



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)**

Cambios en la expresión de sinaptofisina en machos y hembras de la especie *Microtus ochrogaster* criados en familias mono y biparentales.

TESIS:  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO (A) EN CIENCIAS

PRESENTA:  
Bíol. Rebeca Alejandra Cortés Sánchez

TUTOR  
Dra. Wendy Portillo Martínez Instituto de Neurobiología

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
Dr. Manuel Salas Alvarado Instituto de Neurobiología  
Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera Instituto de Neurobiología

Juriquilla, Querétaro, Febrero, 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

# Índice

Abreviaturas.....	4
Resumen .....	5
Abstract .....	7
1. Introducción .....	9
2. Generalidades de la especie.....	10
2.1 Formación del vínculo de pareja.....	12
2.2 Efectos de los cuidados biparentales en el topillo de la pradera.....	13
2.2.1 Componentes de la conducta maternal.....	13
2.2.2 Tipos de cuidado parental.....	14
3. Marcador de plasticidad cerebral.....	17
3.1 Plasticidad neuronal y su evaluación.....	17
3.2 Marcador de plasticidad cerebral: Sinaptofisina.....	17
4. Áreas que controlan las conductas socio-sexuales .....	20
5. Justificación .....	22
6. Hipótesis.....	23
7. Objetivo general.....	23
7.1 Objetivos particulares .....	23
8. Material y métodos.....	23
8.1 Sujetos de estudio.....	23
8.2 Pruebas conductuales.....	25
8.2.1 Prueba de preferencia de pareja.....	26
8.3 Recolección de tejido y análisis de las muestras .....	27
8.4 Inmunofluorescencia para sinaptofisina.....	27
8.6 Análisis de imágenes.....	28
8.7 Análisis estadístico.....	31
9. Resultados.....	31
9.1 Pesos el día del destete.....	31
9.2 Prueba de preferencia de pareja .....	32
9.3 Análisis densitométrico.....	33
9.4 Densitometría del bulbo olfatorio accesorio.....	33
9.5 Densitometría del núcleo accumbens .....	35
10. Discusión.....	37
10.1 Peso de las crías.....	37
10.2 Prueba de preferencia de pareja .....	39
10.3 Expresión de sinaptofisina .....	40
11. Conclusión.....	41
12. Bibliografía .....	42

## Abreviaturas

Acb: Núcleo accumbens  
ACO: Núcleo cortical de la amígdala  
AON: Núcleo olfatorio accesorio  
AVP: Arginina vasopresina  
BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro  
BNST: Núcleo basal de la estría terminal  
BOA: Bulbo olfatorio accesorio  
BOP: Bulbo olfatorio principal  
CA: Cuidados artificiales  
CA-MIN: Cuidados artificiales mínimos  
CA-MAX: Cuidados artificiales máximos  
Cort: Corticoesteroides  
CRH: Corticotropina  
CRH2R: Receptor tipo 2 a CRH  
DA: Dopamina  
DG: Giro dentado  
HBP: Hembra biparental  
HMP: Hembra monoparental  
LS: Septum lateral  
MBP: Macho biparental  
MMP: Macho monoparental  
PFC: Corteza prefrontal  
OT: Oxitocina  
OTR: Receptor a oxitocina  
PBS: buffer fosfato salino  
Pir: Corteza piriforme  
POA: Área preóptica media  
PPP: Prueba de preferencia de pareja  
ROI: Región de interés  
VAMP2: Proteína vesicular asociada a la membrana  
V1aR: Receptor a AVP tipo 1  
VMH: Hipotálamo ventromedial  
VNO: Órgano vomeronasal

## Resumen

El topillo de la pradera (*Microtus ochrogaster*) es una especie que se caracteriza por la formación de vínculo de pareja y cuidados biparentales. El cuidado biparental contribuye al desarrollo socioemocional de las crías, por lo que la ausencia del padre (cuidado monoparental) provoca alteraciones conductuales en la cría al llegar a la edad adulta, un ejemplo de esto es que los machos y hembras criados en familias monoparentales presentan un retraso en la formación de vínculo de pareja. Los mecanismos fisiológicos involucrados en esta alteración conductual no se conocen completamente. En la rata y el mono tití se ha reportado que la reducción en los cuidados maternos disminuye la expresión de sinaptofisina; una proteína que participa en la plasticidad sináptica; en estructuras límbicas incluyendo el núcleo accumbens (Acb).

El objetivo del presente estudio fue determinar si la crianza monoparental provocaba una disminución de sinaptofisina que pudiera explicar el retraso en la formación de vínculo de pareja. Se estudiaron 12 familias, siete asignadas en monoparental y cinco en biparental. Al llegar a la edad adulta a machos y hembras se les asignó una pareja aleatoria y se les permitió copular libremente por 24 horas. Al día siguiente se realizó una prueba de preferencia de pareja (PPP) con la pareja y con un topo extraño para evaluar la formación del vínculo. Posteriormente se realizó una inmunofluorescencia para sinaptofisina en el bulbo olfatorio accesorio (BOA) y núcleo accumbens.

Los resultados demostraron que los machos y hembras criados en familias biparentales pasaron más tiempo con su pareja ( $p=0.043$ ) comparado con el extraño. Los machos monoparentales mostraron una preferencia por el topo extraño ( $p=0.041$ ), mientras que las hembras no tuvieron ninguna preferencia. En el análisis densitométrico no se observaron diferencias de expresión de sinaptofisina en las capas glomerular, mitral y granular del BOA. Tampoco se observaron diferencias en el Acb. Los resultados indican que el cuidado monoparental inhibe la formación del vínculo de pareja, sin

embargo, esto no se explica por una diferencia en la expresión de sinaptofisina en el BOA y Acb.

## Abstract

Prairie voles (*Microtus ochrogaster*) is one of the few species that form lasting pair bonds and display biparental care. Biparental care contribute to socioemotional development of the pups, thus in the absence of the father (monoparental care) adult social behavior, including pair-bonding, of the pups is impaired. In other species reduction on parental care reduces the expression of synaptophysin; a protein involved in synaptic plasticity; in limbic structures including the nucleus accumbens (Acb).

Our aim was to determine whether the delay of pair-bond formation in monoparental voles is associated with a reduction in synaptophysin expression. We use 12 families assigned in monoparental (n=7) and biparental (n=5). When pups reach adulthood both males and females cohabitated and mated with an assigned partner for 24 hrs. The next day we performed a partner preference test (PPP) with their sexual partner and a strange opposite sex vole to assess pair-bond formation. We performed an immunofluorescence for synaptophysin in the accessory olfactory bulb (AOB) and Acb.

We found that as expected biparental males and females spend more time with their sexual partner ( $p=0.043$ ) rather than the strange. Monoparental voles spent more time with the strange ( $p=0.041$ ) whereas females showed no preference. The densitometric results demonstrate no significant differences in the expression of synaptophysin in the glomerular, mitral and granular layer of the AOB, or the Acb between biparental and monoparental voles. Our results demonstrate that monoparental breeding delay pair-bonding formation, though this may not be due to a reduction of synaptophysin expression in the AOB or Acb.

## **Agradecimientos**

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Instituto de Neurobiología por permitirme realizar mi posgrado dentro de sus paredes

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico que me proporcionó durante la duración de mi maestría (Becario no. 770675). Junto con los otros apoyos y donativos proporcionados CONACYT: 252756; UNAM DGAPA-PAPIIT IN202818; y Instituto Nacional de Perinatología 212250-3230-21216-05-15.

A Elsa Nydia Hernández Ríos y a la unidad de microscopia; a la Dra. Deisy Gasca Martínez y a la unidad de análisis conductual por su apoyo técnico durante el desarrollo del proyecto.

Al Dr. Francisco J. Valles Valenzuela de la biblioteca, al MVZ. José Martín García Servín y a Alejandra Castilla León, Ing. Ramón Martínez Olvera de la Unidad de Cómputo y a Ma. De Lourdes Lara Ayala de la Unidad de videoconferencia.

A Leonor Casanova Rico, por todo el apoyo y la magia que hizo para cualquier tramite necesario, de igual manera a Guadalupe Amador por ese apoyo tan necesario.

A mi comité tutor: el Dr. Manuel Salas Alvarado y el Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera por estos cuatro semestres de apoyo y enseñanzas que ayudaron a hacer de este un gran trabajo.

A la Dra. Wendy Portillo Martínez, por todo el apoyo que me proporcionó en estos dos años de maestría y durante mi titulación y proyecto de licenciatura, gracias por todo he aprendido mucho bajo su tutela.

Al Dr. Raúl Paredes por aceptarme en el laboratorio y por las enseñanzas y apoyo que me dio, sus opiniones siempre son muy valiosas y aceptadas, ¡Gracias!

A los miembros del Jurado, por la últimas aportaciones para hacer de este un trabajo mejor.

A todos los miembros del laboratorio D-11: Marie, Pau, Alex, Mariana, Analia, Marco, Guillermo, Lorena, Lili y Ángel; así como los miembros pasados y los “miembros honorarios de la unidad” por los comentarios, dudas y opiniones. Por los buenos momentos de debate (tanto intelectual como geek), por los ratos divertidos y de ocio. He aprendido mucho también con ustedes como colegas. También agradecimiento especial a Francisco Javier Camacho Barrios, sin su apoyo técnico este trabajo no se hubiera llevado a cabo.

Especial agradecimiento al exclusivo y prestigiado grupo de “los jaladores”, sin ustedes la maestría no hubiera sido mismo. Por los buenos momentos que estarán siempre en nuestra memoria, y por futuras aventuras que recordar ¡Salud!

Mas que nada quiero agradecer a mis amigos: Tania, Pau y Joseline. Con ustedes he compartido grandes experiencias, aventuras y bullying que espero duren muchos años más; definitivamente son las mejores personas que he conocido desde que me mude a Querétaro. Los quiero mucho amigos.

Finalmente; quiero agradecer a mi familia, mis padres y mis hermanos que me apoyan incondicionalmente en todo lo que me propongo. A ustedes los admiro mucho y los llevo siempre en mi corazón, los amo y les agradezco que me han convertido en la persona que soy hoy.

(Agradecimiento extra) a Julián y Oswaldo, que ha pesar de que no los vi mucho en estos dos años y me hicieron mucho falta para sobrellevar las clases siempre los tengo en mente.

## 1. Introducción

La monogamia es una estrategia reproductiva de baja frecuencia en los mamíferos, alrededor del 7% de las especies se les considera socialmente monógamos (Phelps, 2010). El sistema de monogamia social se caracteriza por la formación de un vínculo de pareja; al cual es de larga duración y conlleva a la cohabitación con la pareja, agresividad selectiva de macho y hembra posterior a la formación de vínculo hacia congéneres no familiares, cuidados biparentales y un bajo dimorfismo sexual. Sin embargo la monogamia social no asegura la exclusividad sexual (Carter et al. 1995; Kleiman, 1977; Solomon 2004).

