



Universidad Nacional Autónoma de México

Doctorado en Ciencias Biomédicas  
Instituto de Neurobiología

# **EFFECTOS DE LA AUSENCIA DE CUIDADOS PATERNOS SOBRE LA MADURACIÓN FÍSICA Y LA PLASTICIDAD NEURONAL EN MICROTUS OCHROGASTER**



Tesis, que para optar por el grado de:

**Doctor en ciencias biomédicas,**

Presenta:

**Guillermo Valera Marín**

Directora de tesis:

**Doctora Wendy Portillo Martínez**  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

Comité tutor:

**Doctor José Alonso Fernández Guasti**  
CINVESTAV-SUR, IPN  
**Doctora María Teresa Morales Guzmán**  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA



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.



*Nos faltan 43.*

# 1 ÍNDICE

---

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 2     | AGRADECIMIENTOS.....  | 8  |
| 3     | RESUMEN .....   | 9  |
| 4     | SUMMARY.....  | 11 |
| 5     | INTRODUCCIÓN .....  | 13 |
| 6     | ANTECEDENTES .....  | 18 |
| 6.1   | <i>Microtus ochrogaster: Los topillos de la pradera.</i> <sup>1</sup> ..... | 18 |
| 6.2   | <i>La monogamia social</i> .....  | 23 |
| 6.3   | <i>Formación de vínculos de pareja</i> .....                                | 24 |
| 6.3.1 | La cópula en la formación de vínculos de pareja.....                        | 26 |
| 6.3.2 | El sistema olfativo en la formación del vínculo de pareja .....             | 27 |
| 6.3.3 | Circuito neurobiológico de la formación del vínculo de pareja. ....         | 29 |
| 6.4   | <i>Los cuidados parentales</i> .....  | 34 |
| 6.4.1 | Efectos de los cuidados parentales en los topillos de la pradera .....      | 36 |
| 7     | JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO.....   | 40 |
| 8     | OBJETIVOS.....  | 41 |
| 9     | HIPÓTESIS.....  | 43 |
| 10    | MATERIAL Y MÉTODOS.....   | 47 |
| 10.1  | <i>Animales</i> .....   | 47 |
| 10.2  | <i>Grupos experimentales</i> .....  | 48 |

|              |  |           |
|--------------|--|-----------|
| <b>10.3</b>  | <b><i>Procedimientos quirúrgicos y reemplazo hormonal.....</i></b>   | <b>49</b> |
| <b>10.4</b>  | <b><i>Procedimientos para la evaluación del comportamiento.....</i></b>  | <b>50</b> |
| <b>10.5</b>  | <b><i>Experimento 1: Cuidados parentales en familias mono y biparentales y su efecto en el desarrollo de las crías .....</i></b>           | <b>50</b> |
| 10.5.1       | Prueba de cuidado parental.....  | 50        |
| 10.5.2       | Desarrollo de las crías.....   | 51        |
| <b>10.6</b>  | <b><i>Experimento 2: Detección, discriminación olfatoria y Preferencia por olores sexualmente relevantes.....</i></b>                      | <b>51</b> |
| 10.6.1       | Capacidad olfatoria.....   | 51        |
| 10.6.2       | Discriminación olfatoria.....  | 51        |
| 10.6.3       | Preferencia por olores sexualmente relevantes.....   | 52        |
| <b>10.7</b>  | <b><i>Experimento 3: Conducta sexual en machos y hembras mono y biparentales.....</i></b>  | <b>53</b> |
| 10.7.1       | Conducta sexual en machos.....   | 53        |
| 10.7.2       | Conducta sexual en hembras .....   | 54        |
| <b>10.8</b>  | <b><i>Experimento 4: Reforzamiento inducido por la cohabitación con cópula y preferencia de pareja. 55</i></b>                             |           |
| 10.8.1       | Preferencia de lugar condicionada.....   | 55        |
| 10.8.2       | Prueba de preferencia de pareja.....   | 57        |
| <b>10.9</b>  | <b><i>Experimento 5: Cambios en dopamina y serotonina y sus metabolitos después de la cohabitación con cópula. ....</i></b>                | <b>58</b> |
| <b>10.10</b> | <b><i>Experimento 6: Efecto de la exposición a olores de macho y del cuidado bimarental en la formación del vínculo de pareja.....</i></b> | <b>60</b> |
| 10.10.1      | Prueba de cuidado parental.....  | 61        |
| 10.10.2      | Prueba de preferencia de pareja.....   | 61        |
| <b>10.11</b> | <b><i>Análisis estadístico .....</i></b>   | <b>62</b> |
| <b>11</b>    | <b>RESULTADOS .....</b>  | <b>63</b> |
| <b>11.1</b>  | <b><i>Experimento 1: Cuidados parentales en familias mono y biparentales y su efecto en el desarrollo de las crías .....</i></b>           | <b>63</b> |
| 11.1.1       | Pruebas de cuidado parental .....  | 63        |

|             |  |           |
|-------------|--|-----------|
| 11.1.2      | Desarrollo.....  | 64        |
| <b>11.2</b> | <b><i>Experimento 2: Preferencia por olores sexualmente relevantes.</i></b> .....  | <b>66</b> |
| 11.2.1      | Capacidad olfatoria.....   | 66        |
| 11.2.2      | Discriminación olfatoria.....  | 67        |
| 11.2.3      | Preferencia por olores sexualmente relevantes.....   | 69        |
| <b>11.3</b> | <b><i>Experimento 3: Conducta sexual en machos y hembras mono y biparentales.....</i></b>  | <b>69</b> |
| 11.3.1      | Conducta sexual en machos.....   | 69        |
| 11.3.2      | Conducta sexual en hembras. ....   | 70        |
| <b>11.4</b> | <b><i>Experimento 4: Estado afectivo positivo inducido por la cohabitación con cópula y preferencia de pareja.</i></b> .....   | <b>72</b> |
| 11.4.1      | Preferencia de lugar condicionada.....   | 72        |
| 11.4.2      | Preferencia de pareja.....   | 73        |
| <b>11.5</b> | <b><i>Experimento 5: Cambios en el metabolismo dopaminérgico y serotoninérgico después de la cohabitación con cópula</i></b> .....   | <b>75</b> |
| 11.5.1      | Conducta copulatoria .....   | 75        |
| 11.5.2      | <i>Núcleo accumbens</i> .....  | 75        |
| 11.5.3      | Estriado dorsal.....   | 76        |
| <b>11.6</b> | <b><i>Experimento 6: Efecto de la exposición a olores de macho y el cuidado por dos hembras en los cuidados parentales recibidos y la formación del vínculo de pareja.</i></b> ..... | <b>78</b> |
| 11.6.1      | Pruebas de cuidado parental .....  | 78        |
| 11.6.2      | Pruebas de preferencia de pareja .....   | 81        |
| <b>12</b>   | <b>DISCUSIÓN</b> .....   | <b>84</b> |
| <b>12.1</b> | <b><i>El cuidado parental en familias mono y biparentales y su efecto en el desarrollo de las crías</i></b> .  | <b>85</b> |
| <b>12.2</b> | <b><i>El cuidado parental y la estimulación somatosensorial como mecanismos de cambios conductuales en la edad adulta</i></b> .....  | <b>87</b> |
| <b>12.3</b> | <b><i>Los topillos monoparentales no muestran diferencias en su preferencia por olores sexualmente relevantes.....</i></b>   | <b>90</b> |
| 12.3.1      | Machos .....   | 91        |
| 12.3.2      | Hembras.....   | 92        |

|      |  |     |
|------|--|-----|
| 12.4 | <i>El cuidado parental no afecta a la conducta copulatoria en machos o hembras, ni a la inducción de receptividad sexual en hembras</i> .....                            | 93  |
| 12.5 | <i>La cohabitación con cópula no induce un cambio en la preferencia de lugar condicionada en machos monoparentales y estos no forman el vínculo de pareja</i> .....      | 95  |
| 12.6 | <i>Significado biológico del cambio en la estrategia en los topillos de la pradera que reciben menos cuidados</i> .....  | 99  |
| 12.7 | <i>Los machos biparentales muestran un incremento en el metabolismo dopaminérgico en el Núcleo accumbens</i> .....   | 102 |
| 12.8 | <i>El cuidado con dos cuidadores y el enriquecimiento con los olores del padre resulta en cambios sexualmente dimórficos en la formación del vínculo de pareja</i> ..... | 104 |
| 13   | CONCLUSIÓN .....   | 108 |
| 14   | REFERENCIAS .....  | 109 |

## 2 AGRADECIMIENTOS

---

En primer lugar, quiero agradecer de una forma muy especial a Wendy, por acogerme en su proyecto y por todo su apoyo en estos cinco años. Gracias por esta oportunidad y por ayudarme a construir este proyecto. A Raúl, por acogernos en su laboratorio. A mis compañeras del laboratorio, las que están y las que ya se fueron, especialmente a Analía.

A Fernando Martínez, Enrique Lanuza y Ana Martín, por haber sido mis padres en la ciencia. Gracias por todo lo que me enseñasteis.

A Andrea, por acompañarme y por todo tu apoyo y afecto. Sería distinto sin ti.

A todas las personas que trabajan de alguna forma para construir la educación pública en la que siempre me he formado. Gracias a todas, desde las docentes a los conserjes y empleados de limpieza. A todas las personas que colaboran desinteresadamente en los proyectos Wikimedia para hacer accesible el conocimiento a toda la humanidad.

Guillermo Valera Marín fue estudiante del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Fue apoyado económicamente por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con la beca 453854, registro 612319 y con CVU 772772. Su investigación fue apoyada por los proyectos CONACYT 252756, UNAM-DEGAPA-PAPIIT IN202818 e IN208221.

