



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Factores sociales y distribución de receptores ER α y AR en el MPOA y MeA, asociados al establecimiento de la conducta paterna en el hámster enano (*Phodopus campbelli*)

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

LUIS OSCAR ROMERO MORALES

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. JUANA ALBA LUIS DÍAZ
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
COMITÉ TUTOR: DR. LUIS ARTURO BAIZA GUTMAN
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
DR. RENÉ DE JESÚS CÁRDENAS VÁZQUEZ
FACULTAD DE CIENCIAS

MÉXICO, Cd. Mx. ABRIL, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Factores sociales y distribución de receptores ER α y AR en el MPOA y MeA, asociados al establecimiento de la conducta paterna en el hámster enano (*Phodopus campbelli*)

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

LUIS OSCAR ROMERO MORALES

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. JUANA ALBA LUIS DÍAZ
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM
COMITÉ TUTOR: DR. LUIS ARTURO BAIZA GUTMAN
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM
DR. RENÉ DE JESÚS CÁRDENAS VÁZQUEZ
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

MÉXICO, Cd. Mx. ABRIL, 2016

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 15 de febrero de 2016, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **ROMERO MORALES LUIS OSCAR**, con número de cuenta 305148968, con la tesis titulada "**FACTORES SOCIALES Y DISTRIBUCIÓN DE RECEPTORES ERA Y AR EN EL MPOA Y MeA, ASOCIADOS AL ESTABLECIMIENTO DE LA CONDUCTA PATERNA EN EL HÁMSTER ENANO (*Phodopus campbelli*)**", realizada bajo la dirección de la **DRA. JUANA ALBA LUIS DÍAZ**:

Presidente: DR. RÓDOLFO CÁRDENAS REYGADAS
Vocal: DR. ROBERTO EDMUNDO MUNGUÍA STEYER
Secretario: DR. RENÉ DE JESÚS CÁRDENAS VÁZQUEZ
Suplente: DRA. ANA LILIA CERDA MOLINA
Suplente: DRA. LUCÍA ALBA MARTÍNEZ MOTA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., 8 de marzo de 2016.

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al **Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM** la oportunidad para fortalecer mi formación profesional y académica a través de mi estancia en la Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental).

Al CONACyT por la beca proporcionada para la dedicación de tiempo completo en la Maestría en Ciencias Biológicas, UNAM, No. de CVU 622655.

Esta investigación fue financiada por el Programa de Apoyo a los Profesores de Carrera para Promover Grupos de Investigación (PAPCA 2014-2015) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM; y el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN212113-2.

A mi tutora principal:

Dra. Juana Alba Luis Díaz

A mi Comité Tutorial:

Dr. Luis Arturo Baiza Gutman

Dr. René de Jesús Cárdenas Vázquez

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mi familia; a mi mamá María Irma y a mi papá Luis, por su esfuerzo y el apoyo que siempre me brindaron durante mi formación académica, sin ellos, no hubiera alcanzado este logro. A mí hermana Ivonne con quien he compartido trabajo y alegrías.

¡Gracias familia por su apoyo en este recorrido!

A mi tutora, Dra. Juana Alba Luis Díaz, que siempre me apoya y está atenta para resolver cualquier duda, sus consejos y motivaciones estarán presentes en mi carrera como Biólogo. ¡Gracias!

A mi comité tutorial: Dr. Luis Arturo Baiza Gutman y Dr. René de Jesús Cárdenas Vázquez, por cada una de sus observaciones, que sin duda constituyeron un aporte en mi formación académica.

A los miembros de mi jurado; Dr. Rodolfo Cárdenas Reygadas, Dr. Roberto Edmundo Munguía Steyer, Dr. René de Jesús Cárdenas Vázquez, Dra. Ana Lilia Cerda Molina y Dra. Lucia Alba Martínez Mota, por sus comentarios que enriquecieron el trabajo final.

Al M. en C. Agustín Carmona por enseñarme las técnicas quirúrgicas necesarias para la realización de este proyecto.

A la M. en C. Carmen Álvarez Rodríguez por su apoyo en las técnicas histológicas.

A todos mis profesores, amigos y compañeros durante mi formación académica.

A mis compañeros del Laboratorio: Lalo, Berenice, Alejandro, Brenda y Adrián; gracias por los momentos compartidos.

A mí gran casa de estudios la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, por permitirme ser parte de esta comunidad. **¡Por mi raza hablará el espíritu!**

ÍNDICE

1. Resumen.....	1
2. Abstract.....	2
3. Introducción.....	3
3.1 Factores que influyen en la conducta paterna.....	6
3.2 Bases hormonales de la conducta paterna.....	8
3.3 Bases Neurales de la conducta paterna.....	15
3.4 Receptores androgénicos.....	17
3.5 Receptores estrogénicos.....	22
3.6 Características de la especie.....	28
4. Antecedentes.....	30
5. Hipótesis.....	32
6. Objetivos.....	33
7. Material y Método.....	34
8. Resultados.....	38
9. Discusión.....	51
10. Conclusiones.....	54
11. Referencias `.....	55
12. Anexos.....	69

RESUMEN

La mayoría de los machos vírgenes de los roedores de especies biparentales son infanticidas, por lo cual durante su ciclo reproductivo transitan de agresivos a paternales. Esta transición es facilitada por factores sociales, como el apareamiento, cohabitación con la hembra y el nacimiento de las crías. Además, este cambio en la conducta está asociado a incrementos en las concentraciones periféricas de varias hormonas, entre estas la testosterona (T) y sus metabolitos, así como la presencia de sus receptores en áreas neurales que regulan la conducta paterna. En el hámster enano (*Phodopus campbelli*), especie con cuidados biparentales, se ha observado que la exhibición de la conducta paterna no está asociada a cambios en los niveles de T o estradiol (E₂). Esto posiblemente se debe a que alrededor del 95% de los machos vírgenes, acicalan y olfatean a las crías, pero no las recuperan, a diferencia de los machos que han permanecido con la hembra desde el apareamiento hasta el nacimiento de sus crías. El otro 5% de los machos son infanticidas. Estas observaciones llevan a pensar que el despliegue de todas las actividades que integran la conducta paterna, específicamente la recuperación de las crías, así como la transición de machos infanticidas a paternales puede ser facilitado por alguno de los factores sociales antes mencionados. El objetivo de este estudio fue determinar el factor social que induce la conducta de recuperación en el hámster enano y si la exhibición de esta conducta, está asociada, a un cambio en la inmunorreactividad de receptores α -estrógenos (ER α) y/o andrógenos (AR) en el área preóptica media MPOA y la amígdala media (MeA), regiones neurales que participan en la regulación de la conducta paterna en los roedores. El efecto del apareamiento (cópula), la presencia de las crías y la cohabitación con la hembra, en la conducta paterna del hámster enano, fue analizado en 3 modelos experimentales: machos apareados con hembras intactas (McHI), machos con hembras con oviductos ligados (McHS) y machos con hembras ovariectomizadas (McHO). En el grupo de machos con hembras intactas, se realizaron pruebas de conducta paterna después de la cópula, en el día 10 de la preñez, y 24 h después del nacimiento de las crías. En los machos apareados con hembras con oviductos ligados y ovariectomizadas, estas pruebas se realizaron en tiempos equivalentes, al grupo antes mencionado. Después de las pruebas de conducta paterna, 5 machos de cada grupo fueron sacrificados para la obtención de tejido cerebral, el cual fue utilizado para la inmunohistoquímica de ER α y AR en MPOA y MeA. Se cuantificaron los núcleos inmunorreactivos (ir) de ER α y AR en MPOA y MeA en 180 μm^2 . Los datos fueron analizados por la prueba de Kruskal-Wallis y ANOVA de dos factores, para medidas repetidas. Los resultados mostraron que la presencia de las crías, es el factor que induce la exhibición de todas las actividades de la conducta paterna en el hámster enano, específicamente la conducta de recuperación. La exhibición de esta conducta, estuvo asociada a un incremento en la ir-ER α en MPOA, por lo cual se sugiere que los estrógenos participan en la regulación de la conducta paterna de este roedor.

ABSTRACT

Most virgin males of biparental rodent are infanticide, by which during their reproductive cycle transit of aggressive to fatherly. This transition is facilitated by social factors, such as mating, the female cohabitation and the birth of offspring. Moreover, this change in behavior is associated with increases in the peripheral concentrations of several hormones, such as testosterone (T) and its metabolites and the presence of their receptors in neural areas that regulate parental behavior. In the dwarf hamster (*Phodopus campbelli*), specie with biparental care, it has been observed that the display of paternal behavior is not associated with changes in the levels of T or estradiol (E₂). Possibly this is due that about 95% of virgin males groom and sniff the pups, but not display retrieval, unlike of the males that remain with the female since mating until the birth of their pups. The other 5% of the males are infanticide. These observations make us think that the exhibition of all the activities that integrate the paternal behavior, specifically the retrieval of pups, and the transition from infanticide to fatherly can be facilitated by some of the social factors above mentioned. The aim of the present study was to determine the social factor that induces the retrieval of pups behavior in the dwarf hamster, and if exhibition of this behavior is associated with a change in immunoreactivity to α -estrogen receptor (ER α) and/or androgen receptor (AR) in the medial preoptic area (MPOA) and the medial amygdala (MeA), neural regions that regulate paternal behavior in rodents. The effect of mating, presence of pups and cohabitation with the female, on paternal behavior was analyzed in 3 experimental models: males mated with intact females (McHI), males mated with females with oviducts ligated (McHS) and males with ovariectomized females (McHO). In the males of the McHI group, paternal behavior tests were performed after copulation, on day 10 of pregnancy and 24 h after delivery. In males of McHS and McHO groups, paternal behavior tests were performed at equivalent times to those of males from McHI group. After performing the tests of parental behavior, 5 males from each group were killed and their brains dissected. Neural tissues were used for immunohistochemical assays for ER α and AR expression in MPOA and MeA. Immunoreactive nuclei (ir) for AR and ER α in MPOA and MeA were quantified in 180 μm^2 . Data were analyzed by Kruskal-Wallis test and two-way ANOVA with repeated measures. The results showed that the presence of pups is the factor that induces the display of all activities of parental behavior in the dwarf hamster, specifically retrieval behavior. The exhibition of this behavior was associated with an increase in the ir-ER α in MPOA, therefore, it is suggested that estrogens are involved in the regulation of paternal behavior in this rodent.

INTRODUCCIÓN

En los mamíferos los cuidados paternos no son comunes, debido a que la hembra de estos vertebrados ha desarrollado estructuras especializadas para cuidar sola de sus crías (un desarrollo embrionario interno, así como la presencia de glándulas mamarias que le permiten alimentar a sus crías con independencia del macho) (Maier, 2001). Sin embargo, en alrededor del 5% de las especies de mamíferos, el macho participa significativamente en el cuidado de sus crías (Clutton-Brook, 1991). Entre éstas, se encuentran algunas especies de primates, carnívoros, perisodáctilos y roedores (Kleiman y Malcom, 1981). La conducta paterna se define, como cualquier actividad que realiza el macho en beneficio de las crías, que aumenta la sobrevivencia de éstas. Desde el punto de vista evolutivo la expresión de la conducta paterna incrementa la aptitud del macho; por lo cual esta conducta surgió y es mantenida como una estrategia reproductiva secundaria en los mamíferos (Clutton-Brock, 1991; Royle *et al.*, 2012).

En los roedores, la presencia de cuidados paternos está asociada al sistema de apareamiento monogámico, por lo cual, la conducta paterna es menos común en las especies promiscuas (Kleiman y Malcom, 1981). En un marco evolutivo, el sistema de apareamiento de una especie, se define como “cualquier estrategia conductual empleada para conseguir una o varias parejas con el fin último de obtener descendencia” (Emlen y Oring, 1977). Los biólogos de la conducta, analizan el estudio de la conducta animal desde dos perspectivas: las causas últimas o evolutivas, y las causas próximas o de los mecanismos genéticos del desarrollo y los neuroendocrinos (Alcock, 2013). Este estudio

está enfocado a investigar algunas de las causas próximas que subyacen a la conducta paterna.

La presencia de cuidados paternos ha sido observada en varias especies de roedores, como *Phodopus campbelli* (hámster enano), *Meriones unguiculatus* (gerbo de Mongolia), *Peromyscus californicus* (ratón de California), *Neotomodon alstoni* (ratón de los volcanes), entre otras (Hume y Wynne-Edwards, 2005; Luis *et al.*, 2010; Trainor y Marler, 2001).

Los cuidados paternos se clasifican en directos e indirectos; en los primeros las actividades que realiza el macho tienen un efecto inmediato sobre las crías e incluyen: el acicalamiento, abrigo, olfateo, recuperación de las crías y sociabilización. En los indirectos, las acciones del macho benefician a su pareja, reduciendo su gasto energético e incrementando su posibilidad de sobrevivir, se incluyen entre ellos: provisión de alimento, la construcción, mantenimiento y vigilancia del nido (tabla 1, Kleiman y Malcom, 1981; Elwood, 1983).

Tabla 1. Actividades que integran la conducta paterna en roedores (según Elwood, 1983).

Tipo de cuidado	Comportamiento	Descripción
Cuidados directos	Acicalamiento	Colabora en la limpieza de las crías, acicalando todo el cuerpo, principalmente la región perianal, lo que ayuda en la eliminación de los desechos sólidos.
	Abrigo	Reduce la pérdida de calor y protege a las crías.
	Olfateo	Reconocimiento de las crías por medio del olfateo.
	Recuperación de las crías	Con el hocico toma a las crías por el dorso y las regresa al nido, para evitar que sean depredadas.
	Sociabilización	Asiste a las crías en la exploración de su ambiente físico y social.
Cuidados indirectos	Construcción y mantenimiento del nido.	Construye o asiste en la construcción de las madrigueras, zonas de anidación y nidos, así como en su mantenimiento.
	Provisión de alimento	Almacena alimento para el consumo de la hembra durante la lactancia y para las crías después del destete.
	Vigilancia del nido	Alerta a la hembra y a las crías de la presencia de los depredadores.

Factores que influyen en la conducta paterna

La conducta paterna varía según diversos factores, entre los que se encuentran la especie, el sistema de apareamiento, la presencia de la hembra y/o las crías, así como la historia reproductiva del padre y posiblemente otros estímulos externos que no han sido determinados (Brown, 1993; Storey *et al.*, 1994).

El sistema de apareamiento es un factor determinante en la presencia o ausencia de cuidados paternos; por ejemplo, en el hámster enano (*Phodopus campbelli*), especie monógama, el macho participa en el cuidado de las crías, lo cual tiene un efecto positivo en su supervivencia. Contrariamente, en *Phodopus sungurus*, especie polígama, el macho no proporciona cuidados a su descendencia (Wynne-Edwards, 1987). Estas mismas observaciones se han realizado en otras especies de roedores monógamas y polígamas, lo cual ha puntualizado que en los roedores la presencia de cuidados paternos está asociada al sistema de apareamiento monogámico (Kleiman y Malcom, 1981).

Independientemente del sistema de apareamiento, estímulos como la cópula, la cohabitación con la hembra preñada y la presencia de las crías pueden inhibir el infanticidio y facilitar el despliegue de la conducta paterna. En el ratón de California, un 25% de machos vírgenes transita de agresivos a paternales (hacia crías ajenas de la misma especie), 24 horas después de la cópula y cohabitación con su pareja. No obstante, el 100% de los machos de este roedor son paternales después del nacimiento de sus crías (Gubernick y Laskin, 1994). En este ratón también se ha demostrado que la experiencia de crianza de la primera camada, incrementa la probabilidad de mostrar conducta

paterna hacia una cría ajena de la misma especie, lo que sugiere que durante la adquisición de la experiencia reproductiva, el macho sufre una transición de infanticida a paternal (Jong *et al.*, 2009).

En el gerbo de Mongolia la conducta paterna puede ser mantenida por estímulos provenientes de las crías; los machos de este roedor inician el contacto con los neonatos en el día de su nacimiento, quizá como respuesta a estímulos olfativos y vocalizaciones provenientes de éstas, lo cual facilita el reconocimiento de los padres (Clark y Galef, 2000).

Los machos de la rata de laboratorio y los gerbos proporcionan la misma cantidad de cuidados paternos, tanto a sus crías, como a crías ajenas de la especie, una vez que su conducta infanticida ha sido inhibida por el nacimiento de sus propias crías (Brown, 1986; Elwood y Ostermeyer, 1986).

En el ratón de laboratorio (*Mus musculus*), entre el 80 y 90% de los machos vírgenes son infanticidas, conducta que es inhibida por la cópula y/o la cohabitación con la hembra (Vom Saal, 1985). Sin embargo, en este ratón, la presencia de las crías durante varios días no inhibe el infanticidio, por lo que el 90% de los machos siguen mostrando agresión hacia éstas. También se ha indicado que la cohabitación con una hembra ovariectomizada tampoco inhibe el infanticidio en este roedor, lo cual muestra que los estímulos de la cópula son esenciales para el inicio de la conducta paterna (McCarthy y Vom Saal, 1986).