Se han propuesto diferentes teorías que explican la aparición de la monogamia en mamíferos. La primera la propone como una respuesta a los factores ecológicos (ambientes adversos, disminución en la disponibilidad de agua y alimento, alta competencia por territorio) y factores sociales; estos incluyen una baja densidad de hembras lo cual implica una disminución en el número de hembras que defender. Otras propuestas consideran la supervivencia de las crías; la primera sugiere que la monogamia surge para evitar el infanticidio de crías no filiales; y la segunda propone elegir una pareja que participe en el cuidado de ellas y así mejorar su supervivencia (Lukas, 2013). Sin embargo, aún no se tiene claro si los cuidados biparentales son una causa o consecuencia de la monogamia.

Al igual que la monogamia los cuidados parentales son una estrategia reproductiva que puede mejorar la supervivencia de las crías, estos cuidados se pueden presentar de manera facultativa en respuesta al ambiente en el que se desarrollan las especies. Sin embargo, cuando estos cuidados se mantienen a lo largo de las generaciones e incrementan la supervivencia y adaptación de los individuos se le considera una respuesta adaptativa. Dentro del reino animal se pueden observar diferentes estrategias de cuidados parentales: cuidado monoparental, cuando la hembra o el macho cuidan de las crías; cuidado biparental, cuando ambos cuidan de las crías; y

cuidados cooperativos, que se pueden presentar por individuos familiares o por individuos no familiares que ayudan con la crianza (Royle, 2014).

Al topillo de la pradera (*Microtus ochrogaster*) se le reconoce por ser una especie socialmente monógama y que presenta cuidados biparentales, estos últimos son necesarios para el correcto desarrollo de las crías y el mantenimiento de conductas sociosexuales en su progenie; estas características lo hacen un modelo ideal para estudiar las bases neurobiológicas de la monogamia social y el cuidado biparental.

## **2. Generalidades de la especie**

El topillo de la pradera (*Microtus ochrogaster*) es un roedor del género *Microtus* con hábitos semifosoriales (forman nidos y túneles subterráneos y ocasionalmente salen a la superficie), miden alrededor de 12.7-13.9 cm y tienen un peso de 28-42 gr al llegar a la edad adulta. Se distribuyen en la región central de Norteamérica incluyendo los siguientes estados: Alberta, Ohio, Oklahoma e Illinois (Jameson, 1947; Figura 1).

Su principal dieta consiste en varias especies de pasto, tréboles y alfalfa, también pueden alimentarse de semillas secas, y en algunos casos de tallos. Durante el invierno dada la escasez de pasto se alimentan de madreleñas (Jameson, 1947).



**Figura 1. Hembra y macho de la especie topillo de la pradera (*Microtus ochrogaster*).**

Como se mencionó previamente estos animales son semifosoriales, por lo que pasan la mayor parte del tiempo bajo tierra donde forman su nido que se organiza por una red de túneles, estando el nido cubierto por las mismas plantas encontradas en su dieta básica. Estudios de campo han reportado tres épocas reproductivas durante el mes de noviembre, abril y julio; durante estos meses se reporta el mayor número de animales sexualmente maduros y hembras gestantes (Jameson, 1947).

Como esta especie se caracteriza por tener un sistema social monógamo; los machos y hembras forman un vínculo de pareja y permanecen juntos, en épocas reproductivas y no reproductivas, durante toda su vida. Una vez formado el vínculo de pareja los individuos presentan una agresión selectiva a congéneres no familiares. En condiciones naturales la mayor parte de la población (70%) se integra de familias monógamas: padre-madre-progenie; por otro lado se observan topillos que perdieron a

su pareja y que no vuelven a formar un vínculo (menos del 20% de estos animales vuelven a formar un vínculo de pareja), también se observan machos errantes los cuales una vez que alcanzan la madurez sexual abandonan el nido en busca de una pareja potencial. Carter et al. (1980) demostraron que en esta especie el estro es inducido por la presencia de un macho no familiar, estos hallazgos se demostraron al exponer hembras sexualmente inactivas al olor de un macho no familiar y sexualmente maduro por 1 hora en un periodo de 2-10 días. Así, los autores describieron que en la etapa juvenil (20 días), la exposición a sujetos machos induce un crecimiento del útero lo que sugiere un adelanto en la edad reproductiva. En contraste hembras juveniles de 50 días de edad que no son expuestas a este procedimiento no presentan estro. Esta inducción se ha observado solo con la presencia de machos no familiares dado que el olor del padre o de los hermanos no genera este efecto. En esta especie se ha observado una evitación del incesto, incluso con topillos no familiares pero con los que se mantuvo contacto físico durante la crianza (Gavish 1984, Paz y Miño 1998).

Estos comportamientos característicos de *M. ochrogaster* no se han observado en especies del mismo género (*M. pennsylvanicus* y *M. montanus*), ambas especies son polígamas por lo que no forman un vínculo de pareja, no presentan agresión específica y las crías solo reciben cuidados maternos (Insel et al. 1995). De esta manera *M. ochrogaster* puede considerarse como un buen modelo para entender las bases neurobiológicas de estas conductas sociales.

## **2.1 Formación del vínculo de pareja**

Para que se lleve a cabo la formación de vínculo de pareja en esta especie es necesario que los animales copulen por 6 horas (Getz et al 1981) ó 24 horas de cohabitación sin cópula (Winslow et al. 1993). Estudios previos han demostrado que los neurotransmisores implicados en la formación de vínculo de pareja son la arginina vasopresina (AVP, Cushing 2001), la oxitocina (OT, Johnson et al. 2017), la dopamina (DA, Lei et al. 2017) y la hormona liberadora de corticotropina (CRH, Gobrogge 2016).

Estudios comparativos han demostrado diferencias en el patrón de distribución del receptor a la AVP tipo V1a (V1aR) en topillos monógamos y polígamos en áreas cerebrales relacionadas al circuito de recompensa (Insel et al. 1994; Wang et al. 1997). También se han reportado diferencias en la distribución del receptor a OT (OTR) en áreas del cerebro involucradas en conductas de motivación y despliegue de conductas sociales: como lo son el Acb, al núcleo basal de la estría terminal (BNST), la corteza prefrontal medial (mPFC) (Insel 1992). Así mismo se ha reportado que la administración de agonistas a V1aR y OTR inhibe la formación del vínculo de pareja en *M. ochrogaster*.

Por otro lado la DA en el sistema mesocorticolímbico se ha asociado a conductas motivacionales, incluyendo la conducta sexual y su participación en la formación de memoria social y preferencia de pareja. Estos hallazgos se confirman con los trabajos de Wang (1999) quien describió inhibición en la preferencia de pareja al administrar un antagonista de los receptores a dopamina (DAR). Por el contrario cuando se usa un agonista a los receptores se facilita la preferencia de pareja.

## **2.2 Efectos de los cuidados biparentales en el topillo de la pradera**

### **2.2.1 Componentes de la conducta maternal**

Durante las primeras etapas de vida de un individuo es importante mantener un ambiente libre de factores estresantes, esto en conjunto con los cuidados paternos son necesarios para el correcto desarrollo del cerebro y la expresión de conductas sociales en la descendencia. En el caso de los mamíferos las especies socialmente monógamas y que presentan cuidados biparentales representan aproximadamente el 7% de las especies. Los cuidados desplegados por las hembras hacia las crías incluyen: la limpieza corporal, limpieza anogenital, conductas de acarreamiento y manipulación (cuando las transportan sujetándolas por el dorso), el tiempo que pasan cerca de las crías, y la postura cifótica, que consiste en colocarse sobre las crías arqueando el dorso. La frecuencia de estos cuidados varía a lo largo de los primeros

días de desarrollo y del sexo de la progenie, dado que en la rata las madres pasan más tiempo limpiando la región anogenital de las crías macho comparado con tiempo que pasan limpiando a las hembras (Moore y Morelli 1979). Kleiman (1977) reportó que las conductas de cuidado desplegadas por los machos del topillo de la pradera son los mismos (acicalamiento, limpieza y estimulación anogenital, conductas de acarreamiento de crías) y que también son necesarias para el correcto desarrollo de las crías.

### **2.2.2 Tipos de cuidado parental**

De esta manera la ausencia de uno de los padres durante las primeras etapas de vida de los individuos socialmente monógamos como el caso del topillo de la pradera (*Microtus ochrogaster*) puede tener consecuencias negativas en el desarrollo del sistema nervioso y la formación de conductas socio-sexuales de las crías. El cuidado hacia las crías no varía entre los sexos cuando los topillos tienen experiencia sexual; los hembras y machos sin experiencia sexual previa de igual manera muestran cuidados alopARENTALES, sin embargo, cuando los machos son gonadectomizados muestran un mayor cuidado alopARENTAL que las hembras ovariectomizadas. En cambio cuando las hembras son tratadas hormonalmente con estradiol los cuidados hacia las crías aumentan (Lonstein D. y De Vries G. J., 1999). Por otro lado Bales y et al. (2006) demostraron que factores estresantes como el nado forzado provoca conductas parentales sexualmente dimórficas, cuando los machos forcejean al nadar presentan la conducta de cifosis (se colocan sobre las crías y arquean la espalda hacia fuera) de manera más prolongada. Por otro lado estos mismos machos acarrear menos a las crías; además estos investigadores midieron los niveles de corticoesteroides (Cort) para corroborar el estado de estrés en los animales. Estos resultados indicaron que los machos con mayores niveles de Cort en sangre pasan más tiempo lamiendo a las crías y menos tiempo acarreándolas. Ninguna de estas diferencias conductuales fue observada en las hembras.

Ahern y Young (2009) demostraron que topillos machos y hembras criados en familias monoparentales reciben menos cuidados de limpieza a diferencia de los animales criados por ambos padres y pasan más tiempo solos en el nido; además demostraron que un menor porcentaje de hembras criadas en familias monoparentales presentan cuidados alopARENTALES dado que tardan más tiempo en acercarse a las crías, las limpian menos y pasan menos tiempo cerca de ellas; estas alteraciones no se observaron en los machos criados en familias monoparentales. También describieron con una prueba de preferencia de pareja, que machos y hembras criados solo por su madre no muestran una preferencia por su pareja después de 24 y 48 horas de cohabitación, a diferencia de los animales criados por ambos padres que muestran una preferencia hacia su pareja después de 24 horas de cohabitación. En contraste los topillos criados por familia monoparental necesitaron de una semana de cohabitación para mostrar la preferencia hacia su pareja.

En experimentos posteriores Ahern et al. (2010) describieron que machos y hembras pasan el mismo tiempo en el nido durante la crianza, además reportaron que cuando el macho es removido del nido la hembra no aumenta el tiempo que se mantiene en el nido. En este mismo experimento observaron que durante la crianza biparental los machos y las hembras coordinan el tiempo que pasan en el nido, así, el tiempo que las crías pasan solas se ve disminuido. Al analizar las conductas parentales reportaron que hay una diferencia entre la frecuencia de conductas de limpieza hacia las crías entre sexos, y en la coordinación al momento de desplegar esta conducta; de esta manera observaron que cuando los dos padres están presentes en el nido la hembra pasa más tiempo limpiando a las crías que el macho, sin embargo, cuando el macho esta solo con las crías el tiempo que pasa limpiando a las crías es el mismo que la hembra. Estos autores no observaron diferencias en la frecuencia de limpieza entre hembras con pareja y hembras sin pareja. Por último estos investigadores demostraron que el tiempo que las hembras pasan amamantando a las crías no difiere en la condición familiar en la que crecen éstas.