Agradecimientos a: MVZ Francisco Camacho Barrios, Técnico Académico del laboratorio de Conducta Sexual y Plasticidad Neuronal; Dra. Deisy Gasca Martínez responsable de la Unidad de Análisis Conductual; MVZ José Martín García Servín, Dra. Alejandra Castilla León y Dra. María A Carbajo Mata, responsables del laboratorio Universitario de Bioterio.

### 3 RESUMEN

---

La formación de vínculos de pareja, la cohabitación y el cuidado compartido de la descendencia son aspectos centrales de gran parte de las sociedades humanas. Los topillos de la pradera son animales monógamos sociales, forman un vínculo de pareja y se establecen en un nido conjunto donde cuidan juntos de la descendencia (familias biparentales). Los topillos criados únicamente por su madre, familia monoparental, retrasan la formación del vínculo de pareja y requieren hasta una semana de cohabitación para formarlo. Los vínculos de pareja se forman como un proceso asociativo entre las señales, principalmente olfativas, de la pareja con el reforzamiento que produce la cohabitación con cópula, pero desconocemos los mecanismos que subyacen al retraso en la formación de este vínculo en topillos criados en familias monoparentales. En el presente proyecto evaluamos los efectos de los cuidados del padre sobre el desarrollo de sus crías. Además, evaluamos las conductas olfatorias, copulatorias y el reforzamiento asociado a la cohabitación con cópula en las crías cuando fueron adultas. Nuestros datos demuestran que los topillos criados en familias monoparentales reciben menos acicalamiento, pero no tienen retrasos en el desarrollo. En la edad adulta, los machos y hembras criados en ambos tipos de familias no mostraron diferencias en la detección y discriminación de aromas, ambos grupos mostraron una preferencia innata por los olores del sexo opuesto, y no mostraron diferencias en su conducta sexual. Sin embargo, en los topillos machos criados en familias biparentales la cohabitación con cópula induce un estado reforzante que se extiende al contexto, pero este efecto no es observado en los machos criados en familias monoparentales. Estas diferencias podrían deberse al incremento en el metabolismo dopaminérgico que encontramos en el núcleo accumbens. Finalmente, evaluamos el

efecto del cuidado por dos hembras, la madre y una hembra ayudante, y el efecto del aprendizaje olfativo temprano en los topillos de la pradera al ser criados solo por su madre, pero en un ambiente enriquecido con los olores de su padre. Nuestros datos demuestran que los machos y hembras criados por dos hembras no forman un vínculo de pareja después de cohabitar/copular por 24 horas. Las hembras criadas solo por su madre y expuestas a los olores de su padre formaron un vínculo en 24 horas. En cambio, en los machos este tipo de crianza prefieren a una hembra extraña en lugar de a su pareja sexual. Concluimos que el cuidado monoparental afecta a la formación de vínculos de pareja a través de cambios en el reforzamiento de la cohabitación con cópula en machos, pero aparentemente es el aprendizaje olfatorio el factor central para la formación de vínculos de pareja en hembras.

## 4 SUMMARY

---

Pair bonds, cohabitation, and shared caregiving of the offspring are central aspects in most human societies. Prairie voles are socially monogamous animals which form a pair bond and establish in a common nest where both raise the offspring (biparental families). It has been shown that the family composition during early life has an impact in the behavior of the pups. Thus, prairie voles raised only by their mother, monoparental families, showed a delay in pair bond formation and required a week of cohabitation and mating to show a preference for their sexual partners. The pair bond formation involves an associative process between the partner cues, mainly olfactory, and the reinforcement of cohabitation and mating, but the mechanisms underlying the delay are not completely understood. In this research project we evaluated developmental changes in monoparental raised voles and if their delay in pair bond formation is due to olfactory or copulatory differences. We also evaluated the reinforcement of cohabitation and mating in males. Our results show that voles reared in monoparental families received less licking during early life but showed no changes in their development. At adulthood, biparental and monoparental voles show no differences in the detection and discrimination of odors. Also, males and females show an innate preference for sexually relevant odors regardless of the experimental group. We neither found differences in the copulatory behavior in male and female voles. However, biparental males show a contextual reinforcement associated with cohabitation and mating, but monoparental males do not. We found that these differences may be due to increased dopaminergic metabolism in the nucleus accumbens. Finally, we evaluated the effect of being raised by two females, the mother and a female helper, and the effect

of olfactory enrichment with their father's olfactory cues during early life. No changes were found in the animal reared by two females, but females raised in the olfactory enrichment group form a pair bond in 24 h. On the other hand, males reared in the olfactory enrichment group show the opposite effect and prefer the strange female over their sexual partner. As a conclusion, monoparental care affects pair bond formation through the reinforcement of cohabitation and mating in males, but an olfactory learning process seems to be the crucial factor to pair bond in females.

## 5 INTRODUCCIÓN

---

Michael Numan, en su libro *Neurobiology of social Behavior*, establece que: *“Las relaciones sociales humanas incluyen el desarrollo de confianza entre individuos dentro del mismo grupo, la aparición de la cooperación, en que los individuos trabajan juntos para conseguir un objetivo común, y los sentimientos de empatía hacia aquellos que lo necesitan [...] individuos no relacionados forman entre ellos relaciones sociales duraderas, lo que facilita la ocurrencia de empatía, cooperación y altruismo”*.

De esta manera, la formación de vínculos sociales es una característica clave en nuestra especie y nos caracterizamos por formar relaciones duraderas familiares, amistosas o afectivas. Se ha propuesto que la aparición de estas conductas se favoreció por la competencia entre grupos de individuos, lo cual propició la selección de rasgos que incrementasen la eficacia grupal (Lukas y Clutton-Brock 2013; Kappeler y van Schaik, 2002; Numan, 2014). De la misma forma, se ha propuesto que la aparición de nuestras conductas sociales complejas se facilitó por la existencia de una infraestructura neural previa relativa a la formación de vínculos de pareja, que a su vez estaría construida sobre la infraestructura neural de los vínculos maternofiliales (Numan, 2014; Numan y Young, 2016).

Nuestra conducta reproductiva no se reduce a la interacción sexual, sino que las parejas forman vínculos duraderos, cohabitan y se proporcionan apoyo mutuo, incluso en ausencia de la posibilidad de reproducirse (Millers y Rodgers, 2001). De esta manera, en muchas sociedades es habitual que ambos progenitores inviertan en el cuidado de la descendencia, compartan y coordinen la labor y los costes de la crianza de la progenie (Feinberg, 2002). De hecho, incluso en las sociedades que aceptan la poliginia, este no

es el tipo de relación modal, sino que se da únicamente en individuos particularmente ricos (Mulder, 1988).

El vínculo de pareja en nuestra especie es relativamente duradero. Las personas con una pareja afectiva muestran mayor resiliencia ante situaciones estresantes y tienen mejores oportunidades de recuperación después de un evento traumático (Hennessy *et al.*, 2009; Robles y Kiecolt-Glase, 2003; House *et al.*, 1988). Se ha hipotetizado que la formación de vínculos de pareja se favoreció a medida que la necesidad de cuidados de las crías fue incrementando, propiciando el cuidado por ambos progenitores (Washburn y Lancaster, 1968). En cambio, otros investigadores muestran que el cuidado parental puede haber surgido después del establecimiento de estrategias monógamas en mamíferos, que se favorecieron en ambientes con baja densidad de hembras (Lukas y Clutton-Brock, 2013).

La presencia de los progenitores, o cuidadores, en la familia no es únicamente un medio para asegurar la supervivencia de la progenie, sino que los cuidados tempranos conforman nuestras primeras relaciones sociales. De esta manera, gran parte de los aspectos sociales de la vida adulta se aprenden durante la edad temprana. Uno de los primeros estudios al respecto fue realizado por Renè Spitz (1945) que comparó el desarrollo de niños criados en orfanatos con el de niños criados en cárceles de mujeres. Sorprendentemente, eran los niños en orfanatos los que presentaban un síndrome que definió como hospitalismo. Este incluye retrasos en el desarrollo cognitivo, reacciones atípicas a personas extrañas y retrasos en las habilidades motrices y comunicativas. La diferencia clave era que los orfanatos estaban regentados por monjas, que tenían a su cargo a decenas de niños con los cuales interactuaban personal pero no dedicadamente.

En cambio, en la cárcel la madre tenía acceso libre a sus hijos, a los que dedicaban toda su atención (Pero véase Pinneau, 1955). Otros estudios han demostrado que los niños que han pasado largos tiempos de institucionalización muestran problemas de apego, falta de atención, hiperreactividad y retrasos en el desarrollo cognitivo (Rutter *et al.*, 2012) además de una reducción en el volumen amigdalino (Mehta *et al.*, 2009).

De la misma forma, gran parte de las familias se coordinan para asegurar el enriquecimiento social de sus descendientes, un proceso que implica tanto la coordinación de los progenitores, como del resto de individuos familiares e incluso de otros individuos no relacionados sino por vínculos sociales o contractuales. Las unidades familiares formadas por dos individuos, generalmente por la madre y por el padre, se conocen como familias biparentales.