En el hámster enano, en condiciones de laboratorio la presencia de la hembra no afecta los cuidados paternos; debido a que tanto los machos que permanecieron con la hembra después de aparearse, como los que fueron

privados de la presencia de ésta, no cambiaron significativamente sus conductas paternas (Jones y Wynne-Edwards, 2001).

Bases hormonales de la conducta paterna

En los machos de los roedores con cuidados paternos, ocurren cambios hormonales que no han sido observados en machos de especies con cuidados uniparentales, lo que indica que la conducta paterna (como la materna), es regulada por hormonas, tales como la prolactina, la oxitocina, la vasopresina, la testosterona y sus metabolitos, además de la progesterona (Brown, 1985).

Prolactina

Es una hormona polipeptídica producida en la adenohipófisis. Su secreción es regulada por el hipotálamo y es inhibida principalmente por dopamina. También se ha demostrado que esta hormona se produce en tejidos como la placenta, testículos, útero, glándulas adrenales, intestino y distintas áreas cerebrales (Nasello *et al.*, 1998). La prolactina es transportada activamente a regiones neurales específicas que intervienen en la conducta materna, como el Área preóptica media (MPOA) (Bridges *et al.*, 1997). En distintos roedores la presencia de cuidados paternos se ha correlacionado con altas concentraciones de prolactina, tal es el caso del ratón de California, el gerbo de Mongolia y el hámster enano (Gubernick y Nelson, 1989; Brown *et al.*, 1995; Jones, 2000). Sin embargo, se desconoce si el incremento en esta hormona durante la exhibición de la conducta paterna, es causal.

Un estudio experimental en el hámster enano, en el cual se analizó el efecto de la supresión de prolactina hipofisaria en la regulación de la conducta paterna de este roedor, mostró que la administración de dos agonistas de la dopamina,

bromocriptina y cabergolina, ocasionaron una disminución de los niveles de prolactina hipofisaria, pero no afectaron la conducta paterna (Brooks *et al.*, 2005).

Oxitocina

La oxitocina es un neuropéptido, que es sintetizado en las células nerviosas del núcleo paraventricular del hipotálamo, desde donde es transportada por los axones de las neuronas hipotalámicas hasta sus terminaciones en la porción posterior de la neurohipófisis. Esta hormona ha sido relacionada con el establecimiento de lazos de pareja y la conducta paterna en roedores monógamos (Young, 1999).

El papel de la oxitocina en la regulación de la conducta materna ha sido demostrado ampliamente, por ejemplo, en hembras de ratones “*knockout*” del gen de la oxitocina, existe una disminución significativa de la frecuencia de acicalamiento de las crías, en comparación con las hembras silvestres (Pedersen, 2005). Considerando que los mecanismos de regulación neuroendocrina de la conducta materna podrían ser homólogos a los de la paterna, podría esperarse que esta hormona también participe en la regulación de la conducta paterna. Sin embargo, los resultados de los estudios realizados hasta hoy, sobre este aspecto son contradictorios (Wang *et al.*, 2000; Gubernick *et al.*, 1995).

En los ratones de campo (*Microtus pensilvanicus*) y en el de la montaña (*Microtus montanus*), la expresión del gen de la oxitocina se incrementa cuando se convierten en padres (Wang *et al.*, 2000). En el ratón mandarín (*Microtus mandarinus*) la expresión del gen de esta hormona está correlacionada con un

aumento en la expresión de receptores α -estrogénicos, en áreas neurales, como la amígdala media (MeA), región que forma parte del circuito neural de la conducta paterna (Zhenzhen *et al.*, 2010). No obstante, en el ratón de California, las concentraciones plasmáticas de oxitocina no difieren significativamente entre los machos que exhiben conducta paterna y aquellos que muestran agresión hacia las crías (Gubernick *et al.*, 1995).

Vasopresina

La vasopresina es una hormona peptídica, sintetizada en los núcleos hipotalámicos supraópticos y paraventriculares. Esta hormona se almacena en la neurohipófisis. Su regulación depende de los cambios de osmolaridad y volumen circulatorio, es metabolizada rápidamente en el hígado y los riñones (Jara, 2001; Greenspan y Gardner, 2005).

Varios estudios han demostrado en las especies monógamas de mamíferos, que la vasopresina participa en el establecimiento de la pareja (Young, 1999, Wynne-Edwards, 2001). En el ratón de la pradera (*Microtus ochrogaster*), implantes de arginina-vasopresina colocados en el septo lateral del macho, ocasionaron un incremento en los cuidados paternos. Asimismo, en este roedor la expresión del gen de la vasopresina aumenta después del nacimiento de las crías (Wang *et al.*, 1994).

Progesterona

La progesterona es una hormona esteroide, precursora de los andrógenos, que en los machos se produce en las glándulas suprarrenales y el hígado. En el ratón de California las concentraciones de progesterona se correlacionan negativamente con la actividad de la aromatasa y fueron significativamente

más bajas en los machos que exhibieron conducta paterna, comparados con los machos sin experiencia sexual. Además, las concentraciones de esta hormona en plasma se correlacionaron negativamente con la actividad de la aromatasa en el área preóptica media (MPOA). La evidencia sugiere que la progesterona tiene un papel inhibitorio en la regulación de la conducta paterna (Trainor *et al.*, 2003). Asimismo, un estudio realizado en machos del hámster enano, señala que en este roedor, los niveles de progesterona fueron altos desde el día 7 de gestación hasta el día del nacimiento de las crías. Después del nacimiento los niveles de esta hormona decrecieron significativamente reforzando la idea del papel inhibitorio de la progesterona en la conducta paterna (Schum y Wynne-Edwards, 2005).

Testosterona

La testosterona (T) es sintetizada en las células de Leydig a partir de colesterol, aunque en las glándulas suprarrenales también se producen en pequeñas cantidades. Esta hormona tiene diferentes efectos: regula la espermatogénesis, estimula la aparición de los caracteres sexuales secundarios y es el sustrato neural de las conductas agresiva (Jara, 2001; Greenspan y Gardner, 2005), copulatoria y al parecer también de la conducta paterna (fig. 1, Monaghan y Glickman, 1992).

Los primeros estudios que correlacionaron la conducta paterna con la T, indicaron que en los roedores, como el gerbo de Mongolia, ocurre un incremento en los niveles periféricos de esta hormona durante la preñez, seguido por un decremento después del nacimiento de las crías (Brown *et al.*, 1995). Esta disminución en los niveles de T llevó a creer que en los mamíferos,

esta hormona tenía un efecto inhibitorio en la conducta paterna. Un estudio subsecuente señala, que los niveles periféricos de T en los machos de este roedor se mantienen sin cambios significativos durante su ciclo reproductivo. Además, en los machos que permanecen con su pareja y sus crías proporcionando cuidados paternos, los niveles plasmáticos de T fueron significativamente mayores que en los que permanecieron aislados, lo cual sugiere que la T podría facilitar la exhibición de cuidados paternos y no inhibirlos, como se creyó inicialmente. Los machos de este roedor exhiben altos niveles de agresión al mismo tiempo que proporciona cuidados a sus crías (Luis *et al.*, 2010). Estos hallazgos indican, entonces que no hay un “*trade off*” entre conducta paterna y agresión, y que la T no solo puede ser el sustrato neural de la conducta agresiva y copulatoria, sino también de la paternal.

En el topillo rojo (*Myodes glareolus*), un roedor endémico de Gran Bretaña, se reveló que en esta especie europea son necesarios incrementos en los niveles de T para que este roedor despliegue cuidados paternos (Gromov y Osadchuk, 2013).

En el ratón de California, se demostró que la T es necesaria para la exhibición de la conducta paterna; en este ratón la castración reduce el tiempo invertido en el cuidado paterno, mientras que la administración de T a machos castrados incrementa las actividades paternas, por arriba de lo observado en machos en los que se simuló la castración. Entonces, estos resultados indican que en esta especie la T tiene un papel facilitador de la conducta paterna (Trainor y Marler, 2001).

Además, en el ratón de California, al colocar implantes subcutáneos de T o estradiol (E_2) más fadrozol (un inhibidor de la aromatasa), demostraron que la T no regula de manera directa la conducta paterna, sino que lo hace a través de su conversión a E_2 (Trainor y Marler, 2002). Otro trabajo reporta que la actividad de la aromatasa, enzima que participa en la conversión de T a E_2 , es significativamente más alta, en el MPOA de los machos que participan en el cuidado de sus crías, respecto a los machos apareados sin crías (Trainor *et al.*, 2003). Estos resultados sugieren que el incremento en la conversión de T a E_2 contribuye al despliegue de la conducta paterna.

Recientemente, en el gerbo de Mongolia, se determinaron los efectos de la T y sus metabolitos, E_2 y dihidrotestosterona (DHT), en la regulación de la conducta paterna. La administración de T, E_2 o DHT, inhibió la conducta infanticida y facilitó la exhibición de cuidados paternos. Estos resultados sugieren que en este roedor la conducta paterna puede estar regulada, a nivel neural, a través de las vías estrogénica y androgénica (Martínez *et al.*, 2015).

Estos resultados muestran la importancia de la T en la regulación de la conducta paterna, aunque sus efectos a nivel neural son ejercidos a través de su conversión a E_2 y DHT (Fig. 1), con la consecuente participación de los receptores a estrógenos y el de andrógenos.

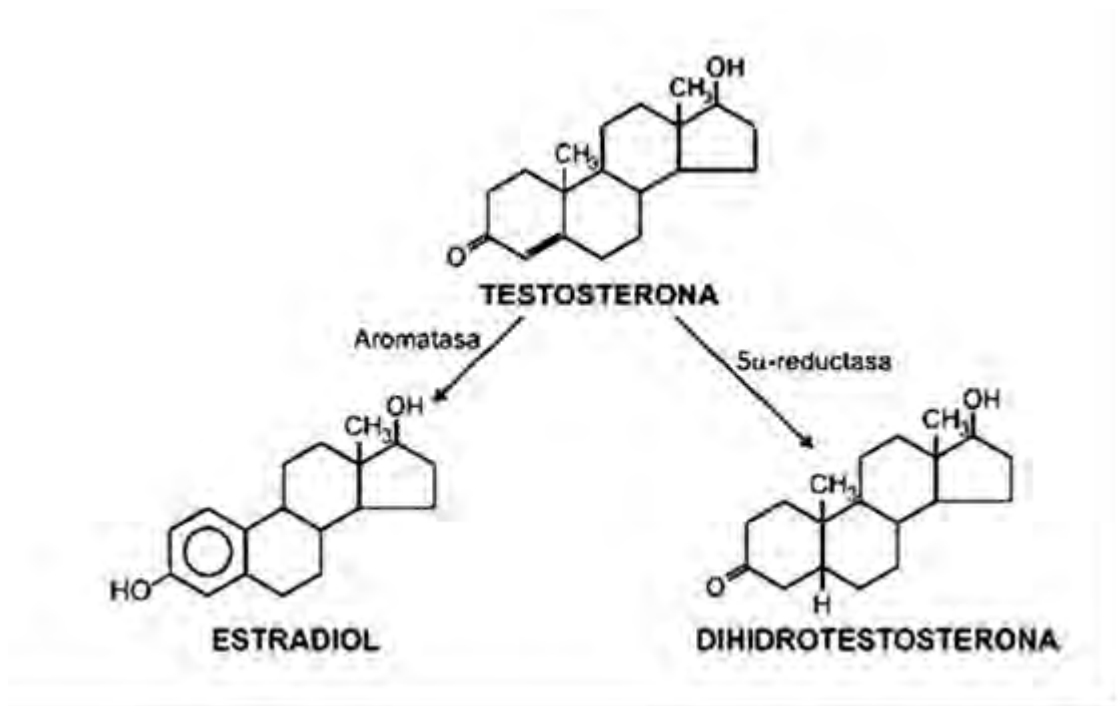


Fig. 1. Vía del metabolismo de la testosterona.

Bases neurales de la conducta paterna

Un buen número de estudios en la rata de laboratorio indican que el circuito neural que regula la conducta materna, está integrado principalmente por el MPOA, la base de la estría *terminalis* (BST), el área hipotalámica anterior (AHA) y el núcleo hipotalámico ventromedial (VMN), así como otras áreas con múltiples conexiones anatómicas con estas regiones, como la MeA, que recibe proyecciones del bulbo olfatorio (BO) (Rilling, 2013). Aunque las bases neurales de la conducta paterna, se están empezando a estudiar, investigaciones realizadas en el ratón de California y la rata de laboratorio, han mostrado, que el MPOA, MeA, BNST y el núcleo *accumbens* participan en la regulación de la conducta paterna (Rosenblatt y Ceus, 1998; Lee y Brown, 2007). En el ratón de California, lesiones del MPOA y la MeA provocan la reducción del acicalamiento, el abrigo y el contacto de los machos con las crías (Lee y Brown, 2007). En ratas machos de laboratorio, los implantes de E₂ en el MPOA, inducen la exhibición de cuidados paternos, a pesar de que en este roedor no se presenta la conducta paterna, de manera natural (Rosenblatt y Ceus, 1998). En la Fig. 2 se muestra la localización de estas áreas neurales.

Newman (1999) ha hecho hincapié en la gran cantidad de superposiciones en los circuitos neuronales que regulan una variedad de comportamientos sociales en los mamíferos, entre los que se incluyen el comportamiento sexual, la agresión ofensiva, y el comportamiento parental, tanto en el caso de la hembra como en el macho.

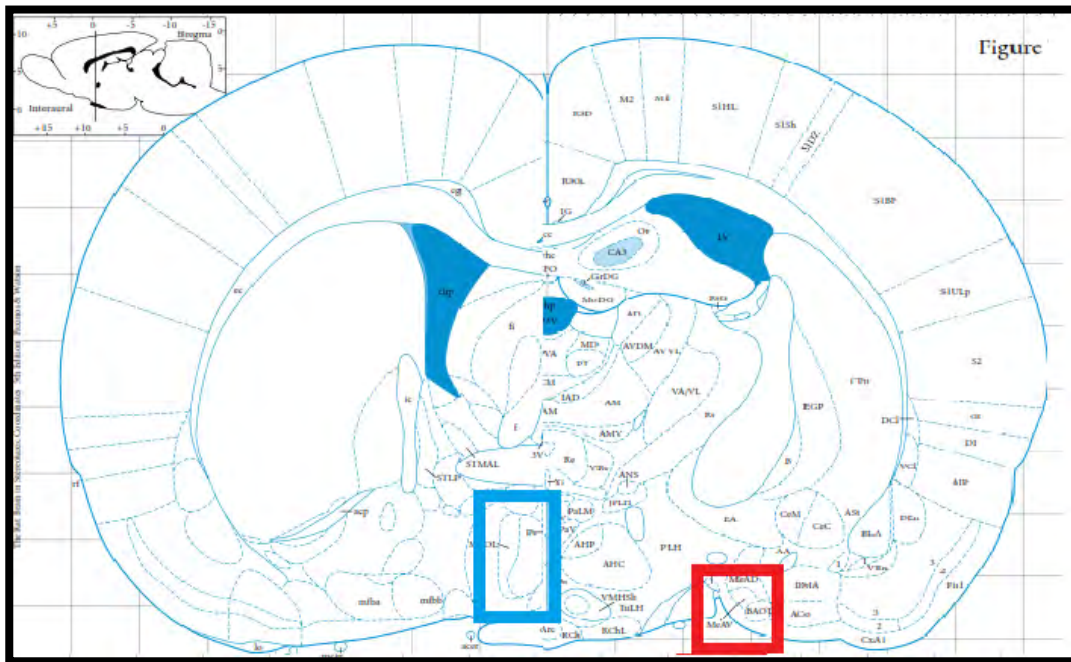


Fig. 2. Ubicación de la MPOA (rectángulo azul) y MeA (cuadro rojo) en la sección frontal del cerebro de rata (según Paxinos y Watson, 2004).

Receptores androgénicos

Mecanismos de acción de los receptores androgénicos (AR)

La acción de los andrógenos en los diferentes tejidos está mediada por los AR (NR3C4; subfamilia de receptores nucleares 3, Grupo C, Gen 4). La familia de receptores nucleares incluye receptores a hormonas esteroides, tiroideas, todos los trans y 9-cis de ácido retinoico, 1,25-dihidroxitamina D, ecdisona y receptores activados por proliferadores de peroxisomas (Evans, 1998; Laudet *et al.*, 1992; Robinson *et al.*, 2001).

