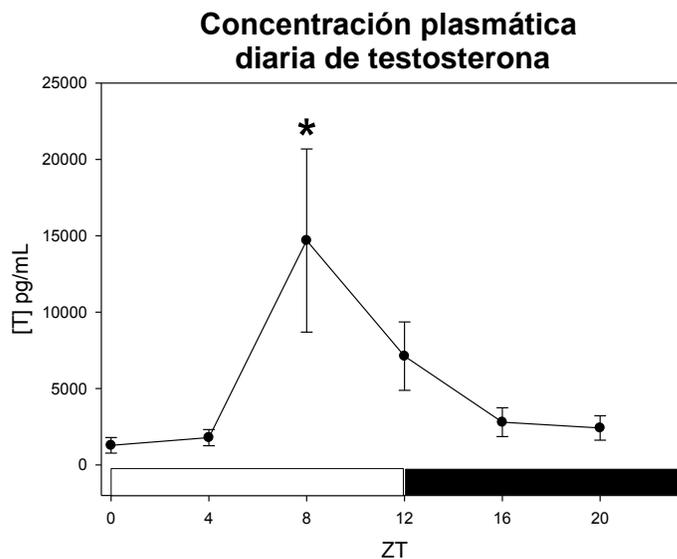


Fig. 8. Concentración diaria de testosterona (n=8). El valor máximo, señalado con un asterisco, se presentó en ZT8. La prueba post-hoc de Tukey muestra diferencias significativas entre ese punto y el resto de las muestras a excepción de ZT12. Las barras inferiores blanca y negra indican la fotofase y la escotofase del ciclo respectivamente.

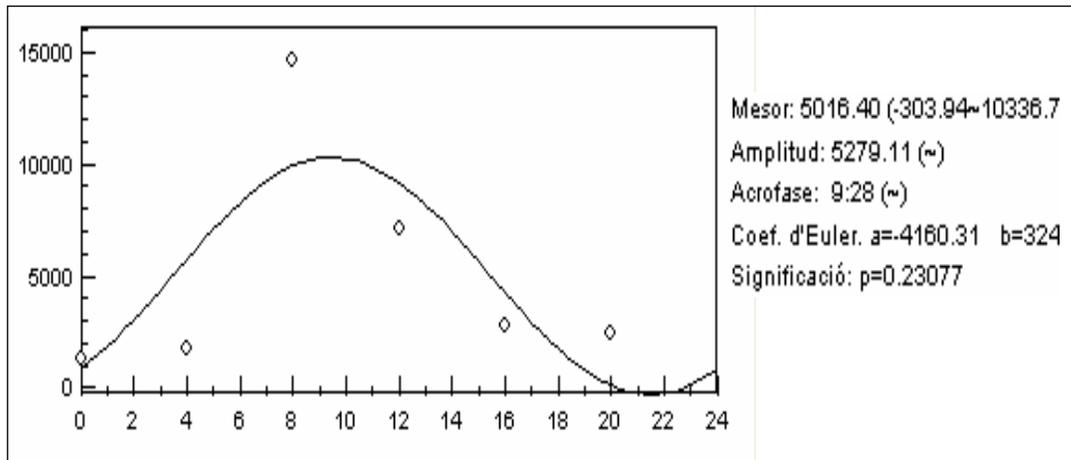


Fig. 9. Gráfica obtenida mediante el programa *Ritme* donde el análisis de Cosinor con $p=0.23077$, indica que no existe significancia. La posible acrofase es muy cercana al valor más alto obtenido. Mientras que la posible batifase se encuentra antes de ZT22, horario próximo a ZT0, donde se obtuvo el valor más bajo en la concentración de testosterona de las muestras (fig. 8).

6. 7. Concentración de testosterona post-enfrentamientos control

Los valores de la concentración plasmática de la hormona después de los enfrentamientos en diferentes horas del día (n=4-8), no fueron mayores que los obtenidos sin enfrentamientos en los mismos horarios excepto el que se llevó a cabo en ZT4. Al comparar los valores obtenidos después de los enfrentamientos con los resultantes de los mismos horarios sin confrontaciones, la prueba ANOVA $F(5,60)=0.71$ con $p=0.6$ indica que no existen diferencias significativas.

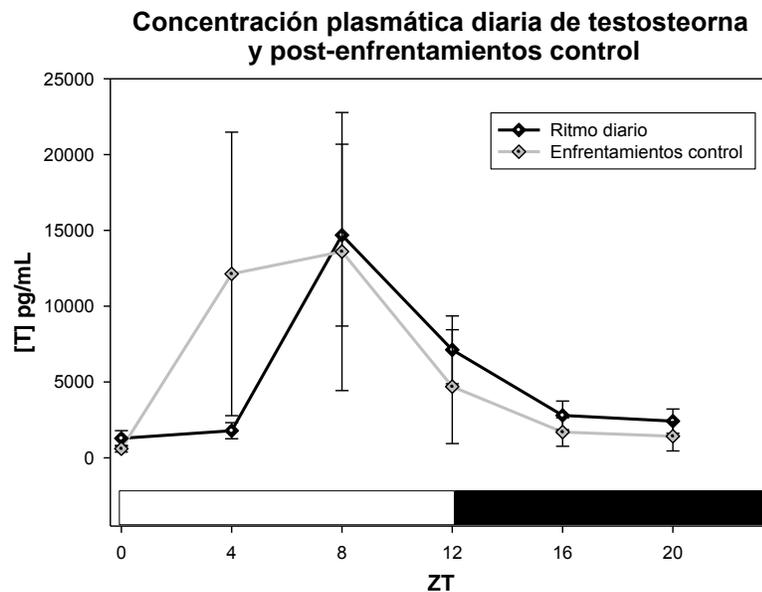


Fig. 10. Comparación entre los promedios de la concentración plasmática diaria de testosterona y después de un enfrentamiento (n=4-8), se muestran también los errores estándar. Únicamente en el punto ZT4 se muestra el aumento en la concentración de la hormona post-enfrentamiento comparado con la línea base.

6. 8. Concentración de testosterona post-enfrentamiento durante *jet-lag* experimental

se presentó la tendencia a la desorganización en la concentración de la testosterona a partir del día tres después de haber recorrido de horario. Durante los últimos dos días bajo ésta condición los valores de la hormona fueron similares en todos los ratones (fig. 11). La prueba de ANOVA $F(7,51) = 4.16$; $p = 0.001$ arrojó que el valor de la concentración plasmática de la hormona obtenido el día dos fue el único significativamente diferente al resto de los días evaluados.

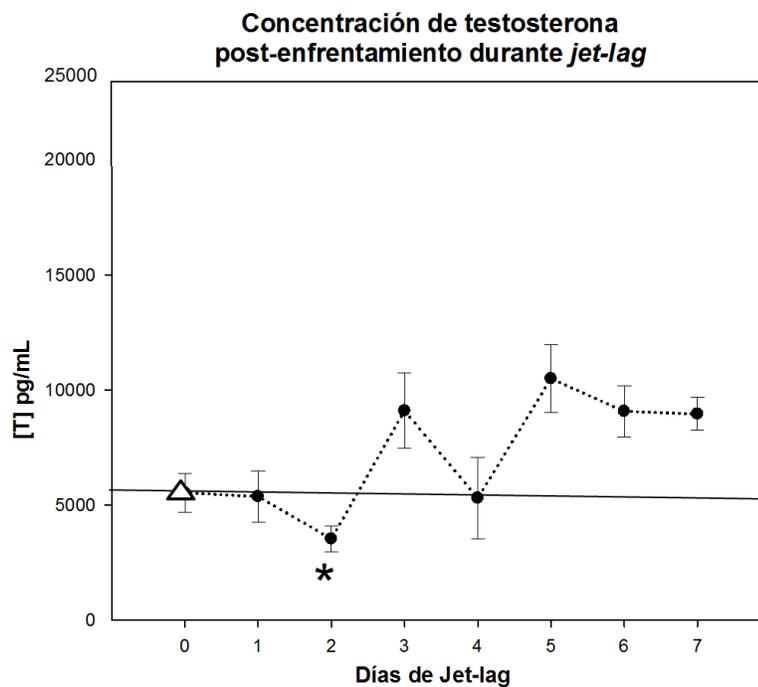


Fig.11. Concentración de testosterona post-enfrentamiento durante *jet-lag* experimental (n=12), y durante el enfrentamiento control en ZT6 (n=4) marcado con un triángulo. La prueba estadística indicó que el valor de testosterona obtenido en el día dos, señalado con un asterisco, es diferente significativamente de todos los demás. La línea transversal marca el valor obtenido después del enfrentamiento control.

7. Discusión

7. 1. Actividad locomotora en la semana base y durante *jet-lag* experimental

En general para *N alstoni*, se ha reportado que la actividad en rueda es predominantemente nocturna, pero en ausencia de la misma y cuando son expuestos a días largos es semidiurna (Fuentes, *et al.*, 2010). Los animales experimentales mostraron ser predominantemente nocturnos de acuerdo con lo descrito por Samario en 2008. Sin embargo, también fueron activos durante la fotofase, como se ha reportado para ratones de laboratorio (Weinert y Waterhouse, 1999).

Todos los machos exhibieron, como se esperaba, ciclos transitorios en el ritmo de actividad locomotora durante el protocolo de *jet-lag*. Sin embargo, los siete días en los que éste ritmo fue registrado no fueron suficientes para que todos los ratones alcanzaran la resincronización.

7. 2. Conducta agresiva registrada en el etograma y en los enfrentamientos control

En la elaboración del etograma se tomaron en cuenta las conductas que ya se habían expuesto previamente por Granados, *et al.*, en 1996 y se describieron otras que no lo estaban. Lo anterior enriquece el conocimiento existente acerca de ésta especie.

A pesar de que en los enfrentamientos control a lo largo de un ciclo LO 12:12, sólo una de las dos parejas tuvo encuentros agresivos, se observó relación directa entre la fase de actividad y la frecuencia de conductas expresadas, lo cual coincide con lo reportado para otras especies por Scotti en 2009, dónde demostró que los roedores nocturnos son más agresivos por la noche y por Landau en 1975 quién describió que el comportamiento agresivo de los hámsteres dorados presenta un ritmo y se expresa durante la noche (revisado en Oyegbile y Marler, 2005).