A pesar de la gran necesidad de cuidados parentales que presenta nuestra especie, gran parte de los hogares están compuestos por un solo progenitor, siendo el padre el progenitor ausente en la mayoría de estos casos (US Census Bureau, 2019). Este tipo de unidades familiares se conocen como familias monoparentales. Como consecuencia de la falta de su pareja, las madres que crían solas a sus hijos han de trabajar más horas y se enfrentan a más eventos estresantes, lo que afecta su relación con sus hijos (Weinraub y Wolf, 1983). Además, la presencia reducida de uno de los progenitores resulta en la reducción de los años de escolaridad de los hijos, mayor riesgo de embarazo durante la adolescencia y mayor riesgo de problemas en el comportamiento o psicológicos (Fitzgerald y Beller 1988; Ellis *et al.*, 2003; Sarkadi *et al.*, 2007). Estas consecuencias se agravan en familias de nivel socioeconómico bajo, minorías en riesgo de exclusión social o personas residentes en países en vías de desarrollo (Brady y

Burroway, 2012; McLanahan, 1983). Esto es probablemente debido a la dificultad de compensar la falta de cuidados con cuidadores adicionales o conciliación laboral.

Estas diferencias en las familias monoparentales parecen relacionadas con la mayor exposición a eventos estresantes en la familia, la peor situación económica y el menor tiempo disponible para interactuar con los hijos (Weinraub y Wolf, 1983). Además, esta situación depende de la ausencia de cualquiera de los dos progenitores, puesto que los hijos de familias homoparentales, compuestas por dos hombres o por dos mujeres, no muestran tales cambios en el comportamiento (Allen y Burrell, 1996; Crowl *et al.*, 2008).

De esta manera, estudiar las bases neurobiológicas de la formación de vínculos de pareja y los efectos de la disminución de cuidados parentales en la infancia es crucial para comprender aspectos clave de nuestra especie.

Estudiar estos mecanismos es complicado en seres humanos, sin embargo, el uso de modelos animales con estrategias reproductivas similares nos permite aproximarnos a la comprensión de los sustratos neurobiológicos subyacentes a estas conductas sociales. Además, el uso de los modelos animales permite disociar los componentes sociales de los biológicos, permitiéndonos aproximarnos a la comprensión del problema de manera más precisa. En el presente proyecto investigaremos los efectos de la ausencia de cuidados paternos en los topillos de la pradera, *Microtus ochrogaster*, una especie de roedores que presenta tanto vínculos de pareja como cuidado biparental de las crías.

A pesar de que en la especie humana existan familias en las cuales el padre es el único progenitor presente, esta condición es más complicada de estudiar en modelos animales de mamíferos puesto que el padre es incapaz de producir leche para alimentar a las crías. Además, las familias monoparentales cuidadas por una mujer son de dos a cuatro

veces más frecuentes que aquellas en las que el cuidador es un hombre [US Census bureau, 2019; Encuesta continuada de hogares (España,2018)]. Por estas razones, si bien es una pregunta interesante, en el presente estudio no evaluaremos los efectos de la ausencia de la madre en nuestro modelo animal.

## 6 ANTECEDENTES

---

### 6.1 *MICROTUS OCHROGASTER*: LOS TOPILLOS DE LA PRADERA.<sup>1</sup>

Los topillos de la pradera, *Microtus ochrogaster*, son una especie de roedores de la familia *Cricetidae*, a la que también pertenecen los hámsteres. Esta especie habita las praderas y pastizales de la mitad superior de Estados Unidos (Hall y Kelson, 1959). Son animales de color marrón-grisáceo en la parte dorsal y leonado-canela en la parte ventral. Su peso oscila entre 40 y 55 gr y miden de 14 a 16 cm de longitud en la edad adulta (Jameson, 1946; Gier y Cooksey, 1967). Presentan además una cola corta (2-4 cm) y pequeñas orejas, de donde proviene el nombre del género, figura 1.

Habitan en madrigueras y túneles que construyen bajo tierra donde almacenan alimento, se cobijan y cuidan de sus crías (Gier y Cooksey, 1967; Jameson, 1946). Los topillos de la pradera se alimentan principalmente de hierbas verdes y suculentas, especialmente alfalfa y gramíneas, pero también pueden alimentarse de tallos y pequeñas semillas. De esta forma, su dieta se compone de gramíneas, leguminosas, solanáceas, boragináceas, caprifoliáceas y asteráceas (Jameson, 1946). Además, utilizan estas plantas para fabricar sus nidos bajo tierra, donde almacenan la comida que recolectan.

1. Parte de la información de la presente sección sobre las generalidades del topillo de la pradera fue utilizada por el autor de la tesis para redactar el artículo en la Wikipedia en español sobre los topillos de la pradera y contribuir así con el conocimiento libre y accesible (*Microtus ochrogaster*, Wikipedia en español). Al ser añadida a Wikipedia pasa a ser de dominio público y ha de ser reconocido y citado adecuadamente. El redactor de gran parte del artículo es el autor de la presente tesis, utilizando las fuentes primarias contenidas en esta tesis doctoral.

Los topillos de la pradera viven en ambientes con baja densidad de alimento. Además, las herbáceas escasean durante el invierno, lo que reduce drásticamente la población. De esta forma, la densidad poblacional de los topillos de la pradera es altamente variable y presenta fluctuaciones drásticas, pudiendo variar desde unos pocos individuos a más de 600 por hectárea (Getz *et al.*, 1987; Getz, 1978).



Figura 1. Fotografía de una familia de topillos de la pradera. El macho (izquierda) y la hembra (derecha) con sus crías. En esta especie las crías permanecen asidas a los pezones de la madre, que las tiene que separar para poder desplazarse. Fotografía de Rebeca Cortés Sánchez.

Las madrigueras de los topillos suelen encontrarse de 5 a 10 cm bajo el suelo y presentan multitud de túneles de unos 4-5 cm de diámetro. Los topillos suelen vivir en nidos

formando grupos sociales durante la primavera y el verano, únicamente en un 37 % de los nidos estos son ocupados por una hembra adulta, que puede estar acompañada de sus crías. El 36% de los grupos está constituido por una pareja de un macho y una hembra, el 27% restante está constituido por grupos comunales de individuos familiares y extra-familiares (Getz y Carter, 1996) donde solo suele haber solo una pareja reproductivamente activa. Alrededor del 30 % de los juveniles se dispersan del nido (Getz y Carter, 1996; Getz *et al.*, 1994), lo cual ocurre cuando los sujetos tienen al menos 20-30 días de edad, aunque es más común a los 40-55 días de edad (Getz *et al.*, 1994). Algunos topillos de la pradera no forman parte de grupos sociales en la edad adulta. De esta manera, muchos machos son solitarios, aunque visitan frecuentemente otros nidos, por lo que son conocidos como nómadas. Los nómadas podrían representar hasta el 50% de la población de machos (Getz y Carter, 1996). Las hembras solitarias suelen formar su propio nido y eventualmente pueden establecerse con un macho o en un grupo familiar. La composición de los grupos familiares cambia durante el año. Durante la primavera y hasta el principio del otoño la composición es similar a la descrita previamente, pero durante el otoño-invierno el 69 % de los grupos son comunales, el 24% lo forma una pareja sexual y únicamente el 7 % están formadas por una hembra aislada (Getz *et al.*, 1993; Getz y Carter, 1996). Además, la movilidad entre nidos se reduce drásticamente durante el invierno. Esta especie presenta la particularidad de tener una estrategia reproductiva de monogamia social. Esto es, los individuos forman un vínculo de pareja después de 24 h de cohabitación, aunque puede acelerarse si copulan por 6 h (Williams *et al.*, 1992; Ahern y Young, 2009), como se explicará a detalle en la sección 4.3.1. La época de reproducción de los topillos es durante el otoño y la primavera, aunque pueden reproducirse durante todo el año. Suelen tener entre 2 y 8

crías, siendo habituales las camadas de 3-4 crías. En condiciones de laboratorio pueden tener camadas consecutivas durante todo el año. La primera camada nace unos 21 días después de la cópula, con aproximadamente  $4\pm 1$  crías de unos 3.5 gr de peso y 40-45 mm de longitud. A partir del nacimiento ganan aproximadamente 1 gr por día hasta los 35 días y siguen ganando peso a menor ritmo a partir de ese momento (Gier y Cooksey, 1967).

En los primeros días de vida los topillos se encuentran adheridos al pezón de su madre la mayor parte del tiempo. Entre los 5 y los 10 días de edad las crías abren los ojos y comienzan a separarse de la madre y son capaces de moverse entre los 10 y los 14 días de edad. Las crías pueden sobrevivir si son destetadas a partir de los 16 días de edad, aunque es habitual el destete a los 21 días (Gier y Cooksey, 1967). A pesar de ello, en el laboratorio es recomendable destetarlas antes de la próxima camada para evitar la competencia con las crías concebidas durante el estro postparto. La mortalidad de las crías ronda generalmente el 5-10%, pero puede alcanzar el 20-40% (Gier y Cooksey, 1967).

