



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

**ACTIVACIÓN NEURONAL HIPOTALÁMICA ASOCIADA A INTERACCIONES
PATERNALES Y AVERSIVAS HACIA LAS CRÍAS, EN EL MACHO DEL GERBO DE
MONGOLIA (*Meriones unguiculatus*).**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

LUIS OSCAR ROMERO MORALES

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. JUANA ALBA LUIS DÍAZ
FES-IZTACALA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA ROSA DE LOURDES ÁVILA COSTA
FES-IZTACALA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. LUCÍA ALBA MARTÍNEZ MOTA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

CD. MX. OCTUBRE, 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.



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

**ACTIVACIÓN NEURONAL HIPOTALÁMICA ASOCIADA A INTERACCIONES
PATERNALES Y AVERSIVAS HACIA LAS CRÍAS, EN EL MACHO DEL GERBO DE
MONGOLIA (*Meriones unguiculatus*).**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

LUIS OSCAR ROMERO MORALES

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. JUANA ALBA LUIS DÍAZ
FES-IZTACALA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA ROSA DE LOURDES ÁVILA COSTA
FES-IZTACALA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. LUCÍA ALBA MARTÍNEZ MOTA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

MÉXICO, CD. MX. OCTUBRE, 2019.

OFICIO CPCB/1016/2019

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.

M. en C. IVONNE RAMÍREZ WENCE
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 12 de agosto de 2019, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno **ROMERO MORALES LUIS OSCAR**, con número de cuenta **305148968**, con la tesis titulada **"Activación neuronal hipotalámica asociada a interacciones paternas y aversivas hacia las crías, en el macho del gerbo de Mongolia (*Meriones unguiculatus*)"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. JUANA ALBA LUIS DIAZ**:

Presidente: DRA. ANA LILIA CERDA MOLINA
Vocal: DRA. MARCELA ARTEAGA SILVA
Secretario: DRA. MARIA ROSA DE LOURDES ÁVILA COSTA
Suplente: DR. LUIS ARTURO BAIZA GUTMAN
Suplente: DR. RENÉ DE JESUS CÁRDENAS VÁZQUEZ

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 22 de septiembre de 2019.


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR 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 el Doctorado en Ciencias Biológicas.

Al CONACYT por la beca proporcionada para la dedicación de tiempo completo en el Doctorado en Ciencias Biológicas, UNAM, No. de CVU 622655.

Esta investigación fue financiada por el Programa de Apoyo a proyectos de Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN 218319

A mi tutora principal:

Dra. Juana Alba Luis Díaz

A mi Comité tutorial:

Dra. María Rosa de Lourdes Ávila Costa

Dra. Lucía Alba Martínez Mota

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mi familia; a mis padres Luis e Irma, por su gran esfuerzo y apoyo que me brindaron durante toda mi formación. A mí hermana Ivonne. Sin ellos, no hubiera logrado esto. **¡Gracias familia!**

A mí gran amor Brenda Magaly García Saucedo, gracias por todo el amor, apoyo y comprensión en todo momento. **¡Te amo!**

A mí tutora, Dra. Juana Alba Luis Díaz, por su apoyo, guía y consejos, que estarán siempre presentes en mi vida. **¡Gracias!**

A mi Comité Tutor y miembros de mi Jurado: Dra. Lucía Alba Martínez Mota, Dra. María Rosa de Lourdes Ávila Costa, Dra. Ana Lilia Cerda Molina, Dra. Marcela Arteaga Silva, Dr. Luis Arturo Baiza Gutman y Dr. René de Jesús Cárdenas Vázquez, por cada una de sus observaciones y comentarios que enriquecieron el presente estudio.

A todos mis amigos, compañeros y alumnos del laboratorio de Biología de la Reproducción; 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 mi raza hablará el espíritu!**

ÍNDICE

1. Resumen.....	1
2. Abstract.....	2
3. Introducción.....	3
3.1 Factores sociales.....	5
3.2 Bases hormonales de la conducta paterna.....	7
3.3 <i>c-Fos</i> como marcador de actividad neural	14
3.4 Bases neurales de la conducta paterna	15
4. Antecedentes.....	16
4.1 Características de la especie de estudio.....	17
5. Hipótesis.....	19
6. Objetivos.....	19
7. Material y Método.....	20
7.1 Animales.....	20
7.2 Tratamiento.....	21
7.3 Procedimiento experimental.....	21
7.4 Inmunohistoquímica para <i>c-Fos</i>.....	22
7.5 Análisis de imagen.....	24
7.6 Cuantificación hormonal.....	24
7.7 Análisis estadístico.....	25
7.7.1 Datos de la inmunoreactividad de <i>c-Fos</i>.....	25
7.7.2 Datos de cuantificación de T.....	25
7.7.3 Datos de comportamiento.....	25

8. Resultados.....	26
8.1 Inmunoreactividad a c-Fos.....	26
8.2 Concentraciones plasmáticas de T.....	34
8.3 Conducta paterna.....	36
8.4 Correlaciones.....	38
9. Discusión.....	39
10. Conclusión.....	43
11. Referencias.....	44
12. Anexo 1.....	56

1. RESUMEN

Ratas vírgenes de la rata de laboratorio pueden ser espontáneamente maternales o aversivas con las crías ajenas de su especie, esta dualidad conductual, según el modelo aproximación/evitación, depende de mecanismos positivos que facilitan la conducta materna e implican el área preóptica media (mPOA) y la base del núcleo de la estría terminal (BNST), mientras que el núcleo hipotalámico anterior (AHN), el núcleo hipotalámico ventromedial (VMH) y el gris periacueductal participan en los mecanismos implicados en la evitación de las crías. Machos vírgenes del gerbo de Mongolia (*Meriones unguiculatus*), como la rata de laboratorio, pueden ser paternales o aversivos con las crías de su especie, basados en esto, planteamos la hipótesis de que en la regulación neural de la conducta paterna de este roedor también participan mecanismos facilitadores e inhibidores. El objetivo del presente estudio fue determinar qué áreas neurales se activan durante las interacciones paternales y agresivas con las crías en el gerbo de Mongolia. Así como determinar si hay una asociación entre las interacciones paternales y agresivas con las concentraciones de testosterona (T) en plasma. A través de pruebas de conducta paterna se seleccionaron 40 machos agresivos con las crías y 20 machos paternos. Estos machos se organizaron en seis grupos de 10 animales en cada uno: machos agresivos que interactuaron con crías (AGG-crías) o dulces (AGG-dulce), machos paternos que interactuaron con crías (PAT-crías) o dulces (PAT-dulces), y machos con conducta paterna inducida con T que interactuaron con crías (IPAT-crías) o dulces (IPAT-dulces). Después de interactuar con las crías o dulces, se extrajeron los cerebros, los cuales fueron procesados para inmunohistoquímica anti-*c-Fos*. Se cuantificó el número de células con inmunorreactividad (ir) a *c-Fos*. Los machos que interactuaron con las crías tuvieron un número significativamente mayor de células *c-Fos*-ir en el mPOA/BNST que los machos que interactuaron con los dulces. Los machos que mostraron agresividad tuvieron significativamente un mayor número de *c-Fos*-ir en el AHN, VMH y el gris periacueductal que los machos agresivos que interactuaron con los dulces. Estos resultados sugieren que en la regulación neural del comportamiento paterno en el gerbo de Mongolia, subyacen mecanismos positivos y negativos, como en la conducta materna.

2. ABSTRACT

Virgin rats of the laboratory rat can be spontaneously maternal or aversive with the pups of their species, this behavioral duality, according to the approximation/avoidance model, depends on positive mechanisms that facilitate maternal behavior and involve the medial preoptic area (mPOA) and the base of the terminal striatal nucleus (BNST), while the anterior hypothalamic nucleus (AHN), the ventromedial hypothalamic nucleus (VMH) and the periaqueductal gray participate in the mechanisms involved in the avoidance of the pups. Virgin males of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*), such as the laboratory rat, can be paternal or aversive with the pups of their species, based on this we hypothesize that in the neural regulation of this rodent's paternal behavior they also participate facilitating and inhibiting mechanisms. The present study aimed to determine which neural areas are activated during paternal and aversive interactions with pups in the Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). As well as determining if there is an association between parental and aggressive interactions with testosterone (T) concentrations in plasma. By testing paternal behavior, we selected 40 males aggressive toward pups and 20 paternal males. These males were organized into six groups of 10 animals in each group: aggressive males that interacted with pups (AGG-pups) or candy (AGG-candy), paternal males that interacted with pups (PAT-pups) or candy (PAT-candy), and aggressive males with T-induced paternal behavior that interacted with pups (IPAT-pups) or candy (IPAT-candy). After interacting with pups or candy, the brains were extracted and analyzed for immunoreactivity (ir) anti-*c-Fos*. Males that interacted with pups had significantly higher *c-Fos*-ir in the mPOA/BNST than males that interacted with candy. Males that displayed aggression had significantly higher *c-Fos*-ir in the AHN, VMH, and periaqueductal gray than aggressive males that interacted with candy. These results suggest that in the neural regulation of paternal behavior in the Mongolian gerbil underlie positive and negative mechanisms as occurs in maternal behavior.

3. INTRODUCCIÓN

En los mamíferos los cuidados paternos no son comunes, debido a que la hembra está altamente adecuada para cuidar sola a sus crías (Maier, 2001). Sin embargo, en alrededor del 5% de las especies de estos vertebrados, el macho participa significativamente en el cuidado de sus hijos (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 supervivencia de estas (Clutton-Brock, 1991).

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). La presencia de cuidados paternos ha sido observada en varias especies de roedores monógamos como, el hámster enano (*Phodopus campbelli*), gerbo de Mongolia (*Meriones unguiculatus*), ratón de California (*Peromyscus californicus*), ratón de los volcanes (*Neotomodon alstoni*), entre otras (Trainor y Marler, 2001; 2002; Hume y Wynne-Edwards, 2005; Luis *et al.*, 2012; Martínez *et al.*, 2015).

Los cuidados paternos se clasifican en directos e indirectos; en los primeros, las actividades que realiza el macho tienen 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: la provisión de alimento, la construcción, mantenimiento y vigilancia del nido (Kleiman y Malcom, 1981; Elwood, 1983, Tabla 1).

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.

3.1 Factores Sociales

La conducta paterna está bajo la influencia de diversos factores sociales, entre los que se encuentran el sistema de apareamiento, la cópula, la presencia de la hembra y/o las crías y posiblemente otros estímulos externos que no han sido determinados (Brown, 1993; Storey *et al.*, 1994).

En los roedores el sistema de apareamiento puede ser monógamo, polígamo o solitario; en el caso de la monogamia, esta puede ser obligada o facultativa. Cuando la monogamia es obligada, por ejemplo, en el hamster enano (*Phodopus campbelli*) la participación del padre en el cuidado de los hijos es necesaria para la crianza exitosa de la descendencia, mientras que cuando es facultativa, como en el hámster Siberiano (*Phodopus sungorus*), el éxito de la crianza no es dependiente de la presencia del padre (Wynne-Edwards, 1987). En especies de roedores polígamas o solitarias la presencia de cuidados paternos no es común. Sin embargo, en otros mamíferos con sistemas de apareamiento poligámico, como la mangosta rayada (*Mungos mungo*), los cuidados paternos son comunes (Rood, 1974).

Los roedores machos, sin experiencia sexual, cuando son expuestos a las crías de su especie, pueden ser infanticidas, paternales o indiferentes, pero todos transitan a paternales después del nacimiento de sus crías, lo cual indica que estímulos provenientes de su condición social y/o reproductiva ocasionan cambios neuroendocrinos que inhiben el infanticidio y facilitan la exhibición de cuidados paternos (Martínez *et al.*, 2019; Romero-Morales, datos no publicados). En el ratón de California el 34 % de los machos despliegan conducta paterna 24 h después de la cópula (Gubernick *et al.*, 1994). En el gerbo de Mongolia (*Meriones unguiclatu*) machos agresivos hacia las crías se convierten en

paternales después de la cópula, e interesantemente este cambio en la conducta está asociado con altas concentraciones de testosterona (T), hormona que participa en la regulación de la conducta paterna (Martínez *et al.*, 2019).

La cohabitación con la hembra preñada también se ha propuesto como una condición social que facilita la exhibición de cuidados paternos. Sin embargo, a este respecto, los resultados son contradictorios. En el ratón de California y ratones de la cepa CF-1, la cohabitación con la hembra preñada inhibe el infanticidio (Vom Saal, 1984; Gubernick y Laskin, 1994), mientras que en el gerbo de Mongolia, machos que cohabitaron con su pareja preñada mostraron agresión hacia las crías (Martínez *et al.*, 2019).

Otro factor social que puede influir en la conducta paterna es la presencia de las crías, pero este factor puede estar más relacionado con el mantenimiento y no con el inicio de la conducta paterna. En el gerbo de Mongolia, machos infanticidas despliegan conducta paterna inmediatamente después del nacimiento de sus crías, aunque la inhibición de la conducta infanticida parece estar relacionada también con la cópula, debido a que las hembras de este roedor copulan en el postparto. Sin embargo, estos machos no atacan a sus crías al nacimiento, lo cual sugiere que la conducta infanticida puede ser inhibida antes del parto, probablemente por feromonas liberadas por la hembra, en la proximidad del estro postparto (Martínez *et al.*, 2019). En el hámster enano, la paternidad facilita el despliegue de la conducta de recuperación de las crías, la cual no es observada naturalmente en machos vírgenes espontáneamente paternales o machos infanticidas tratados con estradiol (E₂) (Romero-Morales, datos no publicados).

Otros factores que podrían influir en la conducta paterna son la dominancia y agresión de la hembra, pero a la fecha estos aspectos no han sido analizados.

3.2 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 T y sus metabolitos, E₂ y dihidrotestosterona, además de la progesterona (Brown, 1985).

Prolactina

Es una hormona polipeptídica producida en la adenohipófisis, cuya 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), región crítica en la regulación de la conducta parental (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 de esta hormona durante la exhibición de la conducta paterna es causa o efecto.

En el hámster enano un estudio experimental, 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 intramuscular de dos agonistas para los receptores dopaminérgicos, bromocriptina (agonista de los receptores D1 y D2) y cabergolina (agonista del receptor D2), ocasionaron disminución de los niveles de prolactina hipofisaria, pero no afectaron la conducta paterna (Brooks *et al.*, 2005), por lo cual se concluyó que la prolactina hipofisaria no participa en la regulación de la conducta paterna de este roedor.

Oxitocina

La oxitocina es un neuropéptido 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 la pareja y la conducta paterna en los 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 portadores de un “knockout” del gen de la oxitocina, existe una disminución considerable de la frecuencia de acicalamiento de las crías, en comparación con las hembras silvestres (Pedersen *et al.*, 2006). Considerando que los mecanismos de la 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 son contradictorios (Wang *et al.*, 2000; Gubernick *et al.*, 1995).

En los ratones de campo (*Microtus ochrogaster*) 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 el 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 que en las especies monógamas de los mamíferos, 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 aumento de 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 en plasma fueron significativamente más bajas en los padres, comparados con los machos sin experiencia sexual, lo cual indica que la

progesterona tiene un papel inhibitorio en la regulación de la conducta paterna (Trainor *et al.*, 2003). Cuando en los ratones se noquea el gen del receptor de la progesterona, estos machos presentan reducción del infanticidio y aumento en la exhibición de los cuidados paternos (Schneider *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 T es sintetizada en las células de Leydig a partir de colesterol (Fig. 1), 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, regula la conducta agresiva (Jara, 2001; Greenspan y Gardner, 2005), copulatoria y la conducta paterna (Monaghan y Glickman, 1992).

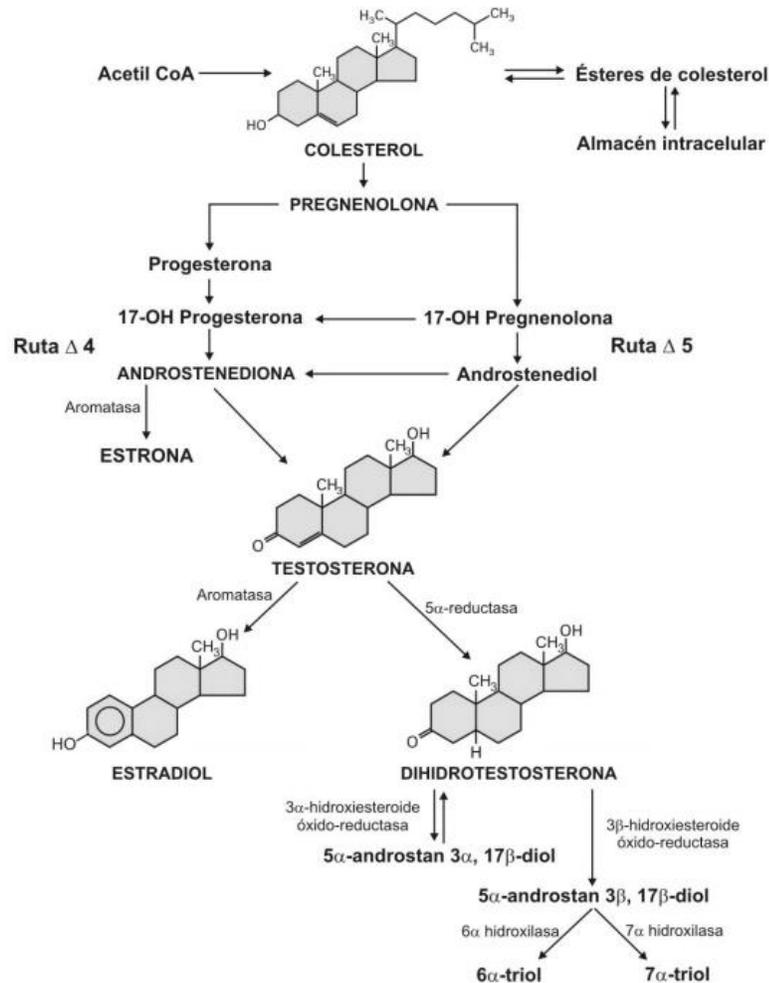


Fig. 1. Vía de síntesis de la Testosterona (T) y sus metabolitos, estradiol (E₂) y dihidrotestosterona (DHT) (Tomado de Saatcioglu, 2011).

Los primeros estudios que correlacionaron la conducta paterna con la T indicaron que en los roedores, como el gerbo de Mongolia, ocurría 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. Sin embargo, un estudio subsecuente señaló que los niveles periféricos de T en los machos de este roedor se mantienen sin cambios significativos durante su ciclo reproductivo (Luis *et al.*, 2010). Además, en los machos que permanecieron 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 exhibieron altos niveles de agresión, al mismo tiempo que proporcionaban cuidados a sus crías (Luis *et al.*, 2010). Estos hallazgos indican que no hay un “trade off” entre la conducta paterna y la agresiva, y que la T no sólo regula la conducta agresiva y copulatoria, sino que también puede estar involucrada en la regulación de la conducta paterna.

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

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 a sus hijos, por lo cual se creyó que esta hormona tenía un papel inhibitorio en la regulación de esta conducta (Reburn y Wynne-Edwards, 1999). No obstante, un estudio posterior menciona que en este roedor, los niveles de T no descienden cuando exhiben cuidados paternos. A diferencia del estudio anterior, en esta investigación las concentraciones de T fueron cuantificadas en los machos, en varios tiempos de la preñez de su pareja y después del nacimiento de sus crías

(Schum y Wynne-Edwards, 2005). Posteriormente, se mostró que, aunque la castración de hámsteres enanos, sin experiencia sexual, ocasionó 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 reemplazo hormonal en machos sin experiencia sexual, se observó que en machos con castración y reemplazo de E₂, que en un principio mostraron agresión a las crías, se convirtieron en paternas. Estos resultados plantean la posibilidad de que la T ejerce sus efectos a través de su conversión a E₂ (Romero-Morales *et al.*, 2018).