7. 3. Conducta agresiva durante el protocolo de *jet-lag*

Las parejas de enfrentamiento siempre fueron las mismas, entonces los ratones lograron desarrollar el reconocimiento de su oponente, el cual se sabe que puede durar al menos 24h y por lo tanto disminuir la expresión de conductas de investigación social (Moura, et al., 2010), es decir, aminoraron su interacción con el oponente, se dedicaron a explorar el área, como consecuencia la frecuencia de conductas ofensivas no aumentó y se observó el patrón generalizado de encuentros no agresivos.

Además del reconocimiento social, lo anterior puede deberse a la disminución en el estado de alerta de los animales, uno de los síntomas que resultan del adelanto en el horario (Esquifino, *et al.*, 2004; Katz, 2011; Refinetti, 2005), o a que posiblemente prefirieron minimizar el riesgo de enfrentarse con otro macho pues se sabe que la agresión ocurre en contextos ritualizados para maximizar el efecto y reducir la probabilidad de resultar herido (Honesty y Marin, 2006).

Se ha observado que varios mecanismos fisiológicos, ya sean neuronales, genéticos, hormonales, perinatales, traumáticos y nutricionales contribuyen con la motivación para iniciar el encuentro agresivo (Jianghong, 2004; Oyegbile y Marler, 2005). Entre esos mecanismos se encuentran, la deficiencia de óxido nítrico en las neuronas y los bajos niveles de serotonina que ocasionan el aumento en los niveles de agresividad, lo mismo ocurre cuando se presenta exceso de vasopresina hipotalámica (Giammanco, *et al.*, 2005). También se ha reportado que la melatonina, hormona cuya secreción ocurre en la escotofase, influye en la expresión de dicho comportamiento (Scotti, 2009).

Como parte de los síntomas del *jet-lag* la secreción de melatonina y el cortisol puede modificarse (Katz, 2011). Probablemente el *jet-lag* experimental y las condiciones en las que fueron confinados los organismos hayan afectado, entre otros parámetros que no fueron medidos, la síntesis de estos neurotransmisores y la secreción de éstas hormonas y con ello se atenúo la conducta agresiva.

7. 4. Conducta agresiva en toda la fase experimental

Durante todos los enfrentamientos a lo largo de la fase experimental no se registraron las conductas “posición vertical defensiva” y “avanzar con boxing”, posiblemente porque la frecuencia de las conductas ofensivas y defensivas puede disminuir al participar en enfrentamientos diariamente, como se ha reportado para ratones de la especie *Mus musculus* (Welch y Welch, 1969).

Por otro lado, se sabe que algunos animales cuentan con cierta habilidad intrínseca para ganar y participar en un sólo encuentro agresivo puede incrementar la conducta agresiva sin importar si fue ganador o perdedor (Oyegbile y Marler, 2005), además se ha observado en hámsteres, que al enfrentar parejas de machos y parejas de hembras, el animal que fue dominante en el encuentro inicial continuó siendo el dominante en todos los encuentros siguientes (Bath y Johnston, 2007). Por lo tanto, aunque los organismos experimentales no hayan sido sometidos antes a peleas, algunos tienen predisposición para ganar, por ello en ciertas parejas siempre uno de los contrincantes mostró tendencia dirigir las conductas ofensivas hacia su oponente. Después de todos los enfrentamientos realizados y de acuerdo con las observaciones hechas en *P. californicus* en las que explican que aquellas especies cuyo sistema ecológico es territorial y monógamo son agresivas y son propensas a mostrar los efectos ganador y de desafío (Oyegbile y Marler, 2005). Se esperaría que dichos efectos se presentaran también en *N. alstoni*, dado que es una especie monógama. Sin embargo, no fue posible distinguirlos. Las explicaciones sobre por qué no se observó el efecto ganador son varias. Quizás éste sea de corta duración, ya que se ha demostrado que puede durar desde unos segundos hasta varios días según la especie (Oyegbile y Marler, 2005), es posible también que para presentarse éste efecto sean necesarios más enfrentamientos, o se haya inhibido como consecuencia de las alteraciones fisiológicas ocasionadas por el *jet-lag* experimental, o que simplemente no exista en *N. alstoni*.

7. 5. Concentración plasmática diaria de testosterona

La posible acrofase en el ritmo de concentración diaria de ésta hormona se presentó antes del inicio de actividad en ZT8, como se reportó para hámsteres en 1977 por Hoffmann y Nieschlag, la posible batifase se observó al final de la fase de actividad, en la primera parte de la fotofase, como ocurre en ratas (Esquifino, 2004).

7. 6. Comparación de la concentración plasmática de testosterona post-enfrentamiento control con los niveles diarios

Existen evidencias de la influencia de la testosterona sobre la conducta agresiva en diversas especies (Gleason, *et al.*, 2009; Giammanco, *et al.*, 2005; Rada, *et al.*, 1976; Russo, *et al.*, 2012; Trainor, *et al.*, 2004). Sin embargo, también se ha reportado que la testosterona puede no ser indispensable para desencadenar ésta conducta (Scotti, *et al.*, 2009; Soma, *et al.*, 2008).

Las variaciones que resultaron después de los enfrentamientos a lo largo del día no presentaron diferencias significativas entre sí, y con los valores que se obtuvieron sin participar en confrontaciones. Es posible que el aumento en los niveles de ésta hormona requiera más tiempo después del encuentro agresivo para ser observado (Oyegbile y Marler, 2005; Rutte, *et al.*, 2006) particularmente en la escotofase, o que en *N. alstoni* dicha hormona no sea indispensable para generar éste comportamiento. Como se ha propuesto para del hámster siberiano, las hormonas adrenocorticales como la dehidroepiandrosterona (DHEA) regulan la conducta agresiva (Scotti, *et al.*, 2009).

Se sabe que cuando la agresividad no está relacionada con los niveles de testosterona no tiene fines reproductivos, pero si influye en la competencia por otros recursos, como el territorio, el cual es defendido agresivamente durante la época de no apareamiento a pesar de que los machos presentan regresión de las características sexuales secundarias y por lo tanto disminuyen los niveles de tal hormona (Soma, 2006; Wen, *et al.*, 2004). La conducta agresiva registrada cuando

se presentan valores bajos en la concentración de testosterona pudo ser desencadenada por la melatonina.

7. 7. Concentración plasmática de testosterona después de un enfrentamiento durante *jet-lag* experimental

En los siete días en los que se llevaron a cabo los enfrentamientos con protocolo de *jet-lag* la concentración de testosterona no presentó cambios significativos, a excepción del día dos, en el que la disminución de éste valor difirió notablemente de los demás y a partir de ese día se presentó la tendencia a la desorganización de la concentración de ésta hormona. La explicación para tal decremento no es clara. Pero, la desorganización de la concentración de la hormona, puede deberse a los desajustes ocasionados por el síndrome de *jet-lag*, tal como se ha reportado para otras hormonas como el cortisol y la melatonina (Katz, 2011).

A pesar de que la expresión de conductas ofensivas y defensivas y la secreción de testosterona no presentaron relación directa, en ambas variables se distingue un desajuste durante el *jet-lag* experimental. Se sabe que algunos ritmos, como la expresión de genes reloj, específicamente *per1*, *per2*, *Dbp*, *Arntl* y *Nr1d1* se sincronizan con mayor velocidad que otros (Kiehl, *et al.*, 2010), así podríamos asumir que el ritmo de secreción de testosterona tarda varios días más en ajustarse y que la expresión de conductas se puede ver influenciada por mecanismos fisiológicos como la secreción de otras hormonas.

En cuanto a la relación entre los niveles de testosterona y la actividad locomotora. Es sabido que el ritmo de actividad locomotora está influenciado por la secreción de melatonina (Pendergast, *et al.*, 2013) y testosterona (Butler, *et al.*, 2012). En los resultados no se encontró vínculo alguno entre la actividad y los niveles plasmáticos de la hormona post-enfrentamiento durante el *jet-lag* experimental, simplemente se distingue el desajuste de ambos ritmos. El ritmo de actividad locomotora en *N. alstoni* podría estar asociado con la secreción de otras hormonas como la

melatonina, debido a que influye en el ritmo de actividad de otras especies (Pendergast, *et al.*, 2013) y no con la secreción de testosterona.

Asimismo, se ha reportado que los osciladores periféricos como la corteza cerebral, la retina, el hígado, el riñón, y el páncreas, varían en su rango de resincronización al *jet-lag* (Kießling, *et al.*, 2010). Por lo tanto, es probable que osciladores circadianos presentes en el NSQ involucrados en la manifestación del ritmo de actividad locomotora (Voguelbaum, *et al.*, 1993) y de concentración plasmática diaria de testosterona se ajusten con diferente velocidad al adelanto en el horario LO al igual que los procesos involucrados en la expresión de la conducta agresiva como son: procesos neuronales, genéticos, hormonales, perinatales, traumáticos y nutricionales (Jianghong, 2004), por eso no se encontró una asociación entre las concentraciones de testosterona post-enfrentamiento, la actividad locomotora y la conducta agresiva durante el *jet-lag* experimental.

7. 8. Influencia del estrés en la conducta y fisiología de los animales experimentales

Se ha demostrado que el estrés es una variable capaz de modificar la fisiología de los organismos y es definido como “una reacción fisiológica caracterizada por la alteración en las secreciones neuronales u hormonales del cuerpo, originadas por el sistema nervioso central en respuesta a una amenaza percibida” (Esquifino, *et al.*, 2004; Honess y Marin, 2006; Justel, *et al.*, 2009). Los patrones de estrés así como de agresión varían porque dependen de las características individuales, estatus, etapa de la historia de vida y medio ambiente (Honess y Marin, 2006; Koolhaas, *et al.*, 2011). Existe evidencia de que el aislamiento social en roedores es un estresor que según el organismo puede aumentar o disminuir la secreción de testosterona y gonadotropina (Márquez, *et al.*, 2003; Esquifino, *et al.*, 2004), entonces se tienen diferentes efectos conductuales, como el aumento de la conducta agresiva al mantener a los ratones aislados por varias semanas, además de que la actividad eléctrica de las neuronas en el hipotálamo y los niveles basales de corticosterona

plasmática disminuyen. A pesar de que esto podría ser interpretado como menos estrés psicosocial, se presenta la respuesta intensificada ante varios estresores, el incremento en el tiempo de intentar escapar y la disminución del tiempo que duermen y comen (Esquifino, *et al.*, 2004).