Tabbaa et al. (2017) señalaron diferencias en el tiempo que la hembra pasa limpiando a las crías, a su vez reportaron una diferencia en el tiempo que la hembra pasa cerca o sobre la cría (cifosis y acurrucados). No se reportaron diferencias entre el tiempo que las hembras pasan transportando a las crías ni construyendo el nido. Estos autores indican que la privación de estos cuidados altera conductas de afiliación social dado que los animales que reciben cuidados monoparentales pasan más tiempo con los animales estímulo comparados con los animales que reciben crianza biparental. Por otro lado, no se observan diferencias en la prueba de reconocimiento social ya que observaron que machos y hembras pueden discriminar entre un topillo con el que no han tenido contacto anterior y un animal al que han sido expuestos previamente. Durante los primeros días posteriores al destete se observó un incremento en la expresión de BDNF (por sus siglas en inglés: *Brain derived neurotrophic factor*), una proteína reguladora de la sinaptogénesis, y su receptor TrKB; este incremento lo asocian a un incremento en los niveles de CRH y su receptor CRH2R. Estos resultados son consistentes en ambos sexos y se sugiere que se deben a una respuesta de estrés generada por la ausencia del padre.

Otros estudios indican que cuando el macho es removido de la caja y los topillos solo reciben los cuidados maternos, las hembras tienen niveles más altos de corticosterona y de adrenocorticotrofina comparada con hembras criadas por ambos progenitores. Este cambio no se observa en sus hermanos machos. Además estos autores demostraron un decremento en receptores de glutamato así como un decremento en la expresión de BDNF en el giro dentado (DG) y las regiones CA1 y CA2 del hipocampo. Los hallazgos sugieren una alteración en eje hipotalámico-hipofisario-adrenal la cual se sugiere es la que provoca una respuesta al estrés incrementada en animales que son privados de los cuidados paternos (Wu R. et al 2014).

Estos estudios sugieren que la conducta materna no varía por el tipo de familia, por lo que la madre no puede compensar la falta del padre, y las consecuencias negativas durante el desarrollo de las crías se deben a la ausencia del cuidado paterno. Sin embargo, se desconocen los efectos que tienen los cuidados monoparentales y

biparentales sobre la plasticidad cerebral mediada por sinaptofisina durante las primeras etapas de vida de los individuos y si estos cambios persisten en la edad adulta.

### **3. Marcador de plasticidad cerebral**

#### **3.1 Plasticidad neuronal y su evaluación**

La plasticidad cerebral se define como la capacidad que tienen las neuronas y los circuitos neuronales de cambiar su estructura y función en respuesta a la experiencia (Sale et al. 2014). Hay diferentes mecanismos de plasticidad cerebral que ocurren con regularidad a diferentes escalas de tiempo; por ejemplo la sinaptogénesis, el crecimiento axonal y dendrítico, la potenciación a largo plazo y la depresión a largo plazo son eventos que se expresan en un periodo corto de tiempo; en cambio la neurogénesis y la gliogénesis son eventos de larga duración (Bruehl-Jungerman et al. 2007).

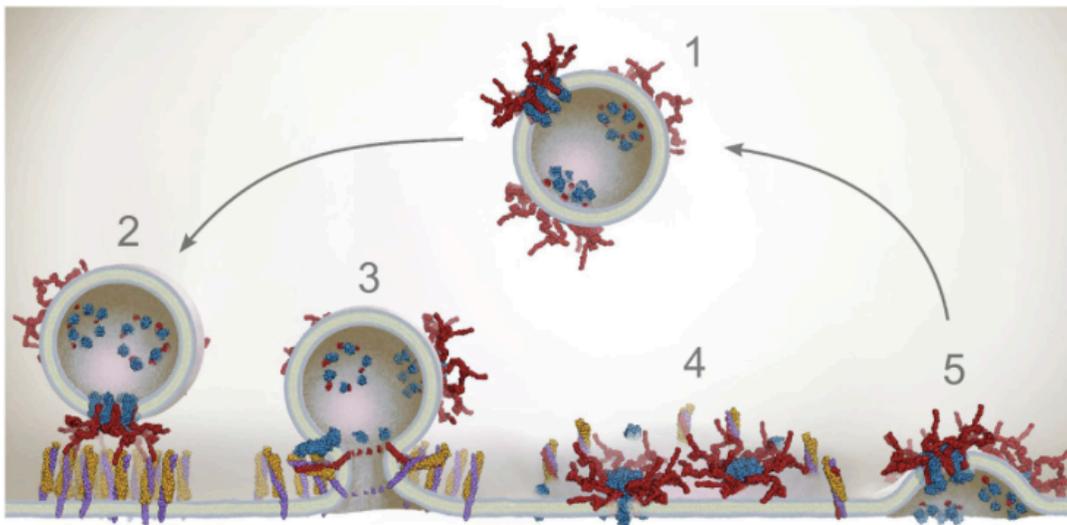
La sinaptogénesis se define como la formación de nuevas sinapsis o el remodelamiento de sinapsis existentes. Este proceso está mediado por la interacción entre las células, esta composición permite mediar la localización, composición, tamaño, y estabilidad funcional de las sinapsis nacientes. La sinaptogénesis ocurre durante el desarrollo embrionario y durante las primeras fases del desarrollo postnatal; durante la edad adulta se ha asociado este proceso con mecanismos de formación de la memoria y el aprendizaje (Waites et al. 2005).

#### **3.2 Marcador de plasticidad cerebral: Sinaptofisina**

La sinaptofisina es una glicoproteína de membrana ubicada en vesículas sinápticas del cerebro, la médula espinal y la retina (Gould V et al., 1986; Figura 2). Se ha propuesto que esta proteína modula la unión de calcio a las vesículas sinápticas, regulando la liberación de neurotransmisores dependientes de calcio (Rehm, Wiedenmann, y Betz,

1986). Wiedenmann y Frank (1985) reportaron que esta proteína se expresa en las vesículas sinápticas en la gran mayoría de la sinapsis, posteriormente Knaus et al. (1986) corroboraron estos hallazgos y demostraron la expresión de sinaptofisina en cerebro, cerebelo, tallo cerebral, médula oblongada y médula espinal. De igual manera estos autores reportaron que la expresión de esta proteína se incrementa a lo largo del desarrollo postnatal.

La actividad de esta proteína se ha asociado principalmente con la plasticidad sináptica. Cabe mencionar que esta proteína tiene una función redundante por lo que se han reportado otras proteínas que participan regulando este fenómeno como lo son la proteína de densidad postsináptica (PSD-95), sinaptofilina, entre otras. Nithianantharajh et al. (2004) demostraron que en ratones que crecen en ambientes enriquecidos con objetos para jugar y hacer ejercicio (pelotas, escaleras, ruedas para correr, etc.) tienen una mayor expresión de sinaptofisina en el hipocampo, el tálamo y el hipotálamo.



**Figura 2.** 1: En la membrana vesicular se observa un complejo formado por sinaptofisina (azul) y VAMP2 (por sus siglas en inglés *vesicle associated membrane protein*, rojo). 2: Este complejo se une a la membrana por las proteínas de anclaje del complejo t-SNARE; la sintaxina-1 (morado) y la SNAP-25 (amarillo). 3: Una entrada de  $Ca^{2+}$  provoca la separación del complejo SNARE y

**disocia el complejo SYP-VAMP-2 lo que permite la fusión de las membranas y la liberación del neurotransmisor. 4. El complejo SNARE, las sinaptofisina y el complejo SYP/VAMP2 forman un parche en la membrana. 5. El complejo SYP/VAMP-2 se vuelve a formar.**

Estudios previos han demostrado los efectos de la condición de crianza sobre la expresión de sinaptofisina. Chaterjee et al. (2007) compararon la expresión de sinaptofisina en ratas macho que fueron aisladas del nido de crianza y recibieron cuidados artificiales (CA) y el alimento necesario por medio de una cánula insertada en la mejilla. Posteriormente se dividieron los animales en dos grupos: los animales que recibieron cuidados mínimos (CA-MIN), que consistían en dos limpiezas anogenitales al día; y el grupo de cuidados máximos (CA-MAX), que consistían en dos limpiezas anogenitales y ocho estimulaciones táctiles al día; el estudio fue complementado con dos grupos control que fueron criados por la madre (MR, por sus siglas en inglés): MR-Control y MR-Sham, el cual tenía la cánula en la mejilla, en ambos casos los animales permanecieron en el nido con su madre y hermanos. Entre los dos grupos control no se observaron diferencias en la expresión de sinaptofisina, por otro lado, los autores reportaron que el aislamiento del nido (CA-MIN y CA-MAX) y por ende la disminución de cuidados maternos disminuyó significativamente la expresión de esta proteína en la corteza prefrontal, hipotálamo y amígdala en los machos que reciben pocas estimulaciones táctiles (CA-MIN). Asimismo cuando se incrementa el número de estimulaciones artificiales (CA-MAX) incrementa la expresión de sinaptofisina comparado con el grupo CA-MIN sin embargo presenta niveles más bajos que los individuos criados por la madre.

Por otro lado, Law et al. (2009) realizaron un experimento en monos tití, especie que se caracteriza por conducta monógama y cuidados biparentales. Los autores demostraron que separar a las crías de sus padres durante la fase de amamantamiento por intervalos cortos (30-120 min) no disminuye los niveles del mRNA para sinaptofisina. Sin embargo, los autores observaron una correlación negativa entre la expresión de sinaptofisina en giro dentado, y los niveles de noradrenalina en orina que se elevaron

en el grupo de animales con privación de cuidados parentales, lo que trabajos previos han asociado con conductas depresivas en la edad adulta.

Estos estudios en conjunto sugieren que el cuidado parental y las condiciones de crianza tienen un efecto en la expresión de sinaptofisina en áreas relacionadas al despliegue de conductas socio-sexuales.