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. Estos resultados indican que en esta especie la T tiene un papel facilitador de la conducta paterna (Trainor y Marler, 2001). Además, en este roedor, se demostró que la T regula la conducta a través de su conversión a E₂, debido a que la colocación de implantes subcutáneos de T + fradazol, un inhibidor de la aromatasa, enzima que participa en la aromatización de T a E₂, disminuye la cantidad de cuidados paternos. Mientras que la administración de E₂ + fadrozol, no tuvo ningún efecto (Trainor y Marler, 2002). Además, la actividad de la aromatasa es significativamente más alta en el mPOA en los machos que participan en el cuidado de sus crías respecto a los machos apareados sin crías (Trainor *et al.*, 2003).

En el gerbo de Mongolia, machos y hembras sin experiencia sexual pueden ser infanticidas o proporcionar cuidados a las crías de su especie. En los machos de este roedor, la presencia de la hembra inhibe la conducta infanticida en aproximadamente el 90% de los

gerbos (Clark y Galef, 2000). El gerbo de Mongolia fue el primer roedor en el que se cuantificaron las concentraciones de T en plasma, observándose que las concentraciones de esta hormona son altas antes del parto y disminuyen después del nacimiento de las crías (Brown *et al.*, 1995). Por lo que se creyó que la T tenía un efecto negativo en el despliegue de los cuidados paternos. Sin embargo, en un estudio posterior se señaló que las concentraciones de T no disminuyen cuando los machos del gerbo de Mongolia proporcionan cuidados paternos (Luis *et al.*, 2010). En nuestro laboratorio, utilizando el modelo de gonadectomía y reemplazo hormonal, que fue uno de los modelos más empleados en el estudio de las bases hormonales de la conducta materna (Lonstein *et al.*, 2015), se encontró que machos sin experiencia sexual, agresivos con las crías ajenas de su especie se vuelven paternales cuando, después de la castración son tratados con implantes de T, E₂ o dihidrotestosterona. Estos resultados sugieren que en este roedor la conducta paterna es regulada por la T a través de su conversión a E₂ y dihidrotestosterona (Martínez *et al.*, 2015). Estos resultados son apoyados por el hecho, que machos paternales presentan en mPOA una mayor cantidad de receptores de estrógenos tipo alfa y de andrógenos, que los machos infanticidas (Martínez *et al.*, 2019).

3.3 *c-Fos* como marcador de actividad neural

c-Fos fue la primera proteína caracterizada de la familia de proteínas de los *Fos*, el gen para *c-Fos* fue clonado a partir del ADN del hígado de ratón. La proteína *c-Fos* tiene un motivo de cremallera de leucina que promueve la dimerización con otros productos oncogénicos, conocidos comúnmente como la familia de los *Jun* (*c-Jun*, *Jun B* y *Jun D*). La unión entre dímeros ocurre en un sitio específico en el ADN, el dominio de unión AP-1. Por lo tanto, la

localización inmonocitoquímica de *c-Fos* y las proteínas *Jun* es nuclear (Hoffman *et al.*, 1993).

La proteína *c-Fos*, como ya se mencionó, es nuclear, lo cual permite identificar el fenotipo de una neurona activada mediante la presencia de esta proteína a través de inmunohistoquímica, por lo cual su amplia aplicación en estudios de los sistemas neuroendocrinos (Baum y Everitt, 1992; Coolen *et al.*, 1996; Hoffman *et al.*, 1993; Koch y Ehret, 1991; Kirkpatrick *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 2000; Lonstein y Stern, 1998; Newman, 1999; Numan e Insel, 2003; Horrel *et al.*, 2017).

3.4 Bases neurales de la conducta paterna

Las bases neuroendocrinas del comportamiento materno en los mamíferos han sido ampliamente estudiadas, utilizando como modelo principal, a la rata de laboratorio. El conocimiento generado por estos estudios puntualiza que varias regiones del cerebro anterior participan en la regulación de la conducta materna (Factor *et al.*, 1993; Fleming *et al.*, 1980; Hansen *et al.*, 1991; Koch y Ehret, 1991; Numan e Insel, 2003).

Las hembras vírgenes de la rata de laboratorio cepa Wistar, cuando son expuestas a crías de la misma especie pueden aproximarse e interaccionar maternalmente, pero también pueden evitarlas. La conducta materna ocurre cuando la predisposición a aproximarse e interactuar con estímulos procedentes de las crías es mayor que la tendencia a evitar esos estímulos. El acercamiento o evitación de las crías depende del estado fisiológico, así hembras vírgenes que evitan a las crías, cuando son tratadas con progesterona y E₂, simulando los cambios hormonales que ocurren al final de la preñez, se vuelven maternas. Esta dualidad conductual en la evitación e interacción con las crías implica a varias regiones

hipotalámicas: un circuito facilitador que desciende de la mPOA, a través del hipotálamo lateral (base del núcleo de la estría terminalis (BNST), al mesencéfalo ventral y el circuito inhibitorio que desciende desde el hipotálamo medio (núcleo del área hipotalámica AHN/núcleo del hipotálamo ventromedial VMN), al área gris periacueductal (Numan e Insel, 2003). Tanto el circuito facilitador, como el inhibitorio de la regulación de la conducta materna, tienen múltiples conexiones con regiones anatómicas, como la MeA, que recibe proyecciones del bulbo olfatorio (BO) (Rilling, 2013).

4. ANTECEDENTES

Respecto a la regulación neural de la conducta paterna, pocas investigaciones se han realizado sobre este aspecto; en el ratón de California, lesiones electrolíticas en mPOA, MeA y núcleo accumbens, ocasionan disminución en el tiempo invertido en el acicalamiento (Lee y Brown, 2007). En el ratón de la pradera (*Microtus onchrogaster*), utilizando a *c-Fos* como marcador de actividad neural, se encontró que la interacción con las crías activa regiones como, el mPOA, MeA, BNST y el septo lateral (Kirkpatrick *et al.*, 1994). Los resultados de estos estudios indican que áreas como la MeA, mPOA y BNST, que forman parte del circuito neural de la conducta materna, también forman parte del circuito neural de la conducta paterna.

De manera similar a las hembras vírgenes de la rata de laboratorio cepa Wistar, los machos sin experiencia sexual de las especies de roedores biparentales, como ya se mencionó, pueden ser paternos o agresivos con las crías de su especie. En el hámster enano, aproximadamente el 74% de los machos son paternos y únicamente 26% son infanticidas (Romero-Morales *et al.*, 2018). En el gerbo de Mongolia, el 88% de los machos son

agresivos con las crías y el 12% son paternales (Martínez *et al.*, 2015). En los machos esta dualidad conductual hacia las crías, también depende del estado fisiológico del individuo, debido a que machos del hámster enano, agresivos con las crías transitan a paternales cuando se les administra E₂. Asimismo, en el gerbo de Mongolia la transición de machos agresivos con las crías a paternales es facilitada con la administración de T o cualquiera de sus metabolitos (Martínez *et al.*, 2015).

Con base en la homología en la regulación neural entre la conducta materna y paterna, así como la dualidad conductual que presentan los machos sin experiencia sexual del gerbo de Mongolia, se plantea la hipótesis de que en la regulación neural de la conducta paterna existe un circuito facilitador y un inhibidor. En este contexto, el presente estudio tuvo como finalidad aportar evidencias de la existencia de un mecanismo inhibitorio y uno facilitador, en la regulación neural de la conducta paterna del gerbo de Mongolia (*Meriones unguiculatus*).

4.1 Características de la especie de estudio

El gerbo de Mongolia (*Meriones unguiculatus*) habita en Asia oriental, principalmente en regiones de Manchuria en China, Rusia y Mongolia (Gulotta, 1971). El gerbo es un roedor miomorfo de tamaño medio, con un largo de cabeza a cuerpo de 100 a 125 mm, con una larga cola entre los 96 a 110 mm (Gulotta, 1971; Fig. 2), Las plantas de las patas están completamente pobladas de pelo, excepto por un parche desnudo cerca del talón, son predominantemente de color marrón pálido, aunque la base del pelo es gris y la punta negra, tienen cola corta y sus garras son oscuras (Milne-Edwards, 1867). Presentan una

glándula olorosa en la región media ventral, la cual es visible en el macho, las secreciones de esta glándula la utilizan para marcar territorio (Gulotta, 1971).

El gerbo de Mongolia alcanza la madurez sexual entre los 70 y 85 días de edad, el periodo de gestación varía entre 24 y 26 días, generalmente tienen de 4 a 6 crías por camada, este roedor es monógamo, el macho de esta especie participa ampliamente en el cuidado de sus hijos (Gulotta, 1971).



Fig. 3. Fotografía lateral del gerbo de Mongolia.

5. HIPÓTESIS

Los machos sin experiencia sexual del gerbo de Mongolia ante la presencia de crías ajenas de su especie pueden interaccionar paternalmente o agredirlas, entonces se espera que, como ocurre en las hembras de la rata de laboratorio, esta dualidad conductual se corresponda con la activación de áreas facilitadoras (mPOA/ BNST) e inhibitoras (AHN/VMH/gris periacueductal) de la conducta paterna, respectivamente, y que las interacciones paternas y aversivas se asocien con las concentraciones de T.

6. OBJETIVOS

General

Determinar si áreas facilitadoras de la conducta materna como mPOA/BNST, o inhibitoras como VMH/AHN/gris periacueductal se activan cuando el macho sin experiencia sexual del gerbo de Mongolia (*Meriones unguiculatus*) interacciona paternal o agresivamente, respectivamente, con las crías de su especie. Así como determinar si hay una asociación entre las interacciones paternas y agresivas con las concentraciones de T en plasma.

Particulares

1. Determinar si el mPOA/BNST se activan cuando el macho tiene una interacción paternal con las crías.
2. Determinar si el AHN/VMH/gris periacueductal se activan cuando el macho tiene una interacción agresiva hacia las crías.
3. Determinar si hay una asociación entre las interacciones paternas y agresivas con las concentraciones de T.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Animales

En este estudio se utilizaron machos vírgenes adultos del gerbo de Mongolia, con una edad entre los 180 a 210 días. Los gerbos fueron destetados entre los 25 y 28 días de edad. Los animales fueron obtenidos de una colonia reproductora mantenida en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. La colonia se mantuvo bajo un fotoperiodo invertido de 12:12 h (ciclo luz-oscuridad, inicio de la luz a 1800 h), a una temperatura ambiente de entre 17°C y 21°C. Los gerbos fueron alimentados con pellets para roedores pequeños (Harlam Laboratories) y agua potable *ad libitum*. Al inicio del estudio, tres o cuatro gerbos del mismo sexo se alojaron en una jaula de policarbonato (37 × 27 × 15 cm) con cama de aserrín.

A través de pruebas de detección de conducta paterna (Martínez *et al.*, 2015), se seleccionaron 40 machos agresivos y 20 machos con comportamiento paterno espontáneo (machos vírgenes del gerbo Mongolia pueden mostrar agresión o ser paternos con crías de la misma especie). Estos gerbos fueron organizados en 6 grupos de 10 animales cada uno:

- 1) Grupo AGG-crías: compuesto de 10 machos agresivos, que interactuaron con las crías;
- 2) Grupo AGG-dulce: 10 machos agresivos; que interactuaron con dulces;
- 3) Grupo PAT-crías: 10 machos con comportamiento paterno espontáneo, que interactuaron con las crías;
- 4) Grupo PAT-dulce: 10 machos con comportamiento paterno espontáneo, que interactuaron con dulce;
- 5) Grupo IPAT-crías: 10 machos inicialmente agresivos con comportamiento paterno inducido por T que interactuaron con las crías;
- 6) Grupo IPAT-

dulce: 10 machos inicialmente agresivos con comportamiento paterno inducido por T, pero que interactuaron con dulces.

Para separar los cambios neuroendocrinos estimulados por factores sociales como la cópula y la convivencia con la hembra, decidimos utilizar un modelo fuera de estas influencias como lo es el de machos vírgenes con comportamiento paterno espontáneo y comportamiento paterno inducido con T.

Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con las normas éticas de la Norma Oficial Mexicana, que regula las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, 2001) Las directrices éticas de la Sociedad Americana de Mammalogistas para el cuidado y uso de los animales (Sikes, 2016). El presente proyecto fue evaluado y aprobado por el comité de Ética de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.

7.2 Tratamiento con T

La solución de T se preparó según Siegel y Rosenblat (1975), que consiste en la dilución de 1 mg de T en 10 ml de aceite de sésamo (Sigma-Aldrich, S3547). A partir de esta solución se tomaron 0.1 ml para ser inyectados subcutáneamente en la región dorsal de los machos de los Grupos 5 y 6, previa asepsia de la zona con cloruro de benzalconio, 24 h después de la inyección de T se realizaron pruebas de conducta paterna o interacción con un dulce.

7.3 Procedimiento experimental

Cada uno de los machos de los grupos que interactuaron con las crías (Grupos AGG-crías, PAT-crías y IPAT-crías), se colocaron individualmente, en una jaula de observación (33x

45x18 cm) con lecho limpio de aserrín, 24 h antes de la prueba, para evitar interacciones con sus compañeros de jaula, lo que puede activar la expresión de *c-Fos*. En la mañana del día siguiente, se introdujeron 2 crías ajenas, pero de la misma especie, con una edad de 1-3 días (Martínez *et al.*, 2015). El periodo de interacción con las crías fue de 30 minutos. Se cuantificaron los siguientes datos: latencia de contacto (tiempo que transcurre desde que se introduce la cría hasta que el macho hace contacto con ella), el tiempo invertido en el acicalamiento y abrigo. Las observaciones se realizaron a través de videograbaciones que fueron realizadas entre las 11 y las 14 h. A los machos de grupos control se le colocó un dulce (oso de goma de grenetina), éste fue utilizado como estímulo control por su suavidad y tamaño, tratando de hacerlo similar a las crías del gerbo de Mongolia. Este dulce también se ha utilizado como estímulo control en las interacciones macho-cría en los topillos de la pradera (Kirkpatrick *et al.*, 1994).

7.4 Inmunohistoquímica para *c-Fos*

Cinco gerbos de cada grupo fueron anestesiados 70 minutos después (debido a que el producto de la expresión de este gen alcanza su máximo entre 60 y 90 minutos después del estímulo, Hoffman *et al.*, 1993), del período de interacción paternal o agresiva, con una dosis de xilazina 10 mg / kg y ketamina 90 mg / kg, una vez anestesiados se perfundieron con una solución de paraformaldehído al 2% en PBS. Se disecó el cerebro, el cual se fijó durante 18 h, en el mismo fijador. Posteriormente, este tejido fue procesado con la técnica histológica convencional y cortado en secciones de 7µm de espesor, con un microtomo (American Optical, modelo 820), entre el primer y tercer tercio en el plano sagital del cerebro. La ubicación de las áreas neurales se realizó por comparación con el atlas estereotáxico del gerbo de Mongolia (Loskota *et al.*, 1974, Fig. 3). Las coordenadas para

BO (+1.7mm bregma, imagen 300), mPOA and BNST (ambos -0.1 mm bregma, imagen 520), MeA and AHN (ambos -0.8 mm bregma, imagen 590), VMH (-1.3 mm bregma, imagen 640) y gris periacueductal (-3.5 mm bregma, imagen 860).

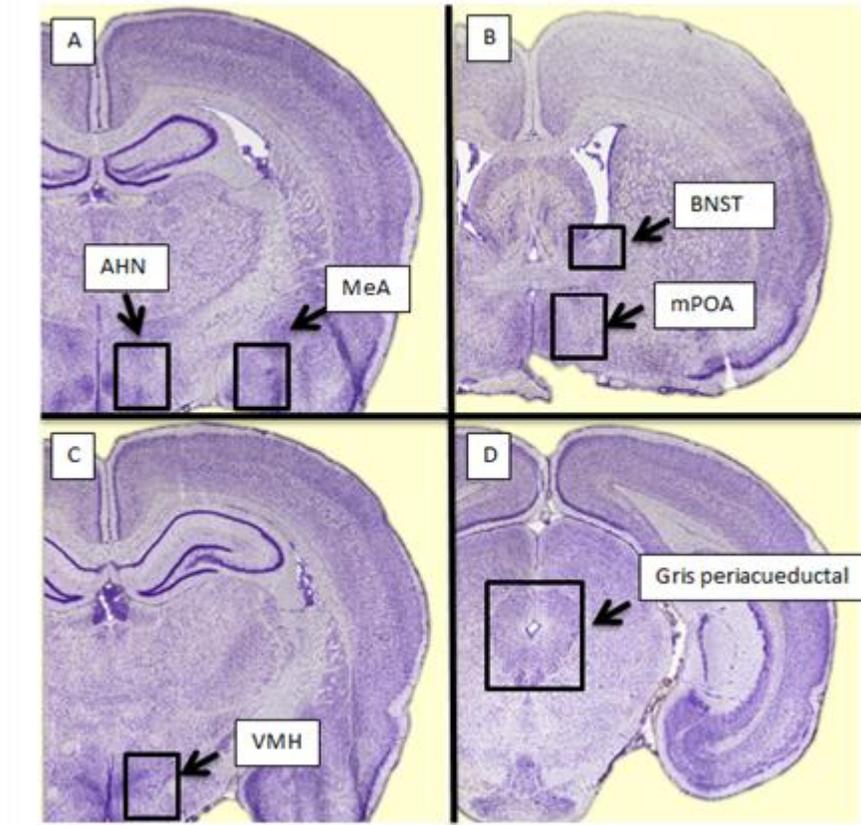


Fig. 3. (A) Ubicación de AHN y MeA en corte coronal. (B) Ubicación de BNST y mPOA en corte coronal. (C) Ubicación de VMH en corte coronal. (D) Ubicación del gris periacueductal en corte coronal (según Loskota *et al.*, 1974).

Una vez obtenidos los cortes de las diferentes áreas neuronales, se colocaron en portaobjetos gelatinizados (Gelatin Nutrient, 70151-500G-F, Sigma-Aldrich), los cortes se desparafinaron e hidrataron (gradiente de 90°, 80°, 70° de Alcohol y H₂O destilada). Cada uno de los siguientes pasos fue seguido por enjuagues en PBS durante 5 min: (1) una incubación de 10 min en H₂O₂ al 3% en PBS; (2) una incubación de 20 min en suero de cabra normal al 5% (Vector Laboratories, kit Vectastain ABC, PK-4000) en PBS; y (3) una

incubación de 16 h a 25 ° C en una dilución 1:50 de anticuerpo anti-*c-Fos* de conejo (Santa Cruz Biotechnology, inc, sc-52) en PBS. Después de dos enjuagues de 5 min en PBS, las secciones se incubaron en un anticuerpo anti-conejo de cabra biotinilado en PBS durante 90 minutos y se lavaron de nuevo dos veces en PBS (Vector Laboratories, kit Vectastain ABC, PK-4000) durante 30 min, seguido por dos enjuagues más de PBS. Finalmente, la unión se visualizó usando diaminobenzidina como cromógeno (Vector Laboratories, DAB Peroxidase Substrato, SK-4100). Las secciones se deshidrataron y se colocó el cubreobjetos. Todas las áreas neurales se procesaron con el mismo ensayo.

7.5 Análisis de imagen

El número de células inmunorreactivas a *c-Fos*, se cuantificaron en microfotografías con un área de 180 μm^2 . Las microfotografías se tomaron con una cámara Nikon conectada a un microscopio Leica. Para cada animal, el número de neuronas inmunorreactivas a *c-Fos*, en cada una de las áreas, se contó a partir de dos secciones en ambos lados del cerebro. Las medias individuales para cada animal se obtuvieron contando bilateralmente neuronas positivas de cada núcleo en tres secciones del cerebro y promediando los resultados a través de cada sección.