Por lo tanto las condiciones en las que fueron confinados los ratones pudieron tener efectos diferentes en cada uno y contrario a lo que se esperaría, la conducta agresiva no aumentó, esto probablemente el efecto del adelanto de 6h en la escotofase del ciclo LO en la fisiología es más evidente que el del aislamiento al que fueron sometidos los animales.

Los conflictos son una causa de estrés capaz de ocasionar cambios en los ritmos biológicos que pueden durar varios días y hasta semanas. La evidencia indica que los efectos más pronunciados ocurren en animales que han perdido las peleas (Meerlo, *et al.*, 2002). Los resultados observados en éste proyecto en la conducta agresiva, actividad locomotora y concentración plasmática de testosterona pudieron ser efectos acumulativos de las confrontaciones en las que participaron los ratones.

8. Conclusiones

- En el presente trabajo la actividad locomotora de los ratones fue principalmente nocturna y se modificó al cambiar el horario de encendido de luces, mostró transitorios para ajustarse al nuevo ciclo LO en el *jet-lag* experimental, como se ha reportado para otras especies de roedores (Corinne, *et al.*, 2005; Singaravel, *et al.*, 1996)
- La actividad locomotora de los organismos fue modificada al estar bajo *jet-lag* experimental, los siete días no fueron suficientes para que todos los ratones alcanzaran por completo la sincronización, esto indica que ésta especie tarda más de un día por cada hora recorrida en el fotoperiodo LO 12:12.
- Se amplió el conocimiento acerca de la etología de ésta especie al elaborar el etograma para enfrentamientos agresivos entre machos.
- La expresión del comportamiento agresivo de los machos de *N. alstoni* presentó relación directa con la fase de actividad, es decir, se presentó en la escotofase.
- El *jet-lag* experimental no indujo la conducta agresiva en los machos de *N. alstoni*. Ésta conducta fue afectada por otras variables etológicas como el reconocimiento social (Moura, *et al.*, 2010).
- La concentración plasmática de testosterona no muestra relación con la expresión de conductas agresivas (ofensivas y defensivas) en los enfrentamientos a lo largo del día. Mientras que durante *jet-lag* experimental, ambas variables mostraron un desajuste.
- Los valores más altos obtenidos en la concentración plasmática de la hormona se presentan antes de iniciar la fase de actividad.
- La concentración elevada de testosterona no es esencial para desencadenar la conducta agresiva en los machos de *N. alstoni*. Ésta conducta puede estar determinada por la secreción de otras hormonas.

8. 1. Perspectivas

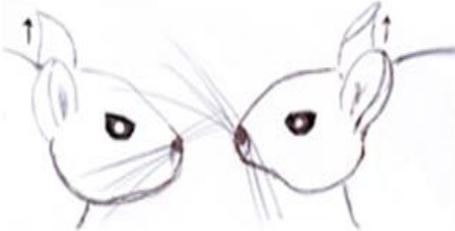
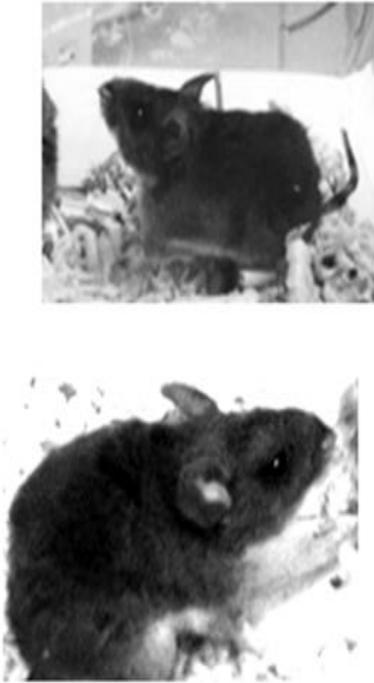
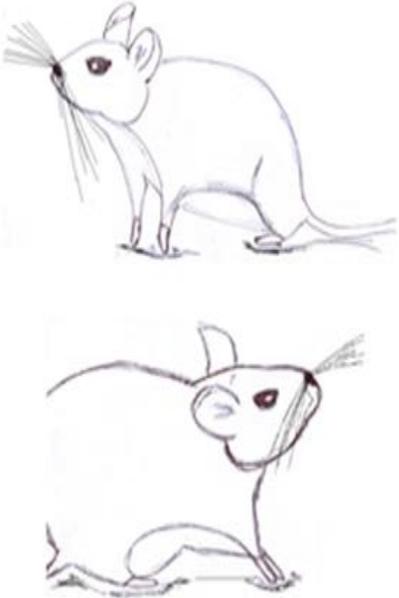
Al tener información acerca de otros parámetros fisiológicos de los animales experimentales se podrá comprender mejor al organismo y los efectos que ejerce sobre él el síndrome *jet-lag*.

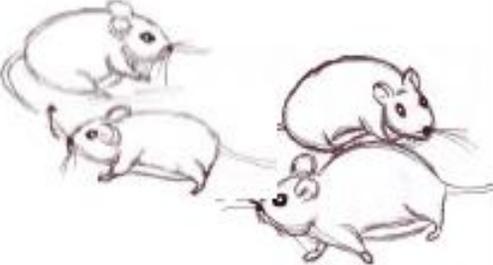
Los efectos del síndrome sobre la conducta al parecer son especie-específicos y con diferencias interindividuales debido a la gran variabilidad observada en los resultados, posiblemente cada individuo posee diferentes tiempos de ajuste al nuevo horario.

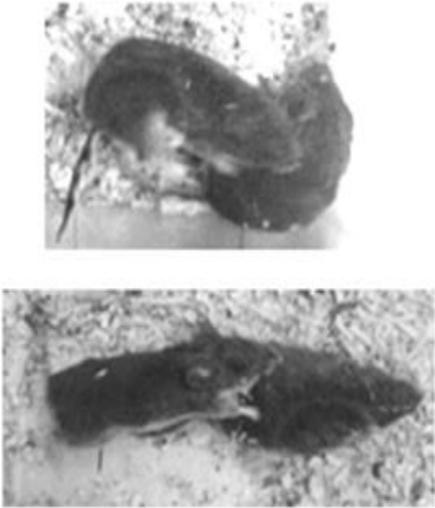
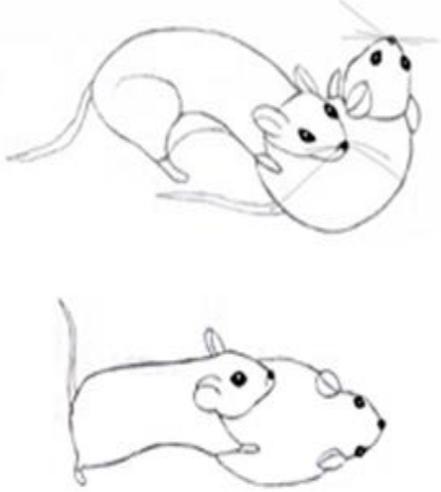
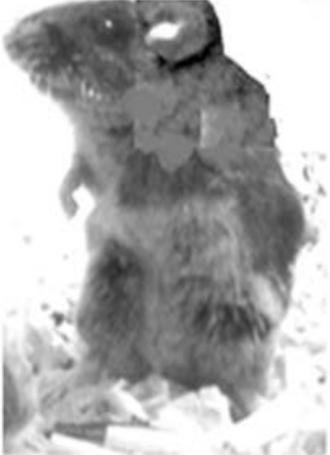
Es pertinente continuar con el trabajo para diseñar otros protocolos para conocer aspectos conductuales de ésta especie como: la existencia del efecto ganador y perdedor, ya que diversa literatura lo refiere en otras especies, qué hormonas y neurotransmisores están relacionados con la conducta agresiva. Los candidatos son la melatonina, la vasopresina y la serotonina. Finalmente, cuánto tiempo tardan en ajustar su ritmo de actividad a un adelanto de 6h.

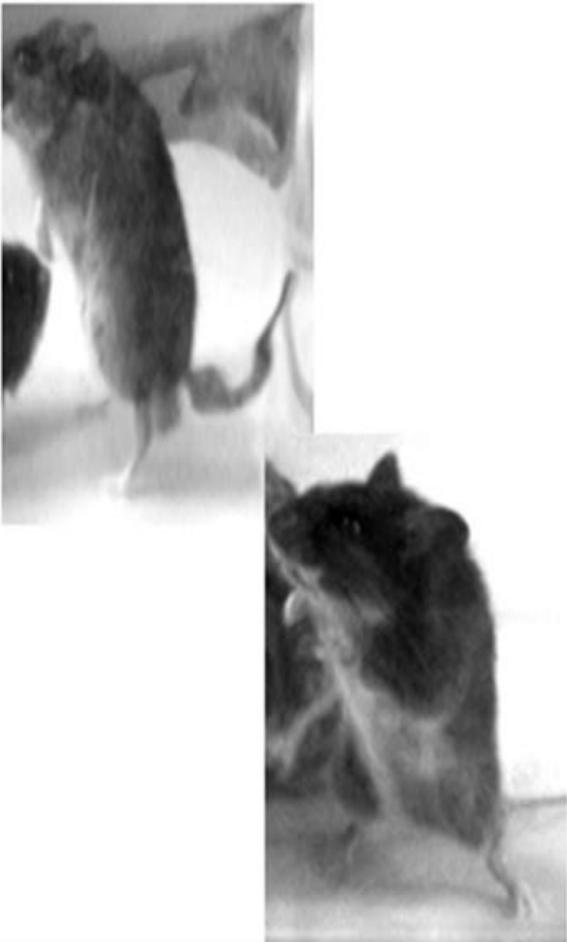
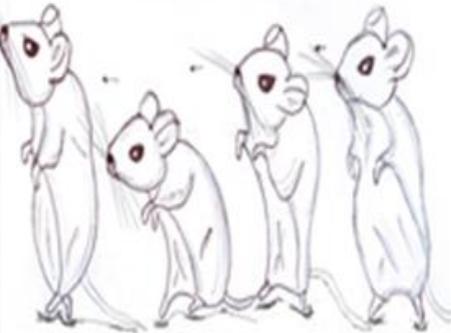
9. Anexos

