



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

Regulación neural de la conducta paterna
en el hámster enano *Phodopus campbelli*.

TESIS

Que para obtener el título de:

BIÓLOGA

Presenta:

DAFNE MARGARITA RAYA CHÁVEZ

Directora de Tesis:

Dra. JUANA ALBA LUIS DÍAZ

Los Reyes Iztacala, Tlanepantla de Baz, Edo. Mex.

Septiembre, 2022





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.

Nothing in biology makes sense except
in the light of evolution.

-Theodosius Dobzhansky

Nothing in life is to be feared, it is only to
be understood

-Marie Curie

Don't waste your time always searching for those
wasted years. Face up, make your stand and
realize you're living in the golden years.

-Adrian Smith

Agradecimientos

A mi familia, que siempre ha estado conmigo desmañándose, alentándome y al pendiente de mi avance personal y académico. Gracias principalmente a mamá, a papá y a Sam. Gracias a todos mis tíos, a mis primos y a mis abuelos consentidores. Los quiero mucho.

A mis amigos de la carrera, por compartir conmigo maravillosos momentos en las aulas, en campo y fuera del rubro académico. Gracias a Dany, Giovanna y Rubén. Gracias a Jael por tantos años de amistad, por los consejos y por la compañía durante toda la carrera.

A mis compañeros de laboratorio por su confianza. Gracias Ikbal, Héctor, Melissa y Brenda. Gracias a Rodrigo por todo el apoyo, comprensión y paciencia; por tanto rock y por todo lo vivido dentro y fuera del laboratorio.

A la UNAM por brindarme la oportunidad de ser estudiante de intercambio y conocer personas, culturas y paisajes increíbles.

A los maestros que tuve a lo largo de la carrera que me dejaron enseñanzas académicas muy valiosas.

A mis hamstercitos que, sin ellos, este proyecto no hubiera sido posible.

A la Maestra Carmen por el apoyo con las técnicas.

Al Doctor Luis Oscar Romero por compartirme de sus conocimientos acerca del hámster enano.

A la Doctora Juanita por aceptar ser mi tutora, por ser tan paciente conmigo y por brindarme tanto durante mi estancia en el laboratorio.

A mis sinodales Dr. Roberto Munguia Steyer, Dr. Rodolfo Cárdenas Reygadas y Dra. Martha Salcedo Álvarez por las observaciones que hacen posible esta tesis.

Al M. en C. Mario Cárdenas del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán por el apoyo con la técnica ELISA.

Este proyecto fue financiado por el programa PAPIIT con número de registro IA205721 de la Universidad Nacional Autónoma de México

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
Conducta paterna	2
Factores sociales que regulan la conducta paterna	8
Regulación hormonal	11
Estudio de la actividad cerebral	17
Regulación neural	19
Antecedentes	21
Descripción del organismo	23
HIPÓTESIS	26
OBJETIVOS	26
MATERIALES Y MÉTODOS	27
Animales	27
Interacciones paternas	28
Obtención de muestras sanguíneas y perfusión	28

Inmunohistoquímica	29
Análisis de datos	31
RESULTADOS	32
Conducta paterna	32
Células inmunorreactivas a c-Fos	35
Testosterona	37
DISCUSIÓN	38
CONCLUSIÓN	41
REFERENCIAS	42
ANEXO I	54
Desparafinado y rehidratado mediante la técnica convencional histológica	54
ANEXO II	55
Técnica inmunohistoquímica para la proteína c-Fos	55
ANEXO III	56
Abreviaturas	56

RESUMEN

La conducta paterna está presente en al menos el 6% de los mamíferos y se define como aquella conducta que incrementa la adecuación de su progenie. Este proceso es regulado a diferentes niveles: sensorial, hormonal y neural. Se ha propuesto que existe una homología en la regulación neural de la conducta materna y paterna. A diferencia del circuito neural de la conducta materna, sobre el cual se han realizado múltiples investigaciones, pocos estudios se han hecho del circuito neural que regula la conducta paterna; por lo anterior, el presente estudio tuvo como objetivo determinar si el área preóptica media (mPOA), el lecho del núcleo de la estría terminalis (BNST), la amígdala media (MeA) y el bulbo olfatorio (OB) participan en la regulación neural de la conducta paterna del hámster enano (*Phodopus campbelli*), así como determinar si la testosterona (T) en este roedor está correlacionada con la cantidad de cuidados paternos desplegados. Se utilizaron 10 hámsteres vírgenes espontáneamente paternales, organizados en dos grupos de 5 animales cada uno. Los machos del primer grupo interactuaron con una cría y los machos del grupo control con un dulce. El periodo de observación fue de una hora, al finalizar, cada hámster fue anestesiado profundamente y se les extrajo una muestra sanguínea por vía retro-orbital, para la cuantificación de T por ELISA. Enseguida fueron perfundidos intracardialmente y los cerebros fueron disectados. Se realizaron cortes coronales de 5µm de las cuatro áreas neurales de estudio, y se realizó la inmunohistoquímica para la proteína c-Fos. El número de células inmunorreactivas de cada área neural fue cuantificado bilateralmente, los datos obtenidos de cada grupo fueron contrastados mediante la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. En los machos que interactuaron con las crías, el número de células inmunorreactivas a c-Fos en mPOA, BNST, MeA y OB fue significativamente más alto que en los machos que interactuaron con un dulce. No hubo correlación entre la concentración de T y el tiempo invertido en el abrigo y acicalamiento de las crías. Estos resultados mostraron que la interacción con las crías causa la activación de mPOA, BNST, MeA y OB, lo cual sugiere que estos núcleos participan en la regulación neural de la conducta paterna del hámster enano, y apoya la homología entre el circuito neural de la conducta materna y paterna.

INTRODUCCIÓN

Conducta paterna

El cuidado parental se define como aquella conducta que realizan los padres, favoreciendo la adecuación de su descendencia (Clutton-Brock, 1991). Dichos cuidados ocurren en gran cantidad de invertebrados como insectos, moluscos y arácnidos; así como en vertebrados como peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos; sin embargo, la participación que tiene el macho y/o la hembra en el cuidado de sus crías, es variable entre los individuos de especies de distintos taxa (Dulac *et al.*, 2014).

En los peces, el cuidado parental se presenta en al rededor del 50% de las especies y es predominantemente paterno (Gross & Sargent, 1985). En las aves, aproximadamente el 90% de las especies de aves son biparentales, es decir, tanto el macho como la hembra se hacen responsables del cuidado de sus crías (Ketterson & Nolan, 1994). En la mayoría de los mamíferos, a diferencia de los peces y las aves, la hembra se encarga del cuidado de las crías y únicamente en el 5% de las especies se ha observado cuidado biparental, en el cual se incluye tanto el cuidado materno como el paterno (Clutton-Brock, 1991).

En los mamíferos, resulta particularmente interesante la presencia de cuidados paternos, pues no es común, debido a que la fertilización interna asegura la maternidad, pero no la paternidad (Dulac *et al.*, 2014). Además, las hembras están altamente adecuadas en la crianza individual de sus hijos mediante la producción de leche y el despliegue de un conjunto de actividades encaminadas a la sobrevivencia y desarrollo de los hijos (Lukas & Clutton-Brock, 2013). Es en estos procesos del embarazo y el parto, donde ocurren gran cantidad de transiciones

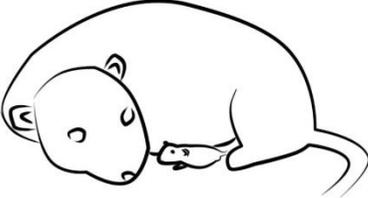
neuroconductuales, tal que aquellas conductas de torpeza, indiferencia o incluso de agresión hacia las crías es reemplazada por cuidados hábiles y compasivos (Numan, 2015). Claro está que aquellos que les proporcionan cuidados a la cría que no son la madre biológica, no gestan ni dan a luz, lo que lleva a buscar una explicación de los cambios neuroendocrinos y hormonales que promueven esta conducta en machos (Lonstein *et al.*, 2015).

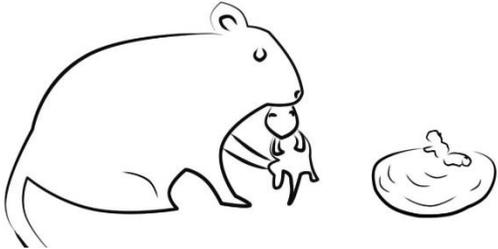
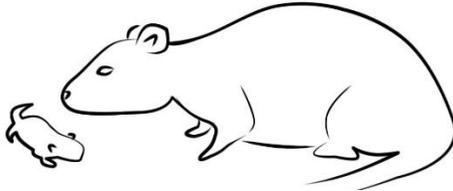
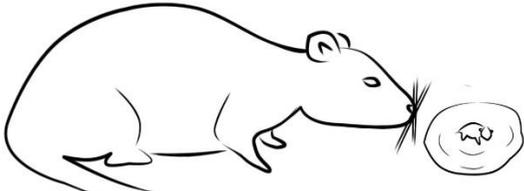
El cuidado paterno se define como el comportamiento que el macho exhibe post-fertilización y que beneficia a las crías. En varias especies biparentales, las crías pueden recibir cuidados de otros miembros de la familia, como hermanos mayores (cuidado aloparental). También puede ocurrir, que incluso parientes no directos pueden participar en el cuidado de las crías. Esta conducta puede ser común en las especies de mamíferos que forman sistemas familiares (Woodroffe & Vincent, 1994). Es posible que las hembras cuiden de su descendencia sin necesidad de un macho, pero su sobrevivencia aumenta significativamente con los cuidados del padre y con esto, aumenta también la adecuación del macho (Gubernick & Teferi, 2000).

En los mamíferos existe una relación entre la presencia de cuidados paternos y la monogamia social, es decir, el cuidado paterno es más común en mamíferos monógamos que en aquellos polígamos (Clutton-Brock, 1991; Kleiman & Malcolm, 1981). Entre los mamíferos que se ha observado la presencia de conductas paternas están algunos primates, carnívoros, perisodáctilos y roedores, en estos últimos se encuentran *Microtus ochrogaster* (ratón de la pradera), *Promiscues californicus* (ratón de California), *Meriones unguiculatus* (gerbo de Mongolia), *Neotomodon Alstoni* (ratón de los volcanes) y *Phodopus campbelli* (hámster enano); (Dudley, 1974; Elwood 1975; Hartung & Dewsbury, 1979; Wynne-Edwards & Lisk, 1989; Luis *et al.*, 2000).

En roedores, los cuidados paternos pueden ser directos (cuando tienen una influencia física inmediata en las crías) e indirectos, que incluye actividades que el macho realiza en ausencia de la cría (Dewsbury, 1985).

En la Tabla 1 se incluyen algunos ejemplos de ambos tipos de cuidados paternos.

Directos	Comportamientos	Descripción	Imagen
	<p>Abrigo (Acurrucamiento)</p>	<p>Duerme con la cría, adoptando una posición curvada del dorso que le permite mantener la temperatura de la cría.</p>	
	<p>Acicalamiento</p>	<p>Limpia a la cría; el macho lame todo el cuerpo de la cría, principalmente la región perianal.</p>	

	Recuperación	Transporte de la cría. Generalmente, el macho devuelve a la cría al nido.	
	Olfateo	Reconoce a la cría por medio del olfato.	
Indirectos	Construcción del nido	Construye la madriguera o nido, donde resguardará a la cría.	

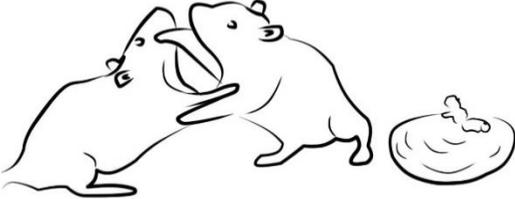
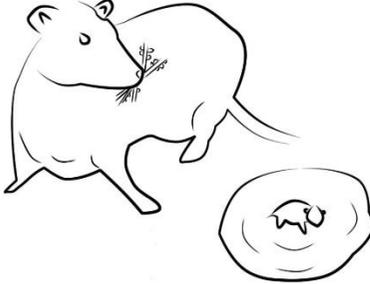
	Protección contra los depredadores	Da aviso o se involucra físicamente contra aquellos que se acerquen al nido	
	Provisión de alimento	Busca comida para la hembra y las crías.	

Tabla 1. Conductas paternas directas e indirectas según Dewsbury, 1985. Entre los cuidados directos se encuentran el abrigo, acicalamiento, recuperación y olfateo, mientras que, en los indirectos, se encuentran la construcción del nido, protección ante depredadores y provisión de alimento.

Factores sociales que regulan la conducta paterna

Como se mencionó anteriormente, se ha sugerido que el sistema de apareamiento es un factor que puede estar relacionado con la presencia de la conducta paterna. Los machos de especies monógamas tienden a presentar este tipo de conductas, en comparación con los machos polígamos.