7.6 Cuantificación hormonal

Después de las interacciones con las crías u ositos de grenetina, de cada macho se colectaron muestras de sangre (250 μl) del seno retro-orbital, usando un tubo capilar heparinizado bajo anestesia ligera (Martínez *et al.*, 2015). La toma de sangre se realizó durante un minuto entre las 11:00 y las 14:30 horas. El plasma se separó por centrifugación y se almacenó a -70°C. El análisis hormonal se realizó mediante ELISA. El nivel de T se

midió con un kit comercial de DRG (Diagnostics, Frauenbergstr 18, D-35039 Marburg, Alemania) a una sensibilidad de 0.083 ng / ml. Los coeficientes de variación intra-ensayo e inter-ensayo fueron de 3.9% y 4.6%, respectivamente.

La placa se leyó en un lector de placas (Thermo Electron Corporation, modelo Multiskan Ascent V1.25, con un filtro de 450 nm).

7.7 Análisis estadístico

7.7.1 Datos de la inmunoreactividad de c-Fos

El número de células con inmunorreactividad a *c-Fos* (ir) en las áreas neurales de los machos del grupo AGG-crías , AGG-dulces, PAT-crías, PAT-dulces, IPAT-crías e IPAT-dulces se analizaron con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, debido a la distribución no normal de los datos. (Prueba de Anderson-Darling, $P < 0.05$). La corrección de Bonferroni para pruebas múltiples se aplicó para comparaciones por pares entre grupos.

7.7.2 Datos de cuantificación de T

Los niveles de T entre los grupos antes mencionados se analizaron aplicando la prueba de Kruskal-Wallis. La corrección de Bonferroni para pruebas múltiples se aplicó para comparaciones por pares entre grupos.

7.7.3 Datos de comportamiento

El tiempo invertido en el olfateo, acicalamiento y abrigo por los machos de los Grupos PAT-crías e IPAT-crías fue comparado aplicando la prueba no paramétrica de U-Mann-Whitney, debido a la no normalidad de los datos (prueba de Anderson-Darling, $p < 0,05$).

Finalmente, los niveles de T se correlacionaron con el tiempo invertido en abrigo y acicalamiento, mediante la prueba de correlación de Spearman. Este análisis también se utilizó para correlacionar las concentraciones de T con el número de células *c-Fos-ir* en el mPOA y BNST.

Los análisis estadísticos se realizaron con SPSS versión 21.0 (IBM SPSS, Armonk, NY).

5. RESULTADOS

8.1 Inmunoreactividad a *c-Fos*

El número de células *c-Fos-ir* varió significativamente entre los Grupos AGG-crías, AGG-dulces, PAT-crías, PAT-dulces, IPAT-crías e IPAT-dulces en el mPOA ($H = 27.17$, $df = 5$, $P < 0.05$, Figs. 4 y 5) y BNST ($H = 25.54$, $df = 5$, $P < 0.05$, Figs. 4 y 5). Los análisis *post-hoc* revelaron, como se esperaba, que los machos del grupo PAT-crías tenían *c-Fos-ir* significativamente mayor en mPOA y BNST que los machos de los grupos PAT-dulces, IPAT-crías, IPAT-dulces, AGG-crías y AGG-dulces. Los machos en el grupo IPAT-crías tuvieron mayor *c-Fos-ir* en estas áreas que los machos de los grupos PAT-dulces, IPAT-dulces, AGG-crías y AGG-dulces (P ajustado de Bonferroni = 0.003).

El número de células *c-Fos-ir* entre los grupos AGG-crías, AGG-dulces, PAT-crías, PAT-dulces, IPAT-crías e IPAT-dulces fueron significativamente diferentes en el AHN ($H = 23.95$, $df = 5$, $P < 0.05$, Figs. 6 y 7), VMH ($H = 24.97$, $df = 5$, $P < 0.05$, Figs. 6 y 7) y gris periacueductal ($H = 22.78$, $df = 5$, $P < 0.05$, Figs. 6 y 7). La comparación por pares reveló, que los machos del grupo AGG-crías tenían *c-Fos-ir* significativamente mayor en AHN, VMH y gris periacueductal que los machos de los grupos AGG-dulces, PAT-crías, PAT-dulces, IPAT-crías e IPAT-dulces (P ajustado de Bonferroni = 0.003).

El número de células *c-Fos-ir* en el BO y MeA en los grupos AGG-crías, AGG-dulces, PAT-crías, PAT-dulces, IPAT-crías e IPAT-dulces fue significativamente diferente ($H = 25.49$; $H = 27.23$, $df = 5$, $P < 0.05$, respectivamente, Figs. 8 y 9). La comparación por pares reveló que los machos del grupo PAT-crías tenían significativamente más células *c-Fos-ir* en BO y MeA que los machos de los grupos AGG-crías, AGG-dulces, PAT-dulces, IPAT-crías e IPAT-dulces. Los machos del grupo IPAT-crías tenían una mayor cantidad de células *c-Fos-ir* en estas áreas que los machos de los grupos AGG-crías, AGG-dulces, PAT-dulces e IPAT-dulces. Del mismo modo, los machos del grupo AGG-crías tenían un mayor número de células *c-Fos-ir* en BO y MeA que los machos del grupo AGG-dulces (P ajustado de Bonferroni = 0.003).

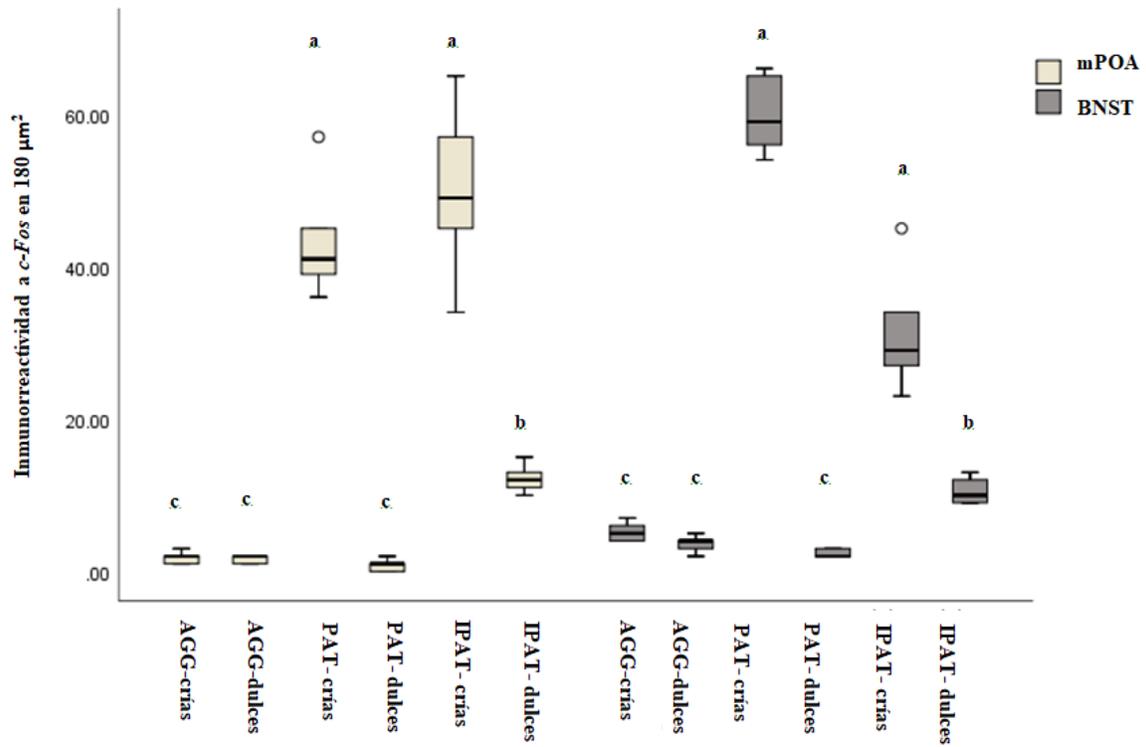


Fig. 4. Los machos paternos que interactuaron con crías (PAT-crías e IPAT-crías) tienen un número significativamente mayor de células *c-Fos*-ir en mPOA / BNST que los machos paternos que interactuaron con dulces (PAT-dulces e IPAT-dulces) y machos agresivos (AGG-crías y AGG-dulces). Los datos se presentan con la mediana y cuartiles. Los círculos indican valores atípicos, y las letras indican diferencias significativas.

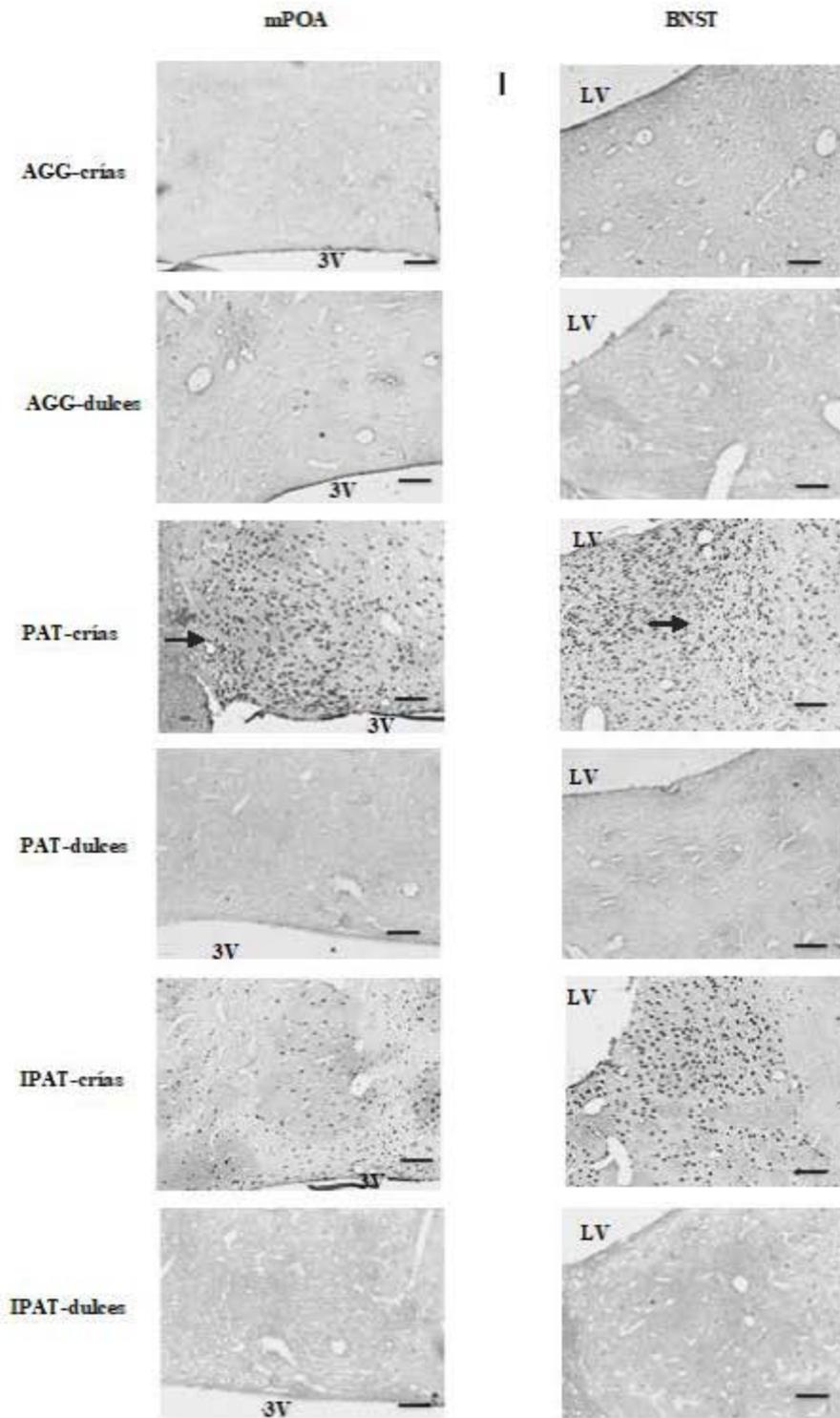


Fig. 5. Número de células *c-Fos-ir* en mPOA / BNST de machos paternales y agresivos del gerbo de Mongolia que interactuaron con crías o dulces. Los machos paternos (PAT-crías e IPAT-crías) tuvieron significativamente mayor *c-Fos-ir* que los machos paternos que interactuaron con dulces (PAT-dulces y IPAT-dulces) y machos agresivos (AGG-crías y AGG-dulces). 3V = 3^{er} ventrículo, LV = ventrículo lateral. Secciones coronales, barras de escala = 100 μ m.

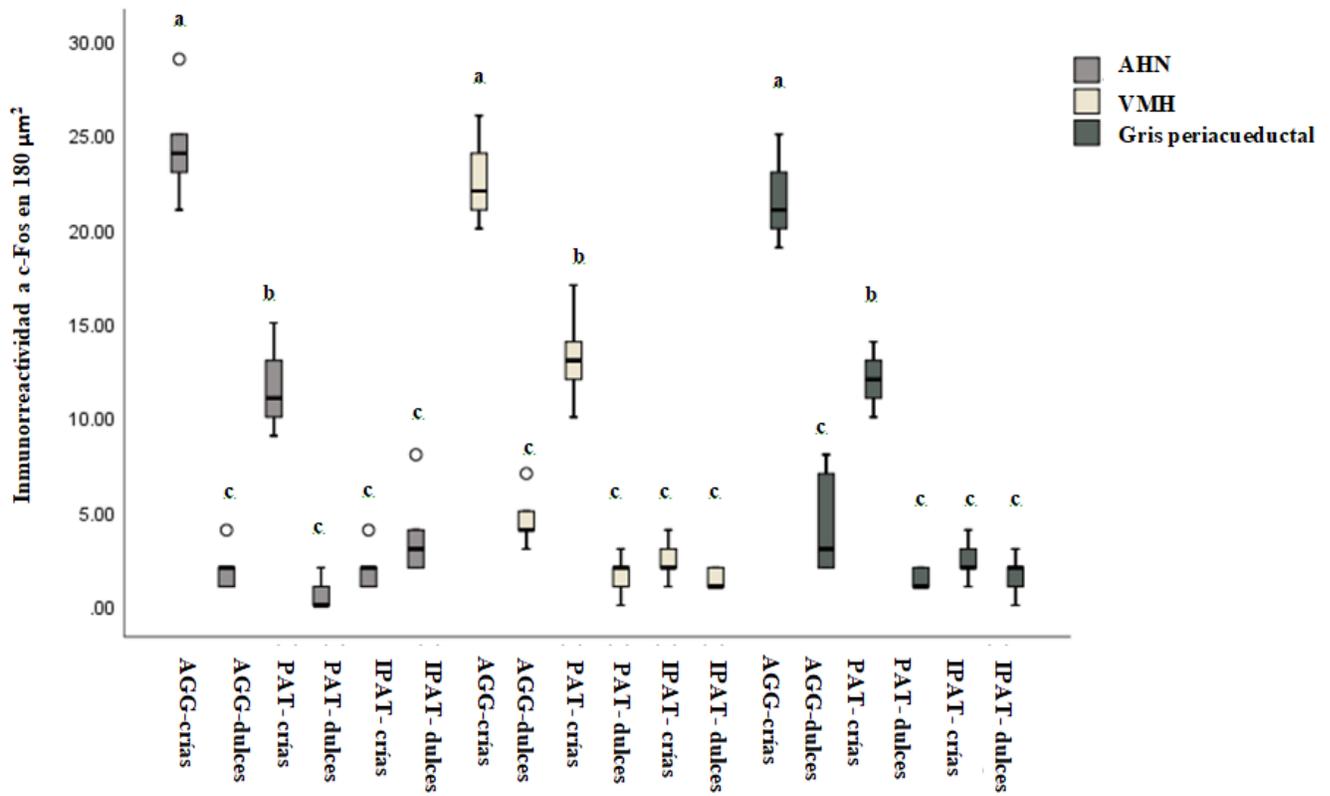


Fig. 6. El número de células *c-Fos*-ir en machos agresivos que interactuaron con crías (AGG- crías) tuvieron significativamente mayor número de células *c-Fos*-ir en AHN, VMH y gris periacueductal que los machos agresivos que interactuaron con dulces (AGG-dulces) y machos paternos (PAT-crías, PAT-dulces, IPAT-crías e IPAT-dulces). Los datos se presentan como mediana y cuartiles. Los círculos indican valores atípicos, y las letras indican diferencias significativas.

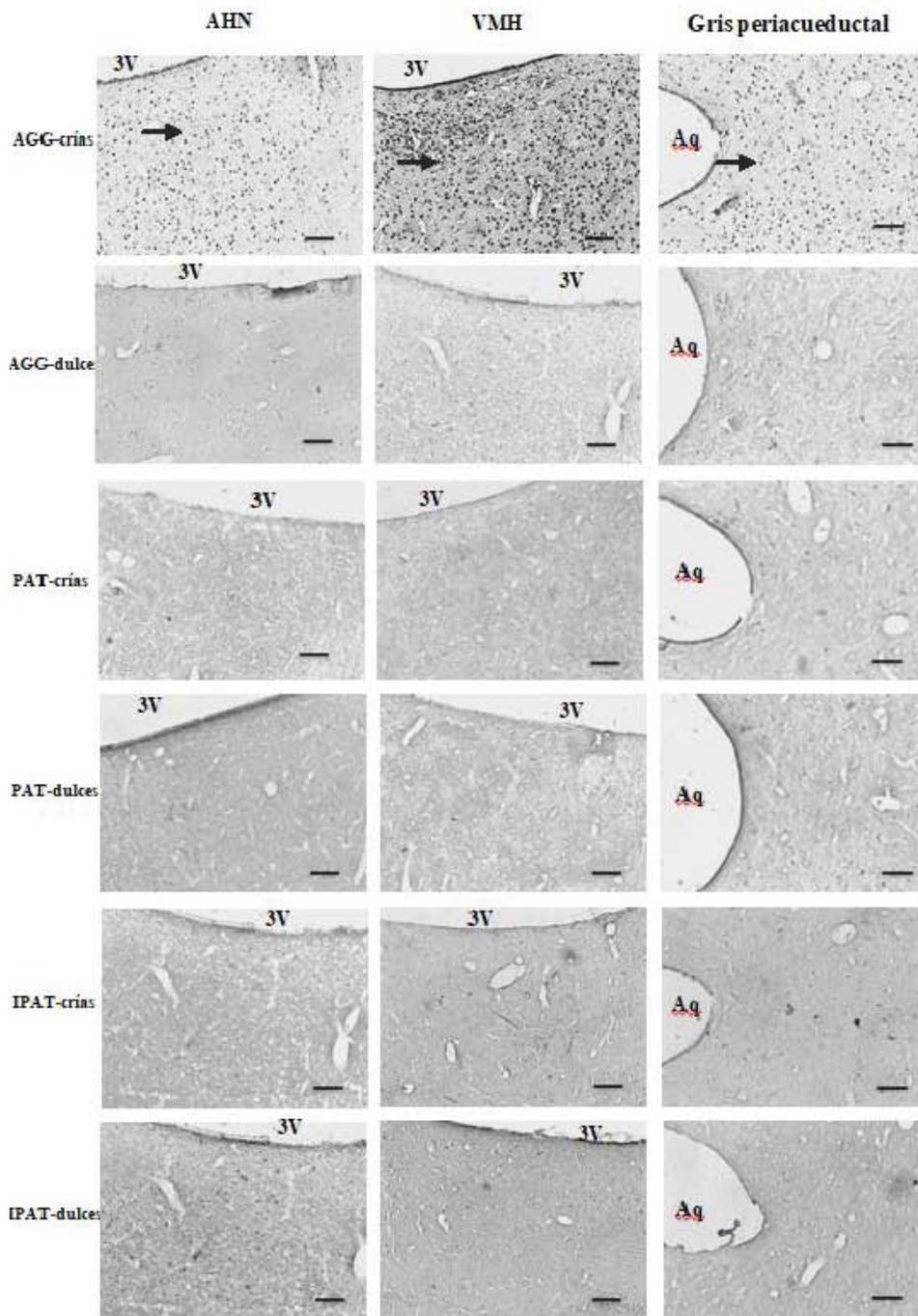


Fig. 7. Número de células *c-Fos-ir* en el AHN / VMH y área gris periacueductal de machos agresivos y paternos del gerbo de Mongolia que interactuaron con crías o dulces. Los machos agresivos que interactuaban con las crías (AGG-crías) tenían significativamente mayor *c-Fos-ir* que los machos agresivos que interactuaban con dulces (AGG-dulces) y paternos (PAT-crías, PAT-dulces, IPAT-crías e IPAT-dulces) 3V = 3^{er} ventrículo, Aq = acueducto. Secciones coronales, barras de escala = 100 μ m.