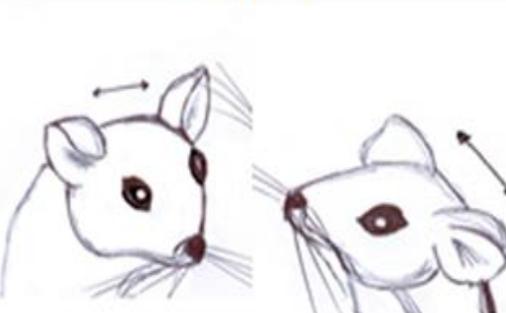
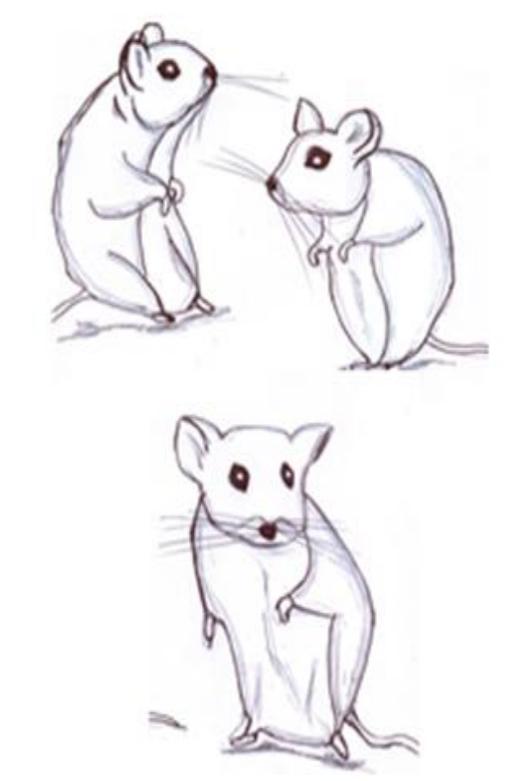
9. 1. Etoograma

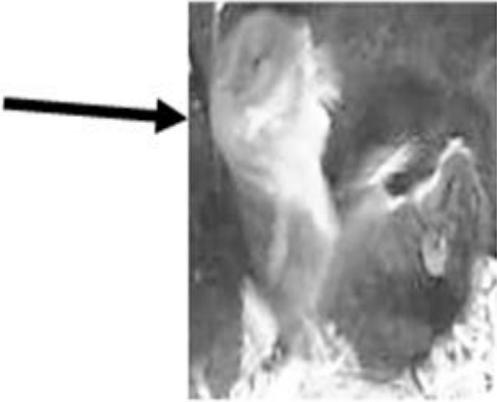
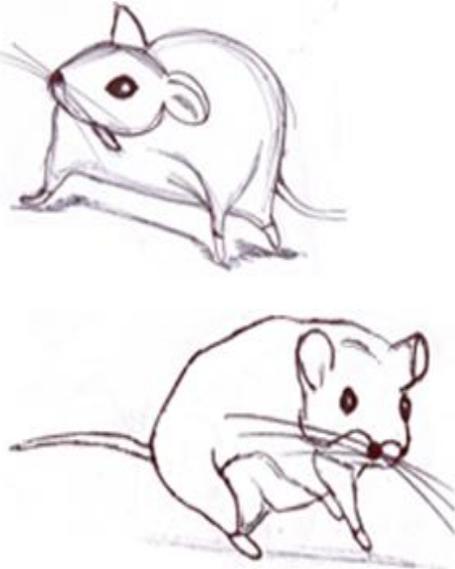
ETOGRAMA PARA LAS CONDUCTAS EXPRESADAS POR LA ESPECIE <i>Neotomodon alstoni</i> DURANTE UN ENCUENTRO AGRESIVO MACHO-MACHO		
CONDUCTAS OFENSIVAS	IMAGEN	Esquema
<p>*Orejas rectas: Ambas orejas se levantan en dirección perpendicular a la cabeza. Esta característica acompaña todas las conductas que aquí se describen cómo ofensivas</p>		
<p>*Danza: El individuo mantiene los cuartos traseros flexionados, y los delanteros sin flexionar, las plantas de sus cuatro extremidades tienen contacto con el piso y eleva su cabeza. A veces el sujeto puede tener un cuarto delantero flexionado en el aire. Quien hace ésta conducta se aproxima o dirige al contrincante, el cual puede estar arrinconado.</p>		

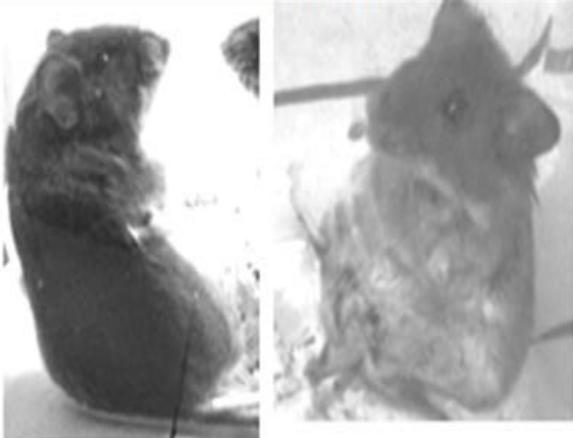
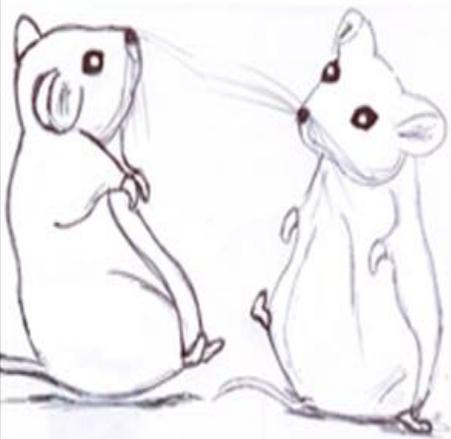
CONDUCTAS OFENSIVAS	IMAGEN	ESQUEMA
<p>*Boxing inclinado: El individuo se apoya en sus cuartos traseros con la cola al ras del piso, posiciona las extremidades delanteras frente a su tórax, inclina el cuerpo y rostro hacia el del contrincante, aunque sus extremidades apunten hacia otra dirección. Usualmente ésta conducta se presenta en la primera parte del enfrentamiento antes de "ataque".</p>		
<p>*Perseguir: El sujeto se mueve rápidamente hacia su contrincante y cuando éste avanza va tras de él. Antes de que ésta conducta se presente, los sujetos pueden haber permanecido un tiempo sin interactuar en los extremos del espacio del enfrentamiento, simplemente observándose y puede ser sucedida por "ataque" y posteriormente "lucha".</p>		
<p>*Movimientos rítmicos de la cola: el sujeto mueve la cola de un lado a otro rápidamente o la hace vibrar al ras del piso mientras hacen alguna de las conductas aquí categorizadas como "ofensivas".</p>		

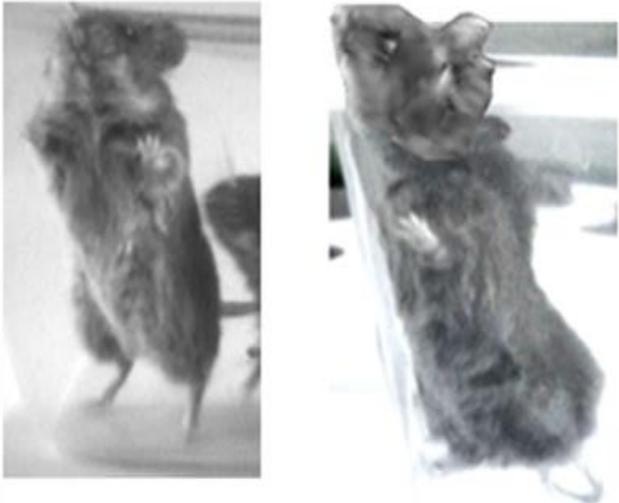
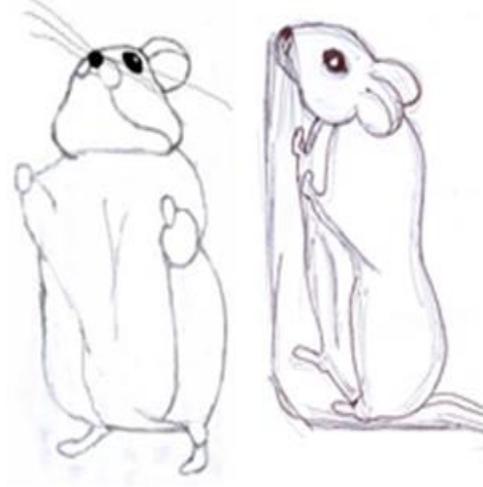
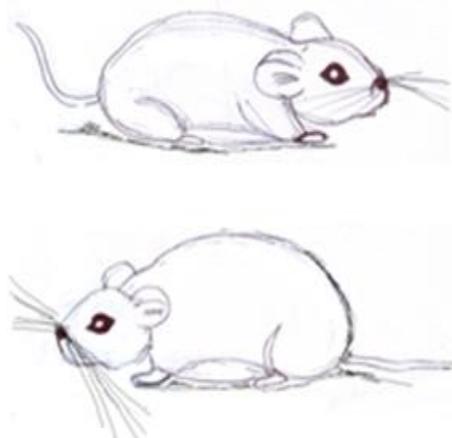
CONDUCTAS OFENSIVAS	IMAGEN	ESQUEMA
<p>Ataque: El individuo da un salto hacia su contrincante, el salto puede ser hacia la región posterior o la región lateral de su oponente. Usualmente ésta conducta desencadena la conducta "lucha".</p> <p>A veces el atacante puede saltar hacia arriba con los cuartos traseros en dirección al oponente, una vez que tiene contacto con él empieza a golpearlo moviendo rápidamente las patas. Esta conducta suele ocurrir después de haber hecho <i>displays</i> de superioridad como "posición vertical defensiva" y "danza".</p>		
<p>*Posición vertical ofensiva: El individuo eleva su cuerpo, con la cola pegada al piso y el dorso tan recto como le sea posible, los cuartos delanteros frente al tórax.</p> <p>Esta conducta se presenta antes de "perseguir" y "ataque", y después de haber hecho "Boxing inclinado".</p>		