El concepto de monogamia se refiere a una prolongada asociación y una relación de pareja exclusiva entre un macho y una hembra (Wittenberger & Tilson, 1980). En la monogamia, el cuidado biparental es necesario para una exitosa crianza de los infantes, y las consecuencias de abandonar a la pareja son mayores que el mantenerse con una sola; por otro lado, en la poligamia la hembra es capaz de cuidar a las crías exitosamente, independientemente de los cuidados proveídos por el macho (Kleiman, 1977).

Ejemplo de esto son dos especies del género *Phodopus*. Estas especies están estrechamente relacionadas, pero pueden tener un comportamiento diferente. Los machos de *P. campbelli* (especie monógama obligada) presentan conducta paterna y se ha observado que la sobrevivencia de las crías incrementa cuando el macho está presente y disminuye cuando está ausente. Por otro lado, en la especie polígama *Phodopus sungorous*, la ausencia del macho no afecta significativamente la sobrevivencia de las crías (Wynne-Edwards, 1998).

Las condiciones ambientales son un factor que puede influir en el sistema de apareamiento, induciendo cambios neurales y fisiológicos, lo cual puede favorecer o no la conducta paterna. Por ejemplo, en aquellos ambientes en los cuales resulta difícil la crianza de los hijos por un solo padre, se puede favorecer la monogamia (Carter, 1995; Rymer & Pillay, 2018). En *P. campbelli* el desarrollo de una monogamia obligada tiene fundamento en las restricciones del ambiente natural en el que habitan, el cual es frío y árido, lo que demanda gran aislamiento y,

por lo tanto, un método de reproducción eficiente. Consiguientemente, el hecho de que el macho ayude a la hembra en el cuidado de las crías asegura un mejor éxito reproductivo (Wynne-Edwards, 2003). Además del sistema de apareamiento, los estímulos que facilitan y/o despliegan la conducta paterna pueden ser varios, entre los que se pueden encontrar la cohabitación con la hembra preñada mediante estímulos olfativos o mediante la cópula, la convivencia con las crías, y la interacción con otros machos (Brown, 1993).

La cohabitación con una hembra preñada y la cópula pueden inhibir el infanticidio y facilitar el despliegue de conductas paternas. Mediante los olores que las hembras emiten, los machos pueden experimentar cambios hormonales y neurales inmediatos, los cuales causan los cambios en la conducta (Brown, 1993; Brown *et al.*, 1995). En presencia del macho del ratón de los volcanes, las hembras limpian y olfatean a la camada recién nacida menos frecuentemente que las hembras que criaron a la camada en ausencia del macho, sin embargo, esto significa un mayor crecimiento y sobrevivencia cuando ambos padres crían a la camada, pues al proporcionar un cuidado adicional a las crías, la calidad del cuidado materno es mayor, permitiendo un mejor desarrollo de la camada (Luis *et al.*, 2004).

Las excretas y la orina son dos estímulos olfativos potentes que pueden facilitar la conducta paterna. La tendencia a exhibir conducta paterna en machos de ratón de California expuestos a excretas de sus parejas es significativamente mayor que en los machos expuestos a excretas de hembras vírgenes o que no están expuestos a ninguna. Además, cuando se exponen a orina de hembras maternas, los machos se muestran paternales, mientras que, al ser expuestos a agua destilada, no lo son (Gubernick, 1990). En esta especie, la simple familiaridad con una hembra no es suficiente para mantener conductas paternas, mientras que la orina sí es un fuerte estímulo.

Aunque las señales olfativas emitidas por la hembra tienden a maximizar la conducta paterna, no siempre son necesarias para el mantenimiento de esta conducta. Cuando se expone un ratón de la pradera macho a un contacto físico continuo con la hembra, pasa más tiempo respondiendo paternalmente y abrigando a la cría, mientras que los machos aislados, aunque presentan cuidados paternos, estos se presentan en menor medida en comparación con los machos que cohabitan con la hembra (Jean-Baptiste *et al.*, 2008).

Por otro lado, a veces son señales que emanan las crías las que activan o mantienen la conducta paterna. Por ejemplo, en el roedor *Microtus pennsylvanicus*, no es necesaria la exposición a hembras preñadas para el despliegue de la conducta paterna, sino que la disminución de la agresión y la facilitación de la respuesta paternal ocurre principalmente después del contacto con las crías (Storey & Joyce 1995).

Regulación hormonal

El inicio de la conducta materna en hembras depende principalmente de los cambios hormonales durante la preñez, mientras que el inicio de la conducta paterna en machos depende del apareamiento, estímulos olfativos y auditivos provenientes tanto de la pareja como de las crías, y algunas otras variables (Brown, 1993). Estos estímulos desencadenan la liberación de diversas hormonas, tales como la prolactina, oxitocina, glucocorticoides y testosterona, lo cual, se sugiere, facilita el cuidado paterno (Rilling, 2013).

Prolactina (PLR)

La prolactina es una hormona proteica secretada por células de la adenohipófisis que posee una función importante tanto en las hembras, como en los machos de los vertebrados. En un inicio se creía que la prolactina era exclusivamente femenina por promover la lactancia, pero con el tiempo se ha demostrado que otros estímulos también se encuentran relacionados con la liberación de esta hormona, tales como el olfateo, la audición e incluso el estrés. Además, se ha encontrado un aumento de prolactina en varios roedores machos al estar en contacto con sus crías (Schradin & Anzenberger, 1999; Feldman *et al.*, 2010).

Las concentraciones de PRL en plasma en machos del ratón de California dos días después de convertirse en padres, son significativamente mayores en comparación con machos vírgenes sin exposición a una cría. Incluso, el nivel de prolactina en padres es similar que en las madres. La estimulación táctil y las señales olfativas hacia las crías podrían ser las causantes de los niveles elevados de PRL en estos roedores (Gubernick & Nelson, 1989).

En otro estudio, al cuantificarse los niveles de transcripción del mRNA del receptor de prolactina (PRL-R) en el plexo coroideo de hámsteres del género *Phodopus*, se observó que estos niveles cambian justo antes y después del parto, lo cual indica un nivel elevado de prolactina en el cerebro, además de que los niveles también son más altos en un macho paternal en comparación de uno que no lo es (Ma *et al.*, 2005). Esto nos indica que, en estas especies, la prolactina también juega un papel importante en cuanto a la conducta paterna se refiere.

Aunque se demuestra la presencia de PRL en machos, no se ha demostrado aún que ésta desempeñe una función en la activación del cuidado paterno. En cambio, es posible que el aumento de la prolactina en padres antes y durante los periodos de cuidado de las crías pueda estar más relacionada a alguna de las otras funciones conocidas de esta hormona, tales como el aumento de consumo de comida, la reducción de la ansiedad y el contacto que se tiene con la cría (Freeman, 2000; Saltzman & Ziegler, 2014).

Oxitocina (OT)

La oxitocina es una hormona peptídica que, además de ser liberada al torrente sanguíneo, puede actuar como neuromodulador en el cerebro. Se ha asociado a la OT con el parto y la lactancia en hembras, pero también se ha demostrado que juega un papel clave en conductas afiliativas en ambos sexos, entre las cuales se incluye la conducta parental (Lonstein *et al.*, 2015; Caldwell & Albers, 2016). Los estudios que involucran a la oxitocina se han enfocado principalmente a hembras, sin embargo, hay evidencia de que esta hormona participa también en el comportamiento paterno.

En el ratón de California, la oxitocina en plasma aumenta en machos un día después de la cópula y permanece elevada durante los primeros 15 días de gestación de la hembra. Al

cuantificarse las concentraciones de oxitocina, tanto en machos con conductas parentales, como en los no parentales, se observó que no hay una diferencia significativa entre ambos grupos; esto sugiere que la oxitocina puede no estar involucrada en el comienzo del comportamiento paterno como tal, sin embargo, es posible que esté involucrada con la unión de la pareja (Gubernick *et al.*, 1995).

En el ratón de la pradera, al recibir inyecciones de un antagonista del receptor de OT (OTA) e inyecciones de OT, se observó que la administración de OT no causó un incremento en los cuidados proporcionados por los padres, aunque sí se pudieron observar cambios sutiles en su conducta. En cambio, la administración de OTA provocó una reducción significativa de los cuidados paternos, así como un incremento en los ataques hacia las crías (Bales, *et al.*, 2004).

En machos del topillo mandarín (*Microtus mandarinus*) los que ya son padres presentan cuidados hacia las crías, mientras que los vírgenes tienden a atacarlas. Al analizarse sus concentraciones de OT, se encontró que los padres tenían una concentración significativamente más alta de esta hormona que los machos vírgenes y, mediante análisis de RT-PCR y Western Blot, se observó que los niveles del receptor de oxitocina (OTR) en el área preóptica media del cerebro fue significativamente mayor en padres que en machos vírgenes (Yuan *et al.*, 2019).

Estos estudios han demostrado que la OT juega un papel crítico en procesos de unión entre padres y crías a través de mecanismos de un cuidado paternal temprano, así como en la cohabitación con la pareja, lo que nos indica que esta hormona puede estar relacionada con las conductas que involucran contacto padre-hijo (Saltzman & Ziegler, 2014).

Glucocorticoides (GLU)

Los glucocorticoides son hormonas esteroides que juegan un papel importante en la mediación de cambios fisiológicos y conductuales que ocurren en respuesta a estímulos estresores. Entre estas hormonas se incluyen el cortisol y la corticosterona (Salposky *et al.*, 2000). Poco se sabe cómo es que estas hormonas están involucradas en la conducta paterna.

En machos de hámster enano, se registró una disminución drástica de las concentraciones de cortisol en plasma al ser colocados con una pareja, mientras que, cuando la pareja quedó preñada, sus concentraciones de glucocorticoides aumentaron (Reburn & Wynne-Edwards, 1999). Por otro lado, Harris *et al.* (2011), al inyectar a padres primerizos de ratón de California con corticosterona, no encontraron alteraciones en la conducta paterna a corto ni a largo plazo en lo que se refiere al desarrollo de las crías, concluyendo que esta hormona por sí sola, no altera la conducta paterna en este mamífero.

En el ratón de las praderas, al exponerse a un estímulo estresor, se observó que los machos, pero no las hembras, mostraron cambios significativos en la conducta paterna, incluyendo más tiempo de acurrucamiento con la cría y una tendencia a pasar más tiempo acicalándolas (Bales *et al.*, 2006).

Esta variación en resultados puede deberse a que estas hormonas se ven influidas por múltiples factores, como lo es el ambiente, la alimentación y la actividad física, además de no contar con una mayor cantidad de estudios con los cuáles comparar dichos resultados (Horrel *et al.*, 2018) por lo que esta hormona y su relación con la conducta paterna aún está pobremente entendida.

Testosterona (T)

La testosterona es una hormona esteroide sintetizada a partir del colesterol (Fig. 1) en las glándulas suprarrenales y en el cerebro. En el cerebro, la T puede unirse a receptores tanto androgénicos, como estrogénicos y así regular la conducta. La T puede unirse directamente (o puede ser convertida en dihidrotestosterona (DHT) mediante la enzima 5-alpha-reductasa) a los receptores androgénicos, o a los receptores estrogénicos mediante su conversión a estradiol (E₂) por la enzima aromataasa (Trainor & Marler, 2002).

Usualmente, esta hormona se asocia con la conducta agresiva, debido a que se ha establecido que promueve una amplia gama de conductas asociadas con la reproducción, como la regulación de la espermatogénesis, la competencia entre machos y la conducta de apareamiento (Zielinski & Vandenberg, 1993; Trainor *et al.*, 2009), sin embargo, se ha encontrado que, en un gran número de especies, el incremento de T puede promover el cuidado paterno mediante la aromatización a estrógeno en el cerebro (Marler *et al.*, 2003).

A pesar de que en el gerbo de Mongolia inicialmente se mencionó una caída en las concentraciones de T después del nacimiento de las crías, por lo cual se le atribuyó una función negativa en la regulación de la conducta paterna (Brown, *et al.*, 1995), en un experimento posterior, Martínez *et al.* (2015) se colocaron implantes con T, E₂ o DHT a machos agresivos, obteniendo como resultados, la eliminación de la agresión y el despliegue de cuidados paternos.

Machos castrados del ratón de California, al ser tratados con implantes de T y E₂, muestran un mayor nivel de cuidados paternales que comparación con los machos que recibieron implantes de DHT o con implantes vacíos (sin ninguna hormona) (Trainor & Marler, 2002). Asimismo, en machos agresivos o indiferentes con las crías del ratón de los volcanes, la castración no tiene ningún efecto en la conducta, debido a que continúan siendo agresivos o paternales, pero al

colocarse implantes de T, estos ratones transitan de agresivos a paternos (Luis *et al.*, 2012). Los resultados de este estudio sugieren que el comportamiento paternal hacia las crías sucede al aumentar los niveles de T en los ratones.