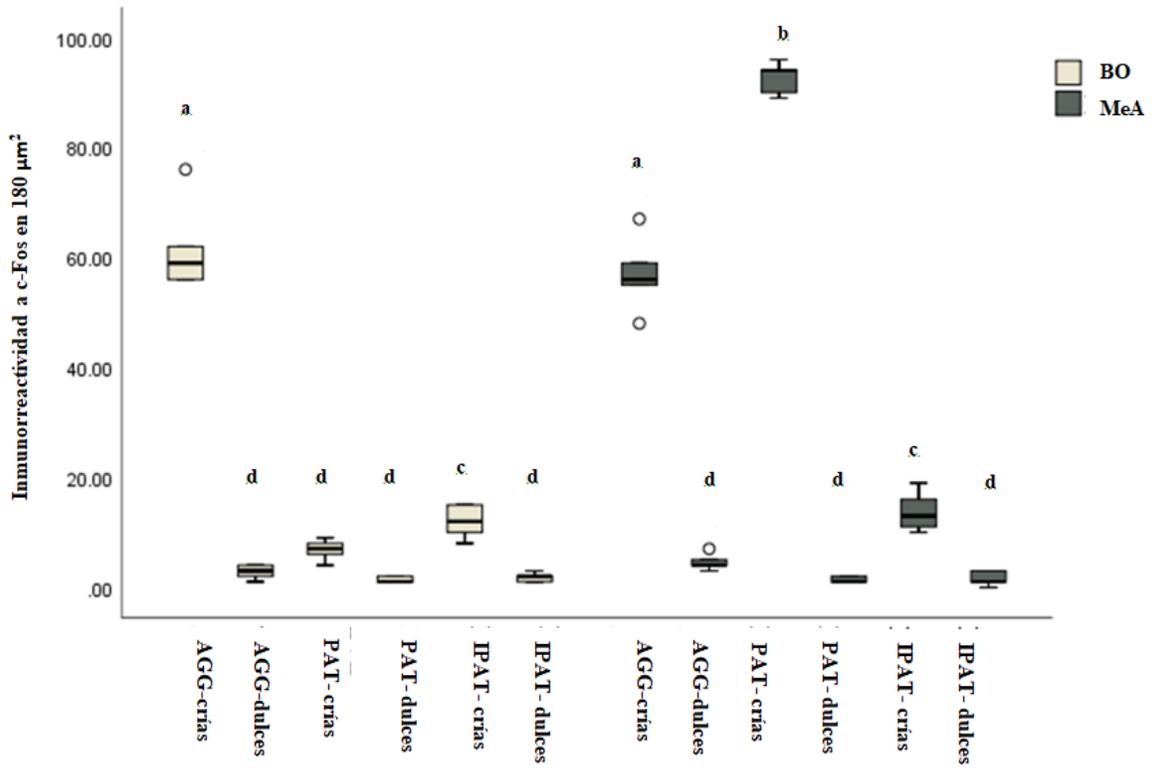


Fig. 8. Tanto las interacciones paternas como las agresivas con las crías tuvieron mayor número de células *c-Fos-ir* en BO y MeA que las que interactuaron con los dulces. Los datos se presentan con mediana y cuartiles. Los círculos indican valores atípicos, y las letras indican diferencias significativas.

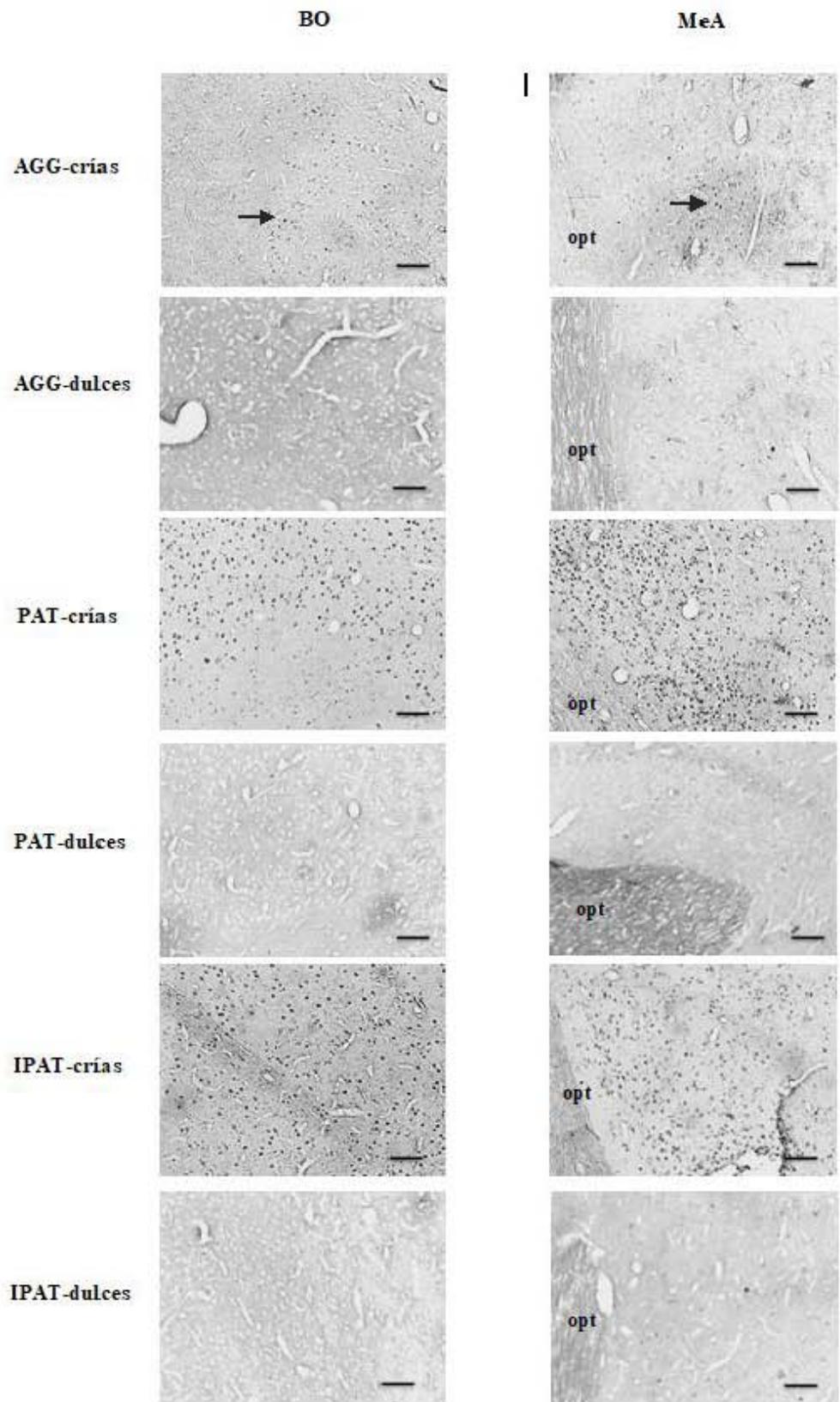


Figura 9. Tanto las interacciones paternas como agresivas con las crías tuvieron mayor número de células *c-Fos-ir* en BO y MeA que las que interactuaban con los dulces. opt = tracto óptico. Secciones coronales, barras de escala = 100 μ m.

8.2 Concentraciones de T en plasma

Las concentraciones de T en plasma en los grupos AGG-crías, AGG-dulces, PAT-crías, PAT-dulces, IPAT-crías e IPAT-dulces, fueron significativamente diferentes ($H = 56.03$, $df = 5$, $P < 0.05$; Fig. 10). La comparación por pares reveló que los machos del grupo IPAT-crías tuvieron concentraciones de T significativamente más altas en el plasma que los machos del grupo AGG-crías, AGG-dulces, PAT-crías, PAT-dulces e IPAT-dulces. Los machos del grupo PAT-crías tuvieron concentraciones más altas de T en plasma que los machos de los grupos AGG-crías, AGG-dulces y PAT-dulces; los machos del grupo AGG-crías tuvieron bajas concentraciones de T en el plasma que los machos del grupo AGG-dulces (P ajustado de Bonferroni = 0.003).

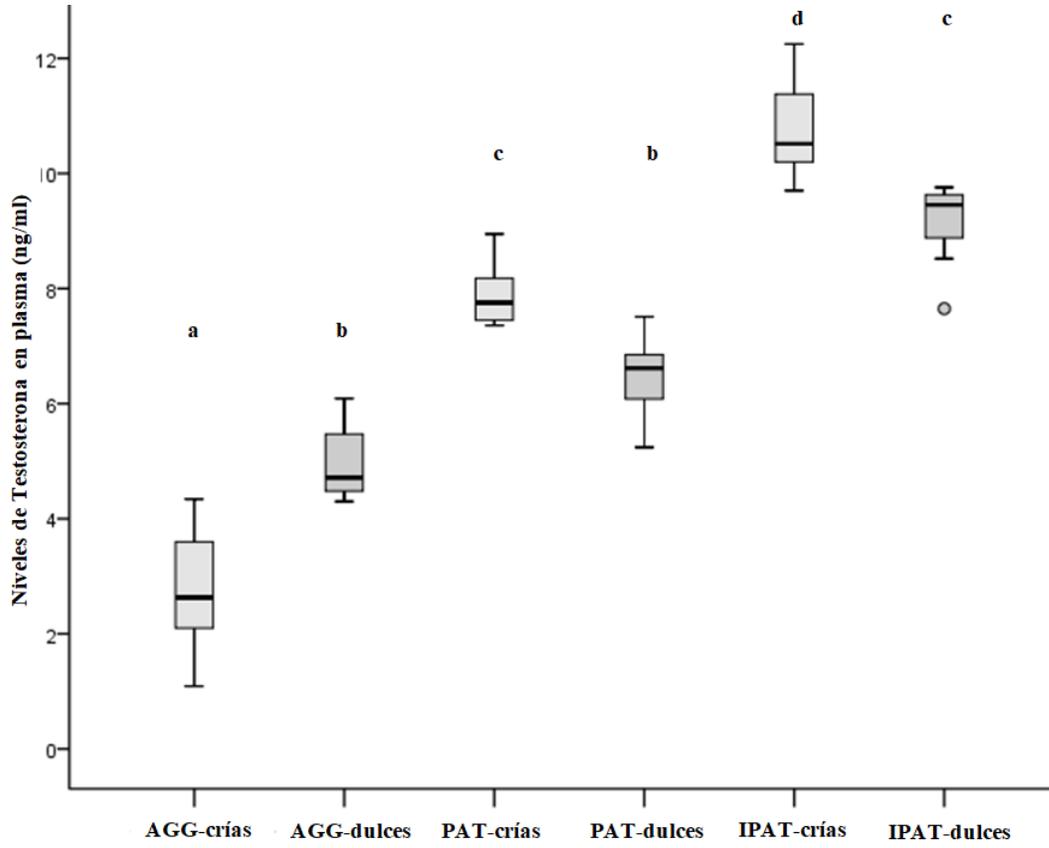


Fig. 10. Los machos paternos (IPAT-crías e PAT-crías) tuvieron niveles de T significativamente mayores que los machos paternos que interactuaron con dulces (IPAT-dulces y PAT-dulces) y machos agresivos (AGG-crías y AGG-dulces). Los datos se presentan como medianas. Los números indican valores atípicos, y las letras indican diferencias significativas.

8.3 Conducta paterna

El tiempo invertido en el olfateo entre los grupos PAT-crías e IPAT-crías no fue significativamente diferente ($U = 64.5$, $P > 0.01$, Fig. 11). El tiempo invertido en el abrigo y el acicalamiento de las crías de los machos del grupo IPAT-crías fue significativamente más largo que lo observado en los machos del grupo PAT-crías ($U = 55.0$, $P < 0.01$; $U = 57.0$, $P < 0.01$, respectivamente).

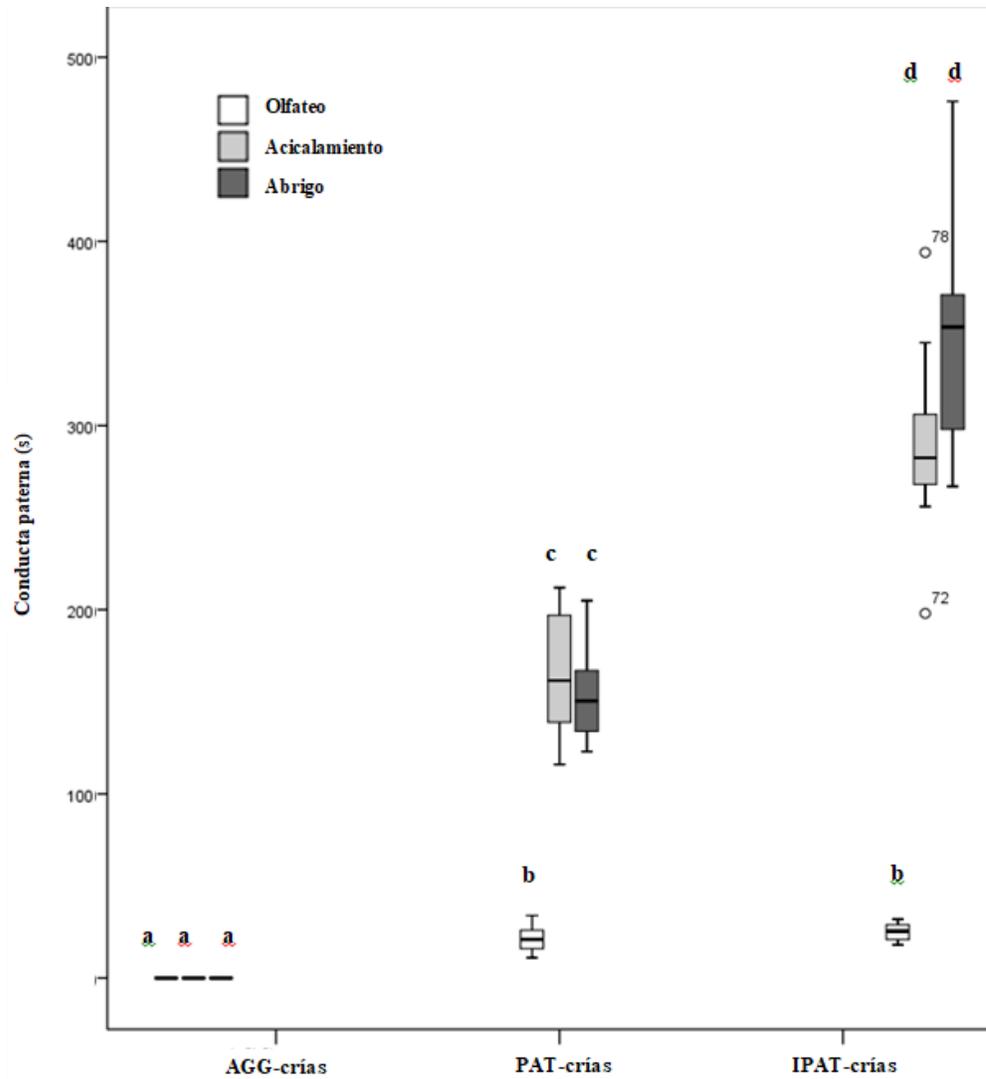


Fig. 11. Los machos del grupo IPAT-crías invirtieron significativamente más tiempo ($P < 0.05$) en abrigo y acicalar que los machos del grupo PAT-crías. Los datos se presentan como las medianas. Los números indican valores atípicos, y las letras indican diferencias significativas.

8.4 Correlaciones

No observamos correlaciones significativas entre los niveles de T en plasma y el número de células *c-Fos-ir* en el mPOA ($r = -0.87$, $P > 0.05$) y BNST ($r = 0.38$, $P > 0.05$) en los machos del grupo PAT-crías. No encontramos correlaciones entre los niveles de T y el número de células *c-Fos-ir* en el mPOA ($r = -0.00$, $P > 0.05$) y BNST ($r = 0.15$, $P > 0.05$) en los machos del grupo IPAT-crías. No se observaron correlaciones significativas entre el tiempo invertido en el abrigo y el acicalamiento con el número de células *c-Fos-ir* en el mPOA ($r = 0.53$, $P > 0.05$; $r = 0.01$, $P > 0.05$, respectivamente) y BNST ($r = 0.74$, $P > 0.05$; $r = 0.00$, $P > 0.05$, respectivamente). Tampoco se observaron correlaciones significativas entre el tiempo invertido en el abrigo y el acicalamiento los niveles de T en plasma ($r = 0.42$, $P > 0.05$; $r = 0.03$, $P > 0.05$, respectivamente).

6. DISCUSIÓN

Determinar si el mPOA/BNST se activa cuando el macho tiene una interacción paternal con las crías.

Los machos del gerbo de Mongolia que interactuaron con las crías tuvieron significativamente mayor *c-Fos*-ir en mPOA y BNST que los machos que interactuaron con los dulces. Estos resultados muestran que estas regiones neurales evidentemente se activan cuando los machos del gerbo de Mongolia despliegan conducta paterna, lo que indica que el mPOA y la BNST participan en la regulación neural de la conducta paterna en este roedor. En la rata de laboratorio, estas áreas neurales son fundamentales para el circuito neural que regula específicamente el comportamiento materno (Numan, 2007; Numan, 2014; Lonstein *et al.*, 2015). En los ratones de la pradera, los machos vírgenes que interactúan paternalmente con las crías de la misma especie tienen mayor activación en mPOA y BNST que los machos que interactúan con los dulces (Kirkpatrick *et al.*, 1994). En los machos vírgenes del ratón de California, las lesiones electrolíticas en el mPOA causan alteraciones en la recuperación, abrigo, acicalamiento y olfateo de las crías (Lee y Brown, 2002, 2007). Por lo anterior, se corrobora el papel facilitador del mPOA y BNST en la regulación neural de la conducta paterna.

Determinar si el AHN/VMH/gris periacueductal se activan cuando el macho tiene una interacción agresiva hacia las crías.

Los machos del gerbo de Mongolia que mostraron agresión hacia las crías tuvieron significativamente mayor *c-Fos*-ir en el AHN, VMH y el gris periacueductal que los machos agresivos que interactuaron con los dulces. Estos resultados sugieren por primera

vez, que estas regiones neurales están involucradas en la regulación de las interacciones agresivas con las crías (infanticidio) en los machos del gerbo de Mongolia. El AHN, el VMH y el gris periacueductal son componentes del circuito neural que media los comportamientos aversivos y defensivos en ratas hembras de laboratorio (Sheehan *et al.*, 2000; Canteras, 2002; Numan e Insel, 2003). Las lesiones excitotóxicas del AHN y VMH estimulan la exhibición de cuidados maternos en ratas nulíparas tratadas con E₂ y progesterona (Bridges *et al.*, 1999). También se ha observado que la electroestimulación de VMH inhibe el disparo de neuronas en el mPOA, que es una región que está involucrada en la exhibición del cuidado parental (Mayer, 1981, Lonstein *et al.*, 2015). Las evidencias conductuales indican que las proyecciones desde el AHN al gris periacueductal juegan un papel importante en el comportamiento defensivo, así como en las respuestas de miedo y evitación (Sheehan *et al.*, 2000; Numan y Insel, 2003).