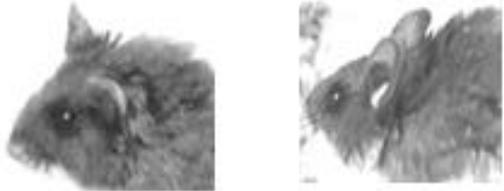
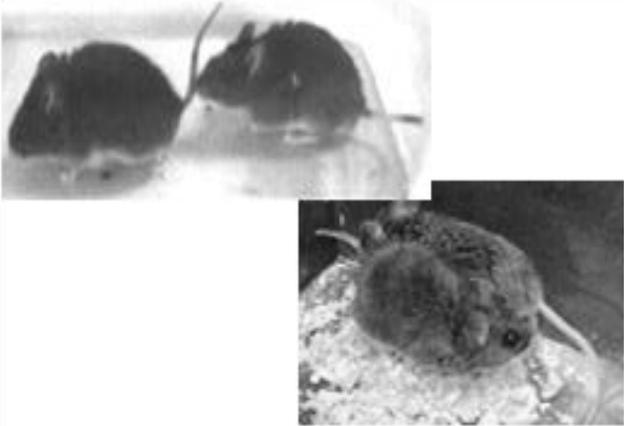
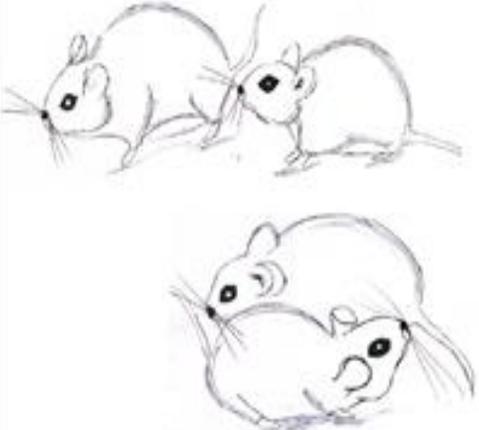
CONDUCTAS OFENSIVAS	IMAGEN	ESQUEMA
<p>*Avanzar con boxing: El sujeto, con la cola apuntando hacia arriba, se desplaza apoyándose en sus cuartos traseros, parece como si diera saltos pues no apoya las extremidades delanteras en el piso. Esta conducta ocurre después de hacer "boxing recto" y es seguida por "perseguir" o "ataque".</p>		

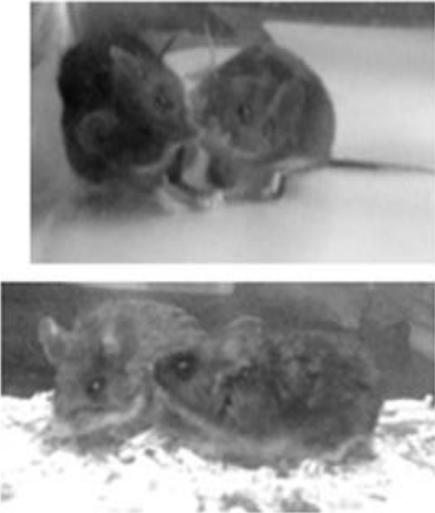
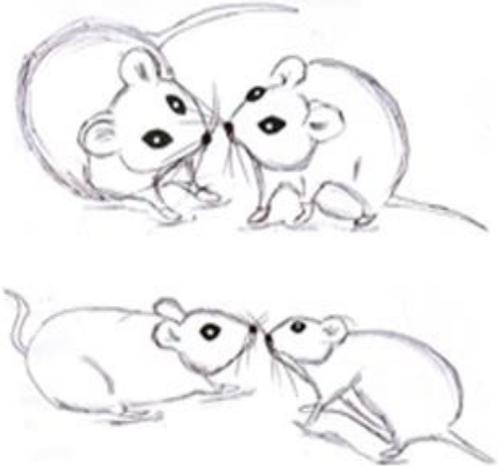
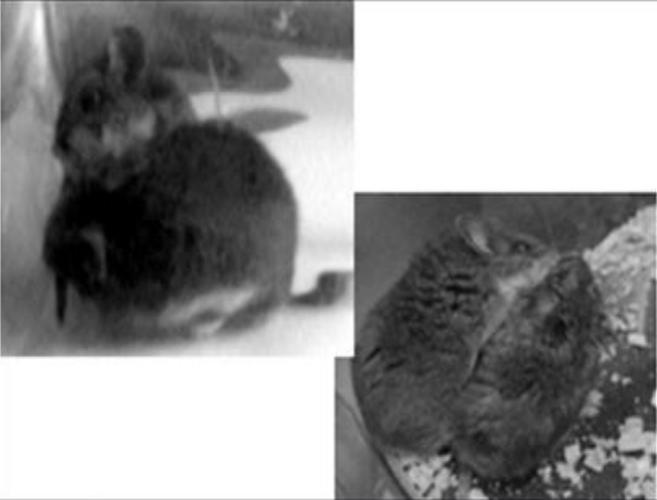
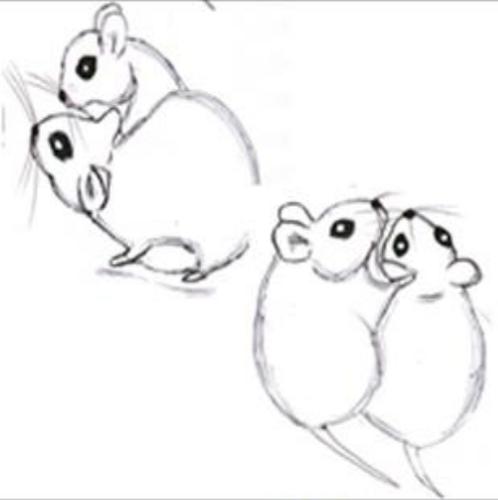
CONDUCTAS DEFENSIVAS	IMAGEN	ESQUEMA
<p>*Orejas hacia los lados. Las orejas del individuo se elevan hacia los lados. La oreja izquierda se eleva hacia el lado izquierdo de la cabeza y la derecha hacia el lado derecho. Esta característica acompaña todas las conductas que aquí se describen cómo defensivas.</p>		
<p>*Posición vertical arqueada: El individuo arquea su espalda, a veces la inclina hacia algún lado, sus cuartos delanteros pegados al tórax. Las extremidades del sujeto pueden o no estar en la misma dirección. Usualmente evita contacto visual con su contrincante. El sujeto eleva la cola de tal modo que apunta hacia arriba. Esta conducta ocurre al inicio de la confrontación.</p>		

CONDUCTAS DEFENSIVAS	IMAGEN	ESQUEMA
<p>Manotazos: El individuo mueve rápidamente alguno de sus cuartos delanteros en dirección a su contrincante, generalmente emite un chillido y cierra los ojos. Esta conducta ocurre después de haber estado en "espalda atrás" y cuando el contrincante está lejos quien se mantiene en ese sitio de la jaula o explora sin acercarse al otro sujeto. La conducta "manotazos" puede suceder varias veces antes de que exprese otra conducta.</p>		
<p>* Posición de sumisión: El sujeto flexiona sus cuartos traseros sobre el piso, al mismo tiempo que apoya una extremidad delantera sobre el piso sin flexionarla y eleva la otra flexionada, el cuerpo se inclina hacia el cuarto trasero que está recto sobre el piso. Ésta conducta se presenta cuando ya hubo "ataque" o "lucha", y generalmente el sujeto está en un extremo de la jaula, a veces el contrincante puede acercarse para olfatear su área genital.</p>		

CONDUCTAS DEFENSIVAS	IMAGEN	ESQUEMA
<p>*Dorso hacia atrás: El sujeto eleva su cuerpo con los cuartos delanteros pegados al tórax, dirige la cabeza y el dorso hacia atrás, a veces se inclina además hacia algún lado. El sujeto puede empeñarse tanto en hacer su dorso hacia atrás que queda sentado y recargado sobre algún extremo de la jaula. Quien hace ésta conducta está en un extremo de la jaula.</p>		
<p>*Posición vertical defensiva: (es el que registré en los enfrentamientos). El sujeto hace el dorso hacia atrás, eleva la cabeza y también la hace hacia atrás con un movimiento ligeramente circular. Sus cuartos delanteros permanecen pegados a su tórax. A veces todo su cuerpo se encuentra en dirección perpendicular a la de su contrincante. Quien hace ésta conducta está en un extremo de la jaula.</p>		 <p>Así se ve desde el ángulo trasero</p>

CONDUCTAS DEFENSIVAS	IMAGEN	ESQUEMA
<p>*Escape: El individuo escarba el aserrín, intenta trepar las paredes de la jaula, o da saltos para salir de ésta.</p>		
<p>*Pecho tierra: El sujeto posiciona el tórax, extremidades y cola al ras aserrín, así aparenta la menor altura posible, y se ubica en el mismo lugar hasta que su contrincante busca contacto físico con él, su cuerpo puede estar o no en dirección a su contrincante.</p>		

CONDUCTAS QUE AMBOS HACEN	IMAGEN	ESQUEMA
*Piloerección: El pelaje de los individuos se eriza.		
Olfatear área genital: Un individuo acerca su cabeza al área genital del otro y empieza a olfatear. Los individuos con tendencia a ser dominantes presentan más esta conducta que los individuos con tendencia a ser subordinados, ésta conducta se da cuando no se han relaciones de dominancia y subordinación.		
Lucha: Ambos sujetos giran en el piso, mientras se golpean con las extremidades y se muerden. En este momento, se pueden presentar conductas tales como cascabelear la cola, algunos chillidos emitidos por el subordinado, piloerección, orejas a los lados y orejas rectas.		

CONDUCTAS QUE AMBOS HACEN	IMAGEN	ESQUEMA
<p>Olfatear rostro: Los sujetos se aproximan al rostro de su contrincante y olfatean. Esta conducta se presenta cuando no la jerarquía entre los individuos no es evidente.</p>		
<p>Acicalar: Un individuo se aproxima al rostro del otro y lo acicala. Esta conducta se presenta cuando no la jerarquía entre los individuos no es evidente.</p>		

9. 2. Tabla para obtener los índices de conducta

Para analizar el comportamiento agresivo observado en machos de *N. alstoni*, se tomaron en cuenta sólo cuatro conductas ofensivas y cuatro defensivas. Los índices para cada una de éstas categorías de conducta se hicieron de la misma manera utilizando la siguiente tabla.