Algunos estudios proponen que la T ejerce sus efectos en la conducta paternal mediante su conversión a E₂ (Fig. 1), hormona que tiene una función esencial en la regulación de esta conducta.

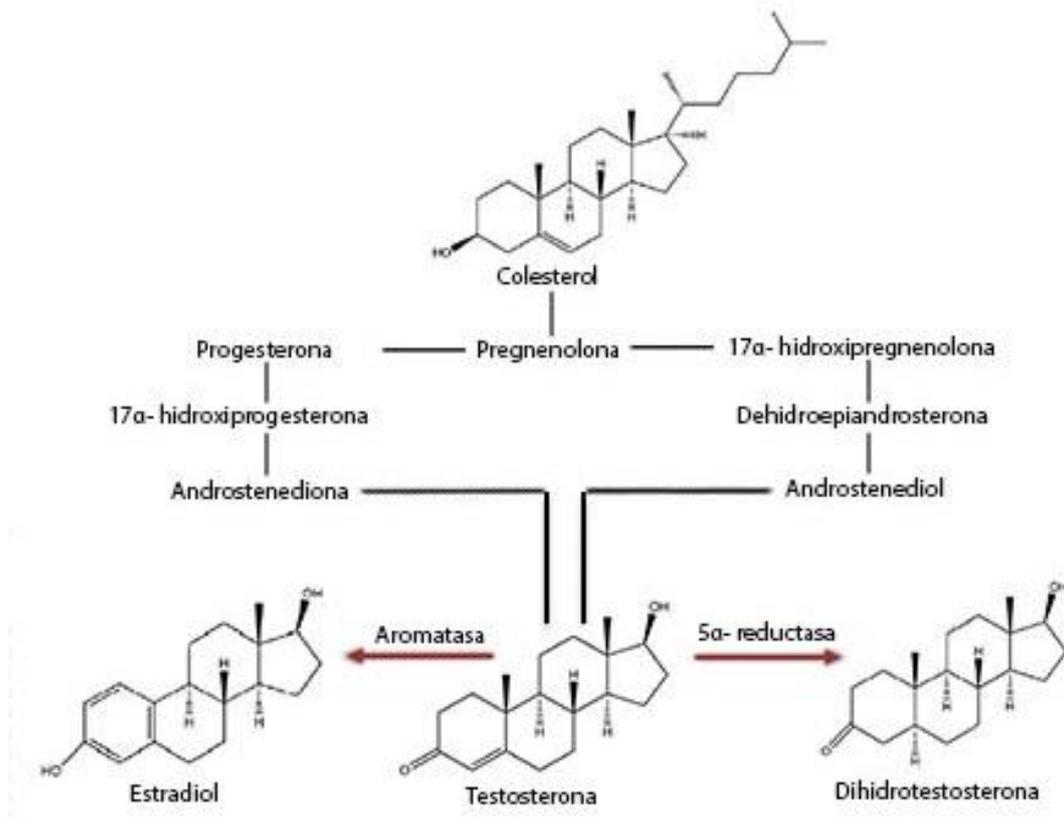


Figura 1. Vía de la síntesis de la T a partir del colesterol y su conversión a E₂ y DHT mediante las enzimas aromatasa y 5α-reductasa, respectivamente. (Modificada de Li *et al.*, 2018).

Estudio de la actividad cerebral

Aunque es ideal medir la actividad neural en tiempo real, esto no siempre es posible o práctico. Algunas funciones celulares pueden ser examinadas mediante el uso de marcadores de actividad en secciones cerebrales histológicas fijadas. Una de las técnicas más utilizadas es la inmunohistoquímica, en donde se mide la actividad neural indirectamente mediante la medición de subproductos que se acumulan durante procesos específicos en neuronas activas y, posteriormente, se examina una fotografía donde se visualiza una representación fijada de un momento en un proceso dinámico (Carter & Shieh, 2015; Gómez, 2017).

Proteína c-Fos como marcador neural

c-Fos fue la primera proteína caracterizada de la familia de proteínas Fos. Es el producto de la expresión del protooncogen *c-fos*. La proteína c-Fos tiene un dominio de unión de tipo cremallera de leucina que promueve la dimerización con productos de otros oncogenes, siendo más comunes los miembros de la familia Jun (c-Jun, JunB y Jun D). La unión de estos dímeros ocurre en un sitio específico del ADN: el dominio de unión AP-1; por lo tanto, es en el núcleo de la célula donde esta reacción se lleva a cabo (Hoffman *et al.*, 1993). Los genes *c-fos* fueron de los primeros genes de expresión rápida (IEGs por sus siglas en inglés “Immediate Early Genes”) en ser identificados (Greenberg & Ziff, 1984). Se les llama así debido a que su nivel basal de expresión es bajo en células quiescentes, pero después de una estimulación extracelular, su transcripción se induce rápidamente, la cual es transitoria e independiente de la síntesis de nuevas proteínas (Sheng & Greenberg, 1990).

Después de la exposición al estímulo, la despolarización provoca la apertura de canales de Ca^{2+} y el Ca^{2+} se introduce en la célula, se une a la proteína calmodulina (CaM) y forman el complejo calcio-calmodulina, el cual fosforila a las cinasas dependientes de calmodulina (CaMK); esta

cinasa se desplaza al núcleo celular, activando al factor de transcripción CREB, el cual se une al ADN. CREB también puede ser activado cuando el AMP cíclico (cAMP), producido en respuesta a la activación de la proteína G mediante el adenilato ciclasa (A.C.) después de la acción de un neurotransmisor, activa a proteínas cinasas dependientes de ciclina (PKA). Así, una vez unido el factor de transcripción al ADN, la expresión del gen *c-fos* es inducida rápidamente en las neuronas, incrementándose la concentración de mRNA de *c-fos* a los 15 minutos de haberse presentado el estímulo (Fig. 2). Una vez expresado este gen, la proteína c-Fos entra al núcleo de la célula y participa en los complejos proteicos Fos/Jun (Morgan *et al.*, 1987; Bullit, 1990).

Es así, como después de 30 minutos del estímulo, la concentración de c-Fos comienza a incrementarse en el núcleo de la célula y vuelve a su nivel basal después de 4 horas. (Morgan *et al.*, 1987; Zhong *et al.*, 2014) Es este retraso en la expresión de c-Fos lo que permite que el animal sea anestesiado y sacrificado sin generar una falsa inmunorreactividad para esta proteína (Hoffman *et al.*, 1993).

Se ha demostrado que la proteína c-Fos está presente en el núcleo de células nerviosas del cerebro de roedores (Dragunow *et al.*, 1987) y, debido a que es precisamente en este lugar donde se localiza la proteína c-Fos, es el núcleo lo que se tiñe.

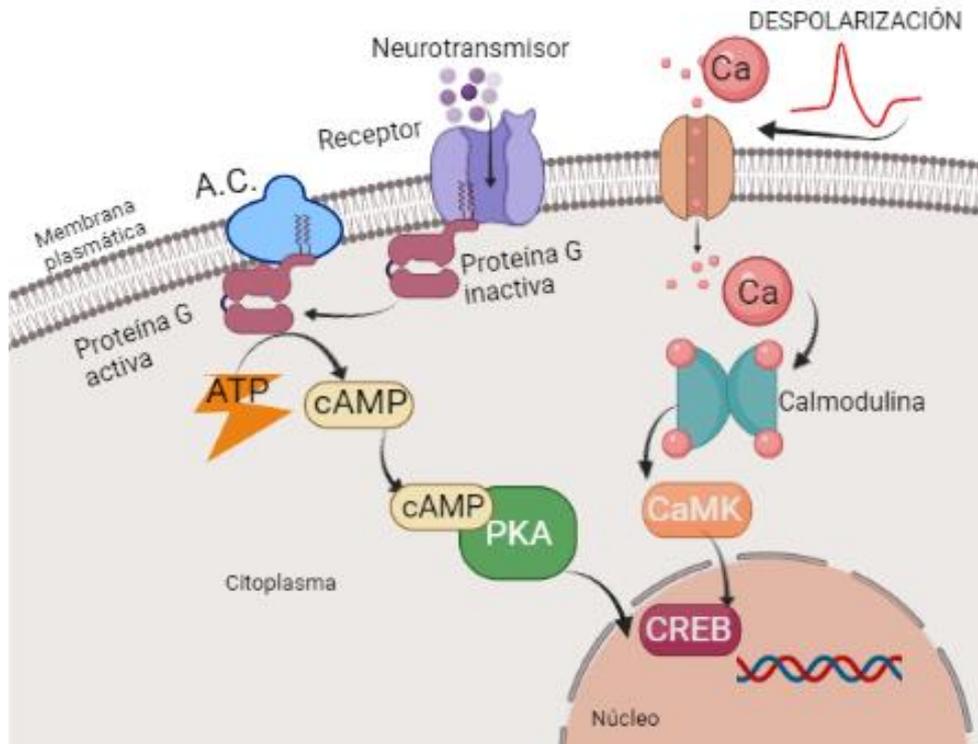


Figura 2. Vía de la expresión de c-Fos después de un estímulo sináptico. Ca^{2+} ingresa a la célula, se une a la proteína CaM, formando el complejo calcio-calmodulina, CaMK se fosforila y se desplaza al núcleo celular, activando al factor de transcripción CREB; este también puede activarse mediante un receptor a un neurotransmisor unido a una proteína G, la cual es activada por el A.C., liberando cAMP, el cual se une a la PKA y activa a CREB, uniéndose al ADN y permitiendo la expresión del gen *c-fos*, el cual codifica la proteína c-Fos. Basado en la información de Sheng *et al.*, Schulman, 2013.

Regulación neural

El análisis del circuito neural de la conducta parental, la cual incluye la conducta materna y paterna, se ha realizado utilizando técnicas de lesión, marcadores de actividad neural, como la proteína c-Fos, técnicas optogenéticas y marcadores moleculares, así como lesiones citotóxicas y excitotóxicas (Lonstein *et al.*, 2015; Horrel *et al.*, 2018).

Los resultados de estos estudios, realizados principalmente en la rata de laboratorio, han identificado varias áreas cerebrales hipotalámicas involucradas en la regulación de la conducta

materna; entre ellas se encuentra el área preóptica media (mPOA) y el lecho del núcleo de la estría terminalis (BNST), la cual es un área que recibe estímulos sensoriales de diferentes modalidades de las crías (Numan & Numan, 1997), por ejemplo, aquellas provenientes desde el bulbo olfatorio (OB) a través de la amígdala media (MeA) (Fig. 3). Se ha planteado que en el mPOA es integrada esta información, y que este proceso está bajo la influencia del medio hormonal, El mPOA facilita la conducta materna de dos formas: inhibiendo núcleos del circuito involucrados en la agresión/miedo, tales como el núcleo hipotalámico anterior (AHN), el núcleo hipotalámico ventromedial (VMH) y gris periacueductal (PG) y excitando el circuito de recompensa vía proyecciones al área tegmental ventral y núcleo accumbens (Horrel *et al.*, 2018).

Debido a que en las especies biparentales se ha observado que los machos despliegan los mismos cuidados que las hembras (a excepción de la lactancia), se ha sugerido que los estímulos de las crías pueden conllevar a un mismo circuito neuronal, tanto en hembras como en machos.

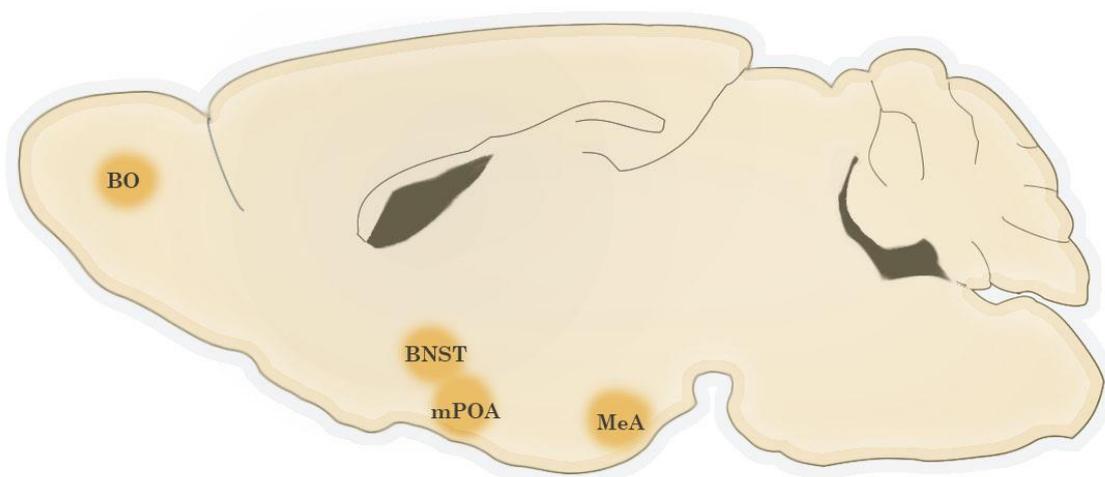


Figura 3. Localización del área preóptica media (mPOA), núcleo de la estría terminalis (BNST) amígdala media (MeA) y bulbo olfatorio (OB) en el cerebro de roedor. Modificado de Dulac *et al.*, 2014.