#### **4. Áreas que controlan las conductas socio-sexuales**

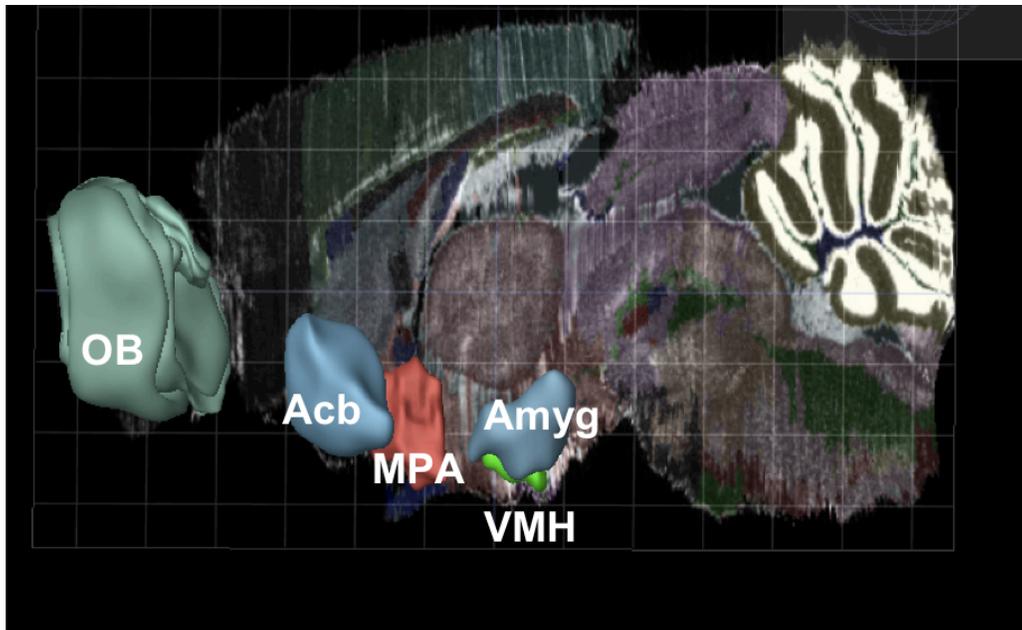
El despliegue de las conductas socio-sexuales es necesario para la supervivencia de las especies sociales; estas incluyen la formación de vínculo de pareja, los cuidados biparentales, y las conductas sexuales. Esta última tiene dos componentes: las conductas proceptivas (conductas que involucran búsqueda de pareja), las conductas receptivas (lordosis en hembras; montas, intromisiones y eyaculación en machos) (Beach, 1976).

El sistema olfatorio modula la expresión de conductas sociosexuales en machos y hembras, este puede dividirse en dos circuitos: el sistema olfatorio principal, formado por el epitelio olfatorio y el bulbo olfatorio principal (BOP) con proyecciones al núcleo accesorio olfatorio (AON, por sus siglas en inglés), la corteza piriforme (Pir, del inglés) y el núcleo cortical de la amígdala (ACO, por sus siglas en inglés) el cual proyecta al hipocampo, a la Pir y a la ME. Este sistema se encarga principalmente de la detección de moléculas volátiles, y está involucrado en el procesamiento de olores relacionados al alimento y sexualmente relevantes. Por otra parte, el sistema olfatorio accesorio, formado por el órgano vomeronasal (VNO, por sus siglas en inglés) y el bulbo olfatorio accesorio (BOA, por sus siglas en inglés) proyecta a la ME, esta estructura a su vez establece conexiones sinápticas con el núcleo basal de la estría terminal (BNST, por sus siglas en inglés), al área preóptica (POA, por sus siglas en inglés) y el hipotálamo ventromedial (VMH, por sus siglas en inglés). El sistema olfatorio accesorio se encarga principalmente de la detección de moléculas no-volátiles y está involucrado preponderantemente en conductas reproductivas y agresivas (revisado en Mucignat-

Carretta C 2010; Figura 3).

Además, el sistema olfatorio es necesario para el reconocimiento de sujetos familiares como las crías, animales con los que se ha cohabitado o con los que se ha copulado. En el caso de las hembras después de la cópula ocurre un proceso de aprendizaje durante las 4 horas posteriores; durante esta etapa se genera un incremento en la expresión de noradrenalina que inhibe la inhibición mediada por GABA lo que mantiene la actividad de las células mitrales que a su vez mantienen inhibidas a las células granulares. Esta inhibición se considera selectiva ya que activa una población de células mitrales/granulares específicas que responden al mismo estímulo (ej: el olor del macho). Cuando se presenta el mismo macho o secreciones de este a la hembra el circuito tiene una respuesta excitatoria, sin embargo, cuando se presenta el olor de otro macho se activará una nueva población de células mitrales por lo que el mismo proceso no se repetirá (Brennan 2004).

En la formación del vínculo de pareja se ha reportado que se activa la corteza PFC, el núcleo accumbens (Acb) y en el caso de los machos el septum lateral (LS). Se ha descrito que en estas áreas además existe una alta densidad de receptores a oxitocina y dopamina comparado con otros roedores del género *Microtus* que no presentan un modelo de apareamiento socialmente monógamo (revisado en Lieberwith & Wang, 2016).



**Figura 3.** El sistema de proyección olfatorio es necesario para el despliegue de conductas socio-sexuales, las áreas que forman este sistema de proyección son el bulbo olfatorio (OB, principal y accesorio), núcleo acumbens (Acb), área preóptica (MPA), el hipotálamo ventromedial (VMH) y la amígdala (Amyg). Imagen obtenida con *Brain Explorer 2* (V. 2.3.5; *Allen Institute*).

## 5. Justificación

Los cuidados parentales durante las primeras fases del desarrollo son necesarios para el desarrollo cognitivo, psicológico y social de los individuos; dado que este periodo es crítico para el refinamiento de circuitos cerebrales relacionados con la conducta. Por el momento se desconocen los cambios plásticos inducidos por la crianza y biparental, en nuestra especie este tipo de estudios se limita debido a la complejidad de nuestro sistema nervioso y los diferentes factores que influyen en el desarrollo además de las cuestiones éticas. Por estas razones, es necesario contar con un modelo animal para poder evaluar las alteraciones que provocan la ausencia del padre. En este sentido, el topillo es un modelo adecuado ya que provee de cuidados biparentales a su progenie. En este estudio se evaluó si la ausencia del cuidado paterno decremente la expresión

de la proteína sinaptofisina; nos enfocamos en dos áreas de interés: en primer lugar el BOA por su importancia en el reconocimiento y elección de pareja y en segundo lugar el Acb por su importancia en la formación del vínculo de pareja en esta especie. Evaluamos si existe una correlación entre la expresión de estas proteínas y las alteraciones en la formación de vínculo de pareja cuando los individuos llegan a la edad adulta.

## **6. Hipótesis**

Los topillos criados por familias monoparentales presentarán una menor expresión de la proteína sinaptofisina en el BOA y el Acb después de la formación del vínculo de pareja.

## **7. Objetivo general**

Evaluar las diferencias en la formación de vínculo de pareja en topillos de la pradera criados en condiciones monoparentales y biparentales.

### **7.1 Objetivos particulares**

- 1) Evaluar la formación de vínculo de pareja en topillos de la pradera criados en familias monoparentales y biparentales.
- 2) Evaluar los cambios plásticos mediante la expresión de sinaptofisina en topillos de la pradera criados en familias monoparentales y biparentales en el BOA y el Acb.

## **8. Material y métodos**

### **8.1 Sujetos de estudio**

Se utilizaron 12 machos y 12 hembras de topillos de la pradera (*Microtus ochrogaster*), los animales fueron criados en el bioterio del Instituto de Neurobiología de la UNAM. La F0 de la colonia utilizada es originaria de Urbana, Illinois y fue proporcionada por el Dr. Larry Young. Los animales se colocaron en un cuarto exclusivo para topillos con un ciclo de 14 horas luz/ 10 horas oscuridad y tuvieron acceso a comida para conejo (Rabbit Chow, Purina Lab Chows, Cat 5321), semillas de girasol, avena y agua *ad libitum*. Los animales seleccionados tenían entre 3-4 meses de edad y fueron sexualmente inexpertos. Las hembras fueron expuestas a aserrín impregnado con secreciones de sujetos macho durante seis días para inducir la receptividad sexual. Al terminar este periodo se les asignó un macho no familiar como pareja y se les permitió copular.

En el día 18 después de la cópula se seleccionaron siete de las parejas al azar para formar las familias monoparentales; en éstas se removió al macho de su caja hogar para asegurar que no estuviera presente durante los últimos días de gestación ni el día de parto; de igual manera el macho estuvo ausente durante toda la crianza. En el caso de las familias biparentales (n=5) el macho permaneció durante toda la gestación de la hembra y hasta el día de destete. Las crías fueron separadas el día postnatal 21.

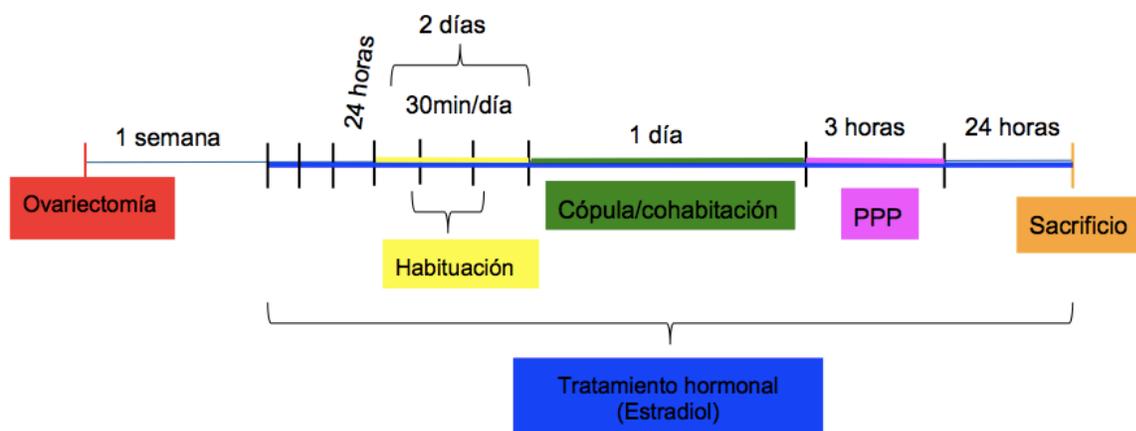
El día del nacimiento se cuantificó el número de crías que nacieron por familia, de las familias monoparentales se obtuvieron 32 crías y de las familias biparentales se obtuvieron 24 crías. Los animales no recibieron ningún tipo de manipulación desde el día de nacimiento hasta el día del destete. El día del destete se agruparon por sexo y pesaron, posteriormente se colocaron en cajas hogar para machos y hembras (de la misma condición experimental) con comida y agua *ad libitum*. En total se obtuvieron 16 hembras y 11 machos monoparentales y de las familias biparentales se obtuvieron 13 hembras y 10 machos.

Todos los protocolos y experimentos fueron aprobados por el Comité local de bioética del Instituto de Neurobiología de la UNAM, que están acordes con la norma NOM-062-ZOO-1999 de la SAGARPA.

## 8.2 Pruebas conductuales

A los tres meses de edad a las hembras (experimentales y estímulo) se les realizó una ovariectomía bilateral, se les inyectó 0.1 ml de anestesia (3 ml ketamina, 1ml xilazina, 6ml solución salina) y se permitió una semana de recuperación; los machos permanecieron gonadalmente intactos.