Dónde de acuerdo con el número de conductas de una categoría (ofensivas o defensivas) y la frecuencia con que las expresaran se asignó un valor, el cual representa el índice de conducta, ya sea ofensiva o defensiva.

No. conductas	Frecuencia	Valor del índice
1		1
2	1-5	1.25
3		1.50
4		1.75
1		2
2	6-10	2.25
3		2.50
4		2.75
1		3
2	11-15	3.25
3		3.5
4		3.75
1		4
2	16-20	4.25
3		4.5
4		4.75
1		5
2	21-25	5.25
3		5.5
4		5.75
1		6
2	26-30	6.25
3		6.5
4		6.75
1		7
2	31-35	7.25
3		7.5
4		7.75
1, 2, 3, 4	36-40	8

9. 3. Análisis de ELISA para cuantificar testosterona

El ELISA, *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, (Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas), se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte (inmoadsorbente) la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmobilizada y, por tanto, será fácilmente revelada cuando la enzima actúe debido a que un sustrato específico producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o colorímetro.

Existen diferentes tipos de ELISA con anticuerpos marcados.

El que se utilizó un ELISA directo (anticuerpo policlonal contra testosterona R156/7) para poder cuantificar la concentración plasmática de testosterona. El cuál consta de los siguientes pasos:

Fijación al soporte insoluble (“tapizado”) de antígenos específicos. Lavado para eliminar los antígenos fijados deficientemente o no fijados.

Adición de anticuerpos marcados (“conjugados”) con una enzima; si los anticuerpos reaccionan con los antígenos, el complejo quedará solubilizado. Lavado para eliminar los anticuerpos marcados que no hayan reaccionado.

Adición de un sustrato sobre el que sea capaz de actuar la enzima marcadora. Se puede parar la reacción si se desea.

Lectura visual o colorimétrica del producto final coloreado (Correa, *et al.*, 2000; Morales y Gaitán, 2013).

A continuación se presenta la curva de calibración tal como se muestra en el trabajo de Rodríguez de 2014, en el cual se cuantificaron las variaciones diarias de glía en el acocil.

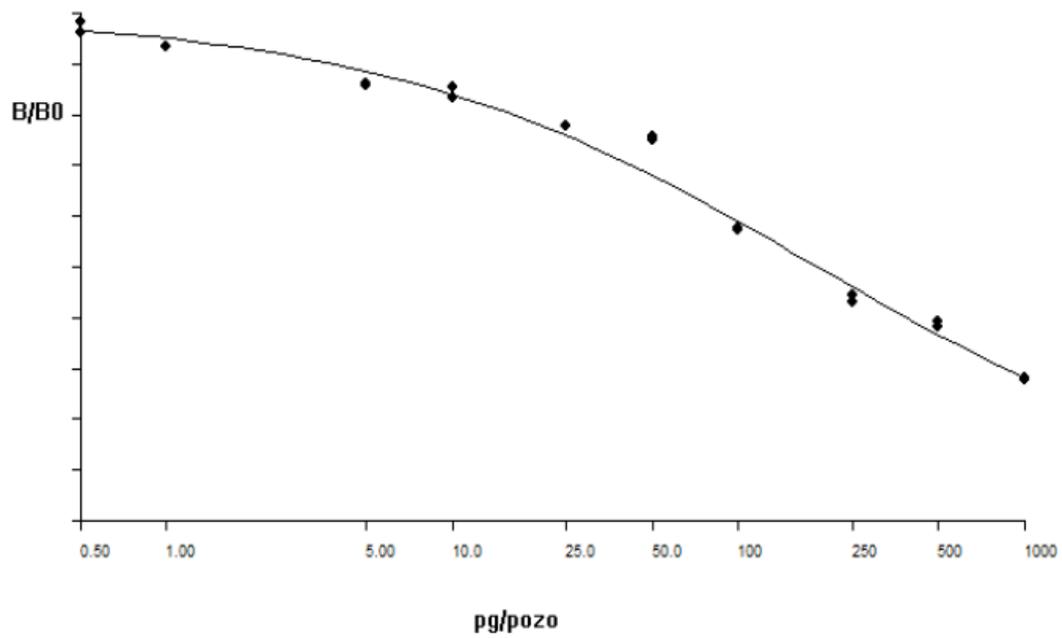


Fig. 12. La línea continua representa la curva de calibración del péptido control de la testosterona y los datos son el promedio.

10. Literatura citada

- Achiraman, S., Snkarganesh, D., Kannan, S., Kamalakkannan, S., Nirmala, N., Archunan, G. (2014). Response of male mice to odours of female mice in different stage of oestrous cycle: self-grooming behavior and the effect of castration. Indian Journal of Experimental Biology, 52(1), 30-35.
- Alaux, C., Sinha, S., Hasadsri, L., Hunt, G., Guzmán-Novoa, E., DeGrandi-Hoffman, G., Uribe-Rubio, J., Southey, B., Rodriguez-Zas, S., Robinson, G. (2009). Honey bee aggression supports a link between gene regulation and behavioral evolution. Proceedings of the National Academy of Sciences, 106(36), 15400-15405.
- Albert, J., Dyson, M., Walsh, L. (1987). Intermale social aggression: reinstatement in castrated rats by implants of testosterone propionate in the medial hypothalamus. Physiology and behavior, 39(5), 555-560.
- Albus, H., Vansteensel, M., Michel, S., Block, G., Meijer, J. (2005). A GABAergic mechanism is necessary for coupling dissociable ventral and dorsal regional oscillators within the circadian clock. Current Biology, 15(10); 886-893
- Alock, J. (2005). Animal Behavior: An evolutionary approach. 8^a ed., Sinauer Associates, EUA, 564p.
- Arguedas, P. (2000). Control de calidad para animales de granja. Editorial Universidad Estatal a Distancia, Costa Rica, 116p.
- Aschoff, J. (1965). Circadian Rhythms in Man. A self-sustained oscillator with an inherent frequency underlies human 24-hour periodicity. Science, 148, 14228-1432.
- Ayala, F., Vargas, R., Ramos, J., Mexicano, G. (1998). Sleep Patterns of the Volcano Mouse (*Neotomodon alstoni alstoni*). Physiology & Behavior, 64(4), 577–580.
- Baisinger, J., Roberts, C. (1972). Reduction of intraspecies aggression in rats by positive reinforcement of incompatible behaviors. Journal of the experimental analysis of behavior, 18(3), 535-540.
- Bass, J. (2012). Circadian topology of metabolism. Nature, 491, 348-356

- Bath, K., Johnston, R. (2007). Dominant-Subordinate relationships in Hamsters: Sex Differences in Reactions to Familiar Opponents. *Hormones & Behavior*, 51(2), 258–264.
- Bernal, J. (2011). Evolución biológica de la moral y el derecho. Universidad del Norte, Colombia, 374p.
- Blanchard, R., Wall, M., Blanchard, C. (2003). Problems in the study of rodent aggression. *Hormones and Behavior*, 44(3), 161-170.
- Butler, M., Karatsoreos, I., LeSauter J., Silver, R. (2012). Dose-dependent effects of androgens on the circadian timing system and its response to light. *Endocrinology*, 153(5), 2344-2352.
- Byers, L., Wiles, V., Dunn, L., Taft, A. (2012). Mouse Estrous Cycle Identification Tool and Images. *Public Library of Science*, 7(4), e35538-e35538.
- Caligioni, C. (2009). Assessing reproductive status/stages in mice. *Current Protocols in Neuroscience*, 11p.
- Cardinali, D., Jordá, J., Sánchez, E. (1994). Introducción a la cronobiología. Fisiología de los ritmos biológicos, Servicio de publicaciones Universidad de Cantabria, 158p.
- Carmona, V., Fuentes, C., Carmona, A., Aguilar, I., Cárdenas, R., Miranda, M. (2012). Obesity alters circadian behavior and metabolism in sex dependent manner in the volcano mouse *Neotomodon alstoni*. *Physiology & Behavior* 105(3), 727–733.
- Collado, R., Aguilar, R., Álvarez, J., Campillo, C., Kuri, P., del Campo, A., Nava R., Pérez I., Valdés, P., Vera, A. (2001). El cambio de horario y la salud. *Revista Facultad de Medicina, UNAM*, 44(5), 216-220.
- Coon, D. (2005). Fundamentos de Psicología. 10a ed., International Thomson Editores, México, 576p.
- Coquelin, A., Desjardins, C. (1982). Luteinizing hormone and testosterone secretion in Young and old male mice. *American Journal of Physiology*, 243(3), 257-263.

- Corinne, J., Schmutz I., Hampp G., Oster, H., Albrecht, U., (2005). A guideline for analyzing circadian wheel-running behavior in rodents under different lighting conditions. Biological Procedures Online, 7(1), 101-116.
- Correa, D., Mandujano, A., Medina, Y., Medina, E., Mata, O., Carpio, J., Zavala, A., Ruiz, A., Gabilondo, J., Ayala, M., Vázquez, J., Bell, H., Dueñas, M., Tamplin, M. (2000). Manual de técnicas modernas en inmunología. Teoría y práctica. México. Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, 95p.
- Craig J. (1986). Measuring social behavior: Social Dominance. Journal of Animal Science, 62(4), 1120-1129.
- Daan, S., Damassa, D., Pittendrigh, C., Smith, E. (1975). An effect of castration and testosterone replacement on a circadian pacemaker in mice (*Mus musculus*). Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 72(9), 3744-3777.
- Davidson, J., Sellix, T., Daniel, J., Yamazaki, S., Menaker, M., Block, D. (2006). Chronic jet-lag increases mortality in aged mice. Current Biology, 16(21), 914-916.
- Davidson, J., Castanon-Cervantes, O., Leise, L., Molyneux, C., Harrington, E. (2009). Visualizing jet lag in the mouse suprachiasmatic nucleus and peripheral circadian timing system. European Journal of Neuroscience, 29(1), 171-180.
- Debru, C. (2009). Neurofisiología del sueño. Editorial CSIC – CSIC, España, 480p.
- Deacon, S., Arendt, J. (1996). Adapting to phase shifts, I. An experimental model for jet-lag and shift work. Physiology & behavior, 59(4), 665-673.
- Dugatkin, L., Dugatkin, A. (2007). Extrinsic effects, estimating opponents' RHP, and the structure of dominance hierarchies. Biology Letters, 3(6), 614-616.
- Escobar, C., Salazar, A., Granados, D., Aguirar, R. (1997). La sincronización: características y mecanismos. II Curso Latinoamericano de Cronobiología. Facultad de Ciencias.
- Esquifino, A., Chacón, F., Jiménez, V., Reyes, C., Cardinali, D. (2004). 24-hour changes in circulating prolactin, follicle stimulating hormone, luteinizing hormone