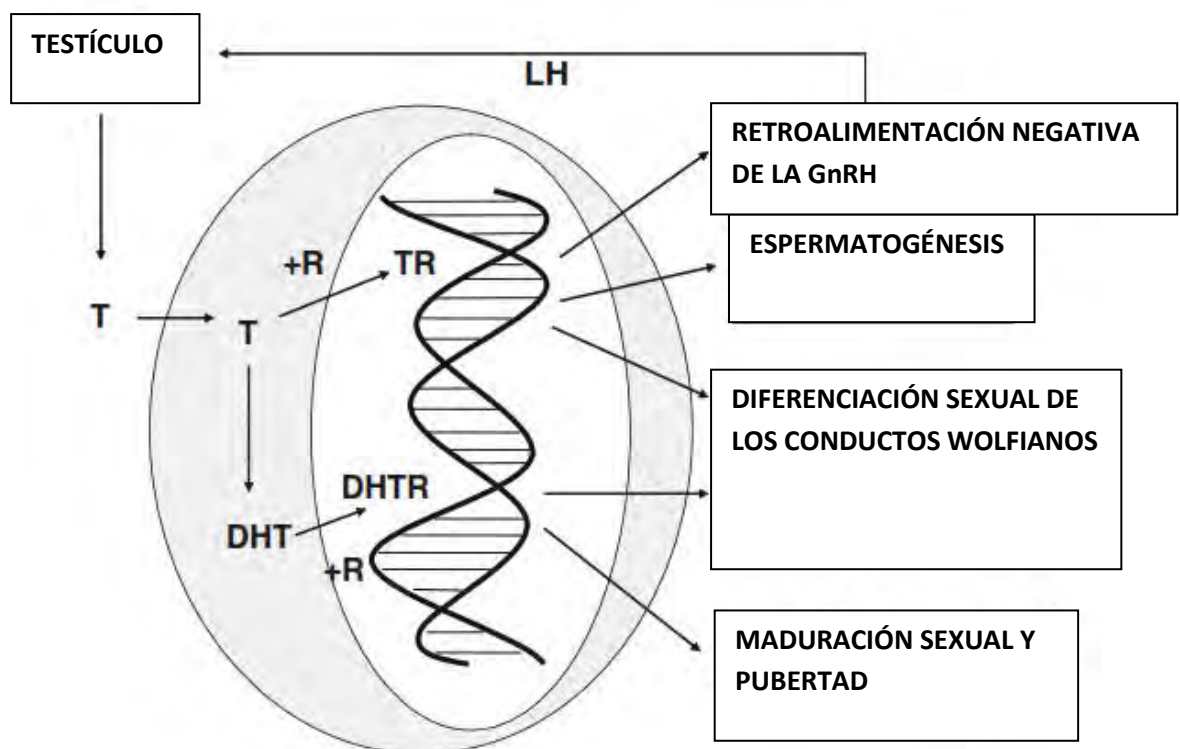


Fig. 3. Diferencias fisiológicas en la acción de la testosterona (T) y 5α-dihidrotestosterona (DHT) vía el receptor de andrógenos (R). LH, hormona luteinizante (modificado de Brinkmann, 2011).

El modelo más conocido para la acción de los andrógenos implica múltiples mecanismos. Cuando la T entra a la célula diana, se puede unir directamente a su receptor o también puede ser reducida a DHT, por la 5 α -reductasa, en ambos casos se une al AR (Fig. 3). La unión al receptor es seguida por la disociación de las proteínas de choque térmico (*heatstock*) en el citoplasma, simultáneamente hay un cambio conformacional del receptor, resultando en la translocación al núcleo. El receptor debe dimerizarse con un segundo receptor, la unión de este dímero al DNA resultará en la unión de otras proteínas (ejemplo: coactivadores, factores de transcripción generales y RNA polimerasa II, Fig. 4), dando lugar a la activación o represión de la transcripción en sitios específicos de la cromatina. Curiosamente, también puede ocurrir a través de la señalización no genómica o rápida, en la que están involucradas las proteínas SCR, Raf-1 y Erk-2 (Migliaccio *et al.*, 2000; Kousteni *et al.*, 2001).

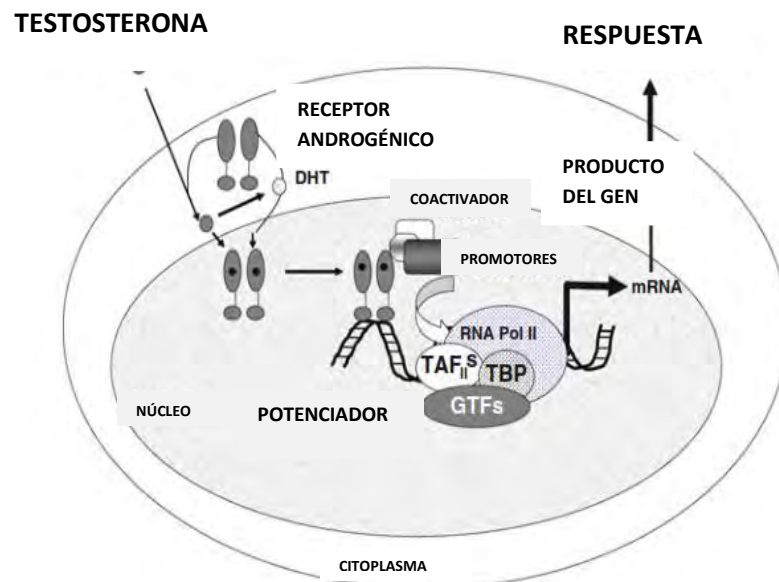


Fig. 4. Modelo convencional de la acción de los andrógenos. TAFIIs son factores asociados a TBP; TBP es la proteína de unión a caja TATA; GTFs es un factor de transcripción general (modificado de Brinkmann, 2011).

Conformación de los AR

La conformación molecular de los AR sigue un patrón general para la subfamilia de receptores nucleares, debido a que estos presentan cuatro dominios (Figura 5):

1. Estructura amino terminal (NH₂): en esta región se localizan las principales funciones de activación de la transcripción y varios subdominios estructurales. En sus 583 aminoácidos, tiene dos dominios de activación independientes; el dominio de activación 1 (AF-1, localizado entre los residuos 101 y 370), que es esencial para el AR de larga duración y el AF-5 (que se encuentra entre los residuos 360 y 485), que se requiere para un AR constitutivamente activo, que carece de dominio de unión a ligando (LBD) (Jenster *et al.*, 1995). Por otro lado, se ha observado que la región AF-5 interactúa con un dominio rico en glutamina en P160 y cofactores como SCR-1 y TIF2/G, y no con sus “*motifs*” (Claessens *et al.*, 2008). El dominio amino terminal (NH₂) es altamente flexible; tiene una estructura entre un estado completamente desplegado, una conformación plegada y una conformación tipo globular (Lavery y McEwan, 2008).
2. El dominio de unión al ADN: este dominio es el mejor conservado en los miembros de la super-familia de receptores nucleares. Se caracteriza por un alto contenido de aminoácidos básicos, 9 residuos de cisteína conservados. El dominio de unión al ADN tiene una estructura compactada globular, en la que se puedan distinguir tres sub-estructuras (2 grupos de zinc y una extensión poco estructurada carboxilo-terminal (CTE)) (Jakob *et al.*, 2007). Tanto los centros de coordinación de zinc

como el carboxilo-terminal flanquean una α -hélice (Luisi *et al.*, 1991). Las dos regiones que interactúan con el zinc, son estructuralmente y funcionalmente diferentes y son codificadas por dos exones diferentes. La α -hélice de la agrupación de zinc, más cercana al extremo N-terminal, interactúa directamente con los nucleótidos del elemento de respuesta a la hormona, en el surco mayor del ADN. Tres residuos de aminoácidos en el extremo N de esta α -hélice, son responsables de la especificidad de reconocimiento de la secuencia del elemento sensible del ADN. Estos tres residuos de aminoácidos, la llamada caja P (*P-box*) [glicina-serina-valina], son idénticos en el AR, progesterona, glucocorticoides y mineralocorticoides, y difieren de los residuos en las posiciones homólogas en el receptor de E₂. No es sorprendente, por tanto, que los AR, progesterona, glucocorticoides y mineralocorticoides puedan reconocer el mismo elemento de respuesta (Saatcioglu, 2011).

3. La región de bisagra: se encuentra entre el dominio de unión al ADN y el dominio de unión al ligando, es una zona no conservada, debido a que puede variar en tamaño en diferentes receptores de esteroides. Esta región puede ser considerada como un enlazador flexible del dominio de unión al ligando y el resto de la molécula al receptor. Esta región es importante para la localización nuclear; debido a que contiene una señal de localización nuclear bipartita. En algunos receptores nucleares, incluyendo los AR, la acetilación puede ocurrir en la región de bisagra (Fu *et al.*, 2004).
4. Finalmente, la segunda región más conservada en el AR es el dominio de unión a la hormona. Este dominio está integrado por

aproximadamente 250 residuos en la región carboxilo-terminal final de la molécula (Hollenberg *et al.*, 1985; Green *et al.*, 1998; Trapman *et al.*, 1988; Misrahi *et al.*, 1987; Arriza *et al.*, 1987; Brinkmann y Trapman, 2000). Experimentos *in vivo* favorecen la interacción funcional dependiente del ligando entre la región AF2 en el dominio de unión al ligando con el dominio NH₂ terminal. La eliminación del dominio de unión al ligando, impide completamente la unión de la hormona. Las deleciones en el dominio N-terminal y dominio de unión al ADN, no afectan la unión a la hormona. La supresión del dominio de unión al ligando conduce a un AR constitutivamente activo, con capacidad de transactivación comparable a la longitud completa de AR (Jenster *et al.*, 1991). Así pues, parece que el dominio de unión a la hormona actúa como un represor de la función de transactivación en ausencia de la hormona (Hollenberg y Evans, 1988).

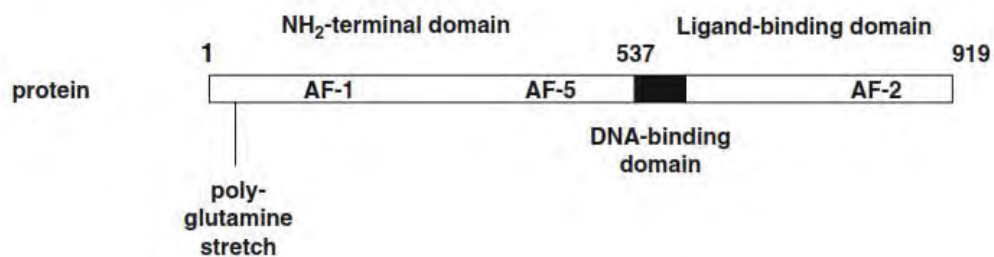


Fig. 5. Organización estructural del receptor de andrógenos (Según Brinkmann, 2011).

Mecanismos de acción de la unión de andrógenos al AR.

Los dos andrógenos más importantes son la T y la DHT, ambas se unen a AR, aunque cada andrógeno tiene su propia especificidad. Durante la diferenciación sexual masculina, la T está directamente involucrada en el desarrollo y la diferenciación de estructuras derivadas de los conductos Wolfianos (epidídimo, conductos deferentes, las vesículas seminales y los conductos eyaculadores), mientras que la DHT está presente en diferentes tejidos diana, tales como el seno urogenital, tubérculo genital y sus estructuras derivadas (glándula de la próstata, el escroto, la uretra y el pene) (Wilson *et al.*, 1993; Randall, 1994, Fig. 3). La interacción de ambos andrógenos con el AR es distinta, la afinidad de la T es dos veces menor que la DHT para el AR (Grino *et al.*, 1991).

Receptores α -estrogénicos

Mecanismo de acción de los ER α

El E₂ es una hormona esteroide sintetizada principalmente en el ovario y los testículos (Katsu *et al.*, 2010), en los vertebrados regula una variedad de funciones, en el sistema nervioso central, inmune y reproductivo (Bakker y Brock, 2010; McCarthy, 2010; Vasudevan y Pfaff, 2008).

Desde hace décadas se conoce que una vía principal de la acción del E₂, se produce a través de la unión de esta hormona a su receptor, y su dimerización es necesaria para su translocación al núcleo, en donde se une a la región promotora de sus genes blanco. Existen dos subtipos de receptores para los estrógenos los ER β y los ER α , a estos últimos les daremos mayor énfasis en la presente tesis, debido a su participación en la regulación de la conducta

materna y reproductiva (Jensen *et al.*, 1968; Toft y Gorski, 1966, Giordano *et al.*, 1996; Numan *et al.*, 2006; Peña *et al.*, 2013, Fig. 6).

El descubrimiento de los genes de ER y los elementos relacionados con la respuesta hormonal, han proporcionado nuevos conocimientos sobre cómo la señalización de estrógenos, induce cambios en la función celular (Green *et al.*, 1986; Kuiper *et al.*, 1996). En general, el mecanismo más conocido de la acción de los estrógenos es el genómico, cuya respuesta tiene una latencia larga; aunque la expresión de algunos genes por la vía genómica puede ocurrir dentro de los primeros 15 min siguientes de la unión de la hormona a su receptor, la expresión de la proteína biológicamente activa, normalmente se produce varias horas más tarde (Zangenehpour y Chaudhuri, 2002; Barnea y Gorski, 1970).

En los últimos años, se han descubierto nuevos mecanismos de acción de los estrógenos, cuya respuesta es inmediata, comparada con las respuestas evocadas por la vía genómica (Vasudevan y Pfaff, 2008). En este mecanismo participan ER α no nucleares, que se localizan en membranas plasmáticas, por ejemplo, este tipo de receptores están presentes en las espinas, axones y terminales dendríticas (Blaustein *et al.*, 1992; Towart *et al.*, 2003). Curiosamente, tanto los ER α del núcleo, como los de la membrana celular son sintetizados a partir del mismo transcripto (Razandi *et al.*, 1999). Los ER de membrana son insertados en esta estructura por palmitilación (Pedram *et al.*, 2007), que ocurre cuando el ácido palmítico se une covalentemente al ER. La palmitilación agrega al ER una cola hidrofóbica, facilitando así su inserción en la bicapa lipídica de la membrana (Acconcia *et al.*, 2005). El hipocampo (Hart *et al.*, 2007) y el hipotálamo (Bondar *et al.*, 2009), tienen ER palmitilados que se

almacenan en vesículas y posteriormente son insertados en la membrana por exocitosis (Boulware *et al.*, 2005).

Conformación de los ER α

Funcionalmente, el ER α al igual que el resto de los receptores esteroideos, está organizado en 4 dominios:

1. La región localizada en el lado amino terminal (NH₂) de la proteína es la menos conservada, entre los distintos receptores nucleares. Este dominio contiene una función de activación de la transcripción genética (AF-1) y varios sitios de fosforilación que son importantes en el proceso de activación de la proteína, especialmente en los procesos en los que el receptor es activado en ausencia de la hormona (Kato *et al.*, 1995; Pietras *et al.*, 1995).
2. Adyacente a la AF-1 está la región de unión al ADN, que es la más conservada entre los diferentes receptores nucleares. Esta región está compuesta por nueve residuos de cisteínas, que son invariablemente conservados entre los diferentes receptores de esteroides, de los cuales, ocho están dispuestos alrededor de dos iones de Zn²⁺, para formar dos dedos de Zn²⁺, que le confieren al receptor la capacidad de unirse específicamente al ADN. La unión a una secuencia específica en el ADN está determinada por la composición de los aminoácidos localizados entre estos dos dedos de zinc, conocida como la caja P (*P-box*) (Laredo *et al.*, 2014).
3. Entre la región de unión al ADN y el dominio carboxilo-terminal, se encuentra la región de bisagra, la cual no ha sido bien caracterizada,

pero se cree que participa en la unión a la proteína chaperona de choque térmico hsp90 (*heatshock protein 90*), la cual permanece unida al receptor, mientras éste se encuentre en un estado inactivo (Laredo *et al.*, 2014).

4. Finalmente, en el extremo carboxilo-terminal se encuentra el dominio de unión al ligando (*LBD*), donde se une la hormona E₂. Esta región a pesar que es conservada entre los diferentes receptores esteroideos, es altamente específica para su hormona, es decir, que el ER se une al estrógeno con alta afinidad, pero no a otras hormonas esteroideas. Otras funciones de este dominio incluyen la activación de la transcripción y de AF-2, la dimerización, la interacción con otras proteínas co-activadoras o co-represoras de la transcripción, la fosforilación y la localización nuclear (Laredo *et al.*, 2014).

Mecanismos de acción de la unión del estradiol a los ER α

Los estrógenos cumplen una función vital en la fisiología reproductiva, tanto femenina como masculina, estimulando el crecimiento y diferenciación celular en el tejido mamario, útero, vagina, ovario, testículos, epidídimo y próstata (Korach, 1994).