Para inducir la receptividad en las hembras durante todo el experimento se administraron 8 inyecciones de estradiol (10µg/kg con aceite vegetal como vehículo) cada 24 horas. Posteriormente para la formación de vínculo de pareja los animales experimentales fueron colocadas con un topillo del sexo opuesto, criado en el bioterio e independiente del experimento, de 3-4 meses sin experiencia sexual previa. Las parejas formadas fueron observadas durante la primera hora para asegurar que las hembras desplegaran conductas receptivas (lordosis) y en el caso de los machos que montaran e intrometieran a las hembras, después de esa hora se les permitió continuar cohabitando por 24 horas. Al siguiente día se realizó la prueba de preferencia de pareja (Figura 4).



**Figura 4: Cronograma experimental; a los tres meses de edad las hembras experimentales y estímulo fueron ovariectomizadas (caja roja) y se les dejó una semana en recuperación. Las hembras recibieron un tratamiento hormonal de benzoato de estradiol (caja azul) al terminar la semana de recuperación y hasta**

**terminar el experimento cada 24 horas. Los machos y hembras fueron habituados a la caja de preferencia de pareja durante dos días durante media hora cada día (caja amarilla); después de la habituación se les asignó una pareja no relacionada familiarmente y se les permitió cohabitar y copular durante 24 horas (caja verde). Al siguiente día se realizó la prueba de preferencia de pareja (PPP, caja rosa) y fueron sacrificados 24 horas después de la prueba.**

### **8.2.1 Prueba de preferencia de pareja**

A los tres meses de edad se realizó la prueba de preferencia de pareja (PPP); para esta prueba se utilizó una caja con tres compartimentos (Figura 5); un compartimento neutro (40x55x30 cm) y dos compartimentos externos a ambos lados de la caja (11x12.5x10 cm). Previo a la prueba los animales experimentales fueron habituados a la caja de PPP colocando al animal experimental en el compartimento central para que explorara libremente, la habituación se realizó por 30 minutos los dos días previos a la prueba. Durante la prueba el topillo experimental se colocó en el compartimento central de la caja, y en los compartimentos laterales se colocaron el animal con el que copuló y cohabitó previamente (pareja) y en el otro extremo se colocó un topillo del sexo opuesto con el que no se tuvo ningún tipo de contacto previo, y se cuantificó el tiempo que pasó en cada extremo de la caja. Los animales fueron sacrificados 24 horas después de la prueba conductual.



**Figura 5. Caja utilizada para la prueba de preferencia de pareja.**

### **8.3 Recolección de tejido y análisis de las muestras**

El día del sacrificio los animales recibieron una sobredosis de pentobarbital y se realizó una perfusión intracardiaca con PBS (buffer fosfato salino, pH 7.4) y paraformaldehído (4%). Los cerebros fueron recolectados y post fijados por una hora en paraformaldehído, después fueron crioprotectados en sacarosa al 30% por una semana. Se realizaron cortes de 30 $\mu$ m y se recolectó el BOA y el Acb.

### **8.4 Inmunofluorescencia para sinaptofisina**

Los cortes fueron montados en porta objetos superfrost (*Blue Color Frost Plus Slide*, cat # 5951PLUS-006, LOT # 091114-9) y se mantuvieron 24 horas a 4°C en cuarto frío para que los cortes quedaran fijados al portaobjeto. El primer día de la inmunofluorescencia los cortes fueron lavados cuatro veces con PBS (0.1M, pH 7.2). Posteriormente se realizó un lavado con PBS con borohidrato de sodio (0.05% por 15 minutos, se realizaron otros 3 lavados con PBS y después un lavado de 30 minutos de PBS y peróxido de hidrógeno al 0.3%. A partir del siguiente lavado se les agrego tritón (Tx100) a todos los lavados con PBS el primer lavado con tritón se utilizó al 1% y

posteriormente se realizaron tres lavados con PBS y tritón al 0.1% de 3 minutos cada uno. Al finalizar los lavados con tritón se realizó un bloqueo con albumina (1%) por 30 minutos. Finalmente los cortes fueron incubados en anticuerpo primario *polyclonal rabbit* anti-sinaptofisina H-93 (1:1200) con albumina (1%) 1 hora a temperatura ambiente y durante toda la noche a 4°C en agitación.

El segundo día se realizaron 4 lavados con PBS y tritón con una duración de 3 minutos por lavado, posteriormente se realizó un bloqueo con albumina al (1%). Después del bloqueo los cortes fueron incubados con anticuerpo secundario anticonejo biotilado (VECTOR BA-1000, 1:400) con albumina al 2% por dos horas. Al finalizar la incubación con el anticuerpo secundario se realizaron 4 lavados con PBS y tritón. Después se incubaron los cortes con ABC (Complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa, Vectastain) por 45 minutos y se realizaron 3 lavados con PBS y tritón.

A partir de este paso los cortes se pasaron a un cuarto oscuro y se incubaron en un kit de amplificación TSA-Cy3 (NEL74401KT, 1:100) por 10 minutos, se realizó otro lavado de PBS y tritón y posteriormente se incubaron con Hoechst (1:1000) para marcar los núcleos de las células. Finalmente se realizó un último lavado de PBS y tritón durante toda la noche. Al otro día se colocó aquamont a los cortes y se cubrieron con cubreobjetos.

## **8.6 Análisis de imágenes**

Se obtuvieron fotomicrografías de las regiones de interés con el microscopio confocal LSM700 en el programa Zen Black (ver. 2012) con el objetivo 20x. Se utilizó el laser 555 para obtener la señal de sinaptofisina con una ganancia de 370-420. Para obtener la señal de Hoechst se utilizó el láser 405 y una ganancia de 630-650.

A las imágenes obtenidas se les realizó un análisis densitométrico con el programa Axiovision (ver. 4.8.0.0), para esto se seleccionó la región de interés (*ROI*, por sus siglas en inglés) y el programa analizó de manera automática la intensidad de señal por

$\mu\text{m}^2$  del canal rojo (el correspondiente a sinaptofisina). El análisis se realizó en las capas glomerular, mitral y granular del BOA y en las regiones core y shell del Acb (Figura 6).

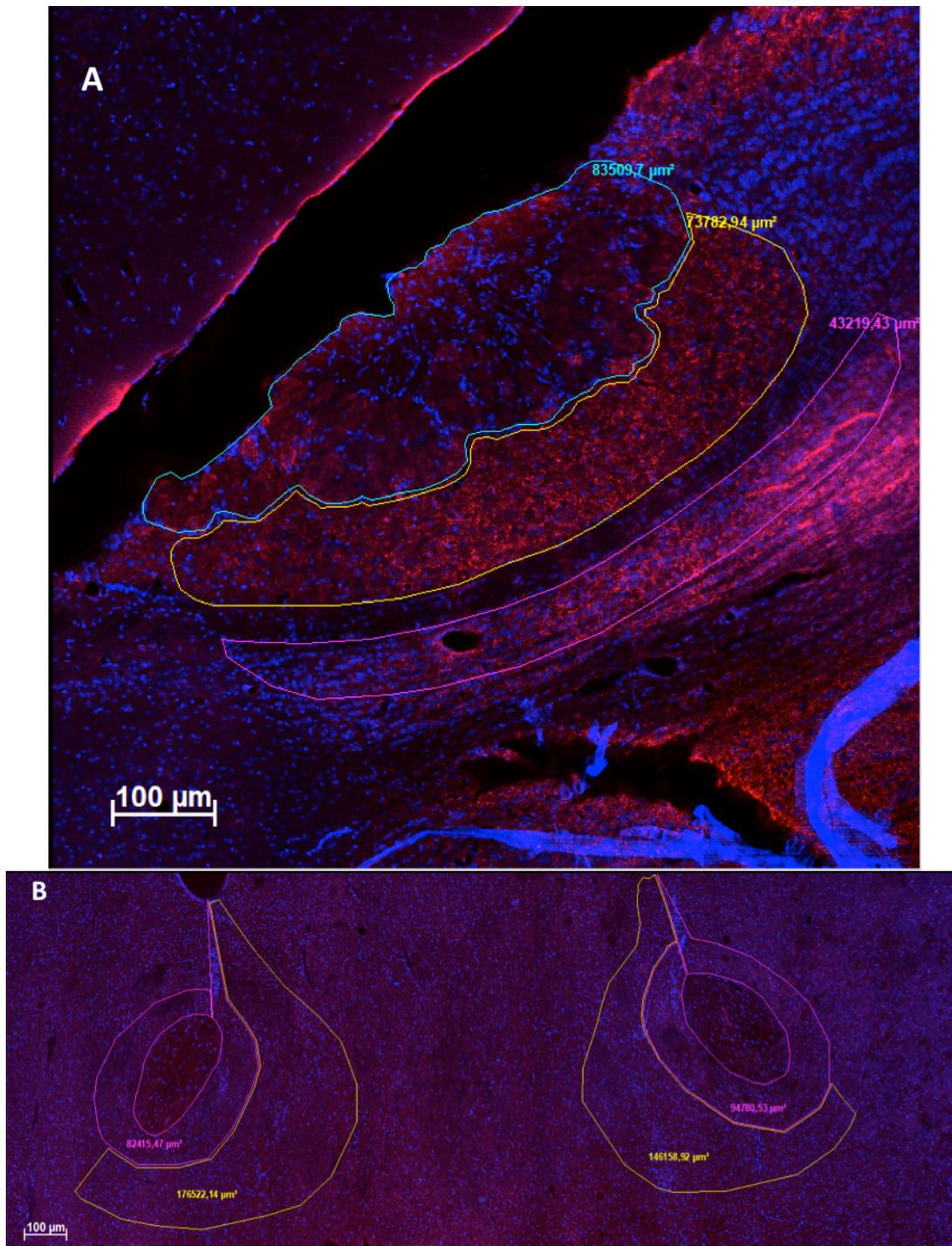


Figura 6. Representación de análisis densitométrico en el bulbo olfatorio accesorio (A) y núcleo accumbens (B). En la figura A se pueden distinguir las tres capas del bulbo olfatorio: en azul la capa glomerular, en amarillo la capa mitral y el magenta la capa granular. En la figura B se pueden distinguir en magenta la región “core” y en amarillo la región “shell” del núcleo accumbens.

## **8.7 Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico se utilizó el programa SigmaPlot (v. 13.0), se realizó la prueba de normalidad Shapiro-Wilk. Los datos obtenidos para el peso de las crías y las pruebas de preferencia de pareja pasaron la prueba de normalidad; por lo que se realizó una prueba de análisis de varianza.

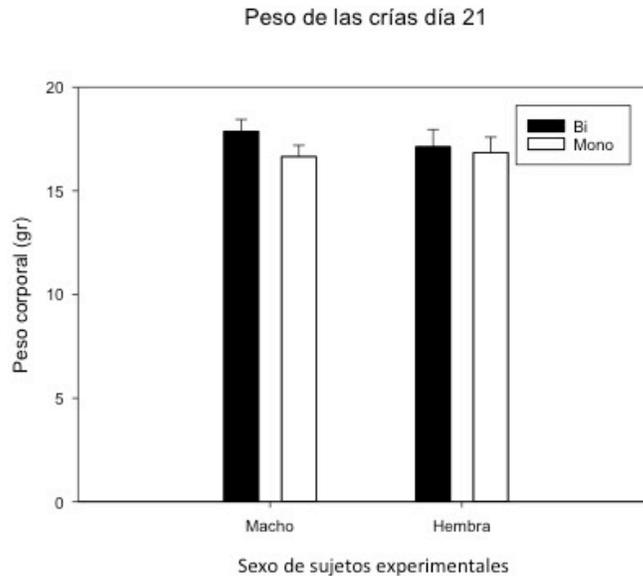
Por otro lado los datos obtenidos para el análisis densitométrico no pasaron la prueba de normalidad; por lo que se utilizó una prueba de Kruskal-Wallis.