El BO y MeA se activaron tanto en machos paternos, como en agresivos, posiblemente porque estas regiones neurales son parte tanto de los mecanismos positivos, como negativos que regulan el comportamiento paterno en el gerbo de Mongolia. Como ya se mencionó, en la hembra de la rata, estas dos áreas neurales tienen conexiones múltiples con las regiones facilitadores (mPOA/BNST) e inhibidores (AHN / VMH) del circuito neural del comportamiento materno (Numan y Insel, 2003; Numan, 2014; Brunton y Russell, 2015; Bales y Saltzman, 2016). El BO es un componente importante del sistema olfativo en roedores; en hembras vírgenes de la rata, la anosmia elimina las respuestas de miedo y evitación hacia las crías (Fleming y Rosenblatt, 1974, Fleming *et al.*, 1979; Brunton y Russell, 2015). Sin embargo, los cambios fisiológicos que ocurren en las hembras al final

de la preñez y en el postparto hacen que los olores de las crías sean atractivos (Kinsley y Bridges, 1990). Las hembras vírgenes con lesiones en MeA, no evitan a las crías, y e esto sucede posiblemente porque esta estructura neural media las respuestas de evitación hacia las crías (Fleming *et al.*, 1980; Numan *et al.*, 1993). Sin embargo, este mecanismo de evitación tendría que ser deprimido en el parto para que ocurra el comportamiento materno (Numan, 2007). Con base en estos resultados, sugerimos que estas áreas neurales participan en los mecanismos positivos y negativos que regulan el comportamiento paterno en este roedor. Los estudios en ratones de campo y ratones de California mostraron que las lesiones en áreas olfativas interrumpen el comportamiento tanto paterno, como materno (Lee y Brown, 2007; Kirkpatrick *et al.*, 1994; Williams *et al.*, 1992). La MeA se ha relacionado con la regulación neural de otros comportamientos sociales, como el apareamiento y la agresión en la rata de laboratorio y el hámster dorado (*Mesocricetus auratus*) (Fleming *et al.*, 1980; Lehman y Winans, 1982; Koolhaas *et al.*, 1990). En los ratones de campo, las interacciones paternas activan la MeA (Kirkpatrick *et al.*, 1994). Los resultados de estos estudios, como en el presente sugieren que estas regiones neurales participan en múltiples comportamientos sociales (Numan e Insel, 2003).

Estos resultados también demostraron que las interacciones paternas o aversivas con las crías son fuertes estímulos para la activación neural, porque los machos agresivos y paternos que interactuaron con las crías tuvieron significativamente mayor *c-Fos*-ir que los machos que interactuaron con los dulces. En los ratones de campo y de California, la *c-Fos*-ir es mayor en machos expuestos a crías, que en machos que interactuaron con un dulce o un fragmento de mármol, en áreas cerebrales como, mPOA, BNST, BO y MeA (Kirkpatrick *et al.*, 1994; Horrel *et al.*, 2017). Según Kirkpatrick y colegas (1994), este

aumento se debe a que las crías son una fuente de estímulos múltiples que causan la activación neural en los machos, durante estas interacciones.

Determinar si hay una asociación entre las interacciones paternas y agresivas con las concentraciones de T.

Los machos que exhibieron conducta paterna tuvieron concentraciones significativamente más altas de T en plasma que los machos que fueron agresivos con las crías. En los machos del grupo IPAT-crías, la concentración de T fue significativamente mayor que en los machos del grupo PAT-crías. Además, los machos del grupo IPAT-crías tuvieron un número significativamente mayor de células *c-Fos-ir* que los machos del grupo PAT-crías en el mPOA / BNST. En nuestro laboratorio hemos encontrado que los machos paternos tienen niveles de T significativamente mayores que los machos agresivos con las crías (Martínez *et al.*, 2019). Según Numan (2006), el acercamiento a las crías, como una muestra de comportamiento paterno depende del estado fisiológico del animal. Esta diferencia en la concentración de T puede ser la base hormonal que subyace a la respuesta hacia las crías.

Los machos de los grupos IPAT-crías y PAT-crías abrigaron, acicalaron y olfatearon a las crías; el tiempo invertido en los machos del grupo IPAT-crías fue significativamente mayor que el de los machos del grupo PAT-crías. Además, los machos del grupo IPAT-crías también tuvieron un número significativamente mayor de células *c-Fos-ir* en el mPOA / BNST que los machos del grupo PAT-crías. Además, de que mayor cantidad de cuidados paternos se correspondió con una mayor *c-Fos-ir* en mPOA y BNST. Estos resultados sugieren que la cantidad de cuidados paternos puede depender de las concentraciones de T

en plasma, y que una mayor actividad paterna implica una alta actividad neural en mPOA y BNST, a pesar de que no se encontraron correlaciones entre estas variables.

Los machos del grupo AGG-crías tuvieron una concentración T significativamente menor que los machos del grupo AGG-dulces, este resultado es sorprendente porque todas las interacciones sociales están asociadas con un aumento en T (Gleason *et al.*, 2009). Este estudio, hasta donde sabemos, es el primero que indica una disminución en los niveles de T cuando los machos agresivos interactuaron con las crías. Creemos que es posible que la presencia de crías cause estrés en los machos, lo que posiblemente afecte la síntesis de T. Algunas investigaciones han mencionado que el estrés afecta la biosíntesis de la hormona luteinizante, causando una disminución en la síntesis de T (Gray *et al.*, 1978; Dong *et al.*, 2004). También pudo ocurrir que los ositos de goma estimulen levemente el contexto social.

7. CONCLUSIÓN

Estos resultados sugieren que a la dualidad conductual en la respuesta de los machos hacia las crías, en el gerbo de Mongolia, subyacen mecanismos neurales positivos y negativos, en los que mPOA y BNST son la parte positiva de la conducta paterna, mientras que AHN / VMH y gris periacueductal son parte del mecanismo negativo del circuito neuronal de la conducta paterna.

8. REFERENCIAS

- Bales, L.K., Saltzman W., 2016. Fathering in rodents: Neurobiological substrates and consequences for offspring. *Hormones and Behavior*. 77, 249-259.
- Baum, M.J., Everitt B.J., 1992. Increased expression of *c-Fos* in the medial preoptic area after mating in male rats: Role of afferent inputs from the medial amygdala and midbrain central tegmental field. *Neuroscience*. 50: 627-646.
- 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.
- Bridges, R.S., Mann P.E., Coppeta J.S., 1999. Hypothalamic involvement in the regulation of maternal behaviour in the rat: inhibitory roles for the ventromedial hypothalamus and the dorsal/anterior hypothalamic areas. *Journal of Neuroendocrinology*. 11: 259-66.
- 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. *Hormones and Behavior*. 47: 358-366.
- Brown, R.E., 1993. Hormonal and experiential factors influencing parental behaviour in male rodents: An integrative approach. *Behavioural Processes*, 30: 1-28.
- Brown, R.E., 1985. Hormones and paternal behavior in vertebrates. *American Zoologist*. 25: 895-910.

- 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.
- Brunton, J.P., Russell A.J., 2015. Maternal brain adaptations in pregnancy. In: Plant, M.T., Zeleznik J.T., Albertini F.D., Goodman L.R., Herbison E.A., McCarthy M.M., Muglia J.L., Richards S.J. (Eds.), *The Physiology of reproduction*. Elsevier, Amsterdam. 1957-2026.
- Canteras, N.S., 2002. The medial hypothalamic defensive system: hodological organization and functional implications. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*.71: 481–91.
- Clark, M.M., Galef B.G., 2000. Effects of experience on the parental responses of male Mongolian gerbil. *Development Psychobiology*. 36: 177-185.
- Clutton-Brock, T.H. 1991. *The evolution of parental care*. Princeton University Press.
- Coolen, L.M., Peters H.J., Veening J.G., 1996. *Fos* immunoreactivity in the rat brain following consummatory elements of sexual behavior: a sex comparison. *Brain Research*. 738: 67-82.
- Dong, Q., Salva A., Sottas C.M., Niu E., Holmes M., Hardy M.P., 2004. Rapid glucocorticoid mediation of suppressed testosterone biosynthesis in male mice subjected to immobilization stress. *Journal of Andrology*. 25(6): 973-981.
- Elwood, R.W., 1983. Paternal care in rodents. In R. W. Elwood (eds.), *Parental Behavior of rodents*. Cichester. John Wiley. 235-257.

- Factor, E.M., Mayer A.D., Rosenblatt J.S., 1993. Peripeduncular nucleus lesions in the rat: I. Effects on maternal aggression, lactation, and maternal behavior during pre-and postpartum periods. *Behavioral Neuroscience*. 107: 166-185.
- Fleming, A.S., Rosenblatt J.S., 1974. Olfactory regulation of maternal behavior in rats. II. Effects of peripherally induced anosmia and lesions of the lateral olfactory tract in pup-induced virgins. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*. 86, 233-246.
- Fleming, A.S., Vaccarino F., Tambosso L., Chee P., 1979. Vomeronasal and olfactory system modulation of maternal behavior in the rat. *Science*. 203, 372–374.
- Fleming, A.S., Vaccarino F., Luebke C., 1980. Amygdaloid inhibition of maternal behavior in the nulliparous female rat. *Physiology and Behavior*. 25: 731-43.
- Gleason, D.E., Fuxjager J.M., Oyegbile O.T., Marler A.C., 2009. Testosterone release and social context: when it occurs and why. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 30: 460-469.
- Gray, G.D., Smith E.R., Damassa D.A., Ehrenkranz J.R.L., Davidson J.M., 1978. Neuroendocrine mechanisms mediating the suppression of circulating testosterone levels associated with chronic stress in male rats. *Neuroendocrinology*. 25, 247-256.
- Greenspan F.S., Gardner D.G., 2005. *Endocrinología básica y clínica*. Editorial Manual Moderno. 6° Edición. México. 1033.
- 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 underling 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.
- Gulotta, E.F., 1971. *Meriones unguiculatus*. The American Society of Mammalogists. *Mammalian Species*. 3: 1-5.
- Hansen, S., Harthoorn C., Wallin E., Lofberg L., Svensson K., 1991. Mesotelencephalic dopamine system and reproductive behavior in the female rat: effects of ventral tegmental 6-hydroxydopamine lesions on maternal and sexual responsiveness. *Behavioral Neuroscience*. 105: 588-98.
- Hoffman, G.E., Smith M.S., Verbalis, J.G., 1993. *c-Fos* and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 14: 3:173-213.
- Horrell, D.A., Perea-Rodriguez J.P., Harris N.B., Saltzman W., 2017. Effects of repeated pup exposure on behavioral, neural, and adrenocortical responses to pups

in male California mice (*Peromyscus californicus*). *Hormones and Behavior*. 90: 56–63.

- 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.
- Jara, A. A. 2001. *Endocrinología*. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España.
- Jones, J. S. 2000. Endogenous and exogenous requirements for natural paternal behavior including midwifery. M. Sc. Thesis. Queen's University. Kingston. Canada.
- Kinsley, C.H., Bridges R.S., 1990. Morphine treatment and reproductive condition alter olfactory preferences for pup and adult male odors in female rats. *Developmental Psychobiology*. 23: 331-347.
- Kirkpatrick, B., Kim W.J., Insel R.T., 1994. Limbic system *fos* expression associated with paternal behavior. *Brain Research*. 658: 112-118.
- 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.
- Koch, M., Ehret G., 1991. Parental behavior in the mouse: effects of lesions in the entorhinal / piriform cortex. *Behavioural Brain Research*. 42: 99-105.

- Koolhaas, J.M., van den Brink T.H.C., Roozendaal B., Boorsma F., 1990. Medial amygdala and aggressive behavior: interaction between testosterone and vasopressin. *Aggressive Behavior*.16: 223-229.
- Lee, A., Clancy S., Fleming A.S., 2000. Mother rats bar-press for pups: effects of lesions of the mPOA and limbic sites on maternal behavior and operant responding for pup-reinforcement. *Behavioural and Brain Research*. 108: 213-231.
- Lee, A.W., Brown R.E., 2002. Medial preoptic lesions disrupt parental behavior in both male and female California mice (*Peromyscus californicus*). *Behavioral Neuroscience*. 116, 968–75.
- Lee, A.W., Brown E.R., 2007. Comparison of medial preoptic, amygdala and nucleus accumbens lesions on parental behavior in California mice (*Peromyscus californicus*). *Physiology and Behavior*. 92: 617-628.
- Lehman, M.N., Winans S.S., 1982. Vomeronasal and olfactory pathways to the amygdala controlling male hamster sexual behavior: autoradiographic and behavioral analyses. *Brain Research*. 240, 27-41.
- Lonstein J.S., Stern J.M., 1998. Site and behavioral specificity of periaqueductal gray lesions on postpartum sexual, maternal, and aggressive behaviors in rats. *Brain Research*. 804: 21-35.
- Lonstein, J.S., Pereira M., Morrell I.J., Marler A.C., 2015. Parenting behavior. In: Plant, M.T., Zeleznik J.T., Albertini F.D., Goodman L.R., Herbison E.A., McCarthy M.M., Muglia J.L., Richards S.J. (Eds.), *The Physiology of reproduction*. Elsevier, Amsterdam. pp. 2371-2437.

- Loskota, W.J., Lomax P., Verity M.A., 1974. A stereotaxic atlas of the Mongolian gerbil brain (*Meriones unguiculatus*). Ann Arbor Science, Publisher Inc. Michigan, USA.
- 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.
- Luis, J., Cadena C., Zedillo B., Reyes J., Ramos G., Martínez M., 2012. Testosterone replacement induced paternal behavior in the Mexican Volcano mouse *Neotomodon alstoni* (*Rodentia: Muridae*) *Ethology Ecology and Evolution*. 24 (3): 275-283.
- 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*. 71: 91-95.
- Martínez, A., Arteaga-Silva M., Bonilla-Jaime H., Cárdenas M., Rojas-Castañeda J., Viguera-Villaseñor R., Limón-Morales O., Luis J., 2019. Paternal behavior in the Mongolian gerbil, and its regulation by social factors, T, ER α and AR. *Physiology and Behavior*. 199: 351-358
- Mayer, M.L. 1981. Electrophysiological analysis of inhibitory synaptic mechanisms in the preoptic area of the rat. *The Journal of Physiology*. 316: 46-327.

- Milne-Edwards, A. 1867. *Observations sur les mammiferes du Nord de la Chine. Annales des Sciences Naturelle.* 8, 5°, 375-377.
- 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., Numan M.J., English J.B., 1993. Excitotoxic amino acid injections into the medial amygdala facilitate maternal behavior in virgin female rats. *Hormones and Behavior.* 27: 56-81.
- Numan, M., Insel T.R., 2003. *The neurobiology of parental behavior.* Springer-Verlag: New York, USA.
- Numan, M., Fleming A.S., Levy F., 2006. Maternal Behavior. In: Knobil, E., Neil J., Ewing L., Greenwald G., Markert C., Pfaff D. (Eds.), *The Physiology of reproduction.* Academic Press, New York. pp. 1596-1564.
- Numan, M., 2007. Motivational systems and the neural circuitry of maternal behavior in the rat. *Developmental Psychobiology.* 49: 12-21.
- Numan, M., 2014. *Neurobiology of social behavior: toward an understanding of the prosocial and antisocial brain.* Academic Press, CA.

- 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.
- 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. *Neuropsychology*. 51:731–747.
- Rood, J.P. 1974. Banded mongoose males guard young. *Nature*. 248 (5444): 176.
- Romero-Morales, L., Martínez-Torres M., Cárdenas M., Álvarez C., Carmona A., Cedillo B., Loya-Zurita E., Luis J., 2018. An increase in estradiol facilitates the onset of paternal behavior in the dwarf hamster (*Phodopus campbelli*). *Hormones and Behavior*. 99: 35-40.
- Saatcioglu, F. 2011. Androgen Action. Molecular Mechanisms of androgen action. Human Press. University of Oslo. Norway. 3-24.
- Schneider, J.S., Stone M.K., Wynne-Edwards K.E., Horton T.H., Lydon J O'Malley B., Levine J.E., 2003. Progesterone receptors mediate male aggression toward infants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100: 2951–2956.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, 2001. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. *D Fed*. 75: 13–160.

- Sheehan, T.P., Cirrito J., Numan M.J., Numan M., 2000. Using *c-Fos* immunocytochemistry to identify forebrain regions that may inhibit maternal behavior in rats. *Behavioral Neuroscience*. 114(2), 337-352.
- Siegel, I.H., Rosenblatt S.J., 1975. Estrogen-induced maternal behavior in hysterectomized-ovariectomized virgin rats. *Physiology and Behavior*. 14: 465–471.
- Sikes, R.S., The Animal Care and Use Committee of the American Society of Mammalogists, 2016. 2016 guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research and education. *Journal of Mammalogist*. 97 (3): 663–688.
- 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.
- 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.
- Trainor, C.B., Marler A.C., 2001. Testosterone, Paternal Behavior and Aggression 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.

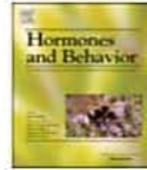
- Vom Saal, F.S. 1984. Time-contingent change in infanticide and parental behavior induced by ejaculation in male mice. *Physiology and Behavior*. 34: 7-15.
- Wang, Z.X., Ferris C.F., De Vries G.J., 1994. Role of septal vasopressin innervations in paternal behavior in prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 91: 400-404.
- Wang, Z.X., Liu Y., Young L.J., Insel T.R. 2000. Hypothalamic vasopressin gene expression increases in both males and females postpartum in a biparental rodent. *Journal of neuroendocrinology*, 12(2): 111-120.
- Williams, T.R., Slotnick B.M., Kirkpatrick B.W., Carter C.S., 1992. Olfactory bulb removal affects partner preference development and estrus induction in female prairie voles, *Physiology and Behavior*. 52, 635-639.
- 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. 2001. Hormonal changes in mammalian fathers. *Hormones and Behavior*. 40: 139-145.
- Wynne-Edwards, K.E., Timonin M.E., 2007. Paternal care in rodents: weakening support for hormonal regulation of the transition to behavioral fatherhood in rodent animal models of biparental care. *Hormones and Behavior*. 52: 114-121.

- Young, L.J., 1999. Oxytocin and vasopressin receptors and species typical social behaviors. *Hormones and Behavior*. 36: 212-221.
- 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.



Contents lists available at ScienceDirect

Hormones and Behavior

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

Neuronal activation associated with paternal and aversive interactions toward pups in the Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*)

Luis Romero-Morales^{a,b}, Mario Cárdenas^c, Martín Martínez-Torres^b, Brenda García-Saucedo^b, Agustín Carmona^d, Juana Luis^{b,*}

^a Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Edificio D, 1° Piso, Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria, Coyoacán, Ciudad de México, Mexico

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

^c Laboratorio de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán, Ciudad de México, Mexico

^d Laboratorio de Biología Experimental, Depto. De Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

mPOA/BNST
AHN/VMH
Mongolian gerbil
Paternal behavior
Aggression

ABSTRACT

Approach/avoid model is used to analyze the neural regulation of maternal behavior in the laboratory rat. This model proposes that the medial preoptic area (mPOA) and bed nucleus of stria terminalis (BNST) are brain regions involved in facilitating mechanisms. By contrast, anterior hypothalamic nucleus (AHN), ventromedial hypothalamic nucleus (VMH), and periaqueductal gray participate in the inhibiting mechanisms of neural regulation of maternal behavior. We hypothesized that there are also facilitating and inhibiting mechanisms in the neural regulation of paternal behavior. Here, we determined which neural areas are activated during paternal and aversive interactions with pups in the Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). By testing paternal behavior, we selected 40 males aggressive toward pups and 20 paternal males. These males were organized into six groups of 10 animals in each group: aggressive males that interacted with pups (AGG-pups) or candy (AGG-candy), paternal males that interacted with pups (PAT-pups) or candy (PAT-candy), and males with testosterone (T)-induced paternal behavior that interacted with pups (IPAT-pups) or candy (IPAT-candy). After interacting with pups or candy, the brains were extracted and analyzed for immunoreactivity (ir) with *c-fos*. Males that interacted with pups had significantly higher *c-fos-ir* in the mPOA/BNST than males that interacted with candy. Males that displayed aggression had significantly higher *c-fos-ir* in the AHN, VMH, and periaqueductal gray than aggressive males that interacted with candy. These results suggest that in the neural regulation of paternal behavior in the Mongolian gerbil underlie positive and negative mechanisms as occurs in maternal behavior.