Los machos son sexualmente maduros a los 42-45 días de edad y las hembras a los 34-40 días. Durante las épocas no reproductivas los machos tienen los testículos escondidos en el vientre, pero estos descienden durante la época de cópula. Durante la temporada reproductiva, los machos orinan frecuentemente para marcar el territorio, de forma que las hembras pueden detectar su presencia, facilitando su activación reproductiva. Los machos son sensibles también a la presencia de otros machos y se ha propuesto que algún factor feromonal<sup>2</sup> inhibe su reproducción en los grupos comunales (Batzly *et al.*,

<sup>2</sup> Feromonal es un adjetivo presente en textos de ámbito científico, pero ausente en el diccionario. Su significado es, como adjetivo derivado de feromona, "Que actúa como feromona"

1977). Esto se hace patente en el caso de machos aislados socialmente, los cuales incrementan su eficacia reproductiva (Perry *et al.*, 2016). Los procesos reproductivos en las hembras están socialmente regulados. De esta forma, no presentan un ciclo estral sino que requieren de estimulación por parte de un macho para entrar en receptividad sexual (Carter *et al.*, 1987). Las hembras olfatean los genitales de machos no familiares para entrar en estro y evitan activamente olfatear a machos familiares, lo que podría desencadenar el estro en una situación no propicia para la reproducción (Carter *et al.*, 1980). En condiciones naturales las hembras comienzan a copular aproximadamente 2 a 5 días después del contacto con el macho. Las hembras reproductivamente activas inhiben la reproducción de otros topillos hembra, de forma que estas requieren de mayor estimulación olfativa para entrar en estro (Batzli *et al.*, 1977; Getz *et al.*, 1983). En los grupos familiares y comunales es habitual que todos los miembros cuiden de las camadas de la pareja reproductiva. Esto se conoce como cuidado parental en el caso de los padres y cuidado aloparental en el caso de los individuos que no son progenitores. La madre es muy cuidadosa con las crías, las cubre, alimenta, limpia y acicala constantemente. Las hembras presentan tres pares de pezones, dos abdominales y uno pectoral. Las crías se agarran fuertemente a los pezones de la madre ya que nacen con incisivos inferiores y los superiores aparecen en unas 24 h (Salo *et al.*, 1994). Este aferramiento se incrementa ante la presencia de cualquier peligro o, en el laboratorio, por cualquier manipulación (Mcguire, 2001; Salo *et al.*, 1994, Gier y Cooksey, 1967). De esta manera, la madre es capaz de desplazarse con las crías y es difícil separarlos sin dañarlos o estresarlos. De hecho, como hemos observado en nuestro laboratorio, la madre debe separar a las crías para abandonar el nido, lo que requiere cierto esfuerzo por su parte.

El macho es también altamente cuidadoso y protector con las crías. Ambos progenitores coordinan el cuidado de la camada para evitar dejar el nido desatendido (Ahern *et al.*, 2011). De esta forma, esta especie presenta cuidados biparentales, asegurando una alta inversión en las crías por parte de ambos progenitores.

## **6.2 LA MONOGAMIA SOCIAL.**

Como se ha mencionado, los topillos de la pradera presentan una estrategia reproductiva de monogamia social. Aunque coloquialmente se entiende como una forma de relación con una pareja sexual, la monogamia social no puede ser vista de forma aislada, sino como parte del sistema reproductivo de la especie. Así pues, la formación de vínculos de pareja va ligada a otros aspectos reproductivos como el cuidado biparental de las crías (Kleiman, 1977).

De acuerdo con Carter *et al.* (1995), la monogamia social se define por los siguientes rasgos, todos presentes en los topillos de la pradera:

- Agresión selectiva y protección reproductiva de la pareja.
- Territorio compartido con la pareja reproductiva.
- Cuidado biparental y, ocasionalmente, aloparental.
- Procesos reproductivos socialmente regulados.
- Evitación del incesto y supresión reproductiva

Este tipo de monogamia se da en aproximadamente un 3-9 % de las especies de mamíferos, aunque es común en familias como los cánidos o en otras clases de vertebrados como las aves (Mock y Fujioka, 1990; Lukas y Clutton-Brock, 2013). Se ha propuesto que la monogamia puede resultar ventajosa en ambientes con baja

concentración poblacional y alta competencia por los recursos (Lukas y Clutton-Brock, 2013, 2014). La monogamia, y posteriormente el cuidado biparental, podrían haber evolucionado en ambientes de baja concentración de individuos para asegurar la descendencia (Lukas y Clutton-Brock, 2013, 2014). De esta forma, tanto la formación de un vínculo de pareja como el anidamiento conjunto aseguran la inversión de ambos progenitores en el cuidado de la descendencia e incrementan la eficacia biológica en especies monógamas (Ophir *et al.*, 2008). Es importante no confundir la monogamia social con la monogamia sexual o genética. En el caso de la monogamia genética hay exclusividad reproductiva, mientras que los monógamos sociales pueden ocasionalmente copular con otros conspecíficos, pero tienen una relación de exclusividad social con la pareja.

En comparación con los mamíferos, la gran mayoría de las aves presentan sistemas monógamos de reproducción. Esto parece deberse a la ausencia de órganos sexuales específicos para la alimentación de las crías. Así pues, los machos pueden alimentar y cuidar de las desvalidas crías, por lo que se hipotetiza que las ventajas de no responsabilizarse de las crías e invertir en conseguir otra pareja reproductiva no superarían las ventajas de invertir en las crías para asegurar su supervivencia (Mock y Fujioka, 1990).

### **6.3 FORMACIÓN DE VÍNCULOS DE PAREJA**

Un aspecto central de los monógamos sociales es la formación de un vínculo de pareja. Este ha sido definido por Michael Numan (2014) como: *“La formación de una atracción selectiva y duradera entre dos individuos adultos específicos que se reconocen y permanecen juntos después de que la actividad sexual se ha consumado”*. Como se

mencionó previamente, el vínculo de pareja en los topillos de la pradera se presenta después de unas 24 h de cohabitación, pero se acelera si los animales copulan y puede observarse desde las 6 h de cohabitación (Williams *et al.*, 1992; Ahern y Young, 2009). Durante este periodo, la hembra y el macho se olisquean, investigan los genitales de la contraparte y eventualmente copulan. Posteriormente se acurrucan juntos y se establecen en un nido conjunto.

Se define que una pareja ha formado un vínculo si los individuos prefieren la compañía de la pareja a la de un conspecífico extraño del sexo opuesto de características similares a la misma (Williams *et al.*, 1992). La formación del vínculo de pareja requiere de la formación de una memoria de la pareja, la atracción selectiva por la pareja, así como un rechazo por el resto de los conspecíficos. Una vez establecido el vínculo, los topillos de la pradera agreden selectivamente a congéneres extraños que se acerquen al nido, lo que se conoce como la fase de mantenimiento del vínculo de pareja (Numan, 2014; Numan y Young, 2016). Se ha reportado que si los individuos se separan de su pareja muestran un incremento en las conductas asociadas a la ansiedad, pero estas se revierten si se reencuentran. Por otro lado, si uno de los individuos es expuesto a un evento estresante, el reencuentro con su pareja reduce sus niveles de estrés y ansiedad. Además, la pareja incrementa notablemente las conductas de acicalamiento hacia el consorte estresado, lo que puede interpretarse como una conducta que busca consolar y aliviar el estrés de la pareja (Sun *et al.*, 2014; revisado por Lieberwirth y Wang, 2016). Si los individuos son separados, a diferencia de los seres humanos, no suelen volver a formar un vínculo de pareja, aunque es posible que se reproduzcan nuevamente (Carter y Getz, 1993). Además, como se explicará en la sección 4.4.1, la separación de los

progenitores y la consecuente privación parental resulta en cambios en el comportamiento de las crías.

En las siguientes secciones explicaremos el papel de la cópula en la formación del vínculo de pareja, la función de los estímulos olfatorios y finalmente se mencionará como ambos estímulos interactúan para dar lugar a la formación del vínculo de pareja.

### **6.3.1 La cópula en la formación de vínculos de pareja**

Las hembras de la mayoría de los roedores presentan un ciclo estral, de forma que aproximadamente cada cuatro días están receptivas sexualmente, es decir, en fase de estrus. En cambio, las hembras de los topillos de la pradera no presentan un ciclo estral, sino que la receptividad sexual es desencadenada por la exposición a los estímulos olfativos del macho mediante el olisqueo anogenital y la consecuente exposición a sus señales feromonales (Carter *et al.*, 1987).

Durante la cópula, el macho y la hembra se olfatean la región anogenital y eventualmente la hembra permite la monta, en la que no hay intromisión penénea. Posteriormente, las montas acaban resultando en intromisiones, en las que el macho realiza movimientos pélvicos rápidos y entromete el pene en la vagina de la hembra. La hembra, en caso de estar receptiva sexualmente, responde de forma refleja con la postura de lordosis, la cual consiste en arquear la espalda y permitir la intromisión (Ulloa *et al.*, 2018). Después de algunas intromisiones se produce la eyaculación, tras la cual ambos se separan y acicalan.

La cópula acelera la formación del vínculo de pareja, las hembras que cohabitan durante 6 h forman un vínculo con el macho si copulan durante este periodo (Williams *et al.*, 1992). En los machos, la cópula durante 6 horas facilita la aparición de agresión selectiva

hacía individuos diferentes a la pareja (Winslow *et al.*, 1993). Se desconoce si 6 h de cohabitación con cópula son suficientes para que los machos formen una atracción por la hembra, aunque el rechazo hacia otras hembras es una parte necesaria de este proceso.

### **6.3.2 El sistema olfativo en la formación del vínculo de pareja**

Como casi todos los roedores, los topillos son animales macrosmáticos y mediante las señales olfativas son capaces de distinguir entre individuos (Zheng *et al.*, 2013; Tang-Martínez y Bixler, 2009), reconocer a sus propias crías (Philips y Tang-Martínez, 1998), a su pareja (Ahern y Young, 2009), de percibir el estado reproductivo de un conspecífico (Taylor y Dewsbury, 1988), la presencia de depredadores y de encontrar alimento.

A rasgos generales, los topillos detectan las señales olfativas volátiles principalmente a través del epitelio olfatorio, cuya información se procesa en el bulbo olfatorio principal. Por otro lado, las señales químicas no volátiles son detectadas principalmente mediante el contacto directo y son procesadas por el órgano vomeronasal, cuya información se procesa a través del bulbo olfatorio accesorio.