## **9. Resultados**

### **9.1 Pesos el día del destete**

Las crías fueron separadas de la caja familiar el día postnatal 21, se pesaron para evaluar si el tipo de familia en el que se criaron (condición monoparental o biparental) afectó su peso corporal.

Se realizó una prueba de ANOVA de dos vías; el análisis estadístico no mostró diferencia entre el peso de las crías y la condición de crianza que los animales recibieron ( $F=0.19$   $p=0.7$ ). Tampoco se reportó diferencia en el peso entre machos y hembras ( $F=0.16$ ;  $p=0.7$ ). Figura 7.

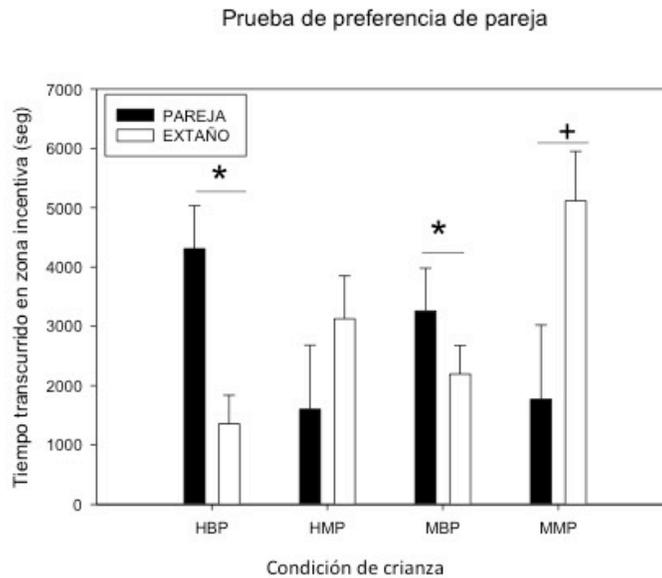


**Figura 7. Peso de las crías monoparentales (MP) y biparentales (BP) a los 21 días de edad. La condición de crianza no alteró el peso de las crías el día del destete en machos (M,  $p=0.145$ ) ni en hembras (F,  $p=0.818$ ).**

## 9.2 Prueba de preferencia de pareja

Para la PPP se excluyeron tres animales por problemas en el archivo durante la grabación, al resto de los animales se les hizo una prueba de normalidad, los datos pasaron la prueba de normalidad ( $p=0.8$ ) y posteriormente se realizó una ANOVA de dos vías. Se observaron diferencias significativas en el tiempo que los animales pasaron en cada zona incentiva. Los machos y hembras criados en condiciones monoparentales pasaron más tiempo en la zona incentiva de los animales extraños que los animales criados en condiciones biparentales ( $F=17$ ,  $p=0.001$ ); también se observó una preferencia hacia el topo extraño en los machos criados en condiciones monoparentales pero esta preferencia no se observó en las hembras criadas en las mismas condiciones ( $F=6.3$ ,  $p=0.016$ ). Por otro lado, los resultados demostraron que los machos y hembras criados en condiciones biparentales pasaron más tiempo en zona incentiva de su pareja que los animales criados en familias monoparentales

( $F=4.9$ ,  $p=0.03$ ); no se observaron diferencias entre el tiempo que pasaron las machos y hembras en la zona incentivada de la pareja ( $F=1.02$ ,  $p=0.3$ ). Figura 8.



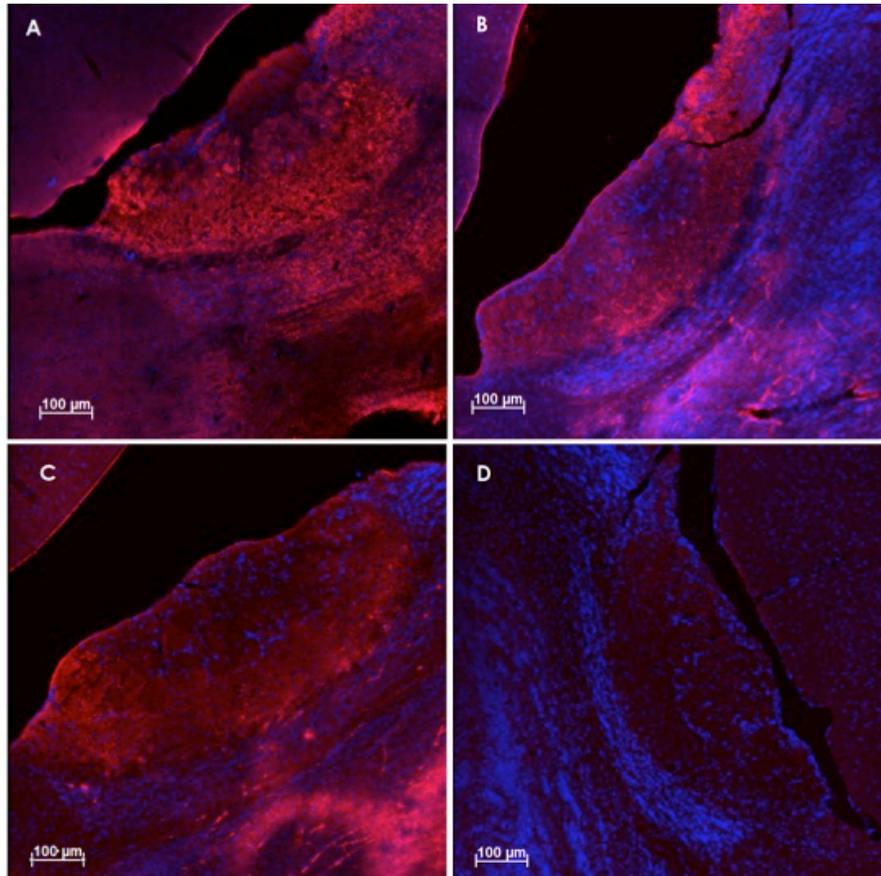
**Figura 8. Prueba de preferencia de pareja. Se registró el tiempo que paso cada animal en la zona incentivada. Las hembras (HBP) y los machos (MBP) biparentales mostraron una preferencia por su pareja (\*). Los machos monoparentales (MMP) mostraron una preferencia por la hembra extraña (+).**

### 9.3 Análisis densitométrico de la intensidad de la señal positiva para sinaptofisina

### 9.4 Densitometría del bulbo olfatorio accesorio

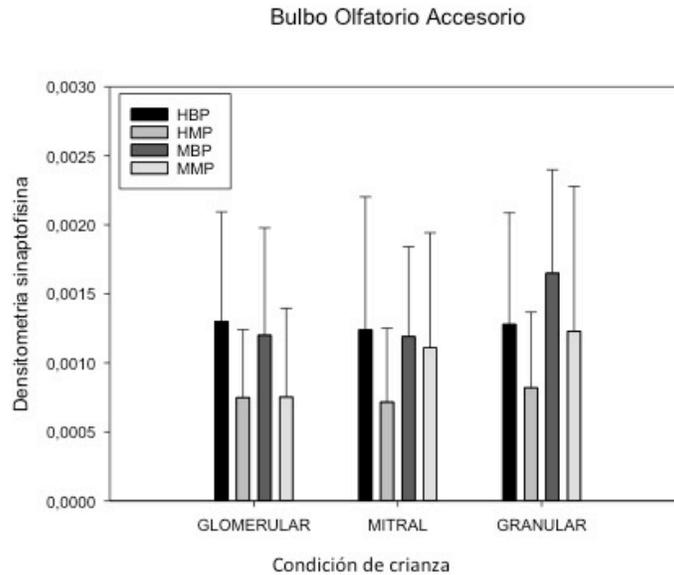
Dado que los datos no pasaron la prueba de normalidad se hizo una prueba Kruskal-Wallis para evaluar las diferencias entre los grupos. Se evaluó el efecto de la crianza en machos y hembras por separado. Como se mencionó previamente se realizó un

análisis densitométrico en tres regiones de interés del BOA: la capa glomerular, la capa mitral y la capa granular. Figura 9.



**Figura 9. Inmunofluorescencia para sinaptofisina del bulbo olfatorio accesorio. A: hembra criada en familia biparental, B: hembra criada en familia monoparental, C: macho criado en familia biparental, D: macho criado en familia monoparental.**

En la capa glomerular no se encontraron diferencias significativas entre las hembras criadas en familias biparentales y monoparentales ( $p=0.07$ ). Los machos monoparentales y biparentales tampoco mostraron diferencias significativas ( $p=0.26$ ). Figura 10.