Por otra parte, los estrógenos tienen efectos importantes en una amplia variedad de comportamientos sociales. Los receptores nucleares de estrógenos en la vía genómica son irrelevantes en la acción rápida de estas hormonas en la conducta. Sin embargo, hay fuertes indicios de que los estrógenos regulan una amplia gama de comportamientos sociales a través de mecanismos no genómicos; tal como la agresión en animales mantenidos bajo fotoperiodos cortos. Machos castrados de la rata de laboratorio, cuando se les

administra E_2 , exhiben conducta sexual entre 15 y 35 minutos siguientes a la administración de la hormona, este periodo en la respuesta indica que no depende de la vía genómica (Caldwell y Albers, 2004; Fiszbein *et al.*, 2010; Sperry *et al.*, 2010).

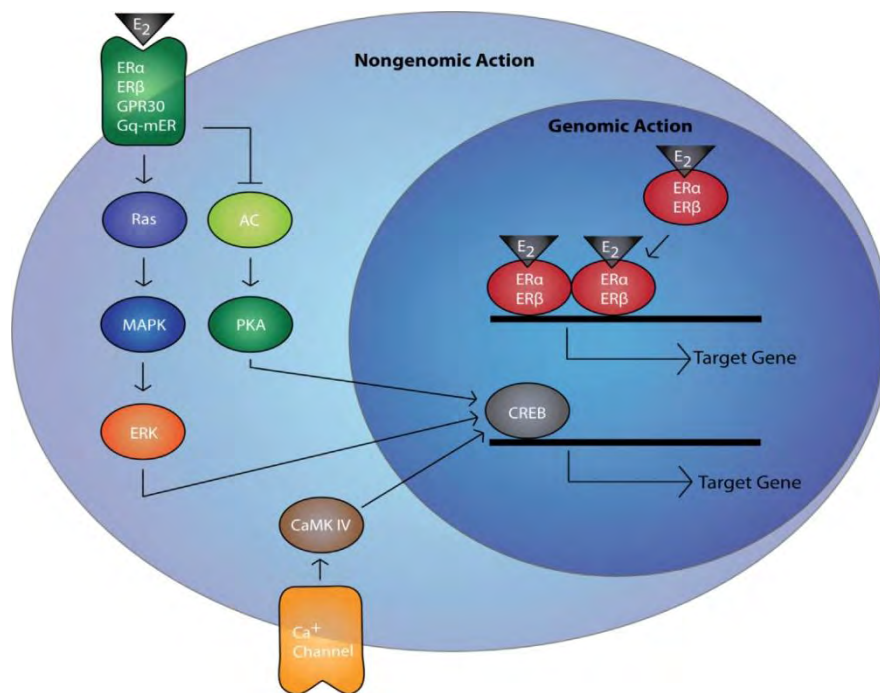


Fig. 6. Modelo del mecanismo de acción del estradiol (E_2): vía genómica y no genómica (según Laredo *et al.*, 2014).

ER α en la regulación de la conducta parental

Entre los dos subtipos de receptores a estrógenos, α y β , el $ER\alpha$ ha sido asociado con la regulación de la conducta materna; en las ratas, la cantidad de marcas de $ER\alpha$ se eleva significativamente, en varias áreas que integran el circuito neural de la conducta materna (MeA, MPOA y BNST), en el último tercio de la preñez, cuando se elevan los niveles de E_2 , hormona, que ha sido demostrada, promueve el inicio de la conducta materna (Giordano *et al.*, 1996;

Numan *et al.*, 2006; Peña *et al.*, 2013). En la rata y ratón de laboratorio, así como en el ratón mandarín, altas concentraciones de E₂ favorecen el despliegue de conducta paterna, que coincide con un incremento en la inmunorreactividad del ER α , en regiones como MPOA y MeA, que posiblemente formen parte del circuito neural de regulación de esta conducta como en el ratón de California (Koch y Ehret, 1988; Rosenblatt y Ceus, 1998; Zhenzhen *et al.*, 2010).

Características de la especie de estudio

El hámster de la especie *Phodopus campbelli*, es uno de los dos hámster enano. El adulto de este roedor tiene una longitud de 80 mm a 103 mm de la cabeza a la cola, con un promedio de 102 mm; longitud del pie trasero 12-18 mm; longitud de la cola 4-14 mm y longitud de la oreja 13-15 mm. Las mejillas y los labios son color crema, el resto de la cara y la cabeza está coloreada en tonos que van del gris al madera-marrón grisácea. El pelaje presenta una raya en posición dorsal, que va desde la nuca hasta 2.5 cm antes de la cola (Fig. 7). Presentan una glándula olorosa en la región media ventral, la cual es visible en el macho. Este roedor presenta actividad crepuscular y nocturna durante todo el año (Ross, 1995).

El hámster enano alcanza la madurez sexual entre los 18 y 23 días postnatal, se reproduce en primavera y verano, y tiene un período de gestación de 20 a 22 días, produciendo de 2 a 10 crías por camada, y de 4 a 6 camadas por año.

En su medio natural se alimentan de alrededor de 51 plantas, entre las que se encuentran *Stipa capillata*, *Allium*, *Iris ruthenia* e *Iris flavissima*. En cautiverio puede ser alimentado con granos de trigo, semillas de girasol, dientes de león, langostas y cítricos (Ross, 1995).

Phodopus campbelli habita las estepas y semi-desiertos de Asia central, las montañas del Altai, la Región Autónoma de Tuvinskaya (Tuva), Transbaikalia, Mongolia, y las zonas adyacentes de Heilungkiang y Hebei, provincias al norte de China (Ross, 1995, Fig. 7).

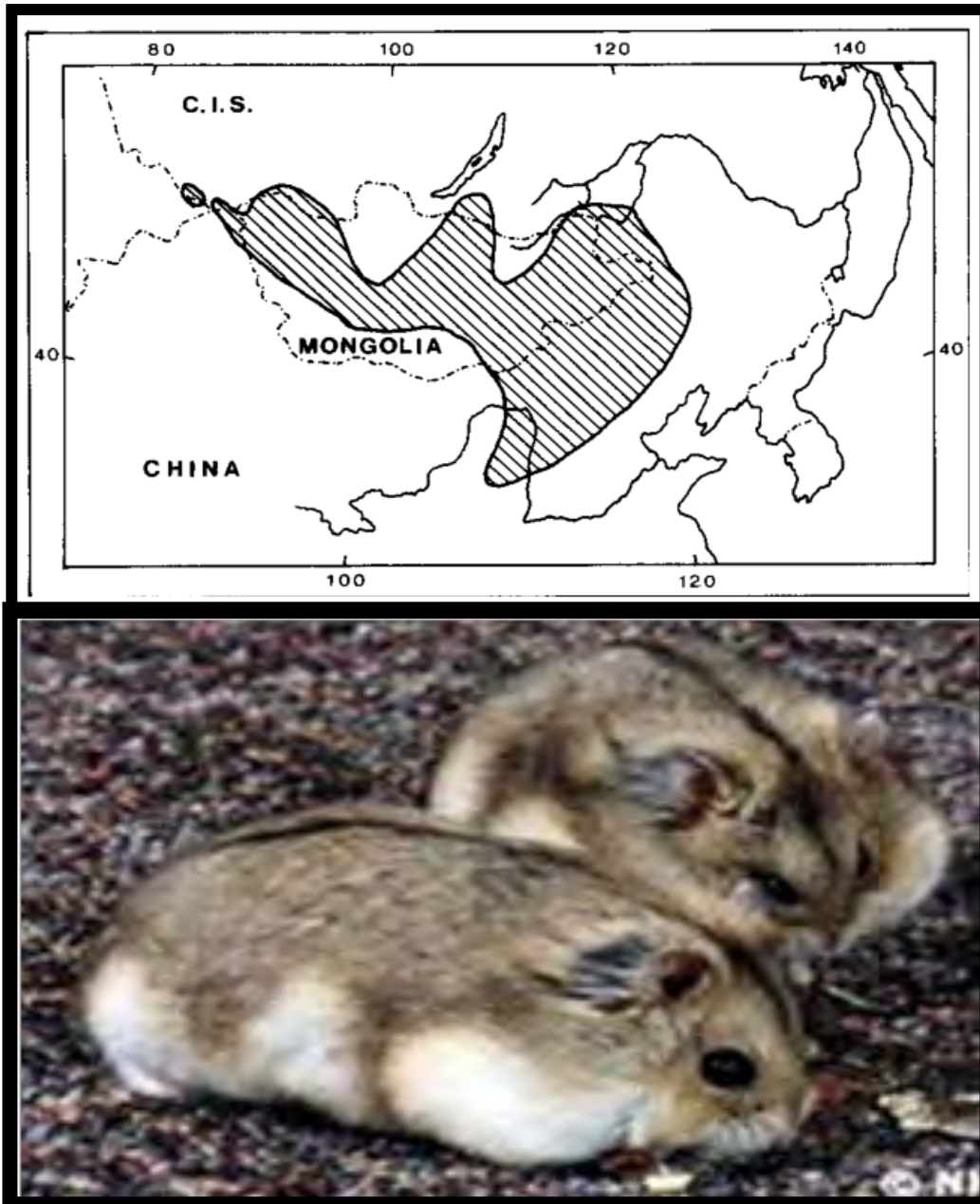


Fig. 7. Distribución geográfica del hámster enano en Asia central (imagen superior), foto lateral del hámster enano (imagen inferior) (según Ross, 1995).

ANTECEDENTES

Debido a que el hámster enano exhibe cuidados paternos naturales, es un modelo de estudio en las investigaciones de las bases neuroendocrinas de la conducta paterna. El hámster enano exhibe acicalamiento, olfateo y recuperación de la crías, esta última actividad se ha utilizado como un parámetro de medición en las pruebas de conducta paterna (Wynne-Edwards y Lisk, 1988, Reburn y Wynne-Edwards, 1999; Schum y Wynne-Edwards, 2005; Hume y Wynne-Edwards, 2005). Probablemente, debido a que esta conducta es específica de la conducta paterna, a diferencia del acicalamiento y el olfateo que también son exhibidos en otras interacciones sociales.

El primer estudio de las bases biológicas de la conducta paterna en el hámster enano, señaló que las concentraciones de T en plasma descienden significativamente después del nacimiento de sus crías, cuando los machos proporcionan cuidados paternos, por lo cual se creyó que esta hormona tenía un papel inhibitorio en la regulación de esta conducta (Reburn y Wynne-Edwards, 1999). Mientras que un estudio posterior, menciona que los niveles de T no descienden, cuando los machos exhiben cuidados paternos. A diferencia del estudio anterior, en esta investigación las concentraciones de T, fueron cuantificadas en varios tiempos de la preñez y la lactancia (Schum y Wynne-Edwards, 2005). Posteriormente, aunque se mostró que la extirpación de testículos, en machos con experiencia sexual, ocasionó una disminución significativa en los niveles de T y E₂, la latencia de contacto y la recuperación de las crías, no fueron afectadas (Hume y Wynne-Edwards, 2005). En nuestro laboratorio, utilizando el modelo de castración y reemplazamiento hormonal en machos vírgenes, se analizó el efecto de la T y el E₂ en la conducta paterna del

hámster enano, encontrándose que aunque los niveles de T y E₂ fueron significativamente más altos en los machos con reemplazamiento de estas hormonas, comparados con los castrados y simulados, no se observó ningún efecto sobre esta conducta (Romero-Morales, 2014). Estos resultados sugieren que la conducta paterna en el hámster enano, no es dependiente de cambios periféricos en los niveles de T o E₂, posiblemente esto se debe a que en este roedor, aproximadamente el 95% de los machos vírgenes, no atacan a las crías de su especie, contrariamente las acicalan y las olfatean, pero no las recuperan, a diferencia de los machos que permanecen con la hembra desde el apareamiento hasta el nacimiento de las crías. El otro 5% de machos son altamente agresivos e infanticidas. Estas observaciones llevan a pensar que el despliegue de todas las actividades que integran la conducta paterna, específicamente la recuperación de las crías, así como la transición de machos infanticidas a paternos puede ser facilitado por estímulos, como el apareamiento, la cohabitación con la hembra, y la presencia de las crías, como ocurre en el ratón California (Gubernick y Laskin, 1994). Estos estímulos pueden estar asociados con cambios en la expresión de ER α y AR, en las áreas neurales que regulan la conducta paterna en los roedores, como el MPOA y la MeA. Desde que estos receptores han sido involucrados en la regulación de la conducta paterna.

HIPÓTESIS

El despliegue de la conducta de recuperación de las crías, es inducido por estímulos, como la cópula y/o la presencia de las crías, y la exhibición de esta conducta se asocia a un cambio en la inmunorreactividad de ER α y AR en el MPOA y MeA del hámster enano (*Phodopus campbelli*).

OBJETIVOS

General

- Determinar el factor social que induce la conducta de recuperación en el hámster enano (*Phodopus campbelli*), y si la exhibición de esta conducta está asociada a un cambio en la inmunorreactividad de receptores α -estrogénicos y/o androgénicos en el MPOA y MeA.

Particulares

- Establecer el efecto de la cópula, la cohabitación con la hembra o la presencia de las crías en la inducción de la conducta de recuperación.
- Determinar los cambios en la inmunorreactividad de los ER α y AR en MPOA y MeA en el hámster enano, en las diferentes condiciones reproductivas antes mencionadas.

MATERIAL Y MÉTODO

Se utilizaron 60 hámsteres enanos (30 machos y 30 hembras) de 90-120 días de edad, sin experiencia sexual, procedentes de una colonia, establecida en un anexo del Laboratorio de Biología de la Reproducción, F.E.S.-Iztacala, UNAM. Los animales se mantuvieron en un fotoperiodo invertido de 12 h: 12 h luz-oscuridad, a una temperatura de 17 a 21 °C y humedad ambiental de laboratorio. Como alimento se les proporcionó Lab Diet Nutricubes, para roedores pequeños y agua *ad libitum*.

Para conocer las conductas (agresivas o no agresivas) de los hámsteres hacia las crías, previamente al experimento, se realizaron pruebas de conducta paterna, con crías ajenas de la misma especie. A través de este método se eligieron 30 machos, que fueron organizados en 3 grupos, de 10 animales cada uno. Cabe señalar, que en estas pruebas de conducta paterna 5 machos mostraron agresión hacia las crías, de estos, 2 machos se integraron al grupo 1, 1 al grupo 2 y 2 al grupo 3. Este criterio de inclusión se basó en el número de animales agresivos.

- Grupo 1: integrado por 10 machos, que fueron apareados (por pareja), con 10 hembras vírgenes intactas.
- Grupo 2: integrado por 10 machos que fueron apareados (por pareja), con 10 hembras vírgenes con oviductos ligados (Salpingoclasia).
- Grupo 3: integrado por 10 machos que cohabitaron con 10 hembras vírgenes ovariectomizadas.

Pruebas de conducta paterna

Cada macho se colocó en una jaula de observación (33x 45x 18 cm), con cama de aserrín limpio; después de 15 minutos de adecuación se introdujeron para cada macho, dos crías ajenas, de la misma especie, con una edad 1-3 días.

Se registraron (Anexo 1):

- La latencia de contacto (tiempo que transcurre desde que la cría es introducida, hasta que el macho entra en contacto con ésta)
- Tiempo invertido en el acicalamiento
- Frecuencia de olfateo
- Frecuencia de recuperación de las crías

Estas pruebas se realizaron en los machos del grupo 1: después de la cópula, a la mitad de la preñez de su pareja, en el día del nacimiento de las crías y a las 24 h siguientes del nacimiento. En los machos del grupo 2: después de la cópula y a los 22 días de cohabitación con la hembra (tiempo equivalente al nacimiento de las crías). En los machos del grupo 3: a los 10 días de cohabitación con la hembra (debido a que éstas se vuelven muy agresivas e incluso matan a los machos que intentan aparearse). Las observaciones se realizaron entre las 11 a 14 h, en cuarto con luz roja. Cada individuo fue observado durante 15 minutos, utilizando el método focal. Cuando la cría fue agredida fue retirada inmediatamente.

Ovariectomías y salpingoclasias

Las hembras del hámster enano fueron anestesiadas vía intramuscular con xilacina 10 mg/kg y ketamina 80 mg/kg. Enseguida se depiló el abdomen y se realizó la asepsia con cloruro de benzalconio. Posteriormente, se hizo una incisión en la región abdominal, para exponer los órganos internos. Se localizó

el ovario, tomando de referencia la localización del riñón, debido a que anatómicamente estos órganos se encuentran acomodados de manera paralela, enseguida el ovario y oviducto fueron expuestos, se ligaron las arterias que corren a cada lado del ovario, con hilo cat-gut 0000. Ambos ovarios fueron cortados y retirados. En las hembras en las que se realizó la salpingoclasia, los oviductos fueron ligados y cortados de los extremos que los unen con el útero. Finalmente, se suturaron los tejidos internos con hilo cat-gut y los externos con seda 0000. Como analgésico se les administró vía intramuscular ketorolaco 66 mg/kg, 1 hora después de haber despertado.