El órgano vomeronasal se encuentra en la cavidad nasal y procesa principalmente señales de tipo feromonal. Las feromonas son señales químicas generalmente no volátiles que constituyen una forma de comunicación intraespecífica. Por definición, las feromonas generan respuestas innatas en los roedores, aunque dicha respuesta puede cambiar según algunos factores, como el estado reproductivo o la experiencia sexual (Martin-Sánchez *et al.*, 2015). Por ejemplo, las hembras de ratón sexualmente vírgenes presentan una atracción innata por las secreciones urinarias del sexo opuesto, pero en el periodo posparto temprano estas secreciones urinarias pueden desencadenar la

agresión maternal o defensa del nido. En ambos casos, las respuestas son innatas y no requieren de aprendizaje, pero se modulan por el estado reproductivo de la hembra (Martin-Sánchez *et al.*, 2015).

Aunque no se han identificado feromonas en los topillos de la pradera, su existencia se presume por la capacidad de las secreciones de generar respuestas innatas. Así pues, se ha reportado que alguna señal química: a) induce la receptividad sexual y la activación reproductiva en las hembras (Carter *et al.*, 1987; Carter *et al.*, 1980); b) inhibe la inducción de receptividad en otras hembras (Getz *et al.*, 1987), c) inhibe el crecimiento y maduración sexual de otros machos (Perry *et al.*, 2016; Mateo *et al.*, 1994) y d) acelera la maduración sexual de juveniles (Hasler y Nalbandov, 1974).

Los topillos de la pradera pueden distinguir entre individuos e identificar su estado reproductivo mediante sus señales olfatorias (Zheng *et al.*, 2013; Tang-Martínez y Bixler, 2009; Taylor y Dewsbury, 1988). Además, lesiones de los bulbos olfatorios disminuyen las conductas copulatorias y previenen la formación del vínculo de pareja en machos (Kirkpatrick *et al.*, 1994). En hembras estas lesiones inhiben la receptividad sexual (Horton y Shepherd, 1979). Particularmente, lesiones del órgano vomeronasal disminuyen el tiempo en que los machos olfatean a las hembras sexualmente receptivas y pocos de estos machos tienen camadas (Wekesa y Lepri, 1994). Además, hembras con lesiones similares no presentan estró y menos de la mitad copulan. Sin embargo, copulan si se les induce el estró con la administración de estradiol, pero siguen sin formar un vínculo de pareja (Curtis y Wang, 2001; Lepri y Wysocki, 1987).

De esta forma, el sistema olfatorio es necesario para múltiples aspectos involucrados en la formación del vínculo de pareja. Es requerido para la inducción del estró, la iniciación

y consumación de la cópula, la identificación de la pareja reproductiva como un individuo particular, la atracción por la pareja y para el rechazo de otros conspecíficos del sexo opuesto.

### 6.3.3 Circuito neurobiológico de la formación del vínculo de pareja.

Michael Numan (2015) ha propuesto que el circuito del vínculo maternal fue el sustrato neurobiológico para la evolución del circuito del vínculo de pareja. Según el modelo representado en la figura 2, las señales olfativas de la pareja son detectadas principalmente por el bulbo olfatorio, cuya información es procesada por la amígdala (Am). Simultáneamente, la cópula activa el área preóptica medial (MPOA), que a su vez estimula tanto el núcleo paraventricular como el área ventral tegmental (NPV y AVT, respectivamente). En respuesta, el NPV libera oxitocina tanto en la Am como en el Núcleo accumbens (NA) y el AVT libera dopamina en el NA.

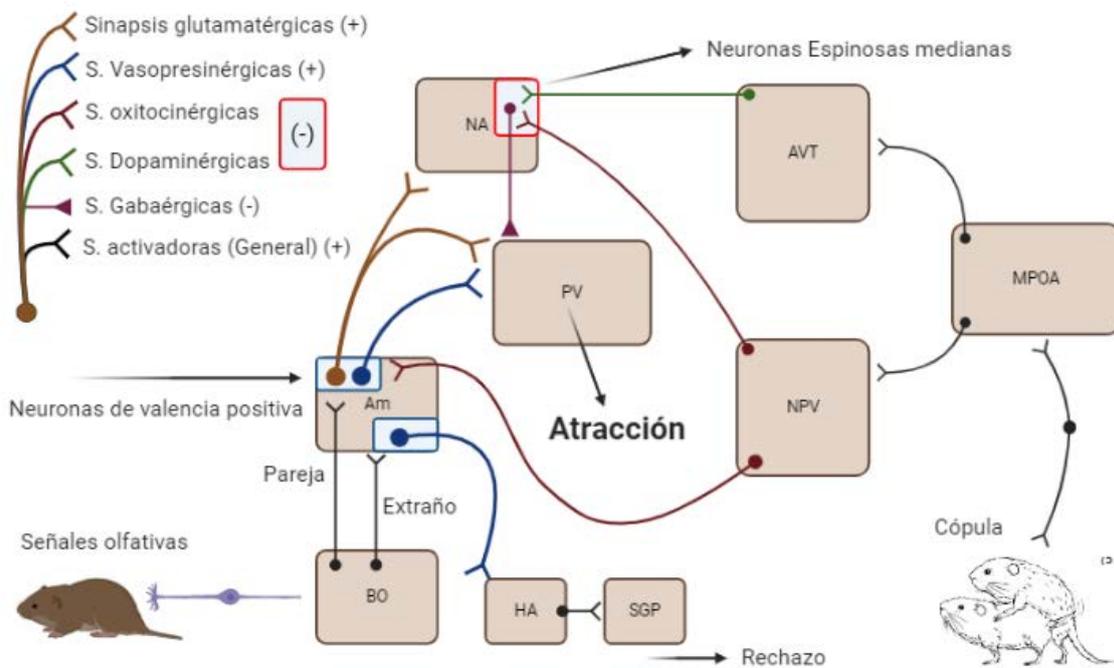


Figura 2. Circuito neurobiológico propuesto para la formación del vínculo de pareja en el topillo de la pradera. Las señales olfatorias de la pareja se asocian con la cópula en el circuito de reforzamiento. Por un lado, las señales de la pareja son detectadas por los bulbos olfatorios (BO), cuya información es procesada en la amígdala (Am) por neuronas de valencia positiva (neuronas que por definición responden a estímulos de valor positivo para el animal). Estas mandan proyecciones glutamatérgicas al núcleo accumbens (NA) y al pálido ventral (PV), que recibe también proyecciones vasopresinérgicas. Por otro lado, la cópula resulta en la activación del área preóptica medial (MPOA), que envía proyecciones tanto al área ventral tegmental (AVT) como al núcleo para ventricular (NPV). Así, el NA recibe proyecciones dopaminérgicas del AVT y oxitocinérgicas del NPV. La acción conjunta de las sinapsis dopaminérgicas y oxitocinérgicas sobre el NA tiene un efecto inhibitorio. En NA inhibe tónicamente al PV, que recibe sinapsis de la amígdala, la cual procesa las señales de la pareja. La inhibición del NA desinhibe al PV lo que permite que sea activado por las señales de la pareja. Numan y Young proponen que, una vez formado el vínculo de pareja, las sinapsis procedentes de la amígdala se fortalecen, probablemente a través del incremento en el número y la ramificación de las sinapsis/dendritas, y son capaces de activar el PV incluso si este se encuentra inhibido por la ausencia de cópula. La Am procesa las señales de los topillos extraños como aversivas a través de proyecciones vasopresinérgicas al hipotálamo anterior (HA), que desencadenarían respuestas estereotipadas a través de la sustancia gris periacueductal (SGP). + sinapsis activadoras, - sinapsis inhibitorias. Neuronas de valencia positiva, categoría arbitraria para designar neuronas que, por definición, procesan información de valor positivo para el animal. Adaptado de Numan, 2014.

En la Am, las señales olfatorias de la pareja son procesadas por neuronas de valencia positiva, es decir, que procesan información con un valor positivo para el animal. Esto genera el recuerdo específico y positivo de la pareja. Estas neuronas amigdalinas tienen proyecciones glutamatérgicas al NA desde la división basomedial/basolateral de la Am y tanto glutamatérgicas como vasopresinérgicas al pálido ventral (PV) desde la división medial de la misma (Numan, 2014; Numan y Young, 2016; Lim y Young, 2004).

Como se mencionaba previamente, durante la cópula se libera tanto oxitocina como dopamina en el NA desde el NPV y el AVT. La interacción de ambos neurotransmisores tiene una acción inhibitoria. El NA inhibe tónicamente el PV, pero la liberación de oxitocina/dopamina desinhibe al PV y permite que las señales provenientes de la Am sean capaces de activar el PV. El modelo propone que estas sinapsis se fortalecerán

durante la formación de vínculo (Véase Numan, 2014), de tal manera que las señales olfativas serían capaces de activar el PV incluso si este no se encuentra desinhibido por la cópula. El modelo propone que las sinapsis del circuito bulbo olfatorio-Am-PV pueden fortalecerse incluso en ausencia de cópula, sin embargo, sería necesaria más interacción para que esto ocurra. De esta forma, se puede formar un vínculo de pareja en ausencia de cópula, pero este proceso es más lento. Por otro lado, durante la formación del vínculo de pareja se facilitaría la expresión de conductas de agresión o rechazo ante individuos extraños (Numan, 2014).

A modo de resumen, las señales olfativas de la pareja se procesan en la Am, que a su vez activa el PV. La cópula inhibe al NA gracias a la interacción de oxitocina y dopamina. El NA inhibido deja de inhibir al PV, lo que permite que las proyecciones amigdalinas lo activen generando la atracción por la pareja sexual.

A diferencia de otros cricétidos no monógamos como *Microtus pennsylvanicus*, los topillos de la pradera presentan una alta densidad de receptores a oxitocina en el NA y de receptores a vasopresina V1a en el PV. De hecho, se ha demostrado que si se expresa el gen de V1a de los topillos de la pradera en el PV de *Microtus pennsylvanicus* estos forman vínculos de pareja como el topillo de la pradera (Lim *et al.*, 2004). En el modelo, esto facilitaría la activación del PV a través de las vías amigdalinas.