1. Introduction

The neuroendocrine basis of maternal behavior in mammals has been extensively studied using the laboratory rat as the main model (Factor et al., 1993; Fleming et al., 1980; Hansen et al., 1991; Koch and Ehret, 1991; Numan and Insel, 2003). Maternal behavior occurs when the tendency to approach and interact with stimuli from pups is greater than the tendency to avoid these stimuli. The approach or avoidance of pups depends on the physiological state of the female. Virgin female rats avoid pups, but when they are treated with progesterone and estradiol, which simulate the hormonal changes that occur at the end of pregnancy, the avoidance behavior changes to maternal behavior (Rosenblatt and Mayer, 1995; Dulac et al., 2014). This duality of

approach/avoidance involves several regions of the brain: a facilitating mechanism that descends from the medial preoptic area (mPOA) through the bed nucleus of stria terminalis (BNST) to the midbrain and an inhibitory mechanism that descends from the middle hypothalamus, anterior hypothalamic nucleus (AHN), and ventromedial hypothalamus nucleus (VMH) to the midbrain (periaqueductal gray) (Numan and Insel, 2003; Numan, 2014; Lonstein et al., 2015; Bales and Saltzman, 2016). Both neural regions involved in the facilitation and inhibition of maternal behavior have multiple connections with other regions such as the medial amygdala (MeA), which receives projections from the olfactory bulb (OB) (Numan and Insel, 2003; Numan, 2014; Dulac et al., 2014; Bales and Saltzman, 2016).

Knowledge of the neural mechanisms that regulate maternal

* Corresponding author at: Av. de los Barrios No. 1, Col. Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla c.p. 05490, Edo. México, Mexico.

E-mail addresses: marcar@unam.mx (M. Cárdenas), martor@unam.mx (M. Martínez-Torres), agustincarmona@unam.mx (A. Carmona), luisdc@unam.mx (J. Luis).

<https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2018.07.010>

Received 5 March 2018; Received in revised form 18 July 2018; Accepted 25 July 2018
0018-506X/ © 2018 Elsevier Inc. All rights reserved.

behavior has been obtained by using electrolytic lesions, exocytotoxic lesions, magnetic resonance imaging, and neuronal activation markers such as the products of early expression genes including the *fos* family, which are used for mapping the functional anatomy of the neuroendocrine system (Baum and Everitt, 1992; Coolen et al., 1996; Hoffman et al., 1993; Koch and Ehret, 1991; Lee et al., 2000; Lonstein and Stern, 1998; Newman, 1999; Numan and Insel, 2003; Numan, 2014).

Some studies have shown that several regions that are part of the neural circuit of maternal behavior also play an important role in regulating paternal behavior. In the California mouse, electrolyte lesions in the mPOA, nucleus accumbens, and MeA cause a decrease in the time invested in retrieving, crouching, and grooming (Lee and Brown, 2007). In prairie voles, interactions with pups were found to activate regions such as the mPOA, BNST, lateral septum, and MeA by using *c-fos* as a marker of neuronal activity (Kirkpatrick et al., 1994a, 1994b).

As females, most virgin males of biparental species tend to attack pups and possibly even kill them. However, when these males are fathers, they show a paternal behavior (Elwood, 1977, 1980; Gubernick et al., 1994; Vella et al., 2005). The transition from infanticidal male to paternal male has a high adaptive value because the survival of offspring is vital for the continued existence of any species (Hrdy, 1979). Virgin males aggressive toward pups of the Mongolian gerbil and Mexican volcano mouse (*Neotomodon alstoni*) show paternal behavior when they are primed with testosterone (T) (Luis et al., 2010; Martínez et al., 2015; Luis et al., 2017). This duality in the behavior of males toward pups is similar to that observed in females. Based on this, we hypothesized that there are facilitating and inhibiting mechanisms in the neural regulation of paternal behavior and that these mechanisms underlie neural regions that are activated according to the response of the male toward pups. The aim of this study was to provide evidence of the existence of inhibiting and facilitating mechanisms in the neural regulation of paternal behavior by using Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) as the model. Neural circuit of paternal behavior has not been established, although brain areas such as mPOA, BNST, OB, MeA, lateral septum, and nucleus accumbens are involved in the regulation of paternal behavior (Lee and Brown, 2007; Kirkpatrick et al., 1994a, 1994b; Lonstein et al., 2015). The Mongolian gerbil is a monogamous species; the male significantly participates in the care of pups (Elwood, 1975). In the Mongolian gerbil, social factors such as copulation, cohabitation with a pregnant female, and the presence of pups may activate neuroendocrine changes that facilitate paternal behavior (Brown, 1993; Brown et al., 1995; Reburn and Wynne-Edwards, 1999). This transition is associated with a significant increase in T (Martínez et al., unpublished data).

2. Materials and methods

2.1. Animals

In this study, we used virgin male Mongolian gerbils of age 180–210 days old. Gerbils were weaned between the age of 25 and 28 days. The animals were obtained from a breeding colony kept at the Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. The colony was maintained under an inverted photoperiod of 12:12 h (light–dark cycle; onset of light at 18:00 h) at an ambient temperature between 17 and 21 °C. Gerbils were fed with pellets of Lab Chow 5001 (Nutrimentos Purina, México) and tap water *ad libitum*. At the beginning of the study, three or four gerbils of the same sex were housed in a polycarbonate cage (37 × 27 × 15 cm) with sawdust bedding. We used virgin male Mongolian gerbils to avoid the effect of sexual experience. Virgin males of this rodent may show an aggressive or paternal behavior toward foreign pups of the same species. The criteria for aggressive male behavior included sniffing and attacking pups and moving them violently. In addition, pups may be bitten if they are not withdrawn. Paternal males sniff and touch pups with the nose and groom and crouch beside

them. Through screen tests of paternal behavior, 40 males aggressive toward pups and 20 paternal males were selected; in this study, we name males aversive to those males aggressive toward the pups because virgin aversive female rats also attack the pups (Peters et al., 1991). During these tests, each male was placed in a polycarbonate cage (37 × 27 × 15 cm) with clean sawdust bedding. After 10 min, two 1- to 3-day-old pups were introduced into the cage. The pups were withdrawn quickly if they were attacked (Elwood, 1991; Martínez et al., 2015). When the males displayed paternal behavior, the observation period was for 10 min. These selected gerbils were organized into six groups of 10 animals in each group. In groups 1 and 2, we included gerbils aversive toward pups; the males of group 1 interacted with pups (AGG-pups) and those of group 2 interacted with candy (AGG-candy). The gummy bear was used as control stimulus for its softness and size, thereby trying to make it similar to the pups of the Mongolian gerbil. Candy has also been utilized as the control stimulus in male-pup interactions in prairie voles (Kirkpatrick et al., 1994a, 1994b). Groups 3 and 4 were integrated with paternal males. In group 3, males interacted with pups (PAT-pups), whereas males of group 4 interacted with candy (PAT-candy). In groups 5 and 6, we included males that were initially aversive toward pups, but those males were primed with T to induce paternal behavior (Martínez et al., 2015). The males of group 5 interacted with pups (IPAT-pups), and those of group 6 interacted with candy (IPAT-candy). Males with T-induced paternal behavior were included to compare the neural activation of these males with that of spontaneously paternal males. Before interactions with the pups or candy, aggressive and paternal males remained in individual cages for 24 h, and they were not disturbed to isolate them of stimuli that could cause neural activation. Tests of paternal behavior or interactions with candy were performed on the morning of the following day. The T concentrations were quantified to analyze the correlation of T levels with neural activity.

All experiments were performed in accordance with the ethical guidelines of the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publication No. 8023) and the ethical guidelines and technical specifications of the Mexican Official Norm for the Production, Care and Use of Laboratory Animals (Sikes and the Animal Care and Use Committee of the American Society of Mammalogists, 2016).

2.1.1. Induction of paternal behavior

Aggressive gerbils were primed with a T solution (1 mg T/10 ml of sesame oil, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (Siegel and Rosenblatt, 1975). Each gerbil was injected subcutaneously in the dorsal region with 0.1 ml of this solution after asepsis of the zone with benzalkonium chloride.

2.1.2. Tests of paternal behavior

At 24 h after isolation, behavioral tests were performed following the method described above for the paternal behavior screening. Two pups were used in each test session for a total of 240 pups. The test was ended when pups were attacked. Six pups were slightly bitten, and their wounds were healed with application of gentian violet (1%) because this antiseptic has no odor. Then they were returned to their parents. The exposure period was 90 min for paternal males to interact with the pups or candy and for aggressive males to interact with candy. In the test with paternal males, the pups were changed two times during the exposure period. These interactions were videotaped with a high-definition infrared camera (IR Bullet camera, 2.1 megapixels). Latencies of the onset of paternal behavior (the time elapsed since the pups were introduced until the male made contact with one of them) and the time invested in crouching and grooming were recorded. Observations were made between 11 and 14 h.

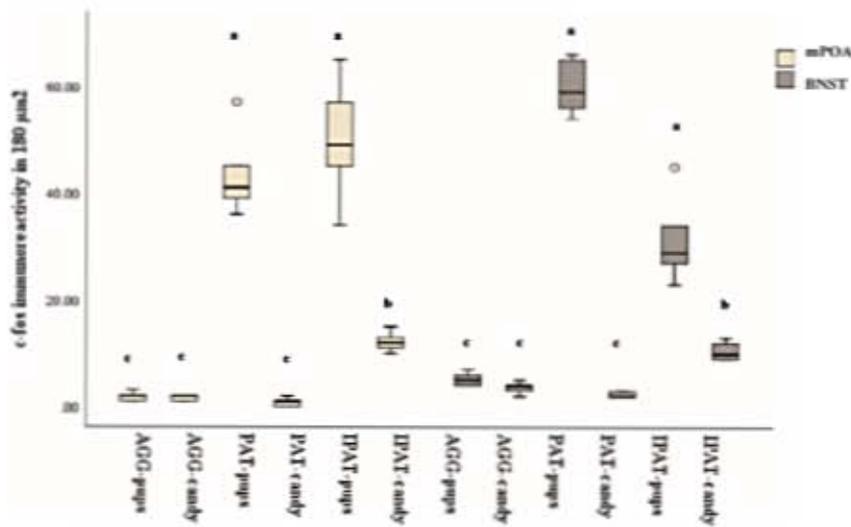


Fig. 1. Paternal males that interacted with pups (PAT-pups and IPAT-pups) have a significantly higher number of *c-fos-ir* cells in mPOA/BNST than paternal males that interacted with candy (PAT-candy and IPAT-candy) and aggressive males (AGG-pups and AGG-candy). Data are presented as the median. Circles indicate outliers, and letters indicate significant differences.

2.2. *c-fos* immunohistochemistry

Five gerbils from each group were deeply anesthetized with a dose of 10 mg/kg xylazine and 90 mg/kg ketamine for 70 min after the interactions because the product of the expression of *c-fos* reaches its maximum between 60 and 90 min following exposure to a stimulus (Morjan et al., 1987; Hoffman et al., 1993). Then, they were intracardially perfused with physiological saline (0.9%), followed by a 2% paraformaldehyde solution in sodium phosphate buffer (0.1 M PB; pH 7.6). The brain was then removed and postfixed for 18 h in the same fixative solution. Subsequently, this tissue was processed and cut into 30 μ m thick coronal sections with a cryostat. The neural areas were located by comparison with the stereotaxic atlas of the Mongolian gerbil (Loskota et al., 1974). The OB (+1.7 mm from bregma, image 300), mPOA (-0.1 mm, image 520, the same section), MeA and AHN (both -0.8 mm, image 590, the same section), VMH (-1.3 mm, image 640, the same section), and periaqueductal gray (-3.5 mm, image 860, the same section). Once sections of the different neural areas were obtained, the samples were placed on gelatinized slides (Nutrient Gelatin, 70151-500G-F; Sigma-Aldrich, CA, USA). Each of the following steps was followed by rinsing in phosphate-buffered saline (PBS) for 5 min: (1) 10 min of incubation in 3% H₂O₂ in PBS, (2) 20 min of incubation in 5% normal goat serum (Vectastain ABC kit, PK-4000; Vector Laboratories) in PBS, and (3) 16 h of incubation at 25 °C with 1:50 dilution of a rabbit *c-fos* antibody epitope located in the N-terminus of human origin (sc-52; Santa Cruz Biotechnology, Inc.) in PBS. After two 5 min rinses in PBS, the sections were incubated with biotinylated goat antirabbit antibody in PBS for 90 min and rinsed two times in PBS (Vectastain ABC kit, PK-6102; Vector Laboratories). The sections were then incubated with an avidin-biotin complex (Vectastain ABC kit, PK-6100; Vector Laboratories) for 30 min, followed by two additional rinses with PBS. Finally, binding was visualized by using 3,3'-diaminobenzidine as the chromogen (DAB Peroxidase Substrate, SK-4100; Vector Laboratories). The sections were dehydrated and then cover-slipped. Negative controls were obtained by omitting the primary antibody incubation step. All neural tissues were processed with the same assay. *c-fos* antibody has been utilized in other rodents such as *Microtus ochrogaster* (Kirkpatrick et al., 1994a, 1994b).

2.2.1. Image analysis

The number of cells that showed *c-fos* immunoreactivity (ir) was quantified in microphotographs with an area of 180 μ m².

Microphotographs were taken with a Motic camera (10 megapixels) attached to a Leica microscope. Three sections of the same area for each animal were bilaterally quantified for *c-fos-ir*. After the data obtained from each animal were added, the mean and standard deviation were calculated for each group.

2.2.2. Hormone assay

Immediately after the parental behavior test, blood samples (250 μ l) were collected from the retro-orbital sinus of all the gerbils in each group. Five males in each group were anesthetized with a mild dose (5 mg/kg xylazine and 60 mg/kg ketamine) for obtaining blood samples, and the remaining five males were anesthetized with a heavy dose for obtaining blood samples before perfusion. These samples were collected in heparinized capillary tubes. Each sample was taken for 1 min between 11 and 14 h. Plasma was separated by centrifugation and stored at -70 °C. Hormonal analysis was conducted by ELISA. The T level was measured with a DRG commercial kit (DRG Diagnostics, Marburg, Germany) at a sensitivity of 0.083 ng/ml. The intra-assay and inter-assay coefficients of variation were 3.9% and 4.6%, respectively. The T assay was validated, and it demonstrated a correlation between the dilutions of serum from Mongolian gerbils and the standard curve. The recovery rate for T was 95.0% ($r = 1.0$). The plate was read in a plate reader (model Multiskan Ascent V1.25, with a filter of 450-nm wavelength; Thermo Electron Corporation).

2.3. Statistical analysis

2.3.1. *c-fos* immunoreactivity data

The number of *c-fos* immunoreactivity (ir) cells in the neural areas of males of the AGG-pups, AGG-candy, PAT-pups, PAT-candy, IPAT-pups, and IPAT-candy groups was analyzed with a nonparametric Kruskal-Wallis test because of the non-normal distribution of the data (Anderson-Darling test, $P < 0.05$). Bonferroni correction for multiple testing was applied for pairwise comparisons.

2.3.2. Testosterone quantification data

The T levels between the AGG-pups, AGG-candy, PAT-pups, PAT-candy, IPAT-pups, and IPAT-candy groups were also analyzed with the Kruskal-Wallis test. Bonferroni correction for multiple testing was applied for pairwise comparisons.

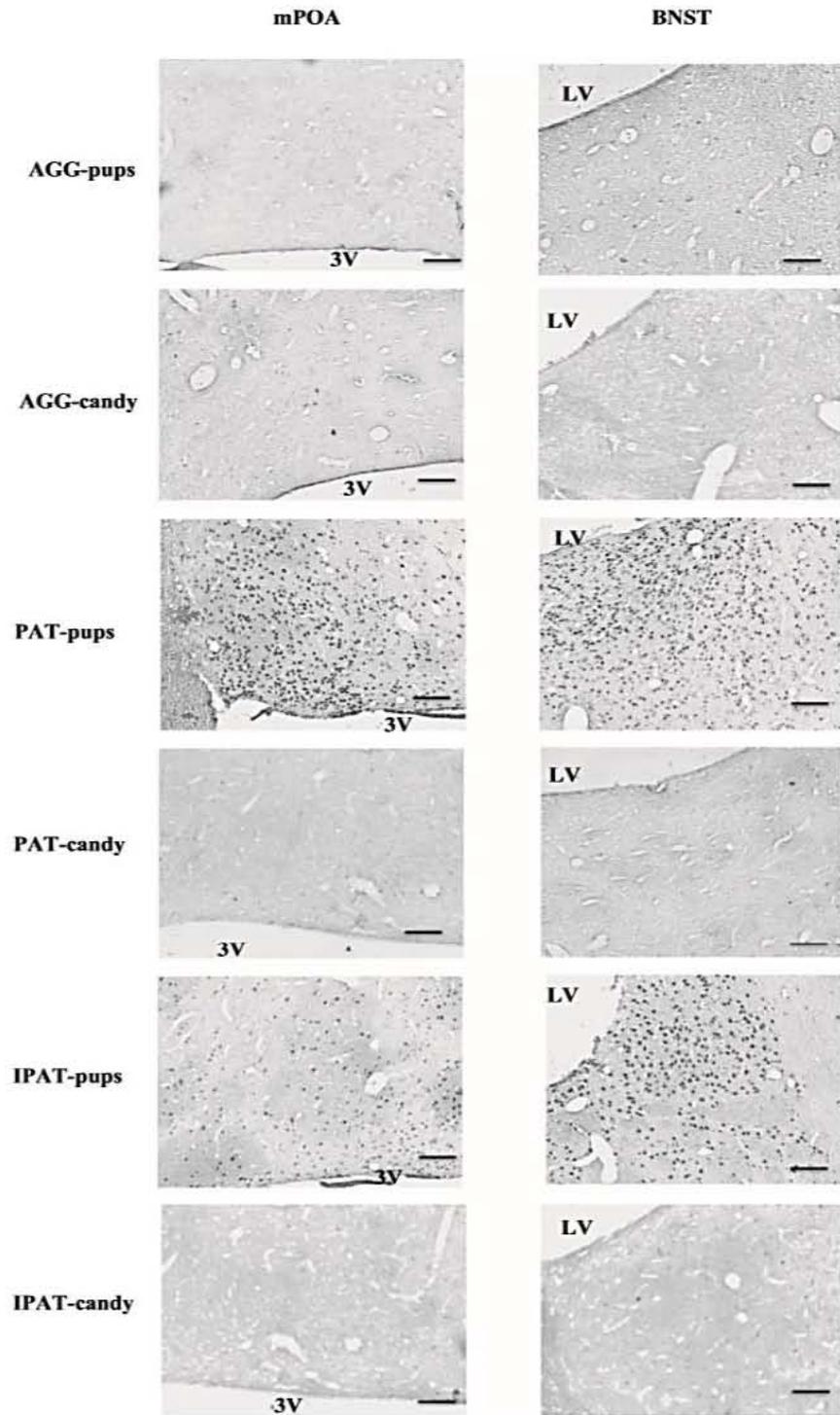


Fig. 2. Representative photomicrographs showing *c-fos*-ir cells in the mPOA/BNST of the males of different groups. 3V = third ventricle, LV = lateral ventricle. Coronal sections, scale bars = 100 μ m.