ANTECEDENTES

El mPOA en roedores machos, así como en la conducta materna, es el área que más ha sido estudiada en la regulación de la conducta parental; en el ratón de California, los machos en paternidad activa tienen significativamente mayor actividad de la aromatasa que los machos sin crías, sugiriendo que un incremento en la producción de estrógeno en esta área cerebral contribuye al inicio de la conducta paterna (Trainor *et al.*, 2003). Estudios de lesión e inmunohistoquímicas utilizando la proteína c-Fos en roedores biparentales e inclusive en el ratón de laboratorio, indican que mPOA, BNST y MeA están involucradas en la regulación de la conducta paterna (De Jong *et al.*, 2009; Lee & Brown, 2002; Lee & Brown, 2007; Zhong, 2014).

Asimismo, se ha demostrado que la MeA forma parte del circuito neural de la conducta paterna; esta área recibe proyecciones directas del bulbo olfatorio (OB) (Kirkpatrick *et al.*, 1994a). Los bulbos olfatorios reciben señales químicas que envían a otras regiones del cerebro y así se despliegan varias formas de conductas sociales, entre ellas la conducta paterna.

Así como se ha propuesto una vía positiva para la regulación de la conducta materna, también se ha propuesto que este circuito neural tiene una vía negativa implicada en la regulación de la conducta aversiva e inclusive agresiva hacia las crías (“approach/evitation model”). Se ha propuesto que, en esta vía, la MeA, la cual tiene también comunicación con los núcleos que regulan positivamente la conducta materna (mPOA y BNST), activa el hipotálamo anterior (AHN) y el hipotálamo ventromedial (VMH), los cuales a su vez poseen proyecciones hacia el gris periacueductal, finalizando en la expresión de conductas agresivas (Dulac *et al.*, 2014; Numan, 2015; Bales & Saltzman, 2016).

En el gerbo de Mongolia, fueron seleccionados dos grupos de machos sin experiencia sexual: el primero con machos espontáneamente paternos y el segundo con machos agresivos hacia las crías; la mitad de ambos grupos interactuó con una cría, mientras que la otra mitad interactuó con un dulce. Los machos que tuvieron interacciones paternales con las crías, y que proporcionaron cuidados directos, tuvieron significativamente un número más alto de células inmunorreactivas a c-Fos en el mPOA y BNST en comparación con los gerbos paternales que interactuaron con un dulce. Los gerbos agresivos que desplegaron agresión hacia las crías presentaron significativamente mayor actividad neural en el AHN, VMH y PG que los machos agresivos que interactuaron con un dulce. Las áreas MeA y OB se activaron de forma similar tanto en machos paternales, como en los agresivos con las crías, pero presentaron mayor inmunoreactividad a c-Fos que los gerbos paternales y agresivos que interactuaron con un dulce. Además, al cuantificar la concentración de T en plasma, se encontró que los gerbos paternales tuvieron una concentración más alta de esta hormona que los hámsteres agresivos con las crías, sugiriendo que esta hormona es parte importante del despliegue de la conducta paterna (Romero-Morales *et al.*, 2018a).

A diferencia del circuito neural de la conducta materna, sobre el cual se han realizado múltiples investigaciones, pocos estudios se han realizado sobre el circuito neural que regula la conducta paterna, aunque se ha propuesto que hay una homología en la regulación neural de la conducta materna y paterna (Timonin *et al.*, 2008). Sin embargo, hace falta generar más conocimiento sobre la regulación neural de la conducta paterna que lleve a la propuesta de un patrón en el circuito neural de la conducta parental. En este contexto, en el presente estudio se determinó qué áreas neurales se activan cuando el macho del hámster enano (*Phodopus campbelli*) interactúa paternalmente con crías ajenas de su especie.

Descripción del organismo

El hámster enano (*Phodopus campbelli*) es un roedor nativo de las estepas y los semi-desiertos de Asia central (Fig. 4). Se distingue por poseer una línea estrecha de pelaje oscuro y definida en la región medio-dorsal, que corre desde la nuca hasta centímetros antes de comenzar la base de la cola. Posee orejas, patas y dedos cortos; las almohadillas de las patas están cubiertas por denso pelaje y su pequeña cola sobresale solo unos milímetros más allá de este. El color de su pelaje en la cara y en el dorso de su cuerpo puede variar entre una escala de grises a tonos marrones. El cuello, la región ventral y la parte interna de las extremidades inferiores tienen un pelaje color crema (Fig. 5).

La longitud del cuerpo (incluida la cabeza) puede oscilar entre los 80 a los 103 mm, mientras que su cola varía entre los 4 y los 14 mm; las patas traseras miden de 12 a 8 mm y sus orejas 13-15 mm. Pesa entre 18 y 50 gramos (Wynne-Edwards, 1995).

En cautiverio se reproduce todo el año, pero durante el verano suelen nacer un mayor número de crías. Pueden tener de una a nueve crías por camada, las cuáles varían entre 1 y 18 durante toda su vida reproductiva. Las hembras alcanzan la madurez sexual aproximadamente a los 2 meses de edad y el ciclo estral dura alrededor de 4 días (Erb *et al.*, 1993). El periodo de gestación puede oscilar entre 18 y 22 días. (Ross, 1995). Su periodo de actividad es crepuscular y nocturno, activo durante todo el año (Wynne-Edwards, 1995; 2003).

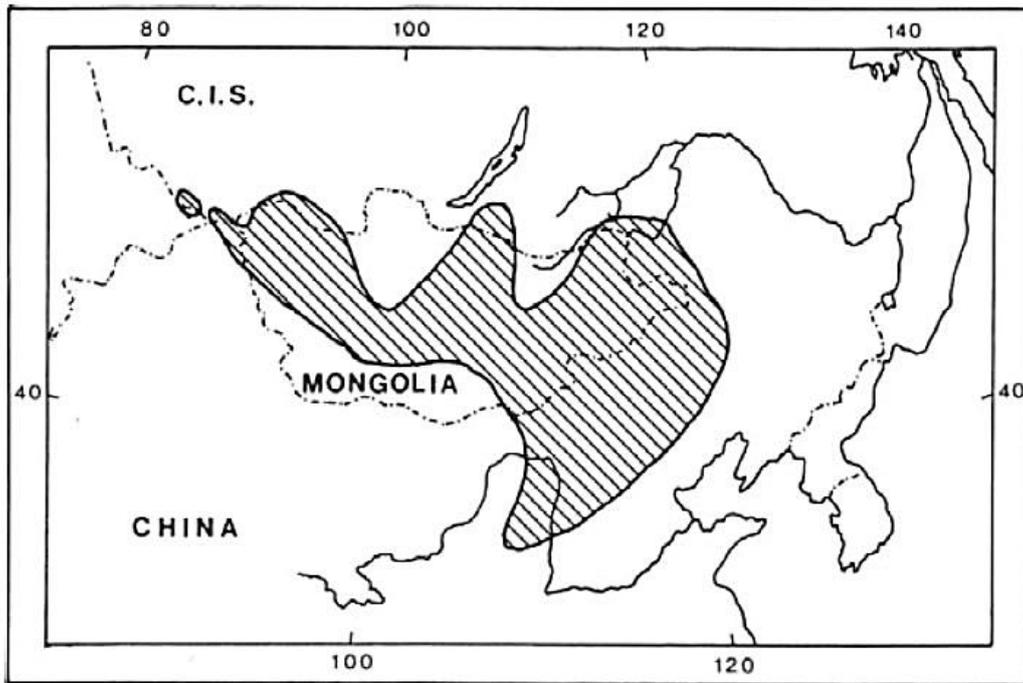


Figura 4. Distribución geográfica del hámster enano en el continente asiático. Mapa tomado de Ross, 1995.



Figura 5. *Phodopus campbelli*. Puede observarse una línea dorsal de pelaje oscuro, característica de esta especie. Fotografía tomada en la FES Iztacala.

El hámster enano, es una especie biparental (Ross, 1995), por lo cual se ha utilizado como modelo de estudio en la regulación de la conducta paterna. En este roedor, la castración disminuye significativamente las concentraciones de T y E₂, sin embargo, ni la respuesta paterna ni su éxito reproductivo se ven alterados por la cirugía, aunque si reduce la agresión directa hacia machos intrusos (Hume & Wynne-Edwards, 2005). Asimismo, cuando machos espontáneamente paternales son castrados y son tratados con T o E₂, se observó que la administración de estas hormonas no ocasionó cambios en la conducta paterna, aunque cuando machos agresivos hacia las crías son tratados altas dosis de E₂, estos hámsteres se vuelven paternales (Romero-Morales *et al.*, 2018b).

Romero-Morales *et al.* (2016) al analizar los receptores estrogénicos (ER α) en la MeA y mPOA de este roedor, encontraron que cuando los machos despliegan conductas paternales espontáneas, se observa un incremento en la cantidad de células inmunorreactivas a estos receptores en el mPOA

HIPÓTESIS

En roedores como el ratón de California, el topillo de la pradera y el gerbo de Mongolia, regiones como el mPOA, BNST, MeA y OB participan en la regulación de la conducta paterna y la respuesta paterna depende de la concentración de T, por lo cual se espera que en el hámster enano (*P. campbelli*) estos mismos núcleos neurales se activen en las interacciones paternas con las crías, y esta respuesta se correlacione con las concentraciones de T.

OBJETIVOS

- Determinar si mPOA, BNST, MeA y OB participan en la regulación neural de la conducta paterna del hámster enano (*P. campbelli*).
- Determinar si la respuesta paterna está correlacionada con las concentraciones de testosterona en plasma de este roedor.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron 20 machos vírgenes del hámster enano, entre 90 y 120 días de edad, procedentes de una colonia establecida en el Laboratorio de Biología de la Reproducción de la FES Iztacala. Estos hámsteres se mantuvieron bajo un fotoperiodo invertido de 12:12 luz-oscuridad, a temperatura y humedad ambiental de laboratorio. Se les proporcionó como alimento pellets de Lab Diet Nutricubos 5001 y agua *ad libitum*.

En este estudio se utilizaron machos vírgenes espontáneamente paternos, los cuales fueron seleccionados a través de pruebas de conducta paterna; cada macho fue puesto en una jaula de policarbonato (37 x 27 x 15 cm) con cama de aserrín limpio. Después de 10 minutos de adecuación se introdujo una cría de dos a cinco días de edad. Los machos paternos olfatean y acicalan a las crías, mientras que los agresivos, aunque también realizan esta conducta, inmediatamente después las atacan (Luis *et al.*, 2017). Cuando los machos fueron paternos, se realizaron observaciones durante cinco minutos, mientras que cuando los machos desplegaron agresión hacia las crías, la prueba fue terminada de inmediato y estos animales no fueron incluidos en el estudio.

Los 20 machos paternos seleccionados fueron organizados en 2 grupos de 10 hámsteres cada uno. Los machos del Grupo 1 interactuaron con una cría y los del Grupo 2 con un dulce de gomita, debido a que presenta un tamaño y firmeza semejante a la cría de hámster enano.

Interacciones paternas

Antes de la interacción, cada uno de los machos permaneció en una jaula individualmente durante 24 horas, esto con la finalidad de evitar que algún estímulo externo ocasionase activación neural. Al término de este periodo, cada uno de los machos interactuó con una cría de la especie (grupo experimental), mientras que los otros 10 machos, con un dulce (grupo control). El periodo de interacción o exposición a las crías o al dulce fue de 60 minutos (con cambio cada 15 minutos para que la cría conservara su calor y así se asegurara la persistencia del estímulo). Se eligió este periodo de observación debido a que la expresión de *c-fos* alcanza su máximo entre los 70 y 90 minutos (Hoffman *et al.*, 1993). Se registraron la latencia de inicio de la conducta (tiempo en que el hámster tarda en reaccionar al estímulo), tiempo invertido en el acicalamiento y en la recuperación de la cría; así como la frecuencia de olfateo.

Obtención de muestras sanguíneas y perfusión

Una vez finalizada la interacción paterna, cinco machos de cada grupo, elegidos al azar, fueron anestesiados profundamente con 10 mg/kg de xilazina y 90 mg/kg de ketamina. Mientras los hámsteres permanecieron dormidos, se tomaron muestras sanguíneas del seno retro-orbital con capilares heparinizados. Estas muestras fueron centrifugadas durante 12 minutos a 5100 rpm y se almacenaron a -20°C hasta la cuantificación de T por la técnica ELISA. Esta se realizó con un kit comercial de DRG (Germany, International Inc.) con una sensibilidad analítica de 0.083 ng/mL.