Así pues, se propone que las señales específicas de la pareja son capaces de activar el circuito de recompensa a través de las vías amigdalinas cuando se ha formado el vínculo de pareja, proceso facilitado por la desinhibición de los circuitos de recompensa inducidos por la cópula.

### **6.3.3.1 El estriado ventral, la dopamina y la formación del vínculo de pareja.**

La dopamina es una catecolamina que se produce y libera en diversas áreas del cerebro. La vía de proyección del AVT hacia el estriado se conoce como vía mesolímbica. El estriado se puede dividir en la parte dorsal, la cual está principalmente implicada en el control motor, incluyendo el control motor de diversas conductas motivadas como la cópula, y la división ventral, que está principalmente implicada en la recompensa de las conductas motivadas (Voorn *et al.*, 2004). El estriado ventral se conoce como NA, el cual tiene varias divisiones funcionales finas (Resendez *et al.*, 2012). El NA está implicado en el reforzamiento de las conductas motivadas y los aspectos apetitivos de dichas conductas, es decir, de las conductas dirigidas hacia un fin (Goto y Grace, 2005; Carelli, 2004). Dentro de estas se engloban tanto la conducta sexual como la parental (Stolzenberg y Numan, 2011).

La dopamina activa dos tipos de receptores, D1 y D2, mostrando alta afinidad por los receptores D2 y baja por los receptores D1. La dopamina se libera en el NA de los topillos de la paradera macho durante la cópula (Aragona *et al.*, 2003). La administración de antagonistas de los receptores D2 inhibe la formación del vínculo de pareja, pero no la administración de antagonistas D1. Por otro lado, la administración de agonistas de D2 facilita la formación del vínculo de pareja, mientras que la administración de agonistas D1 no tiene efecto facilitador (Aragona *et al.*, 2006).

La acción de la dopamina y la oxitocina en el NA es sinérgica. Liu y Wang (2003) demostraron que tanto la administración de agonistas de oxitocina como de los receptores D2 aceleraban la formación del vínculo de pareja, interesantemente la administración del antagonista cruzado (oxitocina + antagonista a D2 o agonista D2 +

antagonista a oxitocina) inhibe la facilitación del vínculo de pareja, mostrando que la acción de ambos es sinérgica e interdependiente.

Los receptores a oxitocina se localizan en las terminales postsinápticas en el NA. Además, se ha reportado que la oxitocina puede formar heterodímeros con el receptor D2 en las células del NA, lo que permite una acción inhibitoria conjunta (Romero-Fernández *et al.*, 2013). Sin embargo, no se conoce si los receptores a oxitocina se encuentran en las mismas neuronas medianas espinosas que poseen receptores D2 y sigue siendo posible que actúen a través de la inhibición de los receptores D1 (Numan, 2014).

De esta forma, la dopamina ejerce una acción inhibitoria sobre las neuronas medianas espinosas que inhiben al PV, por lo que su acción resulta en la activación de esta estructura encefálica. La oxitocina podría potenciar esta acción a través de heterodímeros con la dopamina o, por otro lado, inhibir la acción de los receptores D1 a través de interneuronas inhibitorias. Se ha reportado que las variaciones en la concentración de receptores a oxitocina correlacionan con la formación de vínculos de pareja en individuos aislados en la etapa neonatal (Barret *et al.*, 2015). Sin embargo, no se han descrito cambios en la secreción dopaminérgica después de la cohabitación con cópula que puedan relacionarse con la formación diferencial del vínculo de pareja en topillos de la pradera. De esta forma, en el presente proyecto evaluaremos los niveles de dopamina y sus metabolitos después de la cohabitación y cópula.

Por otro lado, la serotonina también juega un papel importante en las conductas motivadas. Por ejemplo, la administración de fluoxetina, que incrementa la serotonina disponible al inhibir su recaptura, aumenta la latencia del inicio de la conducta parental

en los topillos de la pradera (Villalba *et al.*, 1997). Además, la serotonina puede afectar a la liberación de DA (Yadid *et al.*, 1994; Zhou *et al.*, 2005). En ratones, por otro lado, la oxitocina y la serotonina interactúan en el NA para promover la recompensa de las interacciones sociales (Dolen *et al.*, 2013). De esta manera, es posible que la serotonina en el estriado tenga un papel relevante en la formación del vínculo de pareja.

#### **6.4 LOS CUIDADOS PARENTALES**

Los cuidados parentales son definidos por Numan e Insel (2003) como *“cualquier conducta de un miembro de una especie hacia un individuo reproductivamente inmaduro que incrementa las posibilidades de que el receptor sobreviva hasta la madurez”*. Por lo que los cuidados parentales incrementan la eficacia biológica al incrementar las posibilidades de supervivencia de la descendencia. El cuidado parental se suele dividir en dos grandes tipos de conductas, dependiendo si están o no directamente dirigidas a las crías. Dentro de las conductas dirigidas a las crías encontramos la recogida de las crías y su agrupamiento en el nido, la cobertura con el cuerpo con la postura arqueada, lo que evita la pérdida de calor de las crías poiquilotérmicas y permite su alimentación, y el acicalamiento. Al acicalar a las crías los progenitores limpian cuidadosamente a las mismas, prestando especial atención a la zona anogenital. Esta última conducta es crucial para los movimientos gastrointestinales ya que los recién nacidos son incapaces de miccionar si no son acicalados revisión en (Mguire 2014). Las conductas no dirigidas a las crías engloban la construcción del nido y la defensa de este ante individuos extraños de la misma especie u otros intrusos, pero también otras conductas como la ingesta de placenta o la disminución del estrés y la ansiedad (Pryce *et al.*, 2001; Stern 1996).

Los cuidados parentales han sido especialmente estudiados en otros roedores como la rata y el ratón. En estas especies se ha demostrado que el cuidado de las crías no es una mera inversión para su supervivencia inmediata, sino que constituye una importante relación social que genera cambios en su conducta adulta, siendo particularmente importante el acicalamiento o limpieza (Champagne *et al.*, 2001; Champagne, 2011; Champagne *et al.*, 2003; Pedersen *et al.*, 2011). De esta forma, el acicalamiento asegura una retroalimentación adecuada para la regulación del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal durante la infancia (Meaney, 2001). Además, las crías de rata que reciben más estimulación en forma de acicalamiento presentan niveles más bajos de estrés o miedo en la edad adulta y presentan concentraciones bajas de hormonas relacionadas con el estrés y la ansiedad (Caldji *et al.*, 1998; Francis *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 1997; Pedersen *et al.*, 2011; Meaney, 2001).

Además, la conducta maternal modula en las crías el despliegue de esta misma conducta cuando son adultas, lo que se conoce como la transmisión no-genómica de la conducta maternal. De esta forma, si las crías reciben más acicalamiento, cuando son adultas realizan también más acicalamiento a su propia descendencia (Champagne, 2011; Fleming *et al.*, 2002; Perkeybile y Bales, 2017). La influencia de los padres en el desarrollo de la descendencia incluye cambios en la ansiedad y el estrés, los comportamientos sociales, sexuales y maternales, además de cambios en la dispersión del nido y la agresividad (Champagne, 2011).

En el caso de los topillos de la pradera, el padre presenta el mismo repertorio de comportamientos que presenta la madre, con la excepción de que no puede amamantarlas, aunque las cubre igualmente. El padre y la madre se coordinan para

asegurar que las crías reciban cuidados en todo momento (Ahern y Young, 2009). De esta forma, si uno de los miembros abandona el nido el otro lo sustituye. Algunos individuos incluso acompañan a su pareja hacia el nido para que les reemplace antes de irse a explorar o comer (Observación y comunicación personal con James Burkett). En la primera camada el padre presenta menos acicalamiento que la madre, sin embargo lo incrementa en las camadas subsecuentes (Rogers *et al.*, 2018).

Las conductas sociales de los topillos de la pradera presentan gran variabilidad interindividual. Por ejemplo, algunos topillos realizan más cuidados parentales que otros conspecíficos, incluso si han sido criados en el mismo ambiente. Aprovechando esta situación, algunos experimentos han dividido a los topillos en subgrupos según la cantidad de cuidado parental que recibieron en la infancia debida a la variabilidad interindividual de sus progenitores.

Aquellos que recibieron menos cuidados parentales mostraron también menor investigación hacia individuos juveniles y menos contacto con crías desconocidas, a pesar de ser criados en familias biparentales (Perkeybile *et al.*, 2013). De esta manera, los topillos de la pradera representan un ejemplo de alta inversión en las crías ya que ambos progenitores se dedican a cuidar de la descendencia. Además, el cuidado parental modula las conductas propias de la especie (Ahern y Young, 2009), como será discutido en la siguiente sección.

#### **6.4.1 Efectos de los cuidados parentales en los topillos de la pradera**

Los topillos criados en familias monoparentales muestran, en condiciones de laboratorio, cambios en su comportamiento en la edad adulta en comparación con los criados en familias biparentales. Así pues, los topillos que han sido criados en familias

monoparentales pesan menos en el destete, tienen un retraso en la formación del vínculo de pareja y realizan menos acicalamiento a crías propias y ajenas (Ahern y Young 2009; Ahern *et al.*, 2011).