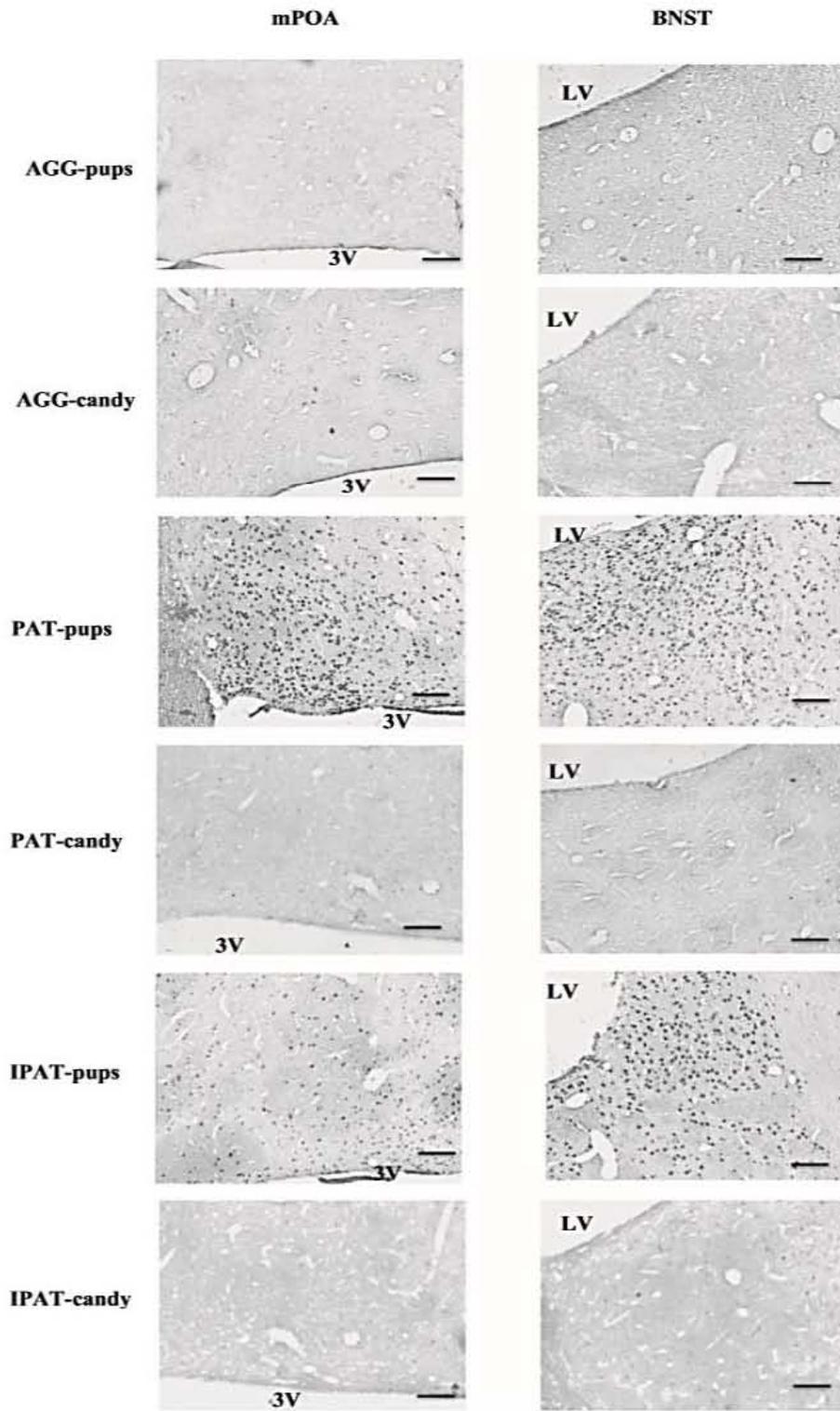


Fig. 2. Representative photomicrographs showing *c-fos*-ir cells in the mPOA/BNST of the males of different groups. 3V = third ventricle, LV = lateral ventricle. Coronal sections, scale bars = 100 μ m.

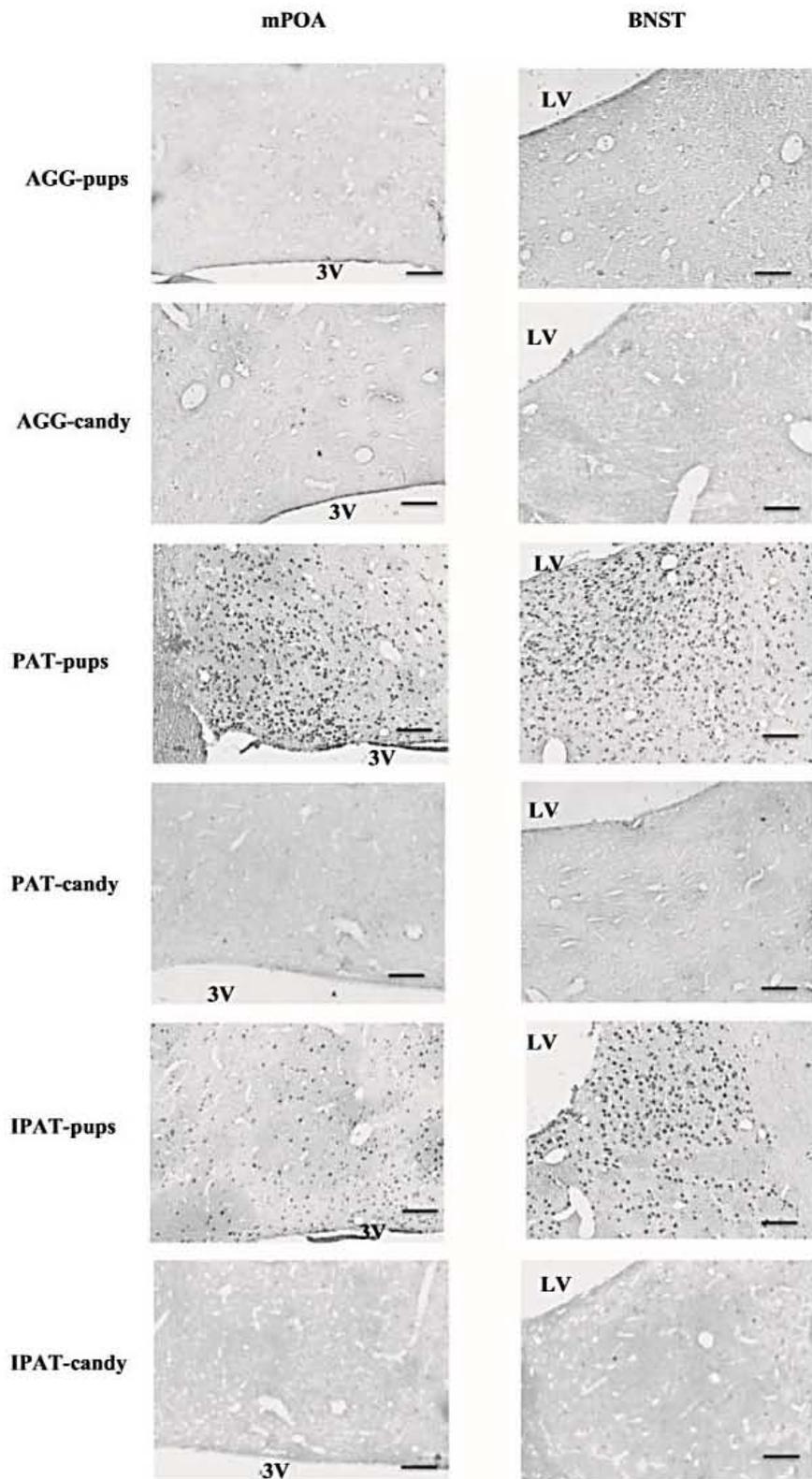


Fig. 2. Representative photomicrographs showing *c-fos*-ir cells in the mPOA/BNST of the males of different groups. 3V = third ventricle, LV = lateral ventricle. Coronal sections, scale bars = 100 μ m.

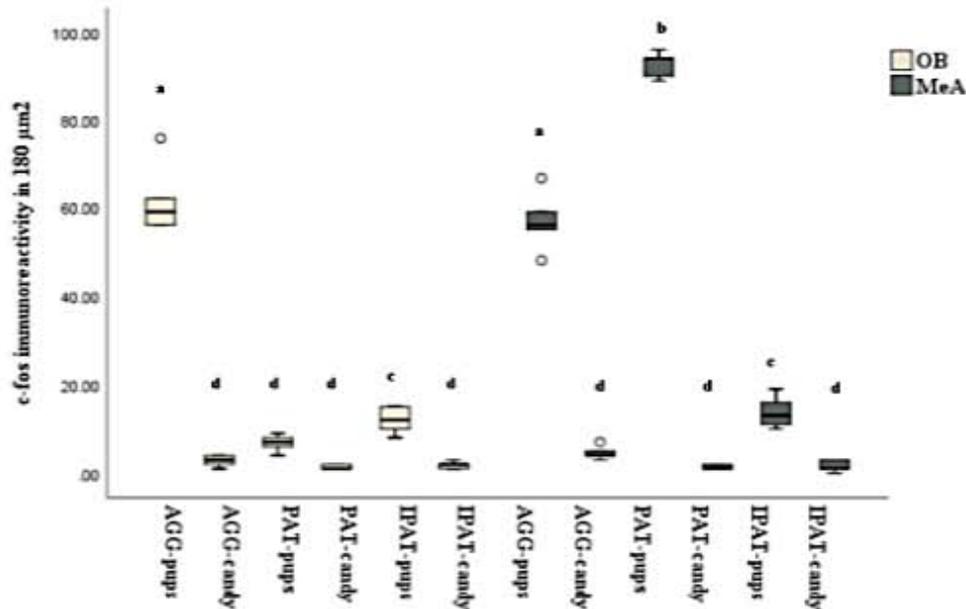


Fig. 5. Both paternal and aggressive interactions with pups had greater *c-fos*-ir cells in OB and MeA than those that interacted with candy. Data are presented as the median. Circles indicate outliers, and letters indicate significant differences.

males that interacted with candy. These results showed that these neural regions are strongly activated when Mongolian gerbil males display paternal behavior, which indicates that the mPOA and BNST regions are involved in the neural regulation of paternal behavior in this rodent. In the laboratory rat, these neural areas are central to the neural circuit that specifically regulates maternal behavior (Numan, 2007, 2014; Lonstein et al., 2015). In prairie voles, virgin males that interact paternally with pups of the same species have higher activation in the mPOA and BNST than males that interact with candy (Kirkpatrick et al., 1994a, 1994b). In virgin California mouse males, electrolytic lesions in the mPOA cause a decrease in the time spent in licking pups and huddling pups (Lee and Brown, 2002, 2007).

Mongolian gerbil males that displayed an aggressive behavior toward pups had a significantly higher number of *c-fos*-ir cells in the AHN, VMH, and periaqueductal gray than aggressive males that interacted with candy. These results suggest for the first time that these neural regions are involved in the regulation of aversive interactions in males. The AHN, VMH, and periaqueductal gray are components of the neural circuit that mediates aversive and defensive behaviors in female laboratory rats (Canteras, 2002; Numan and Insel, 2003; Sheehan et al., 2000). Exocytotoxic lesions of the AHN and VMH stimulate the display of maternal care in nulliparous rats treated with estradiol and progesterone (Bridges et al., 1999). It has also been observed that electrostimulation of VMH inhibits the firing of neurons in the mPOA, which is a region that is involved in the display of parental care (Mayer, 1981; Lonstein et al., 2015). Behavioral evidence indicates that projections from the AHN to the periaqueductal gray play an important role in defensive behavior as well as fear and avoidance responses (Numan and Insel, 2003; Sheehan et al., 2000).

The OB and MeA were activated in both paternal and aversive males possibly because these neural regions are part of the positive and negative mechanisms that regulate paternal behavior in the Mongolian gerbil. As already mentioned, in the female rat, these two neural areas have multiple connections with the facilitators and inhibitors of the mPOA/BNST and AHN/VMH regions, respectively, of the neural circuit of the maternal behavior (Numan and Insel, 2003; Numan, 2014;

Brunton and Russell, 2015; Bales and Saltzman, 2016). The OB is an important component of the olfactory system in rodents; in virgin female rats, the anosmia eliminates fear and withdrawal responses toward pups (Fleming and Rosenblatt, 1974; Fleming et al., 1979; Brunton and Russell, 2015). However, the physiological changes in females postpartum make the odors from pups attractive (Kinsley and Bridges, 1990). Similarly, virgin females with MeA lesions no longer avoid pups, and it is possible that this neural structure mediates avoidance responses toward pups (Fleming et al., 1980; Numan et al., 1993). However, this avoidance mechanism would have to be depressed at parturition for maternal behavior to occur (Numan, 2007). On the basis of these results, we suggest that these neural areas can participate in the positive and negative mechanisms that regulate paternal behavior in this rodent. Studies in California mouse and prairie voles showed that lesions in olfactory areas interrupt both paternal and maternal behavior (Lee and Brown, 2007; Kirkpatrick et al., 1994a, 1994b; Williams et al., 1992). The MeA has been related to neural regulation of other social behaviors such as mating and aggression in the laboratory rat and golden hamster (*Mesocricetus auratus*) (Fleming et al., 1980; Koolhaas et al., 1990; Lehman and Winans, 1982). In prairie voles, paternal interactions activate the MeA (Kirkpatrick et al., 1994a, 1994b). Thus, these neural regions participate in multiple social behaviors. Therefore, they are activated during displays of these behaviors (Numan and Insel, 2003).

These results also showed that paternal or aversive interactions with pups are strong stimuli for neural activation because aggressive and paternal males that interacted with pups had significantly higher number of *c-fos*-ir cells than the males that interacted with candy. In prairie voles and California mouse, the number of *c-fos*-ir cells is greater in males exposed to pups than in males that interacted with candy or marble in brain areas such as the mPOA, BNST, OB, and MeA (Kirkpatrick et al., 1994a, 1994b; Horrell et al., 2017). According to Kirkpatrick et al. (1994a, 1994b), this increase is because pups are a source of multiple stimuli that cause neuronal activation in males during these interactions.

In this study, we observed that *c-fos*-ir cells in the mPOA/BNST in

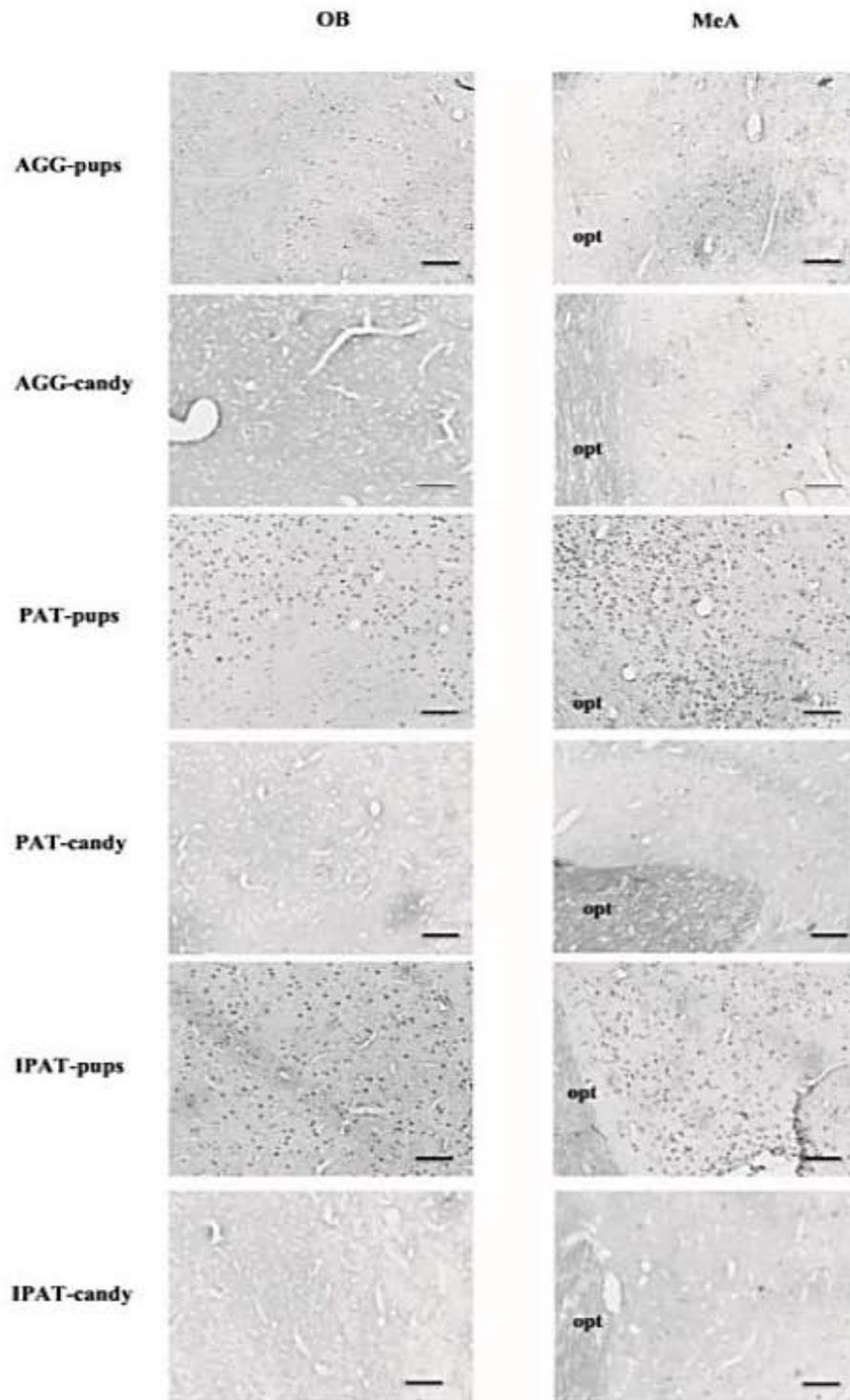


Fig. 6. Representative photomicrographs showing *c-fos-ir* cells in the OB and MeA. opt = optic tract. Coronal sections, scale bars = 100 μ m.