Inmunohistoquímica para receptores androgénicos (AR) y estrogénicos (ER α) en MPOA y MeA

Cinco machos de cada grupo experimental, fueron sacrificados inmediatamente después de la última prueba de conducta paterna, o cuando se presentó, por primera vez, la conducta de recuperación. Cada hámster fue anestesiado vía intramuscular profundamente con xilacina 10 mg/kg y ketamina 80 mg/kg. Una vez anestesiados fueron perfundidos por vía intracardiaca, con solución fisiológica seguida de paraformaldehído al 2% (disuelto en buffer de fosfatos). Después de la fijación se extrajo el cerebro, el cual fue post fijado durante 18 horas en el mismo fijador. Posteriormente, este tejido fue procesado histológicamente (Anexo 2). Se realizaron cortes de 7 μ m de grosor, entre el segundo y tercer tercio en el plano sagital del cerebro. La localización de la región del MPOA y la MeA se realizó por comparación con el atlas estereotáxico de rata (Paxinos y Watson, 2004). En la inmunohistoquímica se utilizaron anticuerpos policlonales para AR y ER α nucleares IgG de conejo

(Santa Cruz Biotechnology, inc). Como segundo anticuerpo se usó el incluido en el kit de Vectastain Elite ABC Kit (Rabbit IgG, Anexo 3).]

Cuantificación de marcas inmunorreactivas

Para la cuantificación de las marcas inmunorreactivas se hicieron observaciones bajo un microscopio óptico (Motic BA400), se tomaron fotografías con una cámara Moticom de 10 MP, a un aumento de 40X, que equivale a $180 \mu\text{m}^2$. Se realizó la impresión de la imagen. El conteo por área neural analizada se hizo en 5 animales, tomando de cada uno de ellos un corte. Una marca se consideró inmunorreactiva, si el producto de reacción azul-negro era visible y de la forma y tamaño de un núcleo de la célula (Meek *et al.*, 1997).

Análisis de datos

Los datos conductuales obtenidos de las pruebas de conducta paterna: latencia de contacto, acicalamiento y olfateo, entre los diferentes grupos experimentales se contrastaron aplicando un ANOVA de dos factores para medidas repetidas (los dos factores a analizar fueron los tiempos y los tratamientos).

La inmunoreactividad de ER α y AR en el MPOA y MeA, cuantificada en los machos de los diferentes grupos se analizaron aplicando el estadístico de Kruskal-Wallis. Aquí se aplicó para las comparaciones múltiples entre pares, la corrección de Bonferroni conservativa (BMI SPSS Statistics, versión 21).

RESULTADOS

Factores sociales y conducta paterna

Transición de agresivos a paternales

Las pruebas de conducta paterna pretratamiento mostraron que el 83% de los machos vírgenes olfatearon y acicalaron a las crías (25 machos), mientras que el 16% mostraron agresión (5 machos). De estos machos agresivos, sólo 3 machos transitaron a paternales después de 10 días de cohabitación con una hembra intacta o con salpingoclasia. Sin embargo, sólo 2 machos agresivos que cohabitaron con hembras ovariectomizadas y que no copularon, no cambiaron su conducta de agresivos a paternales. En las hembras de los diferentes grupos, se confirmó la ausencia de conducta de receptividad sexual, ciclos estrales y la ausencia de cópula en los frotis vaginales, con la presencia de espermatozoides ($\chi^2 = 0$, GL = 1, $P < 0.05$; Fig. 9 y Tabla 2).

Efecto de la preñez

El grupo de machos que permanecieron con hembras intactas, con las cuales se aparearon y tuvieron descendencia, no cambió su conducta hacia las crías: las mismas actividades que se observaron en las pruebas de conducta paterna pretratamiento, también fueron observadas, en las pruebas que se realizaron durante la cohabitación con la hembra preñada. Asimismo, la cohabitación con hembras con salpingoclasia, después de un periodo de 20 días (periodo equivalente a la preñez), tampoco tuvo ningún efecto en la conducta; los machos que eran paternales, continuaron siendo paternales ($\chi^2 = 0$, GL = 1, $P < 0.05$; Tabla 2).

Efecto del nacimiento y presencia de las crías

Las pruebas de conducta paterna que se realizaron después del nacimiento de las crías indicaron que este factor social, sí ocasionó un cambio en la conducta: el 80% de los machos que estuvieron presentes en el nacimiento de sus hijos, exhibieron recuperación de las crías 24 h después del parto (Tabla 2 y Fig. 2).

Latencia y frecuencia de las actividades desplegadas por el macho del hámster enano en los distintos tratamientos

Las latencias de contacto con las crías no difirieron significativamente ($F= 0.18$, $GL= 2$, $P > 0.05$) entre los diferentes grupos. Tampoco se encontraron diferencias significativas, en el tiempo invertido en el acicalamiento y la frecuencia de olfateo, entre los machos mantenidos en las distintas condiciones ($F= 1.77$, $GL= 2$, $P > 0.05$; $F= 3.50$, $GL= 2$, $P > 0.05$). Como únicamente los machos que cohabitaron con hembras intactas hasta el nacimiento de sus crías, exhibieron conducta de recuperación, los registros obtenidos de esta conducta no fueron contrastados estadísticamente (Tabla 2 y Fig. 8).

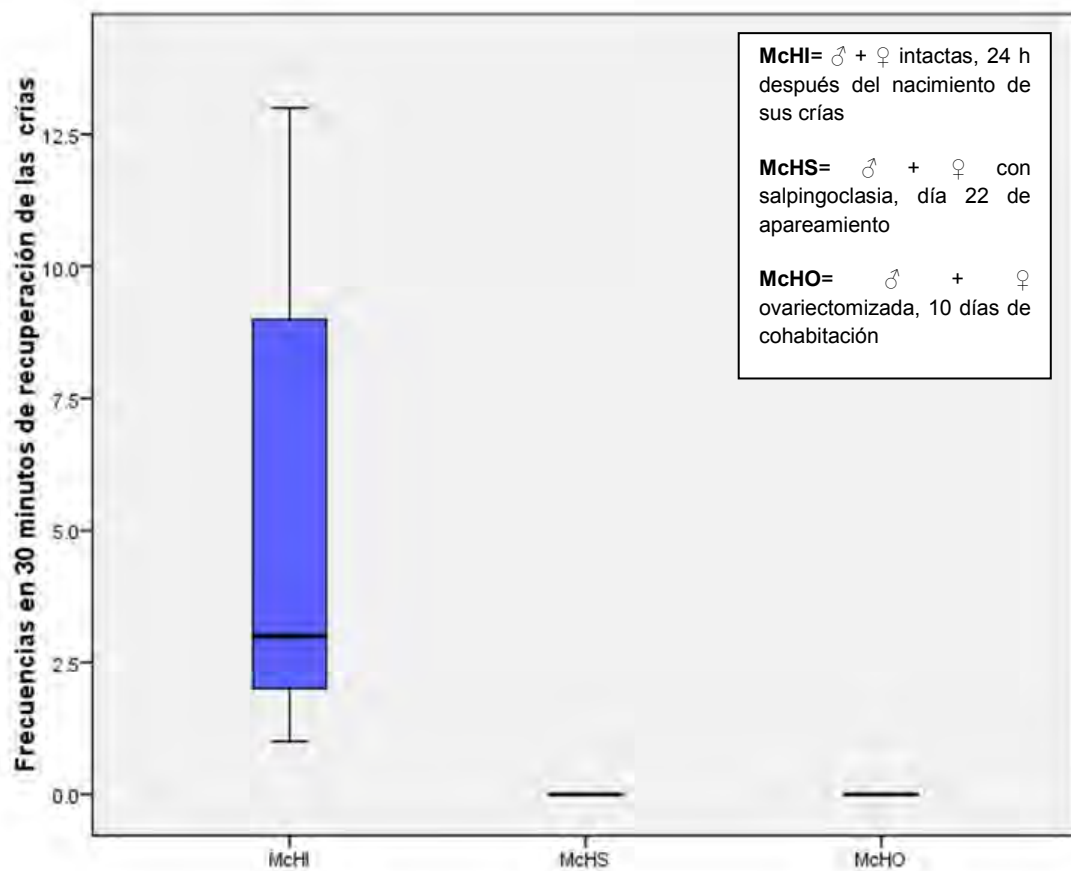


Fig. 8. Únicamente los machos que permanecieron con sus crías después de 24 h del nacimiento, mostraron durante la conducta de recuperación, a diferencia de los otros grupos experimentales. Como únicamente los machos que cohabitaban con hembras intactas hasta el nacimiento de sus crías, exhibieron conducta de recuperación, los registros obtenidos de esta conducta no fueron contrastados estadísticamente. Los datos están representados en medianas y cuartiles, debido a su a que no presentan distribución normal.

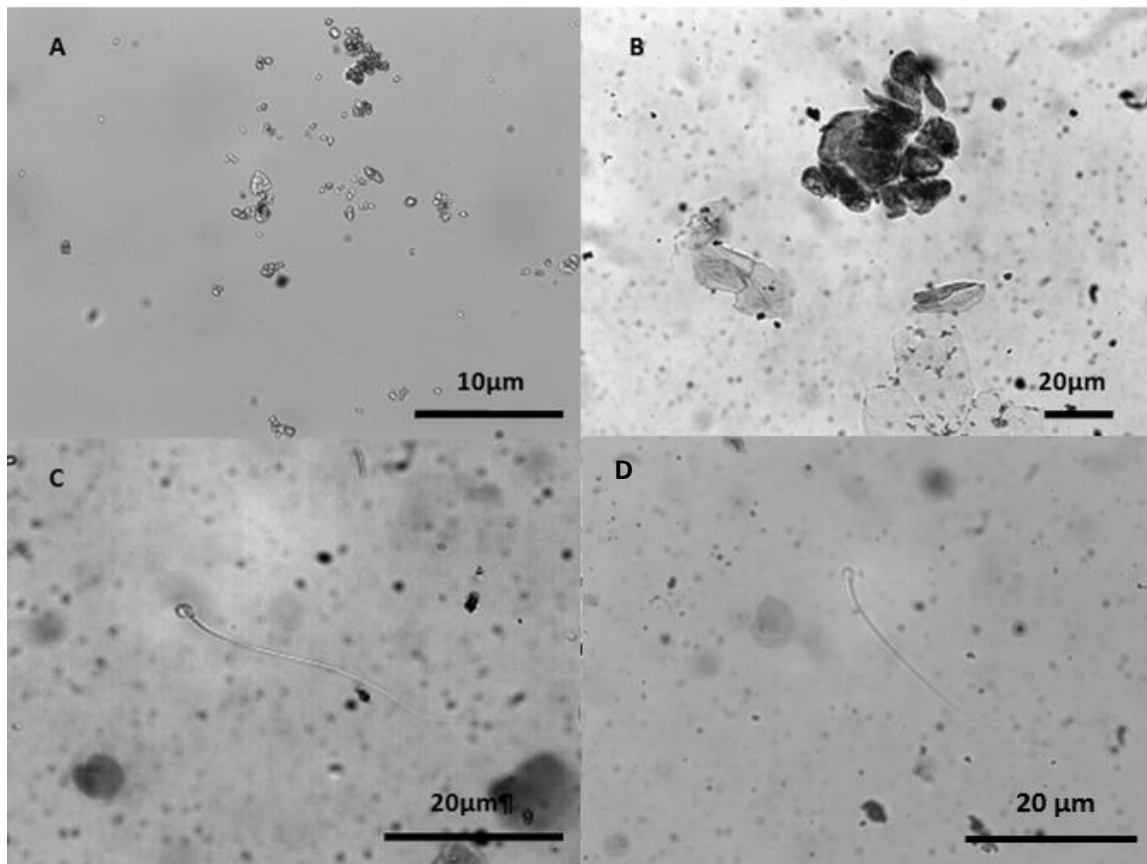


Fig. 9. Fotografías de frotis vaginales de hembra ovariectomizada (A), hembra con salpingoclasia (B), hembra con salpingoclasia y presencia de espermatozoides (C) y hembra intacta con presencia de espermatozoides (D).

Tabla 2. Porcentaje de machos que presentaron agresión (Agr), acicalamiento (Acicala) y recuperación de las crías (RP) en diferentes etapas del ciclo sexual de este roedor.

Pruebas de conducta paterna pre-tratamiento			Condición experimental	1 día después de la cópula			En el día 10 de la preñez			24 h después del nacimiento de las crías		
Acicala	RP	Agr		Acicala	RP	Agr	Acicala	RP	Agr	Acicala	RP	Agr
80%	0%	20%	♂ + ♀ intactas n=10	80%	0%	20%	90%	0%	10%	100%	60%	0%
90%	0%	10%	♂ + ♀ con salpingoclasia n=10	90%	0%	10%	90%	0%	10%	100%	0%	0%
80%	0%	20%	♂ + ♀ con ovariectomía n=10	80%	0%	20%	80%	0%	20%			

Inmunorreactividad de ER α en MPOA y MeA

La inmunorreactividad en 180 μ^2 para ER α (ir-ER α) en MPOA y MeA, difirió significativamente entre los grupos con diferentes intervenciones (H= 18.93, GL= 4, P < 0.001 y H= 11.959, GL= 4, P = 0.018, respectivamente; Fig. 14).

La ir- ER α en MPOA de los machos apareados con hembras intactas, fue significativamente mayor (Bonferroni, P = 0.0125) que la observada en machos apareados con hembras con salpingoclasia y ovariectomizadas. Así mismo, los machos apareados con hembras intactas también presentaron significativamente mayor ir-ER α que los machos vírgenes con conducta paterna espontánea y los agresivos hacia las crías. Machos apareados con hembras con salpingoclasia también presentaron mayor inmunorreactividad que los machos que cohabitaron con hembras ovariectomizadas, con conducta paterna espontánea y los agresivos hacia las crías (Figs. 10 y 14).

En cuanto a la cantidad de marcas ir-ER α en MeA, la comparación múltiple de medias (Bonferroni, P = 0.0125), indicó diferencias significativas solamente entre los machos que cohabitaron con hembras ovariectomizadas y los machos con conducta paterna espontánea (Figs. 11 y 14).

Inmunorreactividad de AR en MPOA y MeA

La cantidad de marcas inmunorreactivas en 180 μ^2 para AR (ir-AR) en MPOA y MeA, difirió significativamente entre los grupos de machos (H = 19.033, GL = 4, P < 0.001 y H = 13.049, GL = 4, P = 0.01, respectivamente; Fig. 15).

La comparación múltiple de medias (Bonferroni, P = 0.0125) indicó diferencias significativas en las marcas ir-AR en MPOA, entre los machos que cohabitaron

con hembras intactas, los machos que cohabitaron con hembras ovariectomizadas y los agresivos hacia las crías. También se encontraron diferencias significativas en la ir-AR en MPOA, entre machos que permanecieron apareados con hembras con salpingoclasia y los que cohabitaron con hembras ovariectomizadas (Figs. 12 y 15).

También en MeA se encontraron diferencias significativas en la ir-AR (Bonferroni, $P = 0.0125$), entre los machos que se aparearon con hembras con salpingoclasia, con los que cohabitaron con hembras ovariectomizadas y los machos con conducta paterna espontánea (Figs. 13 y 15).