Por otro lado, como se mencionó previamente, los topillos criados en familias biparentales requieren de aproximadamente 24 h de cohabitación sin cópula o 6 h de cohabitación con cópula para formar el vínculo de pareja. Sin embargo, la privación de cuidados paternos en la infancia puede cambiar drásticamente esta conducta. Ahern y Young (2009) demostraron que machos y hembras criados en familias monoparentales no muestran una preferencia por su pareja sexual después de cohabitar por 24 h con la misma en comparación con un individuo extraño del sexo opuesto. Así pues, requieren hasta de una semana de cohabitación para mostrar preferencia por la pareja sexual. De esta forma, el vínculo de pareja se forma en topillos monoparentales en algún momento entre los dos y los siete días de cohabitación. Es importante mencionar que en este experimento las hembras no estaban sexualmente receptivas al inicio de la cohabitación. Así pues, después de 24 h de cohabitación, solo aproximadamente un 10 % de los animales habían copulado, tras 48 h, aproximadamente el 75 % de los animales lo habían hecho, pero únicamente los biparentales formaron el vínculo de pareja. Cabe mencionar también que en este experimento no se evaluó la copula en sí misma, sino que los investigadores solo reportaron enrojecimiento y apertura de la vagina de las hembras durante la cohabitación como una medida indirecta de la cópula.

Por otro lado, un estudio reciente demostró que la crianza por la madre junto a una hermana mayor ayudante es capaz de revertir el efecto de la ausencia del padre en la

formación del vínculo en las crías hembras, pero no en los machos (Rogers y Bales, 2019). Es importante destacar que las hembras ayudantes realizaban más cuidados que los padres y, además, las madres eran multíparas por lo que proporcionaron altos niveles de cuidados maternos (Stone *et al.*, 2010; Wang y Novak, 1994; Rogers *et al.*, 2018).

Por otro lado, la disminución de los cuidados posnatales mediante el aislamiento de las crías durante 3 h diarias resulta en un retraso en la formación de vínculos de pareja en las hembras cuando son adultas (Barret *et al.*, 2015). En este estudio propusieron que el protocolo de aislamiento afectaría también la concentración de receptores a oxitocina en el NA. Sin embargo, observaron que el aislamiento no afecta la distribución de estos receptores, pero aquellas hembras aisladas con mayor concentración de receptores a oxitocina eran más resilientes al efecto del aislamiento e incluso formaron el vínculo de pareja en 24 h. En cambio, las hembras control establecieron el vínculo de pareja independientemente de la concentración de receptores a oxitocina. Así pues, parece que una fuente de variabilidad interindividual es la concentración de receptores a este neuromodulador, pero su efecto depende del ambiente de crianza. De esta forma, la oxitocina en el NA proporciona resiliencia a los efectos del aislamiento en la infancia (Barret *et al.*, 2015).

Por otro lado, la estimulación con un pincel podría revertir el efecto del aislamiento al emular los cuidados de los padres, un efecto del que hay evidencia sólida en otras especies (González *et al.*, 2001; van Oers *et al.*, 1998). En los topillos de la pradera, este tipo de estimulación activa a las neuronas oxitocinérgicas del NPV que proyectan al NA y revierte parte de los efectos del aislamiento (Barret *et al.*, 2015). Este podría ser uno

de los mecanismos mediante el cual la estimulación parental afecta a las conductas de las crías adultas de manera temprana. De esta forma, la estimulación somatosensorial por parte de los padres tiene un efecto clave en la formación de vínculos de pareja en la edad adulta. Sin embargo, los estudios de Rogers y Bales (2019) en los que utilizan dos hembras para la crianza de los topillos nos hacen pensar que además de la estimulación somatosensorial hay algún factor que es esencial para la formación de vínculos de pareja, ya que este tipo de estimulación no es suficiente para restaurar la formación del vínculo de pareja en machos. Un factor que no ha sido tenido en cuenta por ningún grupo hasta ahora ha sido la estimulación olfativa que está aportando el padre mediante sus secreciones particulares de macho sexualmente experto.

Se ha demostrado que las crías son capaces de presentar aprendizajes olfativos que perduran en la vida adulta (Woo *et al.*, 1987; Leon *et al.*, 1987; Wilson y Sullivan, 1994; Mclean y Harley, 2004; Shah *et al.*, 2002; Fillion y Blass, 1986), los cuales son especialmente importantes para aprender los olores relativos a la ubicación del nido y las señales olfativas de la madre para alimentarse (Sullivan *et al.*, 1994). El aprendizaje del olor de la madre interviene en la conducta maternal de las crías en la edad adulta. Por ejemplo, si se impregna a una madre en la zona ventral con un olor, esencia de limón, cuando sus crías son juveniles muestran una preferencia por este odorante (Shah *et al.*, 2002). Además, si estas crías se reproducen muestran más cobertura y más acicalamiento a las crías si estas se impregnan con esencia de limón. Por otro lado, los machos criados por madres con este tipo de odorantes, cuando son adultos, prefieren a hembras impregnadas por este mismo aroma (Fillion y Blass, 1986).

De esta manera, es razonable suponer que las señales olfativas del padre pueden influir en la organización temprana de los circuitos relacionados con el comportamiento sexual y parental (Woo *et al.*, 1987; Leon *et al.*, 1987; Madrid *et al.*, 2020; Snell-Rood, 2013; Kasumovic, 2013). De esta forma, la presencia del padre en el nido podría facilitar la formación de vínculos en las hembras a través de un aprendizaje olfativo, lo que facilitaría la formación de vínculos debido a la familiaridad con los olores particulares de macho.

## **7 JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO**

---

En los mamíferos son relativamente raras las especies socialmente monógamas y que presentan cuidados biparentales hacia las crías. En particular en los seres humanos, la dinámica de la formación de vínculos de pareja y las relaciones familiares son altamente complejas, razón por la cual es escaso el conocimiento de las bases neurobiológicas de la formación de vínculos de pareja y las alteraciones del sistema nervioso central que conllevan a la deficiencia en las conductas sociales en los individuos que se desarrollan en familias con solo un progenitor. El topillo de la pradera es un modelo ideal para evaluar los mecanismos involucrados en la formación de vínculos de pareja y para abordar los efectos conductuales y neurales de los cuidados parentales sobre el desarrollo de las aptitudes sociales en la descendencia.

En la presente tesis doctoral determinamos si el retraso en la formación del vínculo de pareja en los topillos criados en familias monoparentales se debe a alteraciones en la detección y discriminación de aromas o en la preferencia por olores sexualmente relevantes del sexo opuesto. Evaluamos si los topillos criados en familias monoparentales tienen alteraciones en el despliegue de la conducta sexual y

determinamos si la cohabitación con cópula induce estados afectivos positivos en los machos y si estos se asocian a cambios en el metabolismo dopaminérgico o serotoninérgico. Finalmente, realizamos estudios para evaluar la influencia de los cuidados de la madre junto a una hembra ayudante y la relevancia de los olores del padre en familias monoparentales en la formación del vínculo de pareja en machos y hembras del topillo de la pradera.

Este proyecto de investigación básica abordará las bases neurobiológicas de los efectos de los cuidados parentales sobre la modulación de conductas sociales complejas como la formación de vínculos de pareja, conducta crucial para la estrategia reproductiva de numerosas especies monógamas.

## **8 OBJETIVOS**

---

Objetivo general:

- Evaluar los cambios generados por la ausencia de cuidados paternos en topillos de la pradera sobre las conductas sociosexuales y a la formación del vínculo de pareja.

Objetivos particulares:

- Evaluar la conducta parental realizada por la madre y el padre en familias biparentales, y por la madre en familias monoparentales.
- Evaluar el desarrollo físico de las crías de familias biparentales y monoparentales.
- Evaluar la función olfativa de las crías biparentales y monoparentales mediante pruebas de detección y discriminación olfativa.
- Determinar la preferencia innata por olores sexualmente relevantes en crías de familias biparentales y monoparentales.
- Evaluar los patrones copulatorios en machos de familias biparentales y monoparentales.
- Evaluar la exploración anogenital, la inducción del estro y la receptividad sexual en hembras criadas en familias biparentales y monoparentales.
- Evaluar el estado afectivo positivo asociado a la cohabitación con cópula en machos criados en familias biparentales y monoparentales mediante la prueba de preferencia de lugar condicionada.
- Determinar si la estimulación sexual durante la prueba de lugar condicionada induce la formación del vínculo de pareja en los machos de topillo criados en familias biparentales y monoparentales.

- Describir los cambios en el metabolismo dopaminérgico y serotoninérgico en machos criados en familias biparentales y monoparentales en respuesta a la cohabitación con cópula.
- Evaluar los cuidados parentales recibidos por las crías en familias monoparentales en presencia de olores de macho y en familias donde una hembra ayuda a la madre a cuidar de las crías.
- Evaluar si la estimulación temprana con los olores del padre o el incremento en la estimulación parental proporcionado por una hembra ayudante afectan a la formación del vínculo de pareja en machos y hembras de topillo de la pradera.

## 9 HIPÓTESIS

---

- Las madres de las familias biparentales y monoparentales realizarán más cuidado parental que los padres de la familia biparental.

- Como resultado del cuidado por dos progenitores los topillos biparentales estarán menos tiempo desatendidos y recibirán más acicalamiento.
- Los topillos criados en familias monoparentales mostrarán retrasos en el desarrollo y en el peso en el destete y edad adulta.
- Los topillos criados en familias monoparentales no tendrán cambios en la función olfativa.
- Los topillos criados en familias monoparentales no preferirán los olores del sexo contrario.
- Los machos criados en familias monoparentales tendrán latencias más largas y un número menor de conductas sexuales que los topillos criados en familias biparentales.
- Las hembras criadas en familias monoparentales mostrarán un retraso en la inducción del estro, menor exploración anogenital hacia los machos y un cociente de lordosis menor que las hembras criadas en familias biparentales.
- En los machos monoparentales no observaremos un reforzamiento contextual asociado a la cohabitación con la cópula.
- Después de 18 h de cohabitación con cópula, los machos criados en familias monoparentales no mostrarán una preferencia de pareja. En los machos biparentales esta estimulación sexual inducirá preferencia por su pareja sexual.
- Los topillos criados en familias biparentales mostrarán un incremento en el metabolismo dopaminérgico después de la cohabitación con cópula. El cual no se observará en machos criados en familias monoparentales. No se observarán diferencias entre los machos criados en familias biparentales y monoparentales en la serotonina ni en su metabolismo.