Después de la obtención de la muestra sanguínea, cada hámster fue perfundido intracardialmente con solución salina fisiológica (0,9%) seguido de una solución de

paraformaldehído al 2% en buffer de fosfato de sodio (0.1 MPB, pH 7.4). Al terminar la perfusión, se disecó el cerebro y se sumergió en la misma solución fijadora durante 12 horas.

Inmunohistoquímica

El tejido neural fue procesado mediante la técnica histológica convencional e incluido en un bloque de parafina. Posteriormente, se realizaron cortes coronales de 5µm de mPOA (-0.36 mm, imagen 36), BNST (-0.36 mm, imagen 36), MeA (-2.52 mm, imagen 54) y OB (5.16 mm, imagen 6). Estas áreas fueron identificadas utilizando el atlas de Praxinos y Watson. (2004) (Fig. 6). Los cortes se recuperaron en laminillas tratadas con gelatina (BioChemika 70151 nutrient gelatin) y sulfato doble de cromo y potasio el cual evita la proliferación de microorganismos.

Una vez obtenidas las cuatro secciones, se desparafinaron, rehidrataron y se procedió a realizar la inmunohistoquímica (Anexo II). Se utilizó como primer anticuerpo una dilución 1:50 de c-Fos (Sc-52 policlonal IgG Anti-Rabbit) en buffer salino de fosfatos (PBS) y como segundo anticuerpo el incluido en el kit de Vectastain Elite (biotinylated goat antirabbit antibody). Para la tinción, se utilizó el cromógeno diaminobencidina el cual, en conjunto con H₂O₂, forma un sustrato para la enzima peroxidasa, provocando así una oxidación y con lo cual, las células inmunorreactivas a c-Fos se tornan de un color marrón oscuro.

Finalmente, los cortes se deshidrataron, se montaron y se observaron bajo el microscopio óptico.



Figura 6. Localización en un plano coronal de las áreas: Bulbo olfatorio (a), Área preóptica media (b), Núcleo de la Estría Terminalis BNST (c), Amígdala Media (d). (Tomada de Praxinos & Watson, 2004).

Análisis de datos

Se observaron al microscopio tres secciones de una misma área para cada animal y el número de células que mostraron inmunorreactividad a c-Fos fue cuantificado en microfotografías en un área de $180 \mu\text{m}^2$.

La cantidad de células inmunorreactivas a la proteína c-Fos que fueron cuantificadas en los hámsteres que interaccionaron con una cría y en los hámsteres que interaccionaron con un dulce, fueron contrastadas aplicando la prueba estadística no paramétrica de U de Mann-Whitney, debido a que no se cumplieron los criterios de normalidad, esto fue comprobado mediante la prueba Anderson-Darling con el programa SPSS.

Los datos que se obtuvieron en la cuantificación de T en plasma del grupo control y del grupo experimental fueron contrastados mediante una t de Student, Finalmente, se realizó una correlación de Pearson entre estos datos y la latencia de inicio.

Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con la guía ética de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, en la se encuentran las especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, 2001) y por American Society of Mammalogists (Animal Care and Use Committee, 1998).

RESULTADOS

Conducta paterna

Al interactuar los machos del hámster enano con la cría de su especie, se registró una latencia de contacto promedio de 12.2 ± 3.08 segundos (error estándar). Como las interacciones con las crías de la especie fueron paternas, se registró en promedio el tiempo invertido en acicalamiento, el cual fue de 121.2 ± 12.70 segundos. Cabe mencionar, que únicamente dos machos exhibieron recuperación de las crías con un tiempo promedio de 1 ± 0.68 segundos (Fig. 7). La frecuencia de olfateo de las crías fue de 44 ± 4.92 veces (Fig. 8).

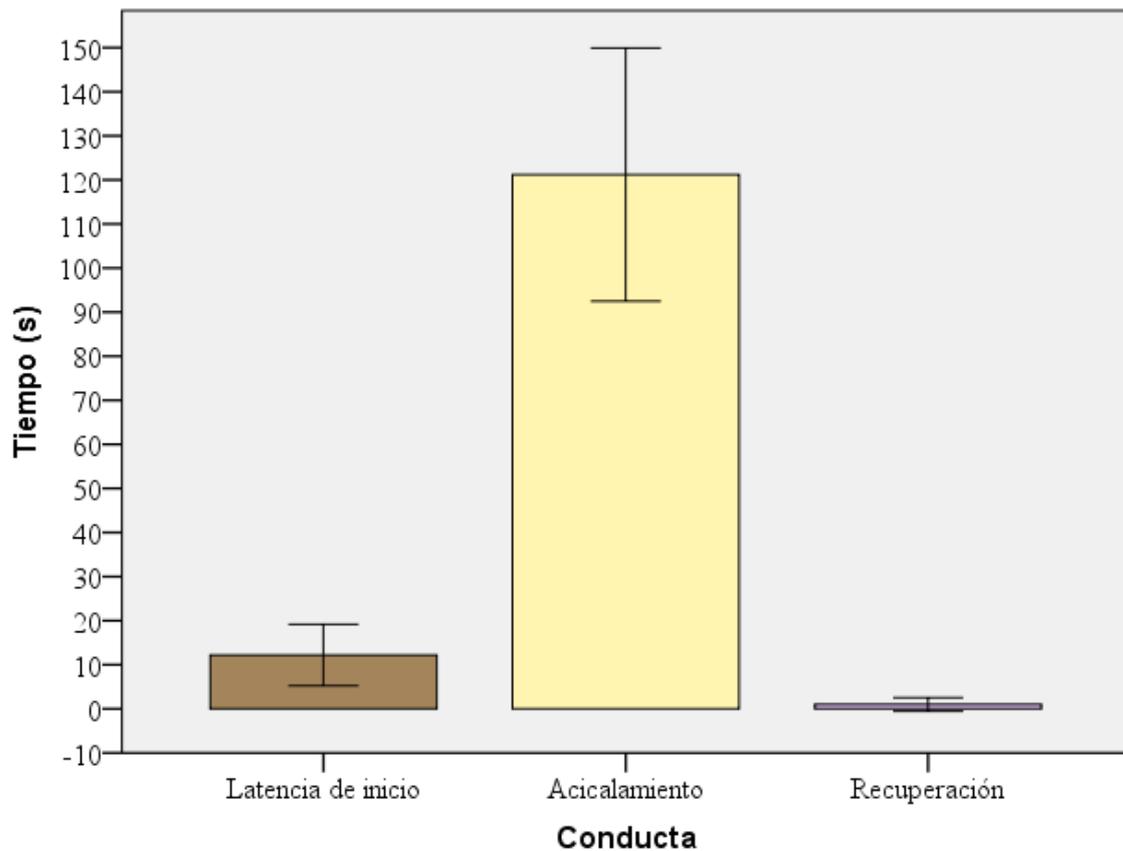


Figura 7. Media y error estándar de: tiempo de latencia de inicio, tiempo invertido en el acicalamiento y tiempo invertido en la recuperación de las crías en el hámster enano.

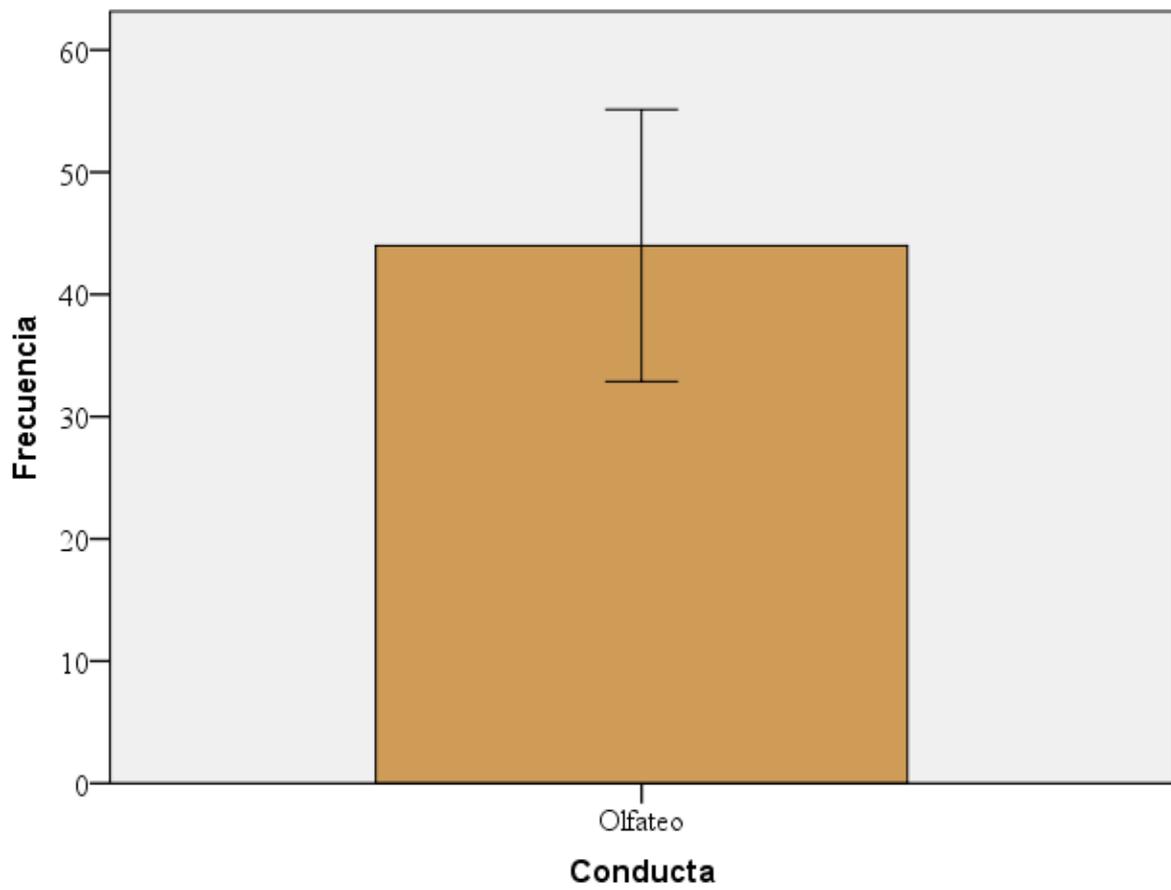


Figura 8. Se muestra la media y el error típico de la frecuencia de olfateo en el macho del hámster enano.



Figura 9. Hámster enano desplegando conductas paternas directas al estar en contacto con una cría de su especie. Olfateo (a), Acicalamiento (b) y Recuperación (c).

Células inmunorreactivas a c-Fos

El número de células inmunorreactivas en mPOA fue significativamente más alto en los hámsteres que interaccionaron con una cría comparado con los que interaccionaron con un dulce ($W = 10.0, p < 0.05$). En BNST el número de células inmunorreactivas también fue significativamente mayor en los machos que interaccionaron con la cría de su especie que el grupo control ($W = 10.0, p < 0.05$). Asimismo, en MeA y OB, el número de células inmunorreactivas fue superior en machos con interacciones paternas hacia una cría que en aquellos que interaccionaron con un dulce ($W = 10.0, p < 0.05$; $W = 10.0, p < 0.05$), en ambas áreas (Fig. 10).