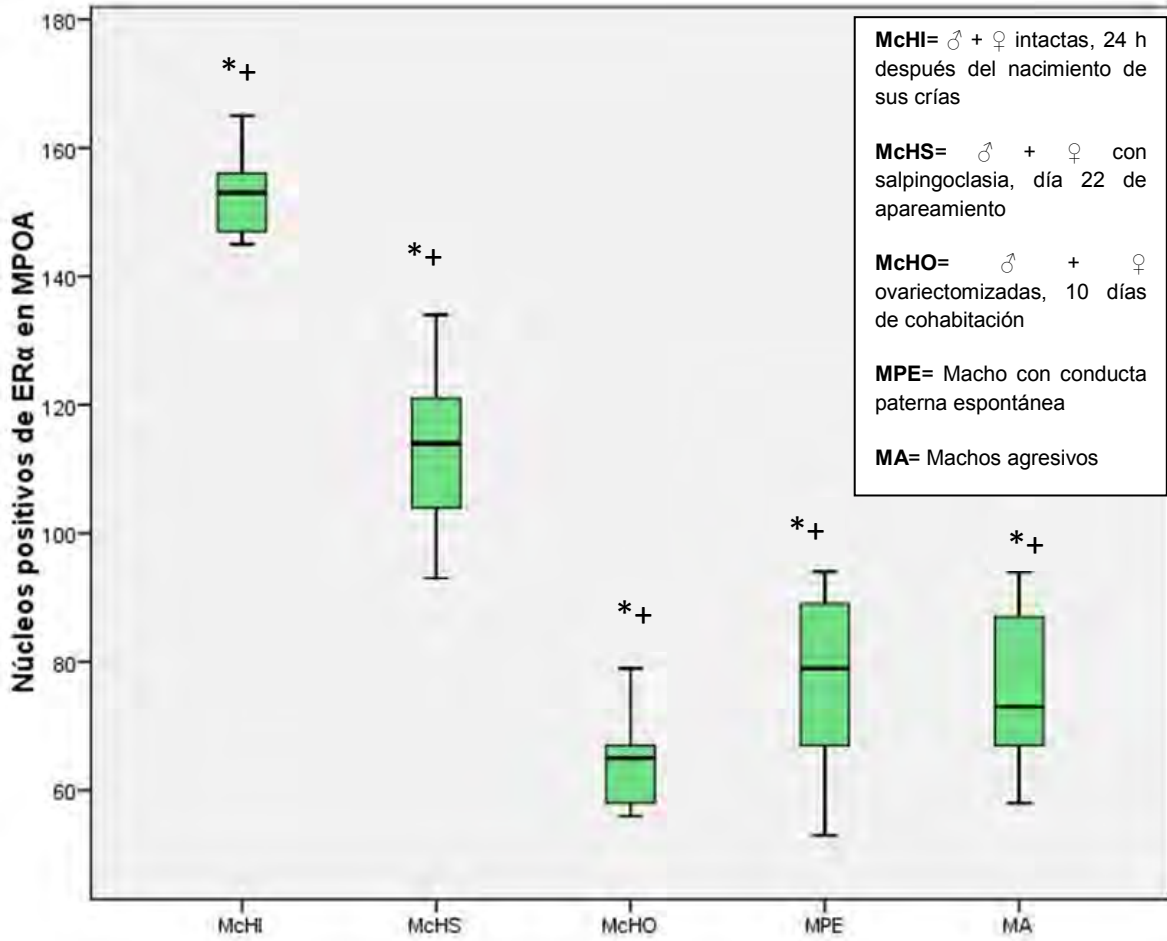


Fig. 10. Los machos que permanecieron con sus crías 24 h después del nacimiento presentaron significativamente mayor ir-ERα en MPOA, que los machos de las otras condiciones experimentales ($P < 0.001$). Cuantificada en $180 \mu\text{m}^2$. Los datos están representados en medianas y cuartiles.

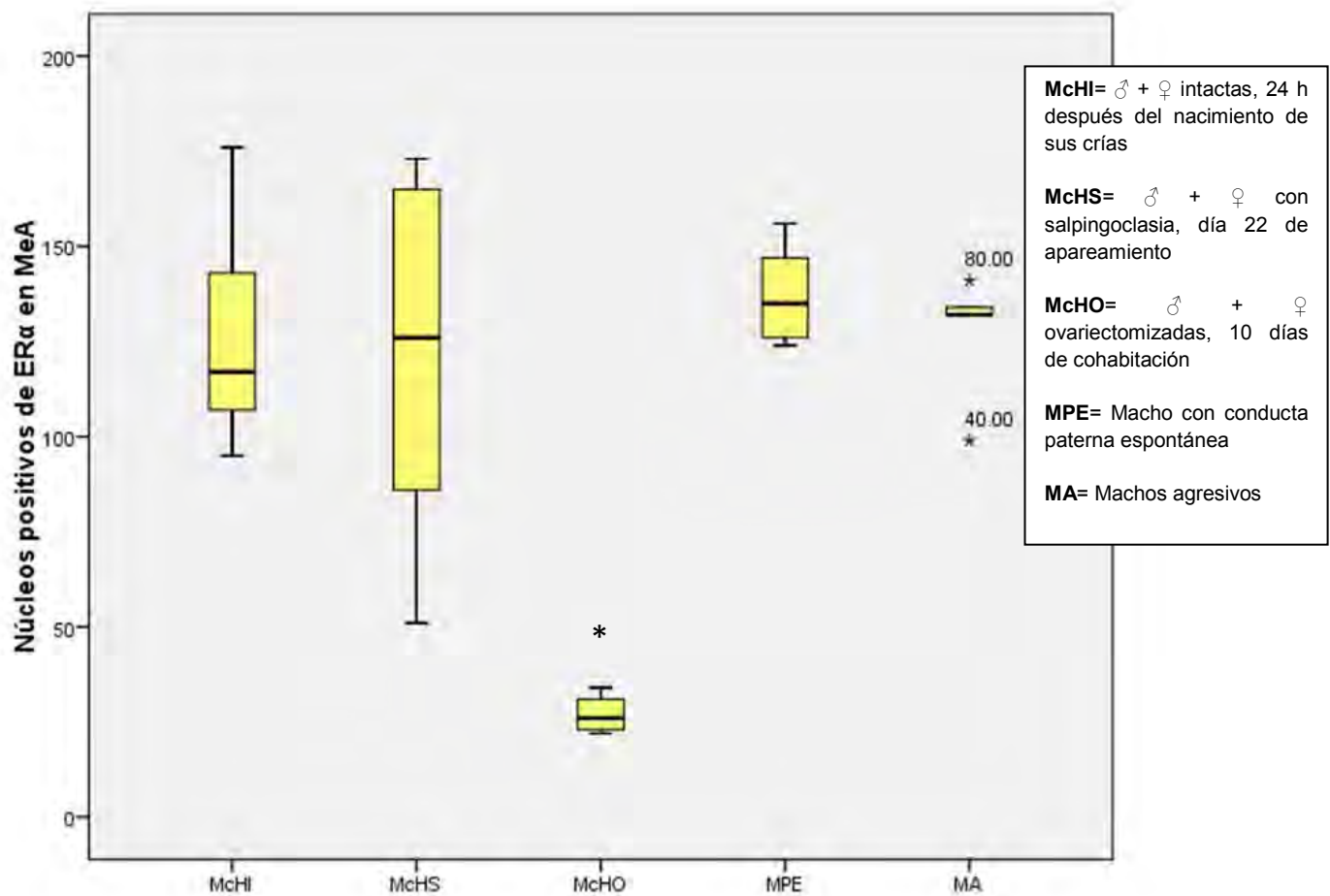


Fig. 11. Los machos con conducta paterna espontánea presentaron significativamente mayor ir-ERα ($P < 0.001$) que los machos que cohabitaron con hembras ovariectomizadas, en el día 10 de cohabitación. Cuantificación en $180 \mu\text{m}^2$. Los datos están representados en medianas y cuartiles.

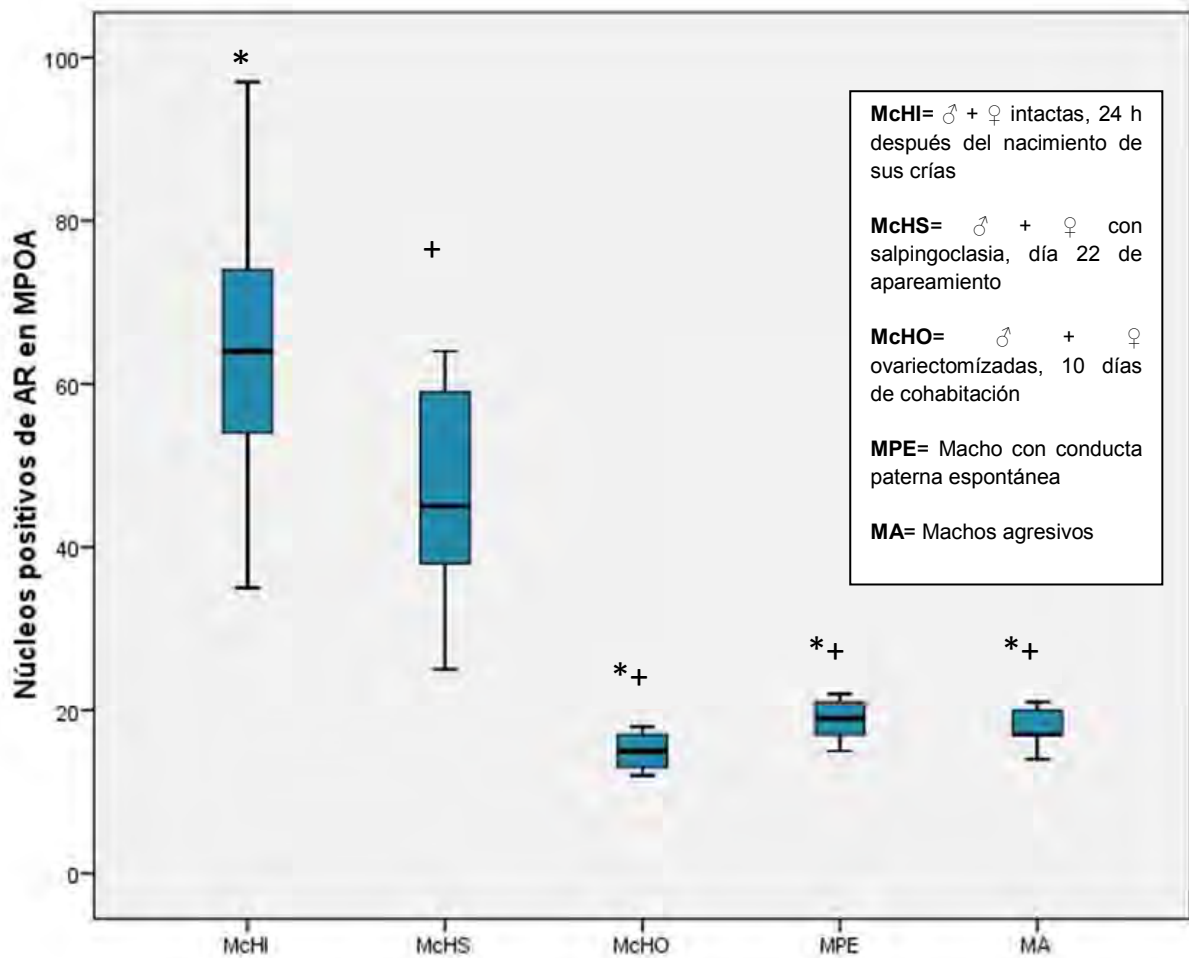


Fig. 12. La ir-AR en MPOA fue significativamente más alta en los machos que permanecieron apareados con hembras intactas, en comparación a los que cohabitaron con hembras ovariectomizadas, machos vírgenes con conducta paterna espontánea y agresiva. Pero no difirieron de los machos apareados con hembras con salpingoclasia ($P < 0.001$). Cuantificación en $180 \mu\text{m}^2$. Los datos están representados en medianas y cuartiles.

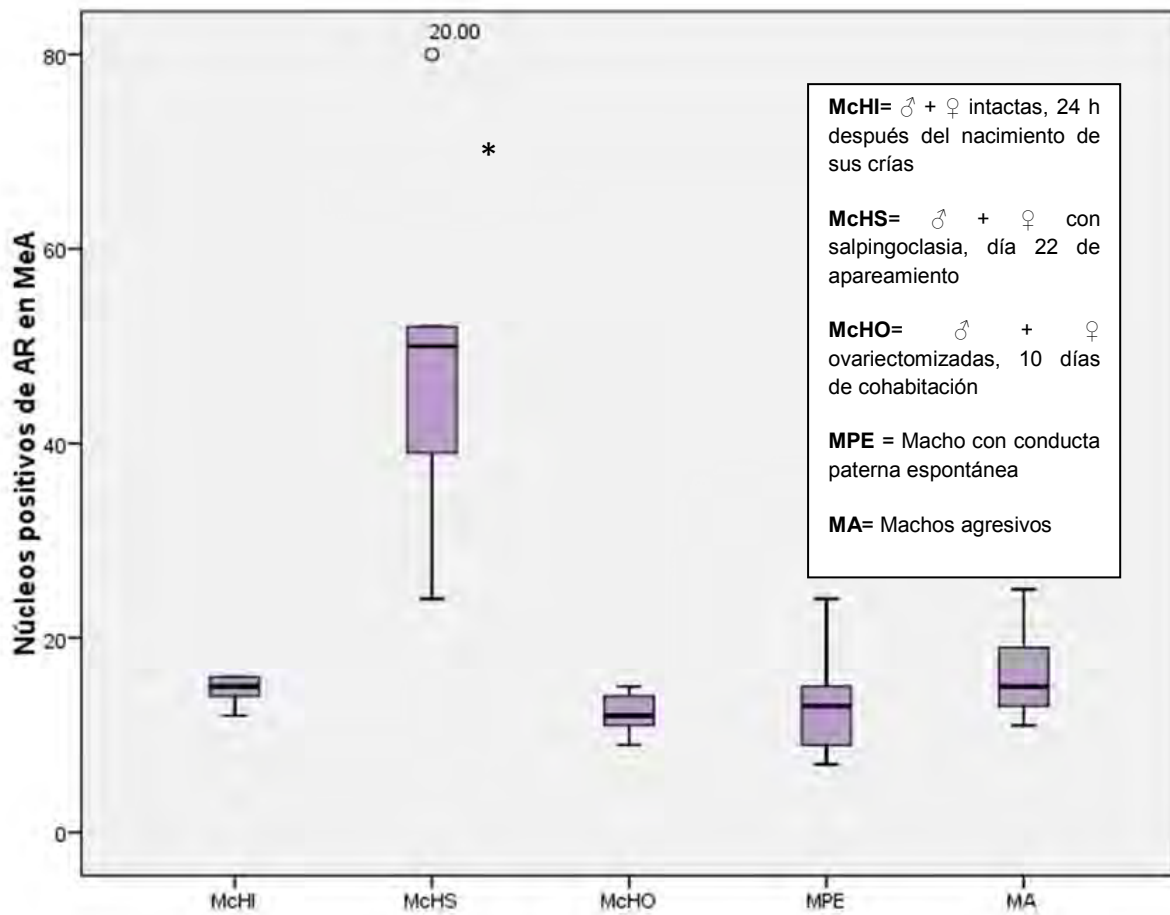


Fig. 13. Los machos apareados con hembras con salpingoclasia presentaron significativamente mayor ir-AR que los machos de las otras condiciones experimentales ($P < 0.001$). Cuantificación en $180 \mu\text{m}^2$. Los datos están representados en medianas y cuartiles.

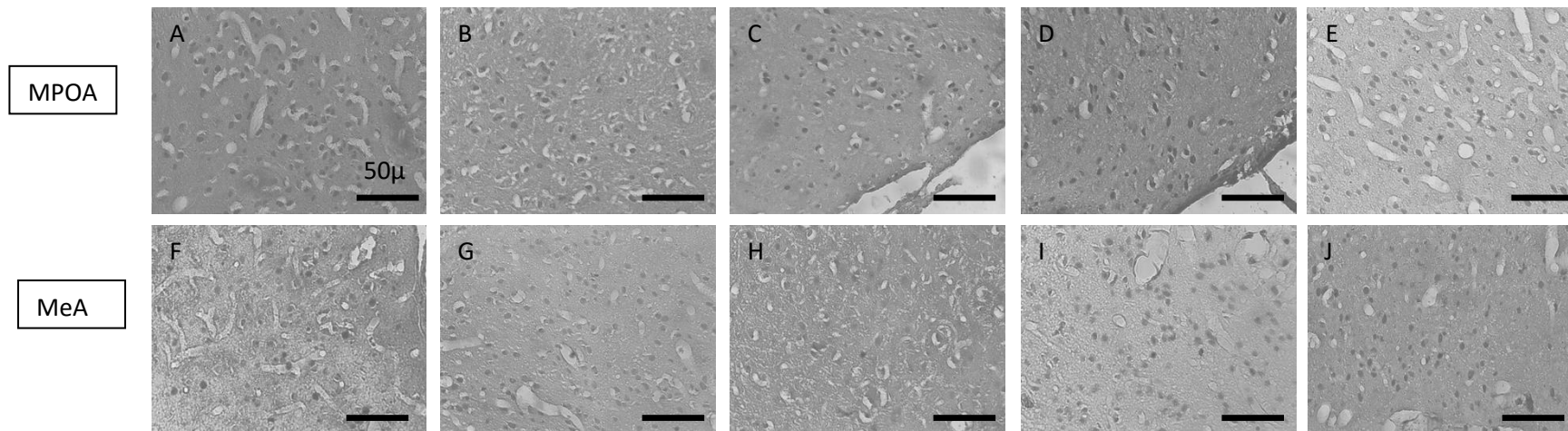


Fig. 14. Fotomicrografías de ir-ER α en el MPOA y MeA, en machos 24 h después del nacimiento de sus crías (A y F), machos en el día 22 de apareamiento (B y G), machos en el día 10 de cohabitación con hembras ovariectomizadas (C y H), machos con conducta paterna espontánea (D e I) y agresivos hacia las crías (E y J). Barra de 50 μ m.