- and testosterone in male rats subjected to social isolation. Journal of Circadian Rhythms, 2(1), 1-6.
- Fedigan, L. (1992). Primate Paradigms, Sex role and social bonds. University of Chicago press, 324p.
 - Filipski, E., Delaunay, F., King, V., Wu, W., Claustrat, B., Gréchez-Cassiau, A., Gueltier, C., Hastings, H., Francis, L. (2004). Effects of chronic jet-lag on tumor progression in mice. Cancer Research, 64(21), 7879-7885.
 - Fuentes, C., Miranda, M., Samario, J., Moreno, E., Carmona, A., Cárdenas, R. (2010). Circadian locomotor activity and response to different light conditions in the Volcano mouse, *Neotomodon alstoni* (Merriam, 1898). Biological Rhythm Research, 41(4), 269-278.
 - Fuxjager, M., Mast, G., Becker, E., Marler, C. (2009). The “home advantage” is necessary for a full winner effect and changes in post-encounter testosterone. Hormones and Behavior, 56(2), 214-219.
 - Garaulet, M., Madrid, J. (2010). Chronobiological aspects of nutrition, metabolic syndrome and obesity. Advanced Drug Delivery Reviews, 12p.
 - Giammanco, M., Tabacchi, G., Giammanco, S., Di Majo, D., La Guardia, M. (2005). Testosterone and aggressiveness. Medical Science Monitor, 11(4), RA, 36-145.
 - Gleason, D., Fuxjager, M., Oyebile, O., Marler, C. (2009). Testosterone release and social context: When it occurs and why. Frontiers in Neuroendocrinology, 30(4), 460-469.
 - Goldman, B. (1999). The circadian timing system and reproduction in mammals. Steroids, 64; 679-685.
 - Goldman, J., Murr, S., Cooper, R. (2007). The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. Birth Defects Research part B. Developmental and Reproductive Toxicology, 80(2), 84-97.
 - Granados, H., Luis, J., Carmona, A., Espinosa, G., Arenas, T. (1996). Comportamiento agresivo del macho del ratón de los volcanes *Neotomodon alstoni* (Rodentia: Cricetidae). Revista de Biología Tropical, 44(2), 861-865.

- Gruart, A., Delgado, J., Escobar, C., Aguilar, R. (2003). Los relojes que gobiernan la vida. Fondo de Cultura Económica, México, 197p.
- Guyton, A., Hall, J. (2007). Tratado de fisiología médica. Elsevier Saunders, 11^a ed., España, 1152p.
- Hart, B. (1974). Gonadal androgen and sociosexual behavior of male mammals: a comparative analysis. Psychological bulletin, American psychological association, 8(7), 383-400.
- Hoffmann, K., Nieschlag, E. (1977). Circadian rhythm of plasma testosterone in the male Djungarian Hamster (*Phodopus sungorus*). Acta Endocrinológica, 86(1), 193-199.
- Honess, P., Marin, C. (2006). Behavioral and physiological aspects of stress and aggression in nonhuman primates. Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 30(3), 390-412.
- Iwahana, E., Karatsoreos, I., Shibata, S., Silver, R. (2008). Gonadectomy reveals sex difference in circadian rhythms and suprachiasmatic nucleus androgen receptors in mice. Hormones and Behavior, 53(3), 422-430.
- Jechura, T., Lee, T. (2004). Ovarian hormones influence olfactory cue effects on reentrainment in the diurnal rodent, *Octodon degus*. Hormones and behavior, 46(3), 349-355.
- Jechura, T., Walsh J., Lee T. (2000). Testicular Hormones Modulate Circadian Rhythms of the Diurnal Rodent, *Octodon degus*. Hormones and Behavior, 38, 243-249.
- Jemiolo, B., Harvey, S., Novotny, M. (1986). Promotion of the Whitten effect in female mice by synthetic of male urinary constituents. Proceedings of Natural Academy of Science, USA, vol. 83, 4576-4579.
- Jensen, D. (1976). Fisiología. Editorial Interamericana, 1094-1095.
- Jianghong, L. (2004). Concept analysis: Aggression. Issues in Mental Health Nursing, 25(7), 693-714.
- Justel, N., Benstosela, M., Mustaca, A. (2009). Comportamiento sexual y ansiedad. Revista Latinoamericana de psicología, 41(3), 429-444.

- Katz, G. (2011). Jet Lag and Psychotic Disorders. Current Psychiatry Reports, 13(3), 187-192.
- Kiessling, S., Eichele, G., Oster, H. (2010). Adrenal glucocorticoids have a key role in circadian resynchronization in a mouse model of jet lag. The journal of clinical investigation, 120(7), 2600-2619.
- Kishi, T., Sunagawa, K. (2011). Experimental 'JetLag' Causes Sympathoexcitation via Oxidative Stress through AT1 Receptor in the Brainstem. Engineering in Medicine & Biology Society, 1969-1972.
- Knaden, M., Wehner, R. (2004). Path integration in desert ants controls aggressiveness. Science, 305(5680), 60p.
- Koolhaas, J., Bartolomucci, A., Buwalda, B., de Boer, F., Flügge, G., Korte, M., Meerlo, P., Mursion P., Olivier, P., Richter-Levin, G., Sgoifo, A., Sterimer, T., Stiedl, O., Van Dijk, G., Wöhr, M., Fuchs, E. (2011). Stress revisited: A critical evaluation of the stress concept. Neuroscience and biobehavioral reviews, 35(5), 1291-1301.
- Koukkari, W., Sothorn, R. (2006). Introducing Biological Rhythms, Cap. II, General Features of Rhythms: Terminology and Characteristics, Springer, USA, 655p.
- Lagerspetz, K. (1964). Studies on the aggressive behavior of mice. Suomalainen Tiedeakatemia, Helsinki. 131p.
- Lahitte, H., Ferrar, H., Lázaro, L. (2002). Sobre el etograma, 1: del etograma como lenguaje al lenguaje de los etogramas. Revista de Etología, 4(2), 1517-2805.
- Luis, J. (1986). Estudio comparativo sobre la reproducción del ratón de los volcanes silvestre (*Neotomodon alstoni alstoni*) en el laboratorio, con hembras apareadas durante uno y dos ciclos estrales. UNAM, Facultad de Ciencias, México, 40p.
- Luis, J., Carmona, A., Delgado, J., Cervantes, F., Cárdenas R. (2000). Parental Behavior of the Volcano Mouse, *Neotomodon alstoni* (Rodentia: Muridae), in Captivity. Journal of Mammalogy, 81(2), 600-605.

- Luis, J., Cervantes, F., Martínez, M., Cárdenas, R., Delgado, J., Carmona, C. (2004). Male influence on maternal behavior and offspring of captive volcano mice (*Neotomodon alstoni*) from Mexico. Journal of mammalogy, 85(2), 268-272.
- Luis, J., Ramírez L., Carmona, A., Ortiz, G., Delgado, J., Cárdenas, R. (2009). Paternal behavior and testosterone plasma levels in the Volcano Mouse *Neotomodon alstoni* (Rodentia: Muridae). Revista Biológica Tropical, 57 (1-2), 433-439.
- Maier, R. (2001). Comportamiento animal, un enfoque evolutivo y ecológico. McGraw Hill Interamericana de España, 608p.
- Manfredini, R., Manfredini, F., Fersini, C., Conconi, F. (1998). Circadian rhythms, athletic performance, and jet lag. British Journal of Sports Medicine, 32(2), 101-106.
- Marinelli, M., Piazza, P., Deroche, W., Maccari, S., LeMeal, M., Herve, S. (1994). Corticosterone circadian secretion differentially facilitates dopamine-mediated psychomotor effect of cocaine and morphine. The journal of neuroscience, 14(5): 2724-2731.
- Márquez, S., Bonilla, H., Vázquez, G., Martínez, R., Velázquez, J. (2003). Changes in masculine sexual behavior, corticosterone and testosterone in response to acute and chronic stress in male rats. Hormones and behavior 44(4), 372-337.
- McClintock, M. (1983). Estrous synchrony: Modulation of ovarian cycle length by female pheromones. Physiology and behavior, 32(5), 701-705.
- Meerlo, P., Sgoifo, A., Turek, F. (2002). The effects of social defeat and other stressors on the expression of circadian rhythms. Stress, 5(1):15-22.
- Meijer, J., Michel S., Vander, Leest H., Rohling, J. (2010). Daily and seasonal adaptation of the circadian clock requires plasticity of the SCN neuronal network. European Journal of neuroscience, 32(12), 2143-2151.
- Mohawk, J., Green C., Takahashi, J. (2012). Central and peripheral circadian clocks in mammals. Annual Review of Neuroscience Circadian Clocks in Mammals, 245-262.

- Mohawk, J., Cashen, K., Lee, T. (2004). Inhibiting cortisol response accelerates recovery from a photic phase shift. American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 288(1), R221–R228.
- Molina, P. (2006). Fisiología endócrina, 2a ed., McGraw Hill, 189-1991.
- Moore, R. (1992). The fourth C.U. Ariëns Kappers lecture. The organization of the human circadian timing system. University of Pittsburgh, U.S.A. Progress in BrainResearch, (93). Elsevier Science Publishers.
- Moore-Ede, M., Sulzman, F., Fuller, C. (1982). The clocks that time us. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, and London, England, 446p.
- Moura, P., Giemenes-Júnior, J., Valentinuzzi, V., Xavier, G. (2009). Circadian phase and intertrial interval interfere with social recognition memory. Physiology and Behavior, 96(1), 51-56.
- Moura, P., Meirelles, S., Xavier, G. (2010). Long-term social recognition memory in adult male rats: factor analysis of the social and non social-behaviors. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 43(7), 663-676.
- Morales, A., Gaitán, I. (2013). Manual de prácticas de laboratorio de inmunología. Universidad Mariano Gálvez, Facultad de Ciencias Médicas y de la Salud, Guatemala, 66p.
- Muñoz, E., Díaz, J., Moreno, C. (2010). Agresión y violencia. Cerebro, comportamiento y bioética. Salud Mental, 33(5), 467-469.
- Normalización. (2001). Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. 58p.
- Olivier, B., Mos, J. (1992). Rodent models of aggressive behavior and serotonergic drugs. Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry, 18, 847-870.
- Olivier, B., Young, L. (2002). Neuropsychopharmacology: The fifth generation of progress, Chapter 118: Animal models of aggression. 1699-1708.