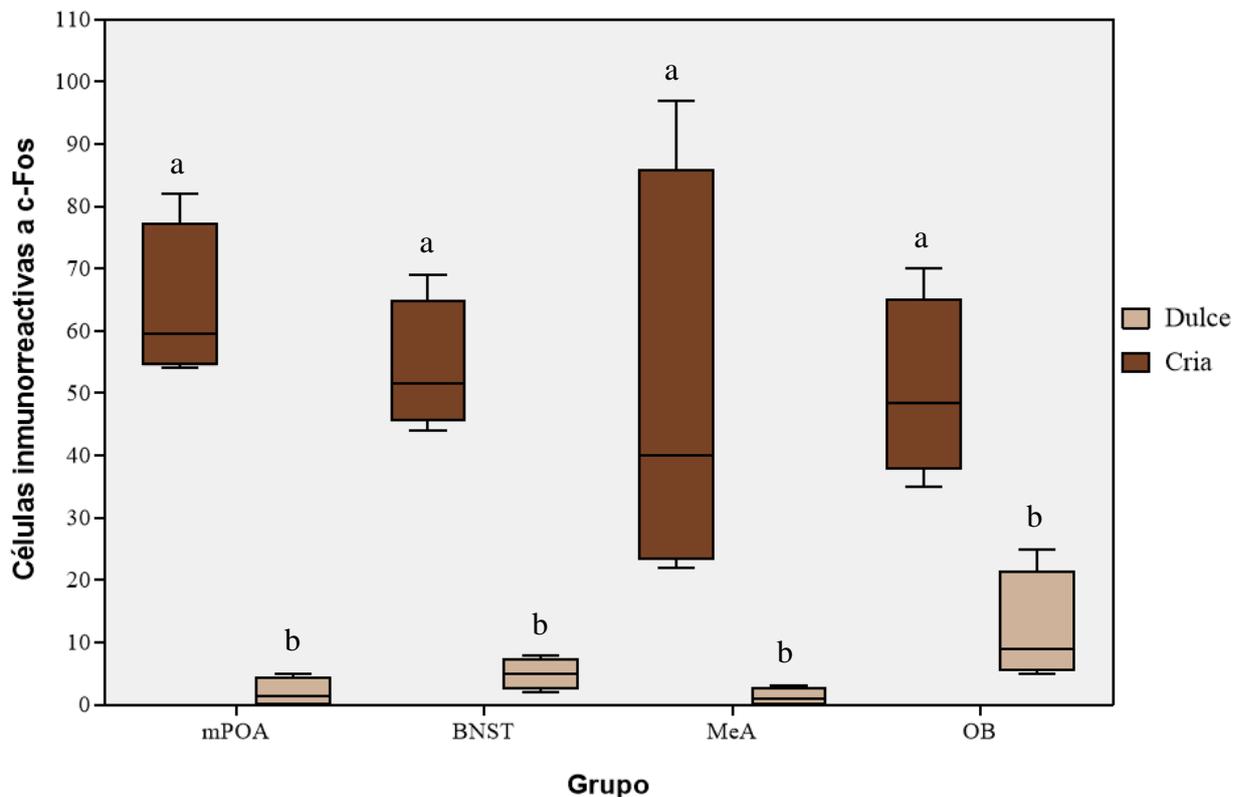


Figura 10. Número de células inmunorreactivas a c-Fos en el hámster enano que interaccionaron con una cría o con un dulce. Se encontraron diferencias significativas en las 4 áreas entre ambos grupos.

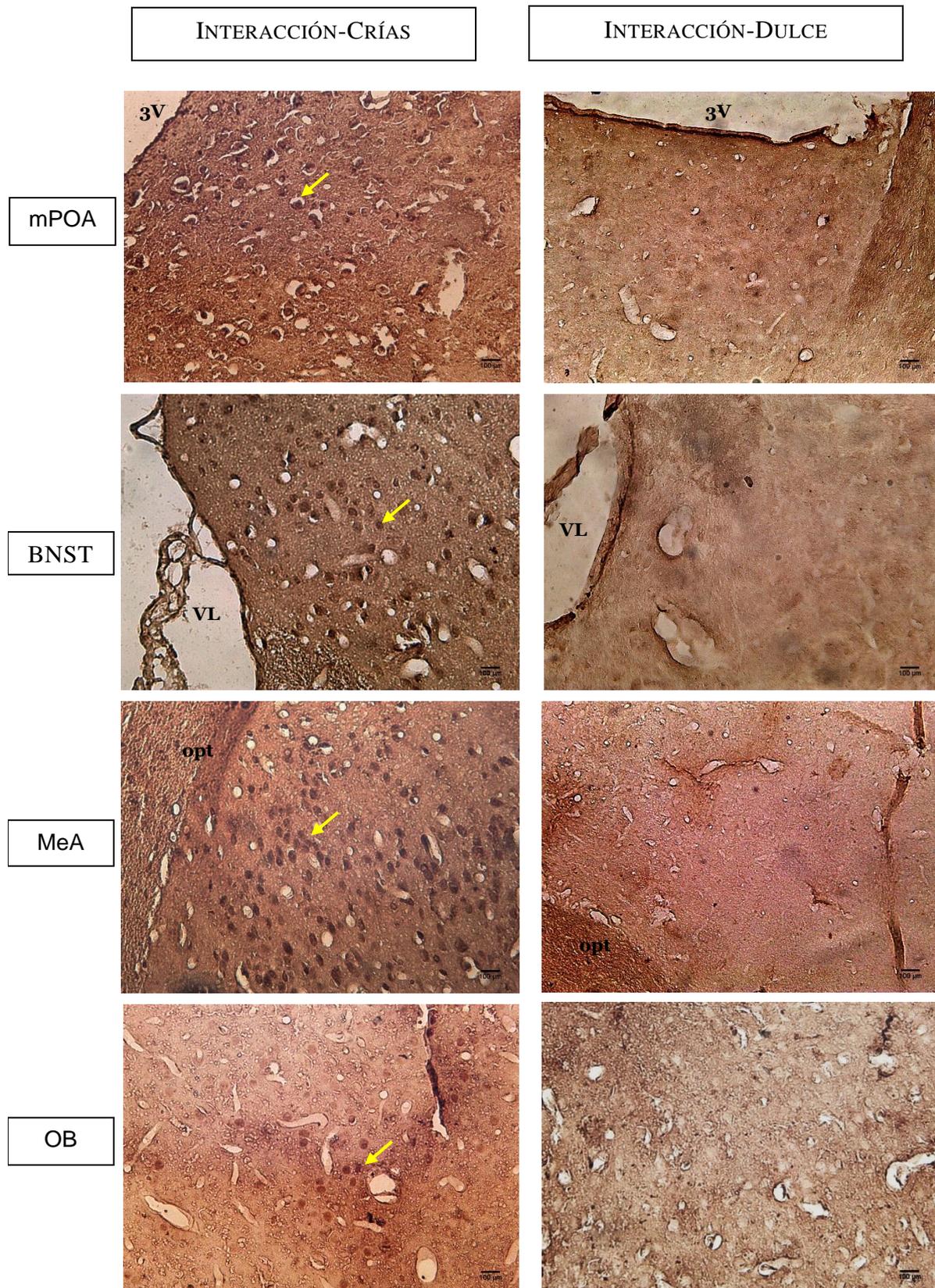


Figura 11. Fotomicrografías de células inmunorreactivas a c-Fos. Aumento de 40x. Se puede observar que el número de estas células fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en hámsteres que interaccionaron paternalmente con las crías (derecha) que éstos que interaccionaron con un dulce (izquierda). 3V= Tercer ventrículo, VL= Ventrículo lateral, opt= tracto óptico. Escala 100 μm .

Testosterona

No se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de T entre los machos que interaccionaron con una cría y éstos que interaccionaron con un dulce ($W = 153, p > 0.05$) (Fig. 12). Asimismo, tampoco se encontró una correlación entre las concentraciones de T y la latencia de inicio ($r = -0.154, p > 0.05$).

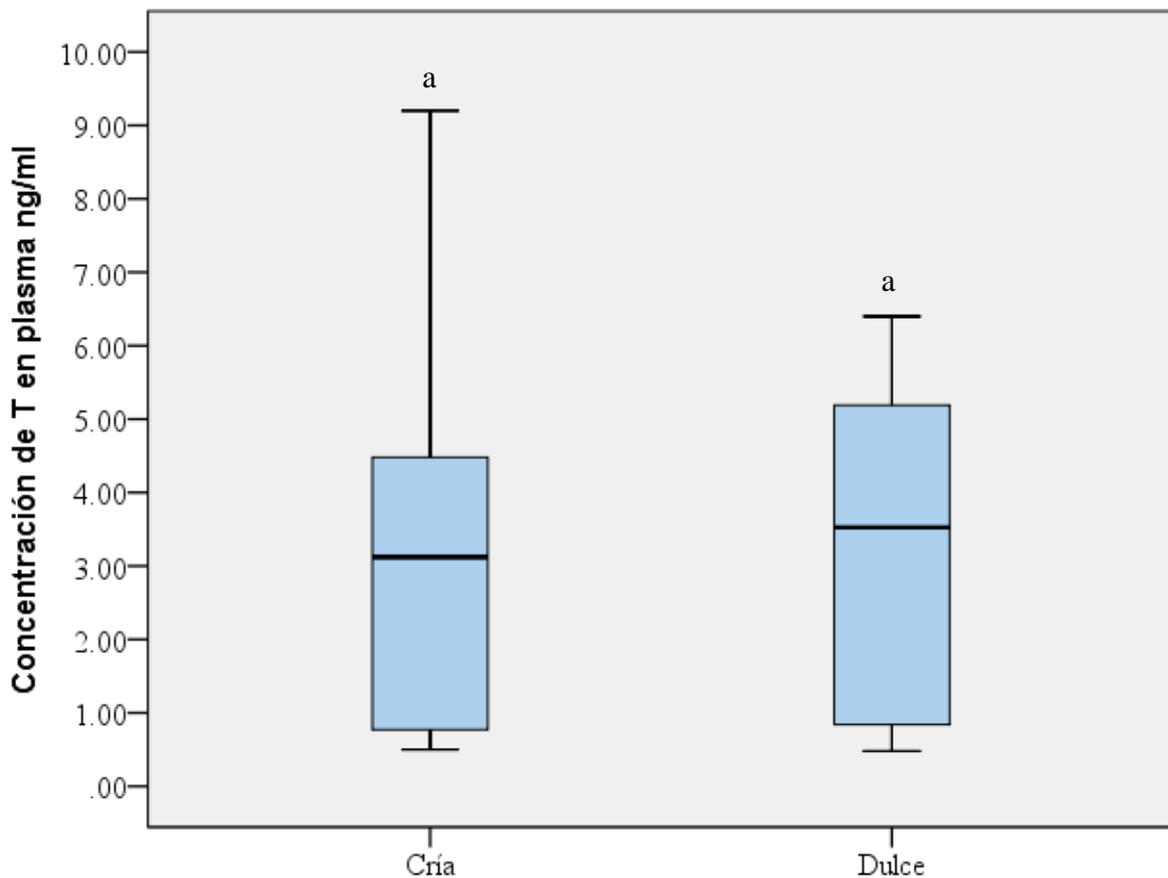


Figura 12. Concentraciones de T (ng/ml) en plasma de los machos del hámster enano que interaccionaron con una cría o un dulce. No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos.

De igual manera, no hubo correlación entre la latencia de inicio y los niveles de T en plasma ($p > 0.05$)

DISCUSIÓN

La frecuencia de olfateo de los machos que interaccionaron con la cría fue mayor en comparación con los que interactuaron con un dulce. Estos resultados sugieren que las crías son estímulos más fuertes que el dulce, probablemente, porque éstas tienen olor, emiten vocalizaciones, son móviles y emanan calor, como ya lo propusieron Kirkpatrick *et al.*, (1994b). Además del olfateo, los machos que interaccionaron con una cría desplegaron acicalamiento; esta actividad ha sido reportada como parte de la conducta paterna de este roedor (Romero-Morales *et al.*, 2018a) y otros roedores biparentales (DeJong *et al.*, 2009). Cabe mencionar, que únicamente dos machos recuperaron a la cría cuando ésta se alejaba, a este respecto, varios estudios han propuesto que la conducta de recuperación de la cría es estimulada por diferentes factores, tales como las vocalizaciones y el olor que emite las crías. En algunas especies el despliegue de esta conducta está asociada a un aumento en la concentración de E₂ (Li & Fleming, 2003; Akther *et al.*, 2015). Sin embargo, es probable que otros factores influyan en el despliegue de esta conducta, debido a que es poco frecuente.

Los hámsteres que interaccionaron paternalmente con las crías tuvieron significativamente un número más alto de células inmunorreactivas a c-Fos en el mPOA y BNST en comparación con los hámsteres que interaccionaron con un dulce. Estos resultados sugieren que tanto mPOA como BNST participan en la regulación de la conducta paterna del hámster enano, y apoyan la hipótesis de que las mismas áreas neurales que regulan la conducta materna también regulan la conducta paterna (Timonin *et al.*, 2008; Horrel *et al.*, 2018). En otros roedores, como el ratón de California, se ha comprobado que mPOA también participa en la regulación de la conducta paterna, debido a que lesiones en este núcleo, provocan que los padres inviertan menos tiempo en el acicalamiento y olfateo de las crías (Lee & Brown, 2002; Lee & Brown, 2007). Asimismo, padres primerizos en este mismo ratón, presentan significativamente mayor

inmunorreactividad a c-Fos en mPOA después que son expuestos a un contenedor con una cría de la especie, en comparación con los ratones que son expuestos a un contenedor vacío. De igual manera, en el ratón de California, BNST presenta un alto número de células inmunorreactivas a la proteína c-Fos en padres a diferencia de los machos vírgenes (De Jong *et al.*, 2009). También, en los ratones ICR, lesiones en mPOA afectan la latencia y frecuencia de acicalamiento, recuperación y acurrucamiento de las crías en comparación con los ratones a los que no se les lesionó dicha área cerebral. Además, la frecuencia de estas conductas también fue menor en padres lesionados (Akther, *et al.*, 2014). Igualmente, en estos ratones, el mPOA se activa significativamente más en los padres que exhibieron conducta de recuperación que en aquellos que no presentaron tal conducta (Zhong *et al.*, 2014).