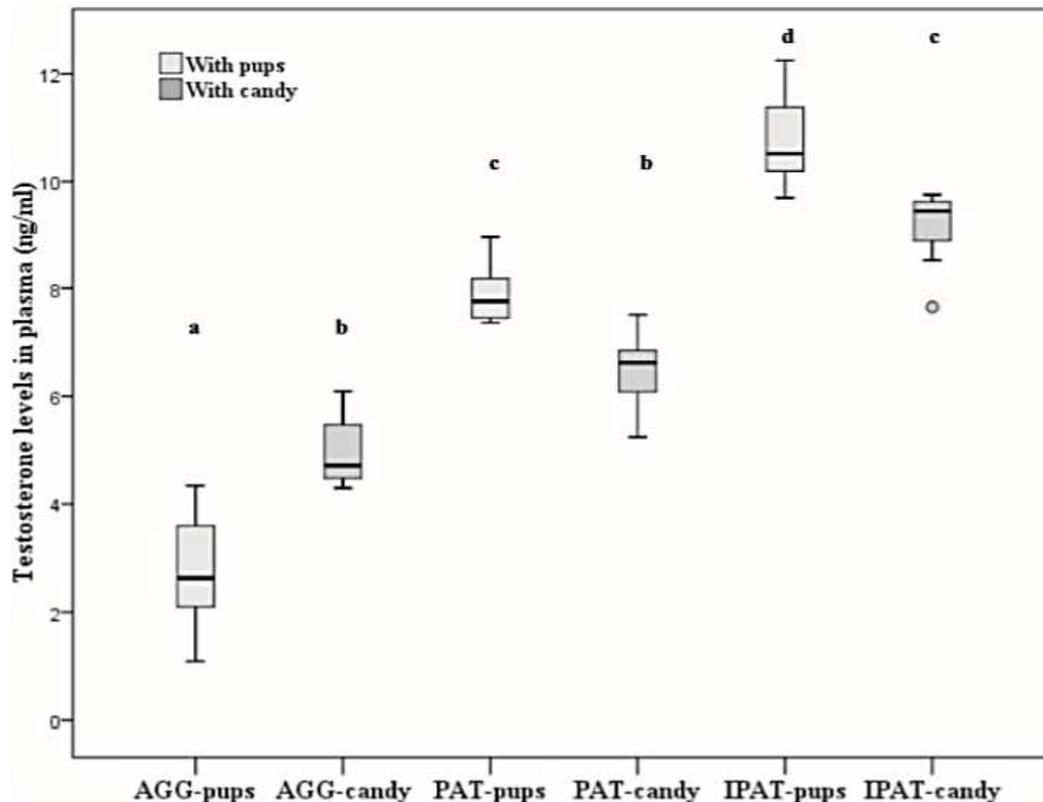


Fig. 7. Paternal males that interacted with pups (IPAT-pups and PAT-pups) had significantly higher T levels than paternal males that interacted with candy (IPAT-candy and PAT-candy) and aggressive males (AGG-pups and AGG-candy). Data are presented as the median. Numbers indicate outliers, and letters indicate significant differences.

males of the AGG-pups group were absent or very low in number. The same was observed in the AHN, VMH, and periaqueductal gray regions in males of the IPAT-pups and PAT-pups groups. These results reinforce that these neural areas are involved in the regulation of paternal and aversive interactions, respectively.

Male Mongolian gerbil that exhibited paternal behavior had significantly higher concentrations of T in plasma than males that displayed aversion toward pups. The concentration of T was significantly higher in males of the IPAT-pup group than in males of the PAT-pups group. Furthermore, males of the IPAT-pups group had a significantly higher number of *c-fos-ir* cells than males of the PAT-pups group in the mPOA/BNST. However, no correlation was found between the T concentrations and the number of *c-fos-ir* cells in these neural areas. Investigations in our laboratory have shown that paternal males have significantly higher T levels than aggressive males (Martínez et al., unpublished data). According to Numan et al. (2006), the occurrence of an approach toward pups (paternal behavior) depends on the physiological state of the animal. This difference in T concentration may be the hormonal basis in response to pups.

Males of the IPAT-pups and PAT-pups groups huddled, groomed, and sniffed the pups. The time spent by males of the IPAT-pups group was significantly higher than that of males of the PAT-pups group. Furthermore, males of the IPAT-pups group also had a significantly higher number of *c-fos-ir* cells in the mPOA/BNST than males of the PAT-pups group. These results suggest that high T concentrations enhance paternal behavior and increase neural activity in these brain regions that regulate paternal interactions. However, in males of the IPAT-pups group, no significant correlations were observed between T concentration and time invested in huddling and grooming and the

number of *c-fos-ir* cells in the mPOA/BNST. This could be because the males of IPAT-pups group had T concentrations in plasma above of the physiological level of those observed in virgin spontaneously paternal males.

Males of the AGG-pups group had a significantly lower T concentration than males of the AGG-candy group; this result is surprising because social interactions such as aggression between conspecific males, copulatory behavior, and paternal behavior have been associated with an increase in the T level (Gleason et al., 2009; Martínez et al., 2015). However, in this study, a decrease in T levels is reported when aversive males interacted with foreign pups of the same species. We believe that the presence of pups could cause stress in these males, which consequently affected the synthesis of T. Some studies have mentioned that stress affects the biosynthesis of luteinizing hormone, thus causing a decrease in T concentrations (Gray et al., 1978; Dong et al., 2004).

These results suggest that the duality of the response of males toward pups in the Mongolian gerbil underlie positive and negative neural mechanisms, in which the mPOA/BNST are part of the positive mechanism of paternal behavior and the AHN/VMH and periaqueductal gray are part of the negative mechanism of neural circuit paternal behavior.

Future studies in other species with paternal care should support these results.

Acknowledgments

This research was supported by Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (IN213317) of Universidad

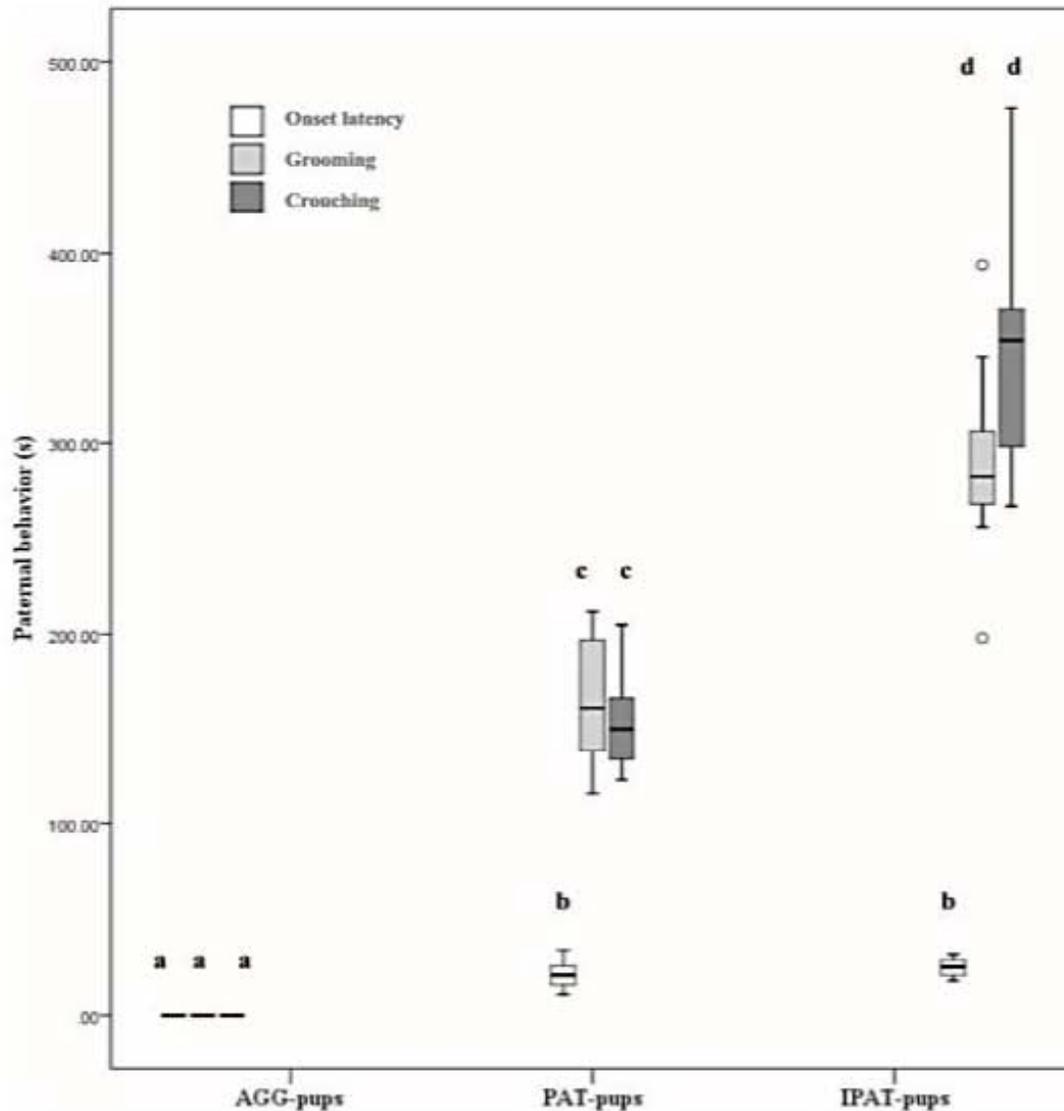


Fig. 8. Males of the IPAT-pups group had an onset latency of paternal behavior shorter than males of the PAT-pups group. The males of the IPAT-pups group also spent significantly more time ($P < 0.05$) in crouching and grooming than males of the PAT-pups group. Data are presented as the median. Numbers indicate outliers, and letters indicate significant differences.

Nacional Autónoma de México and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CVU 622655). We thank Carmen Álvarez Rodríguez and María del Rosario González Valle for their valuable assistance in this study. We express our gratitude to the anonymous reviewers.

References

Bales, L.K., Saltzman, W., 2016. Fathering in rodents: neurobiological substrates and consequences for offspring. *Horm. Behav.* 77, 249–259.
 Baum, M.J., Everitt, R.J., 1992. Increased expression of *c-fos* in the medial preoptic area after mating in male rats: role of afferent inputs from the medial amygdala and midbrain central tegmental field. *Neuroscience* 50, 627–646.
 Bridges, R.S., Mann, P.E., Coppeta, J.S., 1999. Hypothalamic involvement in the regulation of maternal behaviour in the rat: inhibitory roles for the ventromedial hypothalamus and the dorsal/anterior hypothalamic areas. *J. Neuroendocrinol.* 11, 259–266.
 Brown, R.E., 1993. Hormonal and experiential factors influencing paternal behaviour in male rodents: an integrative approach. *Behav. Process.* 20, 1–20.
 Brown, R.E., Mordoch, T., Murphy, P.R., Moger, W.H., 1995. Hormonal responses of male

gerbils to stimuli from their mate and pups. *Horm. Behav.* 26, 114–118.
 Brunton, J.P., Russell, A.J., 2015. Maternal brain adaptations in pregnancy. In: Plant, M.T., Zelenik, J.T., Albertini, F.D., Goodman, L.R., Herbison, E.A., McCarthy, M.M., Muggia, J.L., Richards, S.J. (Eds.), *The Physiology of Reproduction*. Elsevier, Amsterdam, pp. 1957–2026.
 Canteras, N.S., 2002. The medial hypothalamic defensive system: biological organization and functional implications. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 71, 481–491.
 Coolen, L.M., Peters, H.J., Veening, J.G., 1996. *Fos* immunoreactivity in the rat brain following consummatory elements of sexual behavior: a sex comparison. *Brain Res.* 738, 67–82.
 Dong, Q., Salva, A., Sottas, C.M., Niu, E., Holmes, M., Handy, M.P., 2004. Rapid glucocorticoid mediation of suppressed testosterone biosynthesis in male mice subjected to immobilization stress. *J. Androl.* 25 (6), 973–981.
 Dulac, C., O’Connell, A.L., Wu, Z., 2014. Neural control of maternal and paternal behavior. *Science* 345, 765–770.
 Elwood, R.W., 1975. Paternal and maternal behaviour in the Mongolian gerbil. *Anim. Behav.* 23, 766–772.
 Elwood, R.W., 1977. Changes in the responses of male and female gerbils towards test pups during the pregnancy of the female. *Anim. Behav.* 25, 46–51.
 Elwood, R.W., 1980. The development, inhibition and disinhibition of pup-cosmopolitan in the Mongolian gerbil. *Anim. Behav.* 28, 1188–1194.

- Elwood, R.W., 1991. Ethical implications of studies on infanticide and maternal aggression in rodents. *Anim. Behav.* 42, 841–849.
- Factor, E.M., Mayer, A.D., Rosenblatt, J.S., 1993. Peripeduncular nucleus lesions in the rat: I. Effects on maternal aggression, lactation, and maternal behavior during pre- and postpartum periods. *Behav. Neurosci.* 107, 166–185.
- Fleming, A.S., Rosenblatt, J.S., 1974. Olfactory regulation of maternal behavior in rats. II. Effects of peripherally induced anosmia and lesions of the lateral olfactory tract in pup-induced virgins. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 86, 233–246.
- Fleming, A.S., Vaccarino, F., Tambosso, L., Chee, P., 1979. Vomeronasal and olfactory system modulation of maternal behavior in the rat. *Science* 203, 372–374.
- Fleming, A.S., Vaccarino, F., Laebke, C., 1980. Amygdaloid inhibition of maternal behavior in the nulliparous female rat. *Physiol. Behav.* 25, 731–743.
- Gleason, D.E., Fuzjager, J.M., Oyegebile, O.T., Marler, A.C., 2009. Testosterone release and social context: when it occurs and why. *Front. Neuroendocrinol.* 30, 460–469.
- Gray, G.D., Smith, E.R., Damassa, D.A., Ehrenkrantz, J.R.L., Davidson, J.M., 1978. Neuroendocrine mechanisms mediating the suppression of circulating testosterone levels associated with chronic stress in male rats. *Neuroendocrinology* 25, 247–256.
- 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*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 34, 225–231.
- Hansen, S., Harthou, C., Wallin, E., Lofberg, L., Svensson, K., 1991. Mesolimbic dopamine system and reproductive behavior in the female rat: effects of ventral tegmental 6-hydroxydopamine lesions on maternal and sexual responsiveness. *Behav. Neurosci.* 105, 588–598.
- Hoffman, G.E., Smith, M.S., Verbalis, J.G., 1993. *c-fos* and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems. *Front. Endocrinol.* 14 (3), 173–213.
- Horrell, D.A., Perea-Rodriguez, J.P., Harris, N.B., Saltzman, W., 2017. Effects of repeated pup exposure on behavioral, neural, and adrenocortical responses to pups in male California mice (*Peromyscus californicus*). *Horm. Behav.* 90, 56–63.
- Hrdy, S.B., 1979. Infanticide among animals: a review, classification and examination of the implications for the reproductive strategies of females. *Ethol. Sociobiol.* 1, 13–40.
- Kinsley, C.H., Bridges, R.S., 1990. Morphine treatment and reproductive condition alter olfactory preferences for pup and adult male odors in female rats. *Dev. Psychobiol.* 23, 331–347.
- Kirkpatrick, B., Kim, W.J., Insel, R.T., 1994a. Limbic system *fos* expression associated with paternal behavior. *Brain Res.* 658, 112–118.
- Kirkpatrick, B., Williams, L.R., Slotnick, B.M., Carter, C.S., 1994b. Olfactory bulbectomy decreases social behavior in male prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Physiol. Behav.* 55, 885–889.
- Koch, M., Ehret, G., 1991. Parental behavior in the mouse: effects of lesions in the entorhinal/piriform cortex. *Behav. Brain Res.* 42, 99–105.
- Koolhaas, J.M., van den Brink, T.H.C., Roozendaal, B., Boersma, F., 1990. Medial amygdala and aggressive behavior: inter action between testosterone and vasopressin. *Aggress. Behav.* 16, 223–229.
- Lee, A.W., Brown, R.E., 2002. Medial preoptic lesions disrupt parental behavior in both male and female California mice (*Peromyscus californicus*). *Behav. Neurosci.* 116, 968–975.
- Lee, A.W., Brown, R.E., 2007. Comparison of medial preoptic, amygdala and nucleus accumbens lesions on parental behavior in California mice (*Peromyscus californicus*). *Physiol. Behav.* 92, 617–628.
- Lee, A., Clancy, S., Fleming, A.S., 2000. Mother rats bar-press for pups: effects of lesions of the mPOA and limbic sites on maternal behavior and operant responding for pup-reinforcement. *Behav. Brain Res.* 108, 213–231.
- Lehman, M.N., Winans, S.S., 1982. Vomeronasal and olfactory pathways to the amygdala controlling male hamster sexual behavior: autoradiographic and behavioral analyses. *Brain Res.* 240, 27–41.
- Lonstein, J.S., Stern, J.M., 1998. Site and behavioral specificity of periaqueductal gray lesions on postpartum sexual, maternal, and aggressive behaviors in rats. *Brain Res.* 804, 21–35.
- Lonstein, J.S., Pereira, M., Morrell, L.J., Marler, A.C., 2015. Parenting behavior. In: Plant, M.T., Zeleznik, J.T., Albertini, F.D., Goodman, L.R., Herbison, E.A., McCarthy, M.M., Muglia, J.L., Richards, S.J. (Eds.), *The Physiology of Reproduction*. Elsevier, Amsterdam, pp. 2371–2437.
- Loskota, W.J., Lomax, P., Verity, M.A., 1974. A Stereotaxic Atlas of the Mongolian Gerbil Brain (*Meriones unguiculatus*). Ann Arbor Science, Publisher Inc., Michigan, USA.
- 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. *Horm. Behav.* 57, 271–275.
- Luis, J., Ramos, G., Martínez-Torres, M., Carmona, A., Cedillo, B., Delgado, J., 2017. Testosterone induces paternal behavior in sexually inexperienced males of *Neotomodon alstoni* (Rodentia: Muridae). *Rev. Biol. Trop.* 65 (4), 1419–1427.
- 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. *Horm. Behav.* 71, 91–95.
- Mayer, M.L., 1981. Electrophysiological analysis of inhibitory synaptic mechanisms in the preoptic area of the rat. *J. Physiol.* 316, 46–327.
- Morgan, J.I., Cohen, D.R., Hempstead, J.L., Curran, T., 1987. Mapping patterns of *c-fos* expression in the central nervous system after seizure. *Science* 2377, 7–192.
- Newman, S.W., 1999. The medial extended amygdala in male reproductive behavior. A node in the mammalian social behavior network. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 877, 242–257.
- Numan, M., 2007. Motivational systems and the neural circuitry of maternal behavior in the rat. *Dev. Psychobiol.* 49, 12–21.
- Numan, M., 2014. *Neurobiology of Social Behavior: Toward an Understanding of the Prosocial and Antisocial Brain*. Academic Press, CA.
- Numan, M., Insel, T.R., 2003. *The Neurobiology of Parental Behavior*. Springer-Verlag, New York, USA.
- Numan, M., Numan, M.J., English, J.B., 1993. Excitotoxic amino acid injections into the medial amygdala facilitate maternal behavior in virgin female rats. *Horm. Behav.* 27, 56–81.
- Numan, M., Fleming, A.S., Levy, F., 2006. Maternal behavior. In: Knobil, E., Neil, J., Ewing, L., Greenwald, G., Markert, C., Pfaff, D. (Eds.), *The Physiology of Reproduction*. Academic Press, New York, pp. 1569–1654.
- Peters, L.C., Sist, T.C., Kristal, M.B., 1991. Maintenance and decline of the suppression of infanticide in mother rats. *Physiol. Behav.* 50, 451–456.
- Reburn, C.J., Wynne-Edwards, K.E., 1999. Hormonal changes in males of naturally biparental and uniparental mammals. *Horm. Behav.* 35, 163–176.
- Rosenblatt, J.S., Mayer, A.D., 1995. An analysis of approach/withdrawal processes in the initiation of maternal behavior in the laboratory rat. In: Hood, K.E., Greenberg, G., Tobach, E. (Eds.), *Behavioral Development*. Garland Press, New York, pp. 177–230.
- Sheehan, T.P., Cirrito, J., Numan, M.J., Numan, M., 2000. Using *c-Fos* immunocytochemistry to identify forebrain regions that may inhibit maternal behavior in rats. *Behav. Neurosci.* 114 (2), 337–352.
- Siegel, H.I., Rosenblatt, J.S., 1975. Progesterone inhibition of estrogen-induced maternal behavior in hysterectomized-ovariectomized virgin rats. *Horm. Behav.* 6, 223–230.
- Sikes, R.S., *The Animal Care and Use Committee of the American Society of Mammalogists*, 2016. 2016 guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research and education. *J. Mammal.* 97 (3), 663–688.
- Vella, E.T., Evans, M.W., Wynne-Edwards, K.E., 2005. Ontogeny of the transition from killer to caregiver in dwarf hamsters (*Phodopus campbelli*) with biparental care. *Dev. Psychobiol.* 46 (2), 75–85.
- Williams, T.R., Slotnick, B.M., Kirkpatrick, B.W., Carter, C.S., 1992. Olfactory bulb removal affects partner preference development and estrus induction in female prairie voles. *Physiol. Behav.* 52, 635–639.