- Oliviera, J., Ramírez, J., Williams, S. (1986). Reproducción de *Peromyscus (Neotomodon) alstoni* (Mammalia: muridae) en condiciones de laboratorio. Acta Zoológica Mexicana, (ns), 16.
- Oyegbile, T., Marler, C. (2005). Winning fight elevates testosterone levels in California mice and enhances future ability to win fights. Hormones and behavior, 48(3), 259-267.
- Pendergast, B., Cable, E., Cisse, Y., Stevenson, T., Zucker, I. (2013). Pineal and gonadal influences on ultradian locomotor rhythms of male Siberian hamsters. Hormones and Behavior, 63, 54–64.
- Phillips, A., Fulcher, B., Robinson, P., Klerman E. (2013). Mammalian Rest/activity patterns explained by physiologically based modeling. Public Library of Science Computational biology, 9(9), e1003213.
- Pittendrigh, C. (1967). Circadian systems, I. The driving oscillation and its assay in *Drosophila pseudoobscura*. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 58(4), 1762-1767.
- Pittendrigh, S., (1981). Circadian systems: general perspective. Jürgen Aschoff Handbook of Behavioral Neurobiology, Cap. 5, Biological Rhythms. New York, Plenum Press, 4, 55-77.
- Pittendrigh, C., Bruce, V., Kaus, P. (1958). On the significance of transients in daily rhythms. Proceedings of the National Academy of Sciences, U S A, 44(9), 965-973.
- Rada, R., Kellner, R., Winslow, W. (1976). Plasma testosterone and aggressive behavior. Psychosomatics, 17(3), 138-142.
- Ramírez, E. (2002). Caracterización del sistema circadiano que regula el ritmo de actividad locomotora en el cangrejo de río *Pseudothelphusa americana*. UNAM, Facultad de Ciencias, 62p.
- Reddy, A., Field, M., Maywood, E., Hastings, H. (2002). Differential resynchronization of circadian clock gene expression within the suprachiasmatic nuclei of mice subjected to experimental Jet lag. The journal of Neuroscience, 22(17), 7326-7330.

- Refinetti, R. (2005). Circadian physiology. 2a ed., CRC press Taylor and Francis group.
- Rietveld, W., Minors, D., Waterhouse, J. (1993). Circadian rhythms and masking: an overview. Chronobiology International, 10(4), 306–312.
- Russo, S., Murrugh, J., Han, M., Charney, D., Nestler, E. (2012). Neurobiology of resilience. Review, Nature Neuroscience, 11(15), 1475-1484.
- Rodríguez, M. (2014). Variaciones diarias en las cantidades de glía en el acocil adulto *Procambarus clarkii*. Facultad de Ciencias, UNAM, 63p.
- Rutte, C., Taborsky, M., Brinkhof, M. (2006). What set the odds of winning and losing?. Trends in ecology and evolution, 21(1), 16-21.
- Salazar, A., Parra, L., Barbosa, S., Leff, P., Antón, B. (2006). Sincronización luminosa. Conceptos básicos. Primera parte. Salud Mental, 29(3), 11-17.
- Salazar, A., Parra L., Barbosa, S., Leff, P., Antón, B. (2007). Sincronización no-luminosa: ¿Otro tipo de sincronización? Primera parte. Salud Mental, 30(3), 39-47.
- Salgado, D., Angeles, C., Saderi, N., Buijs, M., Escobar, C. (2010). Food Intake during the Normal Activity Phase Prevents Obesity and Circadian Desynchrony in a Rat Model of Night Work. Endocrinology, 151(3), 1019-1029.
- Samario, J. (2008). Caracterización del ritmo de actividad locomotriz del Ratón de los Volcanes *Neotomodon alstoni alstoni*. UNAM, Facultad de Ciencias, 56p.
- Scotti, A., Schmidt, L., Newman, E., Bonu, T., Soma, K., Demas, E. (2009). Aggressive encounter differentially affect serum dehydroepiandrosterone and testosterone concentrations in male Siberian hamsters (*Phodopus sungorus*). Hormones and behavior, 56(4), 376-381.
- Sepúlveda, T., Sabanero, M., Durán, E., Flores, L., Ramírez, J., Solís, M. (2012). Ciclo estral del ratón hembra intacto y ovariectomizado. Acta Universitaria, Universidad de Guanajuato.
- Siegel, P., Siegfried, J., Stanley, R. (1969). Time-zone effects on the long distance air traveler. Department of transportation, Federal aviation administration, Office of aviation Medicine.

- Simpson, K. (2001). The role of testosterone in aggression. McGill Journal of Medicine, Review article, 6(1), 32-40.
- Singaravel, M., Sharma, V., Subbaraj, R., Gopukumar, N. (1996). Chronobiotic effect of melatonin following phase shift of light/dark cycles in the field mouse *Mus booduga*. Journal of Biosciences, 21(6), 789–795.
- Siswanto, H., Hau, J., Carlsson, H., Goldkuhl, R., Abelson, K. (2008). Corticosterone concentrations in blood and excretion in eces after ACTH administration in Male Sprague-Dawley rats. In vivo, 22(4), 435-440.
- Soma, K. (2006). Testosterone and aggression: Berthold, birds and beyond. Journal of Neuroendocrinology, 18(7), 543–551.
- Soma, K., Scotti, A., Newman, E., Charlier, D., Demas, E. (2008). Novel mechanisms for neuroendocrine regulation of aggression. Frontiers in Neuroendocrinology, 29(4), 476-489.
- Suay, F., Salvador, A., González, E., Sanchis, C., Martínez, M., Martínez, S., Simón, V., Montoro, B. (1999). Effects of competition and its outcome on serum testosterone, cortisol and prolactin. Psychoneuroendocrinology, 24(5), 551-556.
- Suburo, A., Pellegrino, A. (1969). An ultrastructural study of the rat's suprachiasmatic nucleus. Journal of Anatomy, 105(3), 439-446.
- Thompson, T., Sturm, T. (1965). Classical conditioning of aggressive display in siamese fighting fish. Journal of the Experimental Analysis of Behavior, 8(6), 397–403.
- Thorpe, J., Rajabi, N., de Catanzaro, D. (2012). Circadian rhythm and response to an acute stressor of urinary corticosterone, testosterone, and creatinine in adult male mice. Hormone and Metabolic Research, 44(6), 249-235.
- Trainor, C., Bird, I., Marler, C. (2004). Opposing hormonal mechanisms of aggression revealed through short-lived testosterone manipulations and multiple winning experiences. Hormones and Behavior, 45(2), 115-121.
- Trainor, C., Marler, A. (2001). Testosterone, Paternal Behavior, and Aggression in the Monogamous California Mouse (*Peromyscus californicus*). Hormones and Behavior 40(1), 32–42.

- Trainor, C., Finy, S., Nelson, J. (2008). Rapid effects of estradiol on male aggression depend on photoperiod in reproductively non-responsive mice. *Hormones and Behavior*, 53(1), 192-199.
- Trainor, C., Takahashi, Y., Silva, L., Crean, K., Hoosteler, C. (2010). Sex differences in hormonal responses to social conflict in the monogamous California mouse. *Hormones and Behavior*, Submitted, 58(3), 506-512.
- Van Hemel, P. (1972). Aggression as a reinforcer: operant behavior in the mouse-killing rat. *Journal Experimental Animal Behavior*, 17(2), 237-245.
- Vasicek, A., Oosthuizen, M., Cooper, M., Bennett, C. (2005). Circadian rhythms of locomotor activity in the subterranean Mashona mole rat, *Cryptomys darlingi*. *Physiology and Behavior*, 84(2), 181-191.
- Villalpando, I., Ramirez, M., Zepeda, A., Castro, A., Cárdenas, R., Vilchis, F. (2005). The Harderian gland of the Mexican volcano mouse *Neotomodon alstoni alstoni* (Merriam 1898): A morphological and biochemical approach. *Journal of experimental zoology*, 303A (1), 13–25.
- Vogelbaum, M., Galef, J., Menaker, M. (1993). Factors determining the restoration of circadian behavior by hypothalamic transplants. *Freund Publishing House Lid*, 4(4), 239-255.
- Weidong, M., Zhongshan, M., Milos, V. (1999). Induction of estrus in grouped female mice (*musdomesticus*) by synthetic analogues of preputial gland constituents. *Chemical Senses*, 24(3), 289-293.
- Weinert, D., Waterhouse, J. (1999). Daily activity and body temperature rhythms do not change simultaneously with age in laboratory mice. *Physiology & Behavior*, 66(4), 605–612.
- Welch, B., Welch, A. (1969). Sustained effects of brief daily stress (fighting) upon brain and adrenal catecholamines ad adrenal, spleen, and heart weights of mice. *Proceedings in the National Academy of Sciences, USA*, 64(1), 100-107.
- Welsh, D., Logothetis, D., Meister, M., Reppert, S. (1995). Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phases circadian firing rhythms. *Neuron*, 14, 697-706.

- Wen, J., Hotchkiss, A., Demas, G., Nelson, R. (2004). Photoperiod Affects Neuronal Nitric Oxide Synthase and Aggressive Behaviour in Male Siberian Hamsters (*Phodopus sungorus*). Journal of Neuroendocrinology, 16, (11), 916-921.
- Wilmer, P., Stone, G., Johnston, I. (2005). Environmental physiology of animals. 2a ed., Black Well publishing, United Kingdom.
- Yan, L. (2011). Structural and functional changes in the suprachiasmatic nucleus following chronic circadian rhythm perturbation. Neuroscience, 183, 99-107.
- Yen, S., Jaffe, R. (1991). Reproductive endocrinology. Physiology, pathophysiology and clinical management, 3a ed., 162-163.