La MeA también se activó significativamente en los machos que interaccionaron con una cría en comparación con aquellos que interaccionaron con un dulce; esto permite proponer que esta área también tiene una función importante en la regulación de la conducta paterna del hámster enano. En el circuito neural de la conducta materna, la MeA lleva estímulos olfativos de los bulbos olfatorios a mPOA, pero también se comunica con el VMH y AHN, que son núcleos que forman parte del mecanismo negativo que integra este circuito según el modelo “approach/avoid” (Numan, 2007; Lonstein *et al.*, 2015).

En la rata hembra se ha sugerido que MeA está involucrada en conductas agresivas debido a que, al lesionar esta área, los cuidados maternos aumentan (Numan, 1993). En el topillo de las praderas, lesiones en la amígdala ocasionan una disminución de las actividades paternas (Kirkpatrick, *et al.*, 1994a). Newman (1999) menciona que esta área forma parte de una red central común que regula las conductas sexuales, de agresión y conducta paterna.

Aunque el OB mostró inmunorreactividad a c-Fos tanto en los hámsteres del grupo experimental, como en los del grupo control, la cantidad de células inmunorreactivas en los

hámsteres que interactuaron paternalmente fue significativamente mayor que en los que interaccionaron con el dulce. Los bulbos olfatorios también forman parte del circuito neural que regula la conducta materna en donde, como ya se mencionó, envían estímulos olfatorios a la MeA, los cuales pueden viajar a BNST o al mPOA (Chen *et al.*, 2019). Aunque aún no se ha propuesto un circuito de regulación neural de la conducta paterna, puede sugerirse que en esta conducta, los bulbos olfatorios podrían desempeñar un papel similar al de la conducta materna, pues varios autores han sugerido que existe una homología a nivel neural en la regulación de la conducta materna y paterna (Timonin *et al.*, 2008; Horrel *et al.*, 2018) Además, cabe mencionar que, en el topillo de la pradera, machos bulboectomizados, al ser expuestos a las crías, las atacan, a diferencia de los machos control, en los cuales sólo se les simuló la cirugía (Kirkpatrick *et al.*, 1994c).

No se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de T entre los machos que interaccionaron con las crías y los que interaccionaron con un dulce. Estos resultados posiblemente se deben a que los machos de ambos grupos, es decir, los del grupo experimental y los del grupo control, desde el inicio fueron espontáneamente paternos. Se ha mencionado que la respuesta tanto de hembras, como de machos vírgenes depende de su estado hormonal y, en los machos, depende particularmente de las concentraciones de T. Con fundamento en esto, es probable que las concentraciones de T que se observaron en este estudio fueran las requeridas para que los machos del hámster enano desplegaran un comportamiento paternal, en lugar de un comportamiento agresivo hacia las crías. En la rata de laboratorio, el estado hormonal adecuado para que se exhiba conducta materna son altas concentraciones de E₂. Esta hormona, actúa principalmente en el mPOA, área que integra las señales recibidas de la MeA (Horrel *et al.*, 2018). En la conducta paterna, la T desempeña un papel similar al del E₂. En el gerbo de Mongolia los machos espontáneamente paternos tienen significativamente más altas concentraciones de T que los infanticidas (Romero-Morales *et al.*, 2018)

En este estudio, no se encontró correlación entre la latencia de inicio y los niveles de T en plasma, esto podría ser porque se ha propuesto que esta hormona no regula de manera directa la conducta paterna, sino a través de sus metabolitos: E₂ y DHT (Rojo-Langruen, 2021).

Finalmente, estos resultados mostraron que cuando el macho del hámster enano interacciona paternalmente con las crías, se activan mPOA, BNST, MeA y OB, lo cual sugiere que estas áreas participan en la regulación de la conducta paterna. Esto apoya la homología entre el circuito de regulación neural de la conducta materna y paterna. Además, estos resultados sugieren la existencia de un patrón de regulación neural en los roedores.

Futuras investigaciones en esta área deben ser encaminadas a establecer las conexiones entre estos núcleos, así como utilizar técnicas que permitan establecer qué subnúcleos, aún no estudiados, están implicados en la regulación de la conducta paterna del hámster enano.

CONCLUSIÓN

Los resultados mostraron que cuando los hámsteres machos proporcionan cuidados a las crías se activan significativamente el mPOA, BNST, MeA y OB, lo cual sugiere que estos núcleos neuronales participan en la regulación de la conducta paterna. Sin embargo, sólo estudios de lesión u optogenéticos podrán corroborar estos resultados.

REFERENCIAS

- Akther, S., Fakhrul, A.A.K.M., Higashida, H. (2014). Effects of the electrical lesions of the medial preoptic area and the ventral palladium on mate-dependent paternal behavior in mice. *Neuroscience letters*. 570: 21.25.
- Akther, S., Huang, Z., Zhong, J., Fakhrul, A.A., Yuhi, T., Lopatina, O., Salmina, A.B., Yokoyama, S., Higashida, C., Tsuji, T., Matsuo, M., Higashida, H. (2015). Paternal retrieval behavior regulated by brain estrogen synthetase (aromatase) in mouse sires that engage in communicative interactions with pairmates. *Frontiers in Neuroscience*. 9:450.
- Animal Care and Use Committee. Guidelines for the capture, handling, and care of mammals as approved by the American society of mammalogists. (1998). *Journal of Mammalogy*. 79(4): 1416-1431.
- Bales, K.L, Kim, A.J., Lewis-Reese, A.D., Carter, S. (2004). Both oxytocin and vasopressin may influence alloparental behavior in male prairie voles. *Hormones and Behavior*. 45: 354-361.
- Bales, K.L. & Saltzman, W. (2016). Fathering in rodents: Neurobiological substrates and consequences for offspring. *Hormones and Behavior*. 77: 249-259.
- Bales, K.L., Kramer, K.M., Lewis-Reese, A.D., Carter, S. (2006). Effects of stress on parental care are sexually dimorphic in prairie voles. *Physiology & Behavior*. 87: 424-429.
- 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., Murdoch, T., Murphy, P.R., Moger, W.H. (1995). Hormonal Responses of Male Gerbils to Stimuli from Their Mate and Pups. *Hormones and Behavior*. 29: 474-491.
- Bullit, E. (1990). Expression of c-Fos like a Protein as a Marker for Neuronal Activity Following Noxious Stimulation in the Rat. *The Journal of Comparative Neurology*. 296:517-530.
- Caldwell, H. K. & Albers, H. E. (2016). Oxytocin, Vasopressin, and the Motivational Forces that Drive Social Behaviors. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*. 27: 51-103.
- Carter, C.S., DeVries, A.C., Getz, L.L. (1995). Physiological substrates of mammalian monogamy: The prairie vole model. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 19(2): 303-314.
- Carter, M. & Shieh, J. (2015). Guide to Research Techniques in Neuroscience. Segunda edición. *Academic Press*. 388.
- Chen, P., Hu, R.K., Wu, Y.E., Hong, W. (2019). Sexually dimorphic control of parenting behavior by the medial amygdala. *Cell*. 176: 1206-1221.
- Clutton-Brock, T.H. (1991). *The evolution of parental care*. Princeton University Press.
- De Jong, T.R., Chauke, M., Harris, B.N., Saltzman, W. (2009). *Hormones and Behavior*. 56: 220-231.
- Dewsbury, D. Paternal behavior in rodents. (1985). *American Zoologist*. 25: 841-852.

- Dragunow, M., Peterson, M.R., Robertson, H.A. (1987). Presence of c-Fos like immunoreactivity in the adult rat brain. *European Journal of Pharmacology*. 135: 113-114.
- Dudley, D. (1974). Paternal behavior in the California mouse, *Peromyscus californicus*. *Behavioral. Biology* 11(2): 247-252.
- Dulac, C., O'Connell, L., Wu, Z. (2014). Neural control of maternal and paternal behaviors. *Science*. 345(6198): 765-770.
- Elwood, R.W. (1975). Paternal and maternal behaviour in the Mongolian gerbil. *Animal Behavior*. 23: 766-772.
- Erb, G.E., Edwards, H.E., Jenkins, K.L., Mucklow, L.C., Wynne-Edwards, K.E. (1993). Induced components in the spontaneous ovulatory cycle of the Djungarian hamster (*Phodopus campbelli*). *Physiology and Behavior*. 54: 955–959.
- Feldman, R., Gordon, I., Schneiderman, I., Weisman, O., Zagoory-Sharon, O. (2010). Natural variations in maternal and paternal care are associated with systematic changes in oxytocin following parent-infant contact. *Psychoneuroendocrinology*. 35: 1133-1141.
- Freeman, M.E., Kanyicska, B., Lerant, A., Nagy, G. (2000). Prolactin: Structure, Function, and Regulation of Secretion. *Physiological Reviews*. 80(4): 1523-1631.
- Gomez, Y. (2017). *Inmunorreactividad de c-Fos en el hipotálamo y el sistema de recompensa asociada a la novedad social en ratas jóvenes*. [Tesis de Licenciatura]. Universidad Autónoma del Estado de México.

- Greenberg, M. & Ziff, E. (1984). Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the *c-fos* proto-oncogene. *Nature*. 311: 433–438.
- Gross, M.R. & Sargent, R.C. (1985). The evolution of male and female parental care in fishes. *The Quarterly Review of Biology*. 80: 807–822.
- 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. & Teferi, T. (2000). Adaptive significance of male parental care in a monogamous mammal. *The Royal Society*. 267:147-150.
- Gubernick, D.J. (1990). A maternal chemosignal maintains paternal behaviour in the biparental California mouse, (*Peromyscus californicus*). *Animal Behaviour*. 39(5): 936–942.
- Gubernick, D.J., Winslow, J.T., Jensen, P., Jeanotte, L., Bowen, J. (1995). Oxytocin changes in males over the reproductive cycle in the monogamous, biparental California Mouse, *Peromyscus californicus*. *Hormones and Behavior*. 29: 59-73.
- Harris, B., Perea-Rodriguez, J.P., Saltzman, W. (2011). Acute effects of corticosterone injection on paternal behavior in California mouse (*Peromyscus californicus*) fathers. *Hormones and Behavior*. 60: 666-675.
- Hartung, T.G., & Dewsbury, D.A. (1979). Paternal behavior in six species of muroid rodents. *Behavioral & Neural Biology*. 26(4): 466–478.

- 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*. 12(3): 173-213.
- Horrel, N.D., Hickmott, P.W., Saltzman, W. (2018). Neural regulation of paternal behavior in mammals: Sensory, neuroendocrine, and experiential influences on the paternal brain. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*. 43: 111-160.
- 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(3): 303–310.
- Jean-Baptiste, N., Terleph, T.A., Bamshad, M. (2008). Changes in paternal responsiveness of Prairie Voles (*Microtus ochrogaster*) in response to olfactory cues and continuous physical contact with a female. *Ethology*. 114: 1239-1246.
- Ketterson, E. & Nolan, V. (1994). Male parental behavior in birds. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 25: 601-628.
- Kirkpatrick, B., Carter, C.S., Newman, S.W. Insel, T.R. (1994a). Axon-sparing lesions of the medial nucleus of the amygdala decrease affiliative behaviors in the prairie vole (*Microtus ochrogaster*) behavioral and anatomical specificity. *Behavioral Neuroscience*. 108: 501-513.
- Kirkpatrick, B., Kim, J.W., Insel, T.R. (1994b). Limbic system *fos* expression associated with paternal behavior. *Brain Research*. 658: 112-118.
- Kirkpatrick, B., Williams, J.R., Slotnick, B.M., Carter, S. (1994c). Olfactory bulbectomy decreases social behavior in male prairie voles (*M. ochrogaster*). *Physiology & Behavior*. 5:885-889.

- Kleiman, D. & Malcolm, J. (1981). The Evolution of Male Parental Investment in Mammals. En: Gubernick, D.J., Klopfer, P.H. (Eds.) *Parental care in mammals*. Plenum Publishing Corporation. 347-387.
- Kleiman, D.G. (1977). Monogamy in mammals. *The Quarterly Review of Biology*. 52: 39-69.
- Lee, A.W. & Brown, R. (2002). Medial preoptic lesions disrupt parental behavior in both male and female California mice (*Peromyscus californicus*). *Behavioral Neuroscience*. 116: 968-975.
- Lee, A.W., Brown, R. (2007). Comparison of medial preoptic, amygdala, and nucleus accumbens lesions on parental behavior in California mice (*Peromyscus californicus*). *Physiology and Behavior*. 92(4):617-28.
- Li, L., Zirkin, B.R., Papadopoulos, V. (2018). Leyding Cell Androgen Synthesis. En: Skinner, M. (Eds.). *Encyclopedia of Reproduction*. Academic Press. 2º edición. 215-221.
- Li, M., Fleming, A.S. (2003). Differential involvement of nucleus accumbens shell and core subregions in maternal memory in postpartum female rats. *Behavioral Neuroscience*. 117:426-445.
- Lonstein, J.S., Pereira, M., Morrell, J.I., Marler, C.A. (2015). Parenting Behavior. En: Plant, M.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. 2371-2437.