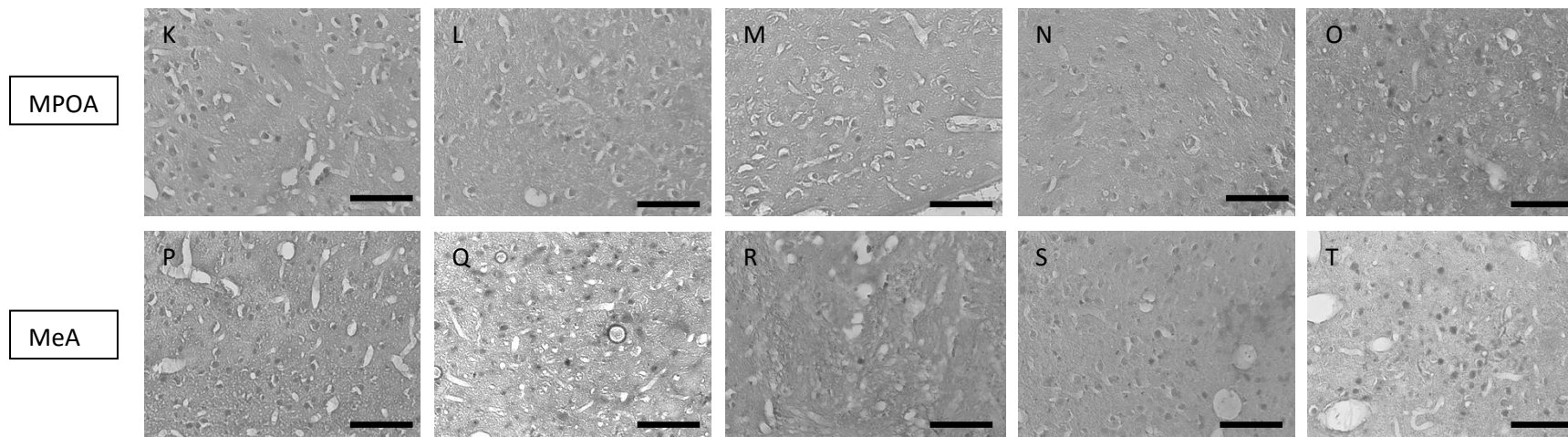


Fig. 15. Fotomicrografías de ir-AR en el MPOA y MeA, en machos 24 h después del nacimiento de sus crías (K y P), machos en el día 22 de apareamiento (L y Q), machos en el día 10 de cohabitación con hembras ovariectomizadas (M y R), machos con conducta paterna espontánea (N y S) y agresivos hacia las crías (O y T). Barra de 50µm.

DISCUSIÓN

En este trabajo encontramos que la presencia de las crías facilita el despliegue de todas las actividades que integran la conducta paterna del hámster enano, específicamente la conducta de recuperación, debido a que ninguno de los machos apareados con hembras con salpingoclasia o que cohabitaron con hembras ovariectomizadas exhibieron esta conducta.

Los machos que en la primera exposición a las crías fueron agresivos (5 machos), cambiaron esta conducta a paternal, después del apareamiento con hembras intactas (2 machos), o con salpingoclasia (1 macho), pero no en la cohabitación con hembras ovariectomizadas (2 machos). Estos resultados sugieren que en el hámster enano, la cópula es un factor social, que facilita la transición de machos agresivos a paternos. En el ratón de California, el 34% de los machos que permanecen cohabitando con su pareja, despliegan cuidados paternos después de 24 h siguientes a la cópula (Gubernick *et al.*, 1994). Esto también ha sido observado en el ratón de laboratorio y el gerbo de Mongolia, en los cuales la transición de infanticidas a paternos también es facilitada por la cópula, en el 100% de los machos (Vom Saal, 1985; McCarthy y Vom Saal, 1986; Clark y Galef, 2000; Jong *et al.*, 2009).

La exhibición de la conducta de recuperación de las crías en el hámster enano, únicamente fue observada en los machos apareados con hembras intactas, que permanecieron con sus crías 24 h después del nacimiento. Esto muestra que la presencia de las crías es un factor determinante en la exhibición de la conducta de recuperación, en este roedor. Estos hallazgos coinciden con lo reportado en el ratón de California, en el cual sólo después del nacimiento de las crías, el 100% de los machos son paternos. Lo cual indica que la

presencia de las crías es un estímulo esencial en el establecimiento de la conducta paterna (Gubernick y Laskin, 1994).

No se encontraron diferencias significativas en la ir-ER α en MeA, en los machos de las diferentes condiciones experimentales. Esto podría deberse a que en la regulación neural de la conducta paterna, como en la regulación de la conducta materna, la MeA tiene como función enviar las señales de olfacción provenientes del BO, tanto a regiones que forman parte del circuito neural positivo, como el negativo que regula esta conducta (Numan, 2007).

Los machos apareados con hembras intactas, que permanecieron 24 h después del nacimiento con sus crías, presentaron significativamente mayor ir-ER α en el MPOA, que los machos de las otras condiciones experimentales. Estos resultados muestran que hay una asociación entre la presencia de las crías, la exhibición de la conducta de recuperación y el aumento en la ir-ER α en MPOA, lo cual sugiere que los ER α , y por tanto los estrógenos desempeñan una función importante en la regulación de la conducta paterna de este roedor. Al parecer, el impacto del efecto de los estrógenos no tiene que ver con cambios en los niveles periféricos de estas hormonas, debido a que éstos no cambian significativamente a través de su ciclo reproductivo (Schum y Wynne-Edwards, 2005). En otro estudio realizado en el hámster enano, en el cual se analizaron los cambios en la ir-ER α en MeA, BNST y MPOA, en machos vírgenes, apareados y con experiencia paterna, se señaló que no se observaron cambios, en las diferentes condiciones reproductivas (Timonin *et al.*, 2008). La diferencia entre estos resultados y los aquí obtenidos, posiblemente se deban al diseño experimental; en este estudio se realizaron pruebas de conducta paterna, antes de iniciar el experimento, que permitieron

conocer la conducta de los machos vírgenes hacia las crías (paternales o agresivos), y se registraron los cambios en estas conductas, ocasionados por la cópula, presencia de la hembra o de las crías, y su relación con la ir-ER α , en las áreas neurales estudiadas. Mientras que en el de Timonin *et al.* (2008), sólo compararon los cambio de ir-ER α en diferentes etapas del ciclo reproductivo, sin asociar el efecto de cada uno de estos factores, con la exhibición de la conducta paterna.

La ir-AR en MPOA y MeA fue significativamente más alta tanto en el grupo de machos que permanecieron con la hembra hasta 24 h después del nacimiento de sus crías, así como en los machos que permanecieron apareados con hembras con salpingoclasia, en comparación con los machos que cohabitaron con hembras ovariectomizadas y los machos vírgenes. Estos resultados sugieren que la ir-AR se incrementa con la cópula, debido a que los dos grupos experimentales con altos niveles de ir-AR tuvieron en común, el factor social, cópula. Estos hallazgos indican que la presencia de las crías no está asociada a la ir-AR. Sin embargo, es probable que en la transición de machos agresivos a paternales, los AR y por tanto los andrógenos participen como un estímulo, que abra el circuito neural de la regulación de la conducta paterna. El efecto facilitador de la cópula, en el inicio de la conducta paterna puede deberse al incremento de T que se registra después del apareamiento (Gary y Kristen, 1969, Bonilla *et al.*, 2006). En el gerbo de Mongolia, machos vírgenes infanticidas, se convierten en paternales después de un incremento suprafisiológico en los niveles de T o de sus metabolitos, E₂ o DHT, ocasionado por la administración de estas hormonas, mostrando que el inicio de la conducta paterna en este roedor, depende de la vía estrogénica y androgénica

(Martínez *et al.*, 2015). Futuros estudios en el hámster enano deben evaluar el efecto de la administración de T o sus metabolitos en el inicio de la conducta paterna en machos vírgenes agresivos hacia las crías.

CONCLUSIONES

Con base en estos resultados se concluye: que la presencia de las crías es el factor que induce la exhibición de todas las actividades de la conducta paterna del hámster enano, específicamente la conducta de recuperación. La exhibición de esta conducta, está asociada a un incremento en la ir-ER α en MPOA, por lo cual se sugiere que los estrógenos participan en la regulación de la conducta paterna de este roedor.

REFERENCIAS

- Acconcia, F., Ascenzi, P., Bocedi, A., Spisni, E., Tomasi, V. & Trentalance, A. 2005. Palmitoylation-dependent estrogen receptor alpha membrane localization: regulation by 17beta-estradiol. *Molecular Biology Cell*. 16: 231-237.
- Alcock, J. 2013. *Animal behavior: an evolutionary approach*. Sinauer Associates, Inc. Publishers. U.S.A.
- Arriza, J. L., Weinberger, C., Cerelli, G., Glaser, T. M., Handelin, B. L., Housman, D. E. & Evans, R. M. 1987. Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with the glucocorticoid receptor. *Science*. 237: 268–275.
- Barnea, A. & Gorski, J. 1970. Estrogen-induced protein. Time course of synthesis. *Biochemistry*. 9: 1899-1904.
- Bakker, J. & Brock. O. 2010. Early oestrogens in shaping reproductive networks: Evidence for a potential organizational role of oestradiol in female brain development. *Journal of Neuroendocrinology*. 22: 728-735.
- Blaustein, J. D., Lehman, M. N., Turcotte, J. C. & Greene, G. 1992. Estrogen receptors in dendrites and axon terminals in the guinea pig hypothalamus. *Endocrinology*. 131: 281-290.
- Bondar, G., Kuo, J., Hamid, N. & Micevych, P. 2009. Estradiol-induced estrogen receptor-alpha trafficking. *Journal of Neuroscience*. 29: 15323-15330.
- Bonilla, J., Vázquez-Palacios, G., Arteaga-Silva, M., Retana-Márquez, S. 2006. Hormonal responses to different sexually related conditions in male rats. *Hormones and Behavior*. 49: 376–382.

- Boulware, M. I., Weick, J. P., Beckund, B. R., Kuo, S. P., Groth, R. D. & Mermelstein, P. G. 2005. Estradiol activates group I and II metabotropic glutamate receptor signaling, leading to opposing influences on cAMP response element-binding protein. *Journal of Neuroscience*. 25: 5066-5078.
- Bridges, R. S., Robertson, M. C., Shiu, R. P., Sturgis, J. D., Henriquez, B. M. & Mann, P. E. 1997. Central lactogenetic regulation of maternal behavior in rats: steroid dependence, hormone specificity, and behavioral potencies o rat PRL and rat placental lactogen. *International Endocrinology*. 138: 756-763.
- Brinkmann, A. O. & Trapman, J. 2000. Genetic analysis of androgen receptors in development and disease. *Advances in Pharmacology*. 47: 317–341.
- Brooks, P. L., Vella, E. T. & Wynne-Edwards, K. E. 2005. Dopamine agonist treatment before and after the birth reduces prolactin concentration but does not impair paternal responsiveness in Djungurian hamsters. *Hormonal and Behavior*. 47: 358-366.
- Brown, R. E. 1985. Hormones and paternal behavior in vertebrates. *American Zoologist*. 25: 895-910.
- Brown, R. E. 1986. Social and hormonal factors influencing infanticide and its suppression in adult male Long-Evans rats (*Rattus norvegicus*). *Journal of Comparative Psychology*, 100:155–161.
- Brown, R. E. 1993. Hormonal and experiential factors influencing parental behavior in male rodents: an integrative approach. *Behavioural Processes*. 30: 1-28.

- Brown, R. E., Mordoch T., Murphy P. R. & Moger W. H. 1995. Hormonal responses of male gerbils to stimuli from their mate and pups. *Hormones and Behavior*. 26: 114-118.
- Caldwell, H. K. & Alberts, H. E. 2004. Effect of photoperiod on vasopressin-induced aggression in Syrian hamster. *Hormones and Behavior*. 46: 444-449.
- Claessens, F., Denayer, S., Van Tilborgh, N., Kerkhofs, S., Helsen, C. & Haelens, A. 2008. Diverse roles of androgen receptor (AR) domains in AR-mediated signaling. *Nuclear Receptor Signal*. 6: 008.
- Clark, M. M. & Galef B. G. 2000. Effects of experience on the parental responses of male Mongolian gerbils. *Development Psychobiology*. 36: 177–185.
- Clutton-Brock, T. H. 1991. *The evolution of parental care*. Princeton University Press.
- Emlen, S. T. & Oring, L. W. 1977. Ecology, sexual selection, and the evolution of mating systems. *Science* 197: 215-223.
- Elwood, R. W. 1983. Paternal care in rodents. In R. W. Elwood (eds.), *Parental Behavior of rodents*. Cichester. John Wiley. 235-257.
- Elwood, R. W. & Ostermeyer M. C. 1986. Discrimination between conspecific and allospecific infants by male gerbils and mice before and after experience of their own young. *Development Psychobiology*, 19: 327-334.
- Evans, R. M. 1988. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*. 240: 889–895.

- Fiszbein, A., Canepa, M., Vazquez, G. R., Maggese, C. & Pandolfi, M. 2010. Photoperiodic modulation of reproductive physiology and behavior in the cichlid fish *Cichlasoma dimerus*. *Physiology and Behavior*. 99: 425-432.
- Fu, M., Wang, C., Zhang, X. & Pestell, R. G. 2004. Acetylation of nuclear receptors in cellular growth and apoptosis. *Biochemistry Pharmacology*. 68: 1199–1208.
- Gavish, L., Carter, C. S. & Getz, L. L. 1983. Male-female interactions in prairie voles. *Animal Behavior*. 31: 511- 517.
- Green, S., Walter, P., Kumar, V., Krust, A., Bornert, J.M., Argos, P. & Chambon, P. 1986. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature*. 320: 134–139.
- Greenspan F. S. & Gardner D. G. 2005. *Endocrinología básica y clínica*. Editorial Manual Moderno. 6° Edición. México. 1033.
- Grino, P. B., Griffin, J. E. & Wilson, J. D. 1990. Testosterone at high concentrations interacts with the human androgen receptor similarly to dihydrotestosterone. *Endocrinology*. 126: 1165–1172.
- Gromov, V. S. & Osadchuk L. V. 2013. Parental care and testosterone in males of the bank vole (*Myodes glareolus*): Sensitization and androgenic stimulation of paternal behavior. *The Biological Bulletin*. 40 (1): 114-118.
- Gubernick, D. J. & Nelson, R. J. 1989. Prolactin and paternal behavior in the biparental California mouse, *Peromyscus californicus*. *Hormones and Behavior*. 23: 203-210.

- Gubernick, D. J. & Laskin, B. 1994. Mechanisms influencing sibling care in the monogamous biparental California mouse, *Peromyscus californicus*. *Animal Behavior*. 23: 203-210.
- Gubernick, D. J., Schneider, A. K. & Jeannotte, A. L. 1994. Individual differences, in the mechanism underlying the onset and maintenance of parental behaviour and the inhibition of infanticide in the monogamous biparental California mouse *Peromyscus californicus*. *Behavioral Ecology Sociobiology*. 34: 225–231.
- Gubernick, D. J., Winslow J. T., Jensen P., Jeanotte L. & Bowen J. 1995. Oxytocin changes in male over the reproductive cycle in the monogamous, biparental California mouse, *Peromyscus californicus*. *Hormones and Behavior*. 29:59-73.
- Hart, S. A., Snyder, M. A., Smejkalova, T. & Woolley, S. C. 2007. Estrogen mobilizes a subset of estrogen receptor-alpha-immunoreactive vesicles in inhibitory presynaptic boutons in hippocampal CA1. *Journal of Neuroscience*. 27: 2102-2111.
- Hollenberg, S. M. & Evans, R. M. 1988. Multiple and cooperative transactivation domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell*. 55: 899–906.
- Hume, J. M. & Wynne- Edwards K. E. 2005. Castration reduces male testosterone, estradiol, and territorial aggression, but not paternal behavior in biparental dwarf hamsters (*Phodopus campbelli*). *Hormones and Behavior*. 48: 303-310
- Jakob, M., Kolodziejczyk, R., Orłowski, M., Krzywda, S., Kowalska, A., Dutko-Gwozdz, J., Gwozdz, T., Kochman, M., Jaskolski, M. & Ozyhar, A.