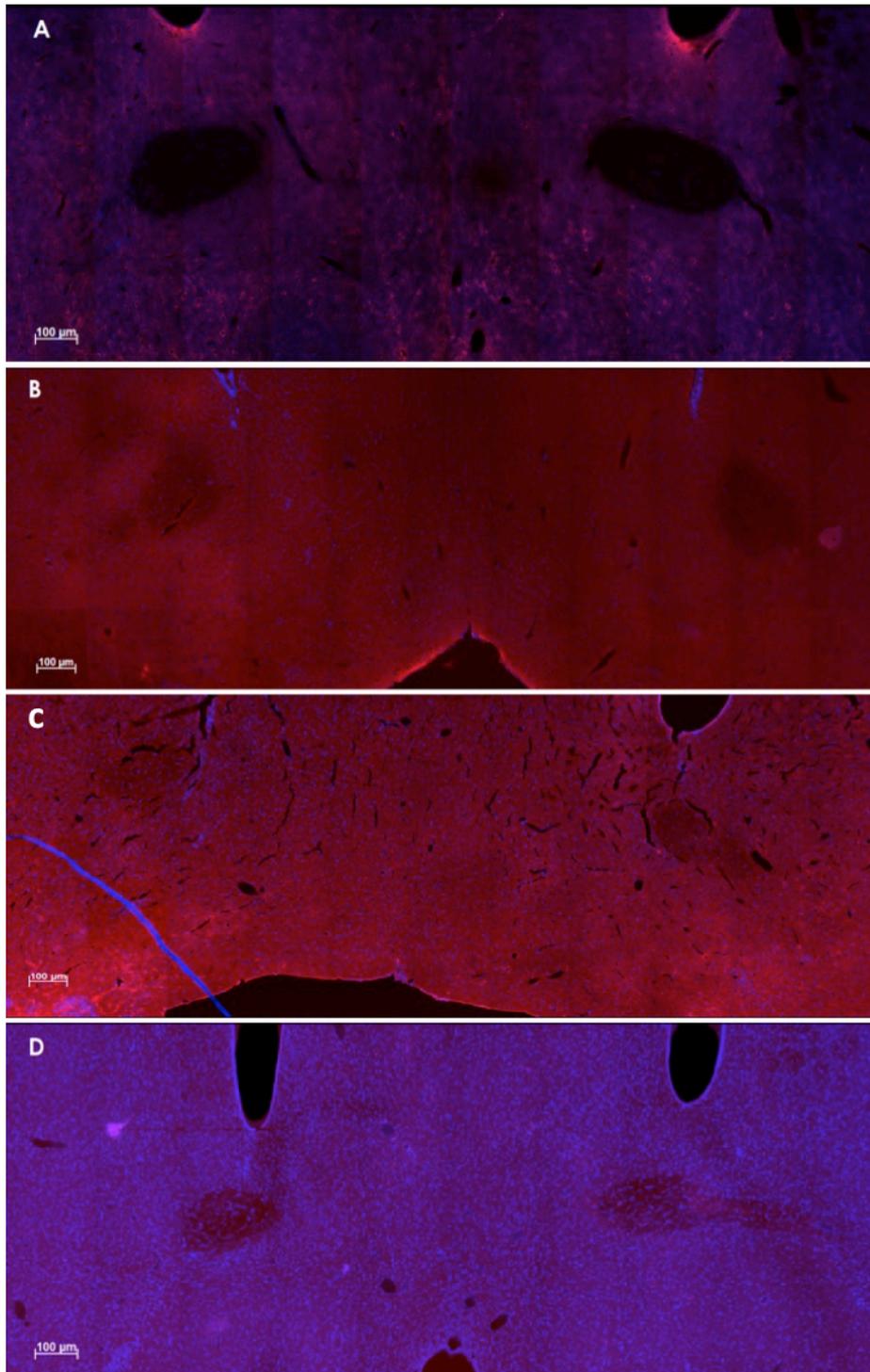
**Figura 10. Densitometría en las capas glomerular, mitral y granular del BOA en hembras mono (HMP) y biparentales (HBP) y en machos mono (MMP) y biparentales (MBP).**

En la capa mitral no se observaron diferencias significativas en las hembras criadas en familias biparentales y monoparentales ( $p=0.054$ ). De manera similar no se observaron diferencias significativas en los machos biparentales y monoparentales ( $p=1.000$ ).

En la capa granular no se encontraron diferencias significativas en la expresión de sinaptofisina en las hembras criadas en familias biparentales y monoparentales ( $p=0.121$ ) ni en los machos ( $p=0.9$ ). Figura 10.

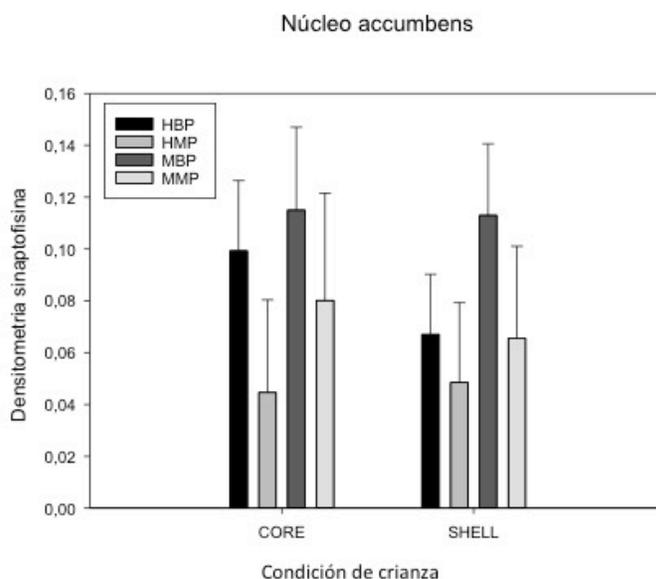
### 9.5 Densitometría del núcleo accumbens

Los datos de la densitometría del núcleo accumbens no pasaron la prueba de normalidad por lo que se realizó una prueba Kruskal-Wallis. Se comparó la expresión de sinaptofisina en animales criados en familias biparentales y monoparentales. Los machos y hembras fueron analizados por separado.



**Figura 11. Inmunofluorescencia para sinaptofisina del núcleo accumbens. A: hembra criada en familia biparental, B: hembra criada en familia monoparental, C: macho criado en familia biparental, D: macho criado en familia monoparental.**

No se encontraron diferencias significativas en la región core del núcleo accumbens entre hembras monoparentales y biparentales ( $p=0.461$ ) y en machos monoparentales y biparentales ( $p=0.461$ ). Figura 11 y 12.



**Figura 12. Densitometría de la región “core” y “shell” del núcleo accumbens. Se observó una disminución no significativa en hembras monoparentales (HMP) y en machos monoparentales (MMP).**

Para la región shell no se encontraron diferencias significativas en la expresión de sinaptosina en hembras y machos monoparentales y biparentales ( $p=0.590$  y  $p=0.590$ , respectivamente). Figuras 11 y 12.

## 10. Discusión

### 10.1 Peso de las crías

Como se ha mencionado previamente las primeras etapas de crianza son importantes para el desarrollo de los animales; en el caso de los humanos, el topillo de la pradera y otras especies de crianza biparental la participación de ambos padres es esencial para el correcto desarrollo social y fisiológico de las crías.

La presencia de los dos padres asegura que las crías pasen menos tiempo solas y expuestas en el nido y facilita que las crías reciban más estimulaciones de contacto y de acicalamiento, esto debido a la coordinación que tienen el macho y la hembra (Ahern y Young, 2011). Estudios previos han demostrado que la madre no compensa la ausencia del macho por lo que estas crías reciben menos cuidados y pasan más tiempo solas; la ausencia del cuidado paterno tiene como consecuencia complicaciones en el desarrollo de las crías; estas pueden variar desde un menor peso al nacer, mayor estrés para las crías dado que presentan un incremento en la expresión de CRH (Tabbaa et al, 2017). Por último, se ha reportado que la crianza monoparental altera conductas socio sexuales cuando los individuos llegan a la edad adulta como la formación de vínculo de pareja, disminución en conductas parentales y aloparentales (Ahern y Young, 2009).

Nuestros datos no muestran diferencias en los pesos de machos ni de las hembras independientemente de la condición familiar en la que se criaron, estos resultados contradicen los resultados obtenidos por Ahern y Young (2009) que reportaron un peso menor en las crías monoparentales. En este caso los autores homogenizaron las camadas de ambos grupos asegurando que cada familia tuviera entre 2-4 crías, en nuestro caso las familias se dejaron intactas y reportamos una variabilidad de 2-7 crías; nosotros sugerimos que la competencia entre hermanos en el tiempo que pasan amamantando puede explicar la falta de diferencias dada la variabilidad en el número de crías por familia, sin embargo no medimos el tiempo que cada cría pasó alimentándose. En un trabajo posterior Ahern y Young (2011) reportaron que las diferencias entre el peso de crías monoparentales y biparentales no se debe al tiempo que pasan las crías amamantando, a pesar de que ambas madres alimentan a sus crías. Se desconoce si la calidad nutricional de la leche es la misma.

Por otro lado Tabba et al. (2017) reportaron un menor peso en los machos criados en condiciones monoparentales comparado con hembras criadas en ambas condiciones, estos autores no hacen mención de homogenizar el número de crías por familia por lo que no podemos determinar si este fue un factor que influyó en estas diferencias; a discrepancia de nuestra condición experimental los padres de las familias monoparentales fueron removidos el día postnatal 1 por lo que las interacciones entre la madre y el padre durante los últimos días de gestación pueden tener un efecto en el desarrollo de las crías. Otro aspecto que vale la pena considerar es la disminución en conductas de acicalamiento que reciben las crías monoparentales y el incremento en el tiempo que pasan solas; estudios previos demuestran la relación entre el desarrollo y la expresión de hormona del crecimiento inducida por los estímulos térmicos y táctiles (Sayler A. y Salmon M., 1969)

## **10.2 Prueba de preferencia de pareja**

Una de las características principales de esta especie es la formación del vínculo de pareja, esta especie se caracteriza por ser altamente sociable hasta la formación del vínculo cuando se observa una agresión selectiva hacia otros congéneres. La crianza monoparental altera las conductas sociales cuando los individuos son adultos presentan un retraso para formar un vínculo de pareja; nuestros resultados demostraron que los animales criados solo por su madre no demostraron una preferencia hacia su pareja después de 24 horas de cohabitación con cópula. Estos resultados replican los reportados por Ahern y Young (2009, 2011), estos autores demostraron que la formación del vínculo requiere más de 48 horas de cohabitación para formarlo. Nuestro experimento se redujo a 24 horas ya que otros autores reportan que 24 horas de cohabitación son suficientes para formar el vínculo en cuidados biparentales. Por otro lado, Tabba et al. (2017), también reportaron que los individuos criados en condiciones monoparentales incrementan conductas de afiliación social lo que indica que estos animales son más sociables y no demuestran agresión selectiva; además demostraron que la crianza monoparental no afecta el reconocimiento social,

lo que indica que a pesar de que los animales pueden identificar al congénere con el que cohabitaron previamente no lo prefieren sobre un animal desconocido.

Nuestros resultados demostraron que los machos criados en condiciones monoparentales pasan más tiempo explorando a los animales desconocidos, este dato contradice los trabajos anteriores, aunque estos datos pueden sugerir un incremento en exploración social y menor agresividad por parte de estos machos como lo menciona Tabbaa ellos no observaron preferencia por ninguna de las hembras y el tiempo de exploración fue similar entre hembras conocidas y hembras desconocidas. Blocker y Ophir (2015) compararon el reconocimiento social en machos “solteros” y machos después de formar el vínculo de pareja, lo que estos autores reportaron fue que los machos con vínculo presentan un reconocimiento social mientras que los machos solteros no mostraron un reconocimiento social por las hembras por lo que sugieren que después de la formación de pareja se desarrolla un aprendizaje social, es posible que los machos criados en familia monoparental sean capaces de discriminar entre una hembra conocida y una hembra desconocida sin embargo al no formarse este aprendizaje social no reconozca a la hembra pareada como su pareja sexual.

### **10.3 Expresión de sinaptofisina**

Como se mencionó previamente el objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos que tiene el cuidado monoparental sobre la plasticidad cerebral, en este caso el enfoque fue en la sinaptofisina pues en estudios anteriores se reportó una disminución de esta proteína cuando a los animales se les aísla de su madre y sus hermanos, cabe destacar que esta disminución se mantuvo en la edad adulta. En este caso los animales recibieron cuidados simulados (CA-min y CA-max), mientras que en este trabajo los animales no fueron separados del ambiente del nido por lo que recibieron estimulaciones permanentes olfatorias, de tacto presión y térmicas por parte de su madre, hermanos y del ambiente del nido, los cuales pudieron haber compensado la falta del cuidado paterno durante la crianza. Además, este estudio se enfocó en individuos adultos por lo que no medimos la expresión de sinaptofisina en etapas

tempranas. Datos de nuestro estudio demuestran que no hay diferencias significativas entre machos y hembras mono y biparentales en el BOA y Acb. Sin embargo, consideramos necesarios estudios adicionales para evaluar la expresión de sinaptofisina en etapas tempranas y determinar si existen alteraciones en su expresión.