- Luis, J., Cadena, C., Zedillo, B., Ramos, G., Martínez, M. (2012). Testosterone replacement induced paternal behaviour in the Mexican volcano mouse *Neotomodon alstoni* (Rodentia Muridae). *Ethology, Ecology & Evolution*. 24(3): 275-283.
- Luis, J., Carmona, A., Delgado, J., Cervantes, F., Cárdenas, R. (2000). Parental behavior of the volcano Mose, *Neotomodon Alstoni* (Rodentia: Muridae), in Captivity. *Journal of Mammalogy*. 81(2): 600–605.
- Luis, J., Cervantes, F.A., Martínez, M., Cárdenas, R., Delgado, J., Carmona, A. (2004). Male influence on maternal behavior and offspring of captive volcano mice (*Neotomodon alstoni*) from Mexico. *Journal of Mammalogy*. 85(2): 268-272.
- Luis, J., 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). *Revista de Biología Tropical*. 65: 1419-1427.
- Lukas, D. & Clutton-Brock, T.H. (2013). The evolution of social monogamy in mammals. *Science*. 341: 526-530.
- Ma, E., Lau, J., Grattan, D.R., Lovejoy, D.A., Wynne-Edwards, K.E. (2005). Male and Female Prolactin Receptor mRNA Expression in the Brain of a Biparental and a Uniparental Hamster, *Phodopus*, Before and After the Birth of a Litter. *Journal of Neuroendocrinology*. 17: 81-90.
- Marler, C.A., Bester-Meredith, J., Trainor, B.C. (2003). Paternal behavior and aggression: endocrine mechanisms and nongenomic transmission of behavior. *Advances in the study of behavior*. 32: 263-322.

- Martínez, A., Ramos, G., Martínez-Torres, M., Nicolás, L., Carmona, A., Cárdenas, M., Luis, J. (2015). Paternal behavior in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*): Estrogenic and androgenic regulation. *Hormones and Behavior*. 71: 91-95.
- Morgan, J.I., Donna R.C., Hempstead, J.L., Curran, T. (1987). Mapping Patterns of *c-fos* Expression in the Central Nervous System After Seizure. *Science*. 237(4811): 192-197.
- 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*. 877:242-57.
- Numan, M. & Numan, M.J. (1997). Projection Sites of Medial Preoptic Area and Ventral Bed Nucleus of the Stria Terminalis Neurons that Express Fos during Maternal Behavior in Female Rats. *Journal of Neuroendocrinology*. 9(5): 369-384.
- Numan, M. (2007). Motivational systems and the neural circuitry of maternal behavior in the rat. *Developmental Psychobiology*. 49(1):12-21.
- Numan, M. (2015). Parental Behavior. En: Numan, M. *Neurobiology of social behavior*. Elsevier. 165-234.
- Numan, M., Numan, M.J., English, J. (1993). Exocytotoxic aminoacid injections into the Medial Amygdala facilitate maternal behavior in virgin female rats. *Hormones and behavior*. 27: 56-81
- Praxinos, G. & Watson, C. (2004). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 5^a edición. Academic Press.

- Reburn, C.J. & Wynne-Edwards, K.E. (1999). Hormonal changes in males of a naturally biparental and a uniparental mammal. *Hormones and Behavior*. 35: 163-176.
- Rilling, K.J. (2013). The neural and hormonal bases of human parental care. *Neuropsychologia*. 51: 721-747.
- Rojo-Langruen, M. (2021). *Testosterona y dihidrotestosterona en el inicio de la conducta paterna en el hámster enano (Phodopus campbelli)*. [Tesis de Licenciatura]. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Romero-Morales, L. (2016). *Factores sociales y distribución de receptores ER α y AR en el MPOA y MEA, asociados al establecimiento de la conducta paterna en el hámster enano (Phodopus campbelli)*. [Tesis de Maestría]. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Romero-Morales, L., Cárdenas, M., Martínez-Torres, M., García-Saucedo, B., Carmona, A., Luis, J. (2018a). Neuronal activation associated with paternal and aversive interactions toward pups in the Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Hormones and Behavior*. 105: 47-57.
- Romero-Morales, L., Martínez-Torres, M., Cárdenas, M., Álvarez, C., Carmona, A., Cedillo, B., Loya-Zurita, E., Luis, J. (2018b). An increase in estradiol facilitates the onset of paternal behavior in the dwarf hamster (*Phodopus campbelli*). *Hormones and Behavior*. 99: 35-40.
- Ross, P. (1995). Mammalian species: *Phodopus campbelli*. *The American Society of Mammalogists*. 503: 1-7.
- Rymer, T.L. & Pillay, N. (2018). An integrated understanding of paternal care in mammals: lessons from rodents. *Journal of Zoology*. 306: 69-76.

- Salposky, R.M., Romero, L.M., Munck, A.U. (2000). How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrine Reviews*. 21: 55-89.
- Saltzman, W. & Ziegler, T.E. (2014). Functional Significance of Hormonal Changes in Mammalian Fathers. *Journal of Neuroendocrinology*. 26: 685-696.
- Schradin, C. & Anzenberger, G. (1999). Prolactin, the Hormone of Paternity. *News in physiological sciences*. 14: 223-231.
- Schulman, H. (2013). Intracellular signaling. In: Squire, L., Berg, D., Bloom, F., Du Lac, S., Ghosh, A., Spitzer, N. (Eds.) *Fundamental Neuroscience*. 4th Edition. Academic Press. 189-209.
- 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. *Diario Federal* 75: 13-60.
- Sheng, M. & Greenberg, M. (1990). The Regulation and Function of *c-fos* and Other Immediate Early Genes in the Nervous System. *Neuron*. 4: 477-485.
- Storey, A.E. & Joyce, T.L. (1995). Pup contact promotes paternal responsiveness in male meadow voles. *Animal Behavior*. 49: 1-10.
- Timonin, M.E., Cushing B.S. & Wynne-Edwards K.E. (2008). In three brain regions central to maternal behaviour, neither male nor female *Phodopus* dwarf hamsters show changes in oestrogen receptor alpha distribution with mating or parenthood. *J. Neuroendocrinology*. 20: 1301-1309.

- Trainor, B. & Marler, C. (2002). Testosterone Promotes Paternal Behaviour in a Monogamous Mammal via Conversion to Oestrogen. *Royal Society*. 269: 823-829.
- Trainor, B.C., Bird I.M., Alday N.A., Schlinger B.A., Marler, C.A. (2003). Variation in aromatase activity in the medial preoptic area and plasma progesterone is associated with the onset of paternal behavior. *Neuroendocrinology*. 78(1): 36-44.
- Trainor, B.C., Sisk, C.L., Nelson, R.J. (2009). Hormone and the development and expression of aggressive behavior. En: Pfaff, D.W., Arnold, A.P., Etgen, A.M., Fahrbach, S.E., Rubin, R.T. (Eds.), *Hormones, brain, and behavior*. Elsevier Academic Press: 167–203).
- Wittenberger, J.F. & Tilson, R.L. (1980). The evolution of monogamy: Hypotheses and Evidence. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 11:197-232.
- Woodroffe, R. & Vincent, A. (1994). Mother's little helpers: patterns of male care in mammals. *Trends in Ecology and Evolution*. 9(8): 294-297.
- Wynne-Edwards, K.E. & Lisk, R. (1989). Differential effects of paternal presence on pup survival in two species of dwarf hamster (*Phodopus sungorus* and *Phodopus campbelli*). *Physiology and behavior*. 45: 465-469.
- Wynne-Edwards, K.E. (1995). Biparental care in Djungarian but not Siberian dwarf hamsters (*Phodopus*). *Animal Behaviour*. 50(6): 1571-1585.
- Wynne-Edwards, K.E. (2003). From Dwarf Hamster to Daddy: The Intersection of Evolution, and Physiology That Produces Paternal Behavior. En: Slater, P.J.B., Rosenblatt, J.S., Snowdon, C.T., Roper, T.J. (Eds.). *Advances in the Study of Behavior*. Elsevier. 207-253.

- Wynne-Edwards, K.E. Evolution of parental care in *Phodopus*: Conflict between adaptations for survival and adaptations for rapid reproduction. (1998). *American Zoologist*. 38: 238-250.
- Yuan, W., He, Z., Houw, W., Wang, L., Li, L., Zang, J., Yang, Y., Jia, R., Qiao, H., Tai, F. (2019). Role of oxytocin in the medial preoptic area (MPOA) in the modulation of paternal behavior in mandarin voles. *Hormones and Behavior*. 110: 46-55.
- Zhong, J., Liang, M., Akther, S., Higashida, C., Tsuji, T., Higashida, H. (2014). c-Fos expression in the paternal mouse brain induced by communicative interaction with maternal mates. *Molecular Brain*. 7(66): 1-11
- Zielinski, W. & Vandenbergh, J. (1993). Testosterone and competitive ability in male house mice *Mus musculus*: laboratory and field studies. *Animal Behaviour*. 45:873-891.

ANEXO I

Desparafinado y rehidratado mediante la técnica convencional histológica

1. Desparafinado en horno.....30 minutos
2. Xilol I.....10 minutos
3. Xilol II.....10 minutos
4. Alcohol 90%.....10 minutos
5. Alcohol 80%.....10 minutos
6. Alcohol 70%.....10 minutos
7. Lavado en agua10 minutos

ANEXO II

Técnica inmunohistoquímica para la proteína c-Fos

1. Colocar las muestras en una caja coplin con citrato de sodio (0.01M) en baño maría hasta que el agua comience a hervir
2. Dejar enfriar
3. Incubar en peróxido de hidrógeno durante 10 minutos
4. Lavar en PBS (Buffer de fosfatos pH 7.2-7.4) durante 5 minutos
5. Incubar en suero bloqueador diluido (albumina de suero bovino al 1% (BSA) durante 20 minutos
6. Quitar exceso de suero
7. Incubar durante toda la noche en el primer anticuerpo (c-Fos Sc-52 policlonal IgG Anti-Rabbit) diluido en PBS 1:50
8. Lavar en PBS (Buffer de fosfatos pH 7.2-7.4) durante 5 minutos
9. Incubar en el segundo anticuerpo biotinilado durante 90 minutos
10. Lavar en PBS (Buffer de fosfatos pH 7.2-7.4) durante 5 minutos
11. Incubar en ABC durante 30 minutos
12. Lavar en PBS (Buffer de fosfatos pH 7.2-7.4) durante 5 minutos
13. Incubar en sustrato para peroxidasa con Diaminobencidina (DAB) durante 3 minutos
14. Sumergir y retirar rápidamente en agua destilada
15. Limpiar, secar y montar con resina

ANEXO III

Abreviaturas

3V: Tercer ventrículo

A.C.: Adenilato Ciclasa

AHN: (Anterior Hypothalamus Nucleus) Núcleo Hipotalámico Anterior

AMP: (Adenosine MonoPhosphate) Adenosín Monofosfato

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ATP: (Adenosine TriPhosphate) Adenosín Trifosfato

BNST: (Bed Nucleus of the Stria Terminalis) Núcleo de la Estría Terminalis

Ca⁺²: Calcio

CaM: (Calmodulin) Calmodulina

CaMK: (Calmodulin-dependent Kinase) Cinasas dependientes de Calmodulina

cAMP: (Cyclic Adenosine MonoPhosphate) Adenosín Monofosfato cíclico

c-fos: Gen

c-Fos: Proteína

CREB: (Calcium Response Element-Binding) Elemento de Unión en Respuesta al Calcio

DHT: (Dihydrotestosterone) Dihidrotestosterona

E₂: Estradiol

Er α : (Estrogen Receptors Alpha) Receptores de Estrógeno Alpha

GLU: Glucocorticoides

PG: (Periaqueductal Grey) Gris Periacueductal

IEGs: (Immediate Early Genes) Genes de Expresión Rápida

LV: (Lateral Ventriculum) Ventrículo Lateral

MeA: (Medial Amygdala) Amígdala Media

mPOA: (Medial Preoptic Area) Área Preóptica Media

mRNA: (Messenger Ribonucleic Acid) Ácido Ribonucleico Mensajero

OB: (Olfactory Bulb) Bulbo Olfatorio

OPT: (Optical Tract) Tracto Óptico

OT: Oxitocina

PKA: (Protein Kinase A) Proteína cinasa A/ Cinasas dependientes de ciclina

PRL: Prolactina

T: Testosterona

VMH: (Ventromedial Hypothalamus) Núcleo Hipotalámico Ventromedial