2007. Novel DNA-binding element within the C-terminal extension of the nuclear receptor DNA-binding domain. *Nucleic Acids Research*. 35: 2705–2718.
- Jara, A. A. 2001. *Endocrinología*. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España.
 - Jensen, E. V., Suzuki, T., Kawashima, T., Stumpf, W. E., Jungblut, P. W., DeSombre, E. R. 1968. A two-step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 59(2): 632-638.
 - Jenster, G., van der Korput, H. A., Trapman, J. & Brinkmann, A. O. 1995. Identification of two transcription activation units in the N-terminal domain of the human androgen receptor. *Journal Biology Chemistry*. 270: 7341–7346.
 - Jones, J. S. 2000. Endogenous and exogenous requirements for natural paternal behavior including midwifery. M. Sc. Thesis. Queen's University. Kingston. Canada.
 - Jones, J. S. & Wynne-Edwards, K. E. 2001. Parental behavior in biparental hamsters, *Phodopus campbelli*, does not require contact with the pregnant female. *Animal Behavior*. 62: 453-464.
 - Jong, T. R., Chauke, M., Harris, B. N. & Saltzman, W. 2009. From here to paternity: Neural correlates of the onset of paternal behavior in California mice (*Peromyscus californicus*). *Hormones and Behavior*. 56: 220-231.
 - Kato, S., Endoh, H., Masuhiro, Y., Kitamoto, T., Uchiyama, S., Sasaki, H., Masushige, S., Gotoh, Y., Nishida, E. & Kawashima, H. 1995.

Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science*. 270(5241): 1491-1494.

- Katsu, Y., E. Taniguchi, H. Urushitani, S. Miyagawa, M. Takase, K. Kubokawa, O. Tooi, T. Oka, N. Santo, J. Myburgh, A. Matsuno & Taisenlguchi. 2010. Molecular cloning and characterization of ligand- and species-specificity of amphibian estrogen receptors. *General and Comparative Endocrinology*. 168: 220-230.
- Kleiman, D. G. & Malcolm J. R. 1981. The evolution of male parental investment in mammals. In D. J. Gubernick y H. Klopfer (eds), *Parental Care in Mammals*. New Cork, Plenum Press. 347-387.
- Koch M. & Ehret, G. 1988. Immunocytochemical localization and quantitation of estrogen-binding cells in the male and female (virgin, pregnant, lactating) mouse brain. *Brain Research*. 489:101-112.
- Korach, K. S. 1994. Insights from the study of animals lacking functional estrogen receptor. *Science*. 266(5190): 1524-1527.
- Kousteni, S., Bellido. T., Plotkin, L. I., O'Brien, C. A., Bodenner, D. L., Han, L., Han, K., DiGregorio, G. B., Katzenellenbogen, J. A., Katzenellenbogen, B. S., Roberson, P. K., Weinstein, R. S., Jilka, R. L. & Manolagas, S. C. 2001. Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell*. 104: 719–730.
- Kuiper, G. G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S. & Gustafsson, J. A. 1996. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* 93: 5925-5930.

- Laredo, S. A., Landeros, R. V. & Trainor, B. C. 2014. Rapid effects of estrogens on behavior: Environmental modulation and molecular mechanisms. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 35: 447-458.
- Laudet, V., Hanni, C., Coll, J., Catzeflis, F. & Stehelin, D. 1992. Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. *European Molecular Biology Organization Journal*. 11: 1003–1013.
- Lavery, D. N. & McEwan, I. J. 2008. Structural characterization of the native NH₂-terminal transactivation domain of the human androgen receptor: a collapsed disordered conformation underlies structural plasticity and protein-induced folding. *Biochemistry*. 47: 3360–3369.
- Lee, A. W. & Brown E. R. 2007. Comparison of medial preoptic, amygdala, and nucleus *accumbens* lesions on parental behavior in California mice (*Peromiscus californicus*). *Physiology and Behavior*. 92, 617-628.
- Luis, J., Vázquez-Gaytán B., Martínez-Torres M., Carmona A., Ramos-Blancas G. & Ortiz G. 2010. Neither testosterone levels nor aggression decrease when the male Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) displays paternal behavior. *Hormones and Behavior* 57:271-275.
- Luisi, B. F., Xu, W. X., Otwinowski, Z., Freedman, L. P., Yamamoto, K. R. & Sigler, P. B. 1991. Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature*. 352: 497–505.
- Maier, R. 2001. *Comportamiento animal*. Mc Graw Hill. México. 252-275.
- Martínez, A., Ramos, G., Martínez-Torres, M., Nicolás, L., Carmona, A., Cárdenas, M. & Luis, J. 2015. Paternal behavior in the Mongolian gerbil

(*Meriones unguiculatus*) would be regulated by estrogenic and androgenic pathways. *Hormones and Behavior*. Accepted Manuscript.

- McCarthy, M. M. & Vom Saal, F. S. 1985. Inhibition of infanticide after mating by wild male house mice. *Physiology and Behavior*. 36: 203-209.
- McCarthy, M. 2010. How it's made: organizational effects of hormones on the developing brain. *Journal of Neuroendocrinology*. 22: 736-742.
- Meek, L. R., Russell, D. R., Colleen, M. N., & Cheryl L. S. 1997. Actions of testosterone in prepubertal and postpubertal male hamsters: Dissociation of effects on reproductive behavior and brain androgen receptor immunoreactivity. *Hormones and Behavior*. 31: 75 – 88.
- Migliaccio, A., Castoria, G., Di Domenico, M., de Falco, A., Bilancio, A., Lombardi, M., Barone, M.V., Ametrano, D., Zan- nini, M.S., Abbondanza, C. & Auricchio, F. 2000. Steroid-induced androgen receptor–oestradiol receptor beta-*Src* complex triggers prostate cancer cell proliferation. *European Molecular Biology Organization Journal*. 19: 5406–5417.
- Misrahi, M., Atger, M., d'Auriol, L., Loosfelt, H., Meriel, C., Fridlansky, F., Guiochon-Mantel, A., Galibert, F. & Milgrom, E. 1987. Complete amino acid sequence of the human progesterone receptor deduced from cloned cDNA. *Biochemical Biophysical Research Communications*. 143: 740–748.
- Monaghan, E. P. & Glickman, S. E., 1992. Hormones and aggressive behavior. In: Becker, J.B., Breedlove, S.M., Crews, D. (Eds.), *Behavioral Endocrinology*. MIT Press, Cambridge, M.A. 261 – 285.

- Nasello, A. G., Machado, C., Bastos, J.F. & Felicio, L.F. 1998. Sudden darkness induces a high activity low anxiety state in male and female rats. *Physiology and Behavior*, 63: 451-454.
- Newman, S. W. 1999. The medial extended amygdala in male reproductive behavior. A node in the mammalian social behavior network. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 877: 242-257.
- Numan, M. 2007. Motivational systems and the neural circuitry of maternal behavior in the rat. *Developmental Psychobiology*. 49: 12-21.
- O'Connell, L. A. & Hofmann, H. A. 2011. The vertebrate mesolimbic reward system and social behavior network: a comparative synthesis. *The Journal of Comparative Neurology*. 519: 3599-3639.
- Paxinos, G. & Watson, C. 2004. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Elsevier Academic Press. 367.
- Pedersen, C. A., Vadlamundi, S. V., Buccia, M. L. & Amico, J. A. 2006. Maternal behavior deficits in nulliparous oxytocin knockout mice. *Genes, Brain and Behavior*. 5: 274-281.
- Pedram, A., Razandi, M., Sainson, R. C., Kim, J. K., Huges, C. C. & Levin, E. R. 2007. A conserved mechanism for steroid receptor translocation to the plasma membrane. *Journal of Biological Chemistry*. 282: 22278-22288.
- Pietras, R. J., Arboleda, J., Reese, D. M., Wongvipat, N., Pegram, M. D., Ramos, L., Gorman, C. M., Parker, M. G., Sliwkowski, M. X. & Slamon, D. J. 1995. Her-2 tyrosine kinase pathway targets estrogen receptor and promotes hormone-independent growth in human breast cancer cells. *Oncogene*. 10(12): 2435-2446.

- Randall, V. A. 1994. Role of 5 alpha-reductase in health and disease. *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism*. 8: 405–43.
- Razandi, M., Pedram, A., Greene, G. L. & Levin, E. R. 1999. Cell membrane and nuclear estrogen receptor (ERs) originate from a single transcript: studies of ER α and ER β expressed in Chinese hamster ovary cells. *Molecular Endocrinology*. 13: 307-319.
- Reburn, C. J. & Wynne-Edwards K. E. 1999. Hormonal changes in males of naturally biparental and uniparental mammals. *Hormones and Behavior*. 35: 163-176.
- Rilling, J. K. 2013. The neural and hormonal bases of human parental care. *Neuropsychologia*. 51:731–747.
- Robinson-Rechavi, M., Carpentier, A. S., Duffraisse, M. & Laudet, V. 2001. How many nuclear hormone receptors are there in the human genome?. *Trends Genet*. 17: 554–556.
- Romero-Morales, L. O. 2014. Conducta paterna testosterona y estradiol en el hamster enano (*Phodopus campbelli*). Tesis de Licenciatura. FES-Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Rosenblantt, J. S. & Ceus K. 1998. Estrogen implants in the medial preoptic area stimulate maternal behavior in male rats. *Hormones and Behavior*. 33: 23-30.
- Ross, P. D. 1995. Mammalian species. *Phodopus campbelli*. The American Society of Mammalogists. 503: 1-7.
- Royle, N. J., Smiseth, P. T. & Kolliker, M. 2012. The evolution of paternal care. Oxford University Press.

- Saatcioglu, F. 2011. Androgen Action. Molecular Mechanisms of androgen action. Human Press. University of Oslo. Norway. 3-24.
- Schum, J. E. & Wynne-Edwards K. E. 2005. Estradiol and progesterone in paternal and non-paternal hamsters (*Phodopus*) becoming fathers: conflict with hypothesized roles. *Hormones and Behavior*. 47: 410-418.
- Sperry, T. S., Wacker, D. W., & Wingfield, J. C. 2010. The role of androgen receptors in regulating territorial aggression in male song sparrows. *Hormones and Behavior*. 57: 86-95.
- Storey, A. E., Bradbury C. G. & Joyce T. L. 1994. Nest attendance in male meadow voles: the role of the female in regulation male interactions with pups. *Animal Behavior*. 47:1037-1046.
- Timonin, M. E., Cushing, B. S. & Wynne-Edwards, K. E. 2008. In three brain regions central to maternal behaviour, neither male nor female *Phodopus* dwarf hamsters show changes in oestrogen receptor alpha distribution with mating or parenthood. *Journal of Neuroendocrinology*. 20: 1301–1309.
- Toft, D. & Gorski, J. 1966. A two-step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 55(2):632-638.
- Towart, L. A., Alves, S. E., Znamensky, V., Hayashi, S., McEwen, B. S. & Milner, T. A. 2003. Subcellular relationships between cholinergic terminals and estrogen receptor-alpha in the dorsal hippocampus. *Journal of Comparative Neurology*. 463: 390-401.

- Trainor, C. B. & Marler A. C. 2001. Testosterone, Paternal Behavior and Agression in the Monogamous California Mouse (*Peromyscus californicus*). *Hormones and Behavior*. 40: 32-42.
- Trainor, C. B. & Marler A. C. 2002. Testosterone promotes paternal behavior in a monogamous mammal via conversion to estrogen. *The Royal Society*. 269 (1463): 823-829.
- Trainor, C. B., Bird I. M., Alday N. A., Shlinger B. A. & Marler C. A. 2003. Variation in aromatase activity in the medial preoptic area and plasma progesterone is associated with the onset of paternal behavior. *Journal Neuroendocrinology*. 78: 36-44.
- Trapman, J., Klaassen, P., Kuiper, G. G., van der Korput, J. A., Faber, P. W., van Rooij, H. C., Geurts van Kessel, A., Voorhorst, M. M., Mulder, E. & Brinkmann, A. O. 1988. Cloning, structure and expression of a cDNA encoding the human androgen receptor. *Biochemical Biophysical Research Communications*. 153: 241–248.
- Vasudevan, N. & Pfaff. D. W. 2008. Non-genomic actions of estrogens and their interaction with genomic actions in the brain. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 29: 238-257.
- Vom Saal, F. S. 1984. Time-contingent change in infanticide and parental behavior induced by ejaculation in male mice. *Physiology and Behavior*. 34: 7-15.
- Wang, Z. X., Ferris C. F. & De Vries G. J. 1994. Role of septal vasopressin innervations in paternal behavior in prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 91:400-404.

- Wilson, J. D., Griffin, J. E. & Russell, D. W. 1993. Steroid 5 alpha-reductase 2 deficiency. *Endocrine Reviews*. 14: 577–593.
- Wynne- Edwards, K. E. 1987. Evidence for obligate monogamy in the Djungarian hamster, *Phodopus campbelli*: pup survival under different parenting conditions. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 20: 427-437.
- Wynne-Edwards, K. E. & Lisk, R. D. 1988. Differences in behavioral responses to a competitive mating situation in two species of dwarf hamster (*Phodopus campbelli* and *P. sungorus*). *Journal of Comparative Psychology*. 102: 49–55.
- Wynne- Edwards, K. E. 2001. Hormonal changes in mammalian fathers. *Hormones and Behavior*. 40: 139-145.
- Young, L. J. 1999. Oxytocin and vasopressin receptors and species typical social behaviors. *Hormones and Behavior*. 36: 212-221.
- Zangenehpour, S. & Chaudhuri, A. 2002. Differential induction and decay curves of c-fos and zif268 revealed through dual activity maps. *Molecular Brain Research*. 109: 221-225.
- Zhenzhen Song, Fadao Tai, Chenyjun Yu, Ruiyong Wu, Xia Zhang, Hugh Broders, Fengqin He & Rui Guo. 2010. Sexual or paternal experiences alter aloparental behavior and the central expression of ER α and OT in male mandarin voles (*Microtus mandarinus*). *Behavioral Brain Research*. 214: 290-300.

Anexo 1. Etograma utilizado en el registro de las conductas paternas del macho del hámster enano (*Phodopus campbelli*).

Macho/ Conducta	M1 LI:	M2 LI:	M3 LI:	M4 LI:	M5 LI:	M6 LI:	M7 LI:	M8 LI:	M9 LI:	M10 LI:
Acicalamiento										
Olfateo										
Abrigo										
Reconstrucción del nido										
Recuperación de la cría										
Agresivo										

Donde: M= Macho, LI= Latencia de inicio.

Anexo 2

Técnica para deshidratación del tejido cerebral e inclusión en parafina.

1. Después de la perfusión dejar el tejido en el fijador (paraformaldehído al 2%) entre 12 y 16 horas.
2. Lavar con agua corriente (Cambios cada 15 minutos).....1h
3. Alcohol 60°40 min
4. Alcohol 70°40 min
5. Alcohol 80°40 min
6. Alcohol 90°40 min
7. Alcohol 96°40 min
8. Alcohol 100° 1.....40 min
9. Alcohol 100° 2.....40 min
10. Alcohol Amílico 12 min
11. Alcohol Amílico 2.....2 min
12. Parafina 1.....1 h 30 min
13. Parafina 2.....1 h 30 min
14. Inclusión en cubo de parafina

Anexo 3

Técnica para Inmunohistoquímica en tejidos fijados con paraformaldehído al 2% con el Kit Vectastain Elite.

1. Xilol 1.....10 min
2. Xilol 2.....10 min
3. Hidratar (alcohol 90°, 80°, 70° y agua destilada).....10 min c/u
4. Citrato de sodio (0.01M).....Baño María hasta 90° C y dejar enfriar
5. Colocar Bloxall (Bloking solution (SP-6000)).....10 min
6. Lavar en buffer de fosfatos..... 5 min
7. Incubar en suero bloqueador.....20 min
8. Quitar exceso de suero e incubar en 1° anticuerpo 1/50 ...Toda la noche
9. Lavar en buffer de fosfatos.....5 min
- 10.Incubar 2° anticuerpo biotilnado (ABC- KIT-Elite).....1 h 30 min
11. Lavar en buffer de fosfatos..... 5 min
12. Incubar en ABC-Reagent Vectastain.....30 min
- 13.Lavar en buffer de fosfatos.....5 min
- 14.Incubar en sustrato para peroxidasa hasta cambio de color (DAB
Sustrate Kit (SK-4100))
- 15.Lavar con agua destilada
- 16.Limpiar, secar y montar con Vecta Mount (H-5000)

Anexo 4

Lista de abreviaturas

AR	Receptor androgénico
BNST	Núcleo de la base de la estría terminalis
DHT	Dihidrotestosterona
E2	Estradiol
ER α	Receptor estrogénico α
AHA	Área hipotalámica anterior
Ir-	Núcleo inmunorreactivo
McHI	Machos apareados con hembras intactas
McHO	Machos que cohabitaron con hembras ovariectomizadas
McHS	Machos apareados con hembras con salpingoclasia
MeA	Amígdala media
MPOA	Área preóptica media
T	Testosterona
VMN	Núcleo hipotalámico ventromedial