Otro estudio de nuestro interés fue el realizado por Law (2018) en monos titi, ellos hacen énfasis en el efecto estresante que implica la separación parental durante la crianza (de 30-120 minutos al día); estos autores midieron diferentes marcadores de plasticidad cerebral durante la adolescencia. Este grupo no encontró una disminución significativa en la expresión de sinaptofisina, aunque cabe destacar que estos autores midieron el RNA mensajero y no la expresión de la proteína por lo que en este caso podemos sugerir que hay una alteración al momento de traducir el mensajero a proteína.

Como perspectivas futuras a este trabajo será necesario evaluar otras áreas cerebrales involucrados en el despliegue de conductas sociosexuales como lo son el área preóptica, el hipotálamo ventromedial y la amígdala medial. Así como distintos marcadores de plasticidad como la proteína asociada al crecimiento-43 (GAP-43) o BDNF que pueden determinar si hay diferencias en la estructura de los circuitos neuronales.

## **11. Conclusiones**

1. El cuidado monoparental altera el despliegue de conductas sociales como la formación del vínculo de pareja, el cual no ocurre cuando solo se permiten 24 horas de cohabitación con cópula.
2. Las hembras criadas en condiciones monoparentales no muestran diferencias entre el tiempo que pasan en la zona incentivada de la pareja.
3. La ausencia del vínculo no se explica por diferencias en la expresión de sinaptofisina en el BOA o en núcleo accumbens, sino posiblemente involucra un circuito complejo con variadas propiedades plásticas.

## 12. Bibliografía

Ahern TH, Young LJ. 2009. The impact of early life family structure on adult social attachment, alloparental behavior, and the neuropeptide systems regulating affiliative behaviors in the monogamous prairie vole (*Microtus ochrogaster*). *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 3(17) 1-19.

Ahern TH, Hammock EAD, Young LJ. 2011. Parental division of labor, coordination, and the effects of family structure on parenting in monogamous prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Developmental Psychobiology*. 53: 118-131.

Bales KL et al. 2006. Effects of stress on parental care are sexually dimorphic in prairie voles. *Physiology and Behavior*. 87: 424-429.

Beach F. A. 1976. Sexual attractivity, proceptivity and receptivity in female mammals. *Hormones and Behavior*. 7: 105-138.

Bharadwaj et al. 2013. Increased dendritic spine density and Tau expression are associated with individual differences in steroid regulation of male sexual behavior. *Plos One*. 8(7): 1-9.

Brennan PA. 2004. The nose knows who's who: chemosensory individuality and mate recognition in mice. *Hormones and Behavior*. 46: 231-240.

Bruel-Jungerman E, Davis S, Laroche S. 2007. Brain plasticity mechanisms and memory: a party of four. *Neuroscientist*. 13(5): 492-505.

Cartes CS, Getz LL, Gavish L, Mc Derott JL, Arnorld P. 1980. Male-relates pheromones and the activation of female reproduction n the prairie vole (*Microtus ochrogaster*). *Biology of Reproduction*. 23: 1038-1045.

Carter CS, DeVries AC, Getz LL. 1995. Physiological substrates of mammalian monogamy: the prairie vole model. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 19 (2):303-314.

Chatterjee D. et al. 2007. Maternal isolation alters the expression of neural proteins during development: "Stroking" stimulation reverses these effects. *Brain Research*. 11-27.

Curtis R. 1993. Growth-associated protein-43 (GAP-43) is expressed by glial cells of the central and peripheral nervous system. *Annals of New York Academy of Sciences*. 679:407-411.

Cushing BS, Martin JO, Young LJ, Carter CS. 2001. The effects of peptides on partner preference formation are predicted by habitat in prairie voles. *Hormones and Behavior*. 39: 48-58.

Gavish L, Hofmann JE, Getz LL. 1984. Sibling recognition in the prairie vole, *Microtus ochrogaster*. *Animal Behavior*. 32(2): 362-366.

Insel TR, Shapiro LE. 1992. Oxytocin receptor distribution reflects social organization in monogamous and polygamous voles. *Proceeding of the National Academy of Science USA*. 89: 5981-5985.

Insel TR, Wang ZX, Ferris CF. 1994. Patterns of vasopressin receptor distribution associated with social organization in microtine rodents. *Journal of Neuroscience*. 14: 5381-5392.

Insel TR, Preston S, Winslow JT. 1995. Mating in the monogamous male: behavioral consequences. *Physiology and Behavior*. 57: 615-627.

Jameson Jr., E. W. 1947. Natural history of the prairie vole (Mammalian genus *Microtus*). *University of Kansas publications Museum of Natural History*. 1 (7) 125-151.

Johnson ZV, Walum H, Xiao Y, Riefkohl PC, Young LJ. 2017. Oxytocin receptor modulate a social salience neural network in male prairie voles. *Hormones and Behavior*. 87: 16-24.

Kleiman DG 1977. Monogamy in mammals. *The Quarterly Review of Biology*. 52(1): 39-69.

Knaus P, Betz H, Rehm H. 1986. Expression of synaptophysin during postnatal development in the mouse brain. *Journal of Neurochemistry*. 47: 1302-1304.

Law A. J., Pei Q., Feldon J. Pryce C. R., & Harrison P. J. 2009. Gene expression in the anterior cingulate cortex and amygdala of the marmoset monkeys following parental separation in infancy. *Journal of Neuropsychopharmacology*. 12(6): 761-772.

Law et al. 2010. Early parental deprivation in the marmoset monkey produces long-term changes in hippocampal expression of genes involve in synaptic plasticity and implicated in mood disorder. *Journal of Neuropsychopharmacology*. 34(6): 1381-1394.

Lei K, Liu Y, Smith AS, Lonstein JS, Wang Z. 2017. Effects of pair bonding on parental behavior and dopamine activity in the nucleus accumbens in male prairie voles. *European Journal of Neuroscience*. 46: 2276-2284.

Lieberwith C, Wang Z. 2016. The neurobiology of pair bond formation, bond disruption and social buffering. *Current Opinion in Neurobiology*. 40: 8-13.

Lonstein D, De Vries G. J. 1999. Sex differences in the parental behaviour of adult virgin prairie voles: Independence from gonadal hormones and vasopressin. *Journal of Neuroendocrinology*. 11(6): 441-449.

Lowell L, Getz C, Carter CS, Gavish L. 1981. The mating system of the prairie vole, *Microtus ochrogaster*: field and laboratory evidence for pair-bonding. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 8(3): 189-194.

Lukas D, Clutton-Brock TH. 2013. The evolution of social monogamy in mammals. *Science*. 341: 526-529.

Moore CL, Morelli GA. 1979. Mother rats interact differently with male and female offspring. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*. 93(4) :677-684.

Morita S, Miyata S. 2012. Synaptic localization of GAP-43 in cultured hippocampal neurons during synaptogenesis. *Cell Biochemistry and Function*. 31:400-411.

Mucignat-Carreta C. 2010. The rodent accessory olfactory system. *Journal of comparative physiology*. 196: 767-777.

Nithianantharajah J, Levis H, Murphy M. 2004. Environmental enrichment results in cortical and subcortical changes in levels of synaptophysin and PSD-95 proteins. *Neurobiology of Learning and Memory*. 81 (3): 200-210.

Paz y Miño G, Tang-Martinez Z. 1998. Effects of exposure to siblings or siblings odors on sibling recognition in prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Animal Behavior*. 57(5): 1091-1098.

Platinga LC, Verhaagen J, Gispen WH. 1993. The expression of B-50/GAP-43 in schwann cells. *Annals of the New York academy of sciences*. 679:412-417.

Royle NJ, Russell AF, Wilson AJ. 2014. The evolution of flexible parenting. *Science*. 345: 776-781.

Sayler A, Salmon M. 1969. Communal nursing in mice: Influence of multiple mothers on the growth of the young. *Science*. Vol. 164: 1309-1310.

Solomon NG, Keane B, Knoch LR, Hogan PJ. 2004. Multiple paternity in socially monogamous prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Canadian Journal of Zoology*. 82: 1667-1671.

Stern JM, Lonstein JS. 2001. Neural mediation of nursing and related maternal behaviors. *Progress in Brain Research*. 133: 263-278.

Tabbaa M, Kelly L, Liu Y, Wang Z. 2017. Paternal deprivation affects social behaviors and neurochemical systems in the offspring of socially monogamous prairie voles. *Neuroscience*. 343: 284-297.

Taylor SA, Salo AL, Dewsbury DA. 1992. Estrus induction in four species of voles (*Microtus*). *Journal of Comparative Physiology*. 106(4): 366-373.

Verhaageen J, Oestreicher AB, Gispen WH, Margolis FL. 1989a. The expression of the growth associated protein B50/GAP-43 in the olfactory system of neonatal and adult rats. *The Journal of Neuroscience*. 9(2):683-691

Verhaageen J, Greer CA, Margolis FL. 1989b. B50/GAP-43 expression in the rat olfactory system during postnatal development and aging. *European Journal of Neuroscience*. Vol. 2:397-407.

Verhaageen J, Oestreicher AB, Grillo M, Khew-Goodall YS, Gispen WH, Margolis FL. 1990. Neuroplasticity in the olfactory system: differential effects of central and peripheral lesions of the primary olfactory pathway on the expression of B50/GAP-43 and the olfactory marker protein. *Journal of Neuroscience Research*. 26:31-44.

Verhaageen J, Zhang Y, Hamers FPT, Gispen WH. 1993. Elevated expression of B50(GAP-43)-mRNA in a subpopulation of olfactory bulb mitral cells following axotomy. *Journal of Neuroscience Research*. 35:162-169.

Waites CL, Craig AM, Garner CC. 2005. Mechanisms of vertebrate synaptogenesis. *Annual Review of Neuroscience* 28: 251-274.s

Wang Z, Larry YJ, Liu Y, Insel TR. 1997. Species differences in vasopressin receptor binding are evident early in development comparative anatomic studies in prairie and montane voles. *Journal of Comparative Neuroscience*. 378: 536-546.

Wiedenmann B, Franke WW. 1985. Identification and localization of an integral membrane glycoprotein of  $M_r$  38,000 (synaptophysin) characteristics of presynaptic vesicles. *Cell*. 41: 1017-1028.

Winslow JT, Hastings J, Carter CS, Harbaugh Cr, Insel TR. 1993. A role for central vasopressin in pair bonding monogamous prairie voles. *Nature*. 365: 545-548.

Wu et al. 2014. Early paternal deprivation alters levels of hippocampal bBrain-Derived Neurotrophic Factor and glucocorticoid receptor and serum corticosterone and adrenocorticotropin in a sex-specific way in socially monogamous mandarin voles. *Neuroendocrinology*. 100: 119-128