- La presencia de olores del padre no afectará al cuidado materno, pero las familias compuestas por la madre y una hembra ayudante mostrarán cuidados similares a los de una familia biparental.
- Las hembras criadas por su madre y una tía formarán vínculos de pareja 24 h después de la cohabitación con cópula, de manera similar a las hembras criadas en familias biparentales. Los topillos de la pradera machos criados con su madre y una tía no formaran vínculos de pareja después de 24 h de cohabitación con cópula.
- La exposición a los olores del padre durante la crianza en familias monoparentales no afectará a la formación del vínculo de pareja en los machos, pero restaurará la formación del vínculo en hembras.

Proponemos que las madres de las familias biparentales y monoparentales realizarán más cuidados a sus crías que el padre de la familia biparental dado que la aportación de leche es el único alimento de las crías durante sus primeros días de vida. En general en los mamíferos las madres despliegan más conductas a las crías que los padres. Dado que en las familias biparentales están constituidas por dos progenitores pueden coordinar el cuidado de sus crías. Si uno de ellos sale a buscar alimento o explorar el otro queda a cargo de la descendencia. En cambio, la familia monoparental si la madre requiere explorar o buscar alimento las crías se quedan solas. Dado que el padre contribuye en el acicalamiento, recogida y cobertura de las crías provee de estimulación somatosensorial y regulación térmica estos factores contribuyen al desarrollo de las crías. Las madres de familias monoparentales no incrementan estas conductas para suplir la ausencia del padre, por lo que sus crías pueden tener retraso en el desarrollo y su peso corporal.

En la formación del vínculo de pareja los olores sexualmente relevantes de la pareja son determinantes para poder identificarla y preferirla del resto de los congéneres.

Nosotros postulamos que los topillos criados en familias monoparentales no tendrán alteraciones en la detección o discriminación de aromas volátiles que se detectan principalmente por el bulbo olfatorio principal, pero si tendrán alteraciones en la preferencia por los olores sexualmente relevantes lo cual podría explicar su retraso en la formación del vínculo de pareja.

Debido a que en los topillos la cópula facilita la formación del vínculo de pareja, proponemos que los sujetos criados en familias monoparentales tendrán alteraciones en la conducta sexual. De esta forma los machos criados en familias monoparentales podrían presentar latencias más largas y un número menor de eventos copulatorios que los criados en familias biparentales. Mientras que en la hembra podría presentar un retraso en la inducción del estro, menos motivación a realizar exploración anogenital del macho y en respuesta a la cópula mostrar bajos niveles de receptividad sexual.

En el topillo macho la cópula y la formación de vínculo de pareja induce estados afectivos positivos, proponemos que un retraso en la formación de este vínculo social en los machos criados en familias monoparentales puede estar relacionado con alteraciones en el reforzamiento inducido por la cópula. Dado que la dopamina en el NA juega un papel muy importante en la cópula y formación del vínculo de pareja proponemos que los machos criados en familias monoparentales tendrán alteración en este neurotransmisor y/o sus metabolitos.

Finalmente, en el estudio de los cuidados por dos madres pretendemos replicar los estudios de Rogers y Bales (2019) y continuar con esta línea de investigación al evaluar la relevancia de los olores del padre durante la crianza en familias monoparentales. Proponemos que en los topillos la crianza en familias monoparentales la exposición a los olores del padre tendrá un efecto sexualmente dimórfico en la formación del vínculo de pareja de las crías.

## 10 MATERIAL Y MÉTODOS

---

### 10.1 ANIMALES

Los topillos de la pradera fueron obtenidos de nuestra colonia local en el Instituto de Neurobiología, de la UNAM. La colonia fue iniciada con parejas donadas por el Dr. Larry J. Young. Todos los animales fueron estabulados en cajas de acrílico (40x20x20 cm) con lecho de aserrín y papel de estroza en una habitación con un ciclo de luz/oscuridad de 14/10 h, a 20-25°C y con acceso *ad libitum* a comida y agua (Rabbit diet high fiber 5326 LABDIET, semillas de girasol y avena). Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud de la Secretaría de Salud de México y fueron acordes a la Norma oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Los experimentos fueron aprobados por el Comité de ética en la Investigación del Instituto de Neurobiología y el Comité de ética del Instituto Nacional de Perinatología INPER212250-3230-21216-05-15 y 2018-1- 163, México.

## 10.2 GRUPOS EXPERIMENTALES

Parejas de machos y hembras no relacionados familiarmente fueron usadas para obtener topillos criados en familias biparentales (BP) y monoparentales (MP). Para obtener estos animales, las hembras fueron expuestas durante 5 días a aserrín impregnado con las secreciones de diversos machos antes de cohabitar con su pareja asignada. Por otro lado, los machos fueron estabulados individualmente durante el mismo tiempo. Ambos procedimientos aceleran el inicio de la cópula en esta especie (Carter *et al.*, 1987; Perry *et al.*, 2016). Posteriormente, los topillos de la pradera fueron estabulados en parejas y se les dejó copular libremente. El día 18 después del estabulado las parejas fueron seleccionadas aleatoriamente para formar familias BP o MP. En las familias BP, el macho fue retirado brevemente y devuelto para que cuidara de sus crías. En las MP, el macho fue retirado para asegurar que no estuviera presente durante el parto y el resto de la crianza de los recién nacidos (Mcguire *et al.*, 1992). En ambos grupos las familias se movieron a una caja nueva durante el procedimiento para que en las familias MP no quedaran olores del padre. A partir del día 20 desde el estabulado los topillos fueron revisados diariamente para determinar el día del parto intentando evitar el estrés en las hembras.

En el día del parto, día postparto (DPP) 0, las camadas fueron reducidas a 4 crías (Martin-Sanchez *et al.*, 2015). Este procedimiento ha sido reportado en topillos de la pradera (Ahern y Young, 2009), se basa en que las hembras tienen 6 pezones, 4 abdominales y 2 en las axilas. Los pezones de las axilas proveen una menor cantidad de leche y hay poca evidencia de su uso en la lactancia por lo que solo 4 crías a la vez pueden recibir suficiente aportación de leche (Fitch, 1957, Jameson, 1974). En esta especie las crías jóvenes suelen estar todo el tiempo enganchadas a los pezones maternos (Fitch, 1957).

Las camadas de un número menor recibieron crías de otras unidades reproductivas del mismo grupo experimental y de la misma edad, en caso de que fuera posible. Las crías fueron destetadas a el DPP 21 y estabuladas en cajas del mismo grupo y sexo. Todas las cajas alojaron de 3 a 5 animales que provenían de al menos dos unidades de reproducción diferentes para igualar el enriquecimiento social que esto provee a todos los animales.

### **10.3 PROCEDIMIENTOS QUIRÚRGICOS Y REEMPLAZO HORMONAL**

Para los experimentos de conducta sexual se utilizaron hembras estímulo de 3 a 5 meses de edad que fueron ovariectomizadas quirúrgicamente tras ser anestesiadas con una solución sedante de ketamina (30 mg/Kg/mL) y xilacina (6 mg/kg/mL) diluida en NaCl al 0.9 %. Los animales se dejaron recuperar de la cirugía por al menos dos semanas y, comenzando dos días antes de la prueba conductual, fueron inyectadas diariamente con estradiol benzoato (EB, 10 µg en 50 µL de aceite de maíz) para asegurar su receptividad sexual y evitar la gestación (Cushing *et al.*, 2004). El tratamiento persistió hasta el fin de las pruebas conductuales en las que formaban parte.

Para el experimento 6 utilizamos machos estímulo vasectomizados siguiendo el mismo procedimiento sedativo que con las hembras estímulo. Esto nos permitió utilizar machos capaces de copular sin necesidad de suministrarles testosterona y sin que fueran capaces de preñar a las hembras, lo cual podría afectar la conducta de las hembras experimentales.

#### **10.4 PROCEDIMIENTOS PARA LA EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO**

Las pruebas conductuales fueron realizadas en una sala aislada. Topillos de la pradera de diferentes cohortes fueron seleccionados al azar para realizar los experimentos 2-4, pero no todos los animales realizaron las tres pruebas. Ningún animal participó tanto el experimento 3 como en el 4. Cohortes diferentes fue utilizadas para los experimentos 5 y 6. Las pruebas conductuales se realizaron entre las 10:00 y las 18:00 h, durante el ciclo diurno (Ahern y Young, 2009; Ahern *et al*, 2011).

#### **10.5 Experimento 1: Cuidados parentales en familias mono y biparentales y su efecto en el desarrollo de las crías**

##### **10.5.1 Prueba de cuidado parental**

En el DPP 6 los padres y madres de las familias BP y las madres de las familias MP (n=8 en cada grupo) fueron colocados junto con sus camadas en una caja hogar vacía. Su comportamiento fue grabado durante 2 h. Los progenitores de la familia BP permanecieron juntos durante el experimento.

Los comportamientos parentales fueron registrados utilizando el protocolo descrito por Martín-Sánchez *et al.* (2015), con modificaciones. Los primeros 60 min fueron considerados habituación. Después, el comportamiento mostrado por cada progenitor fue registrado una vez por minuto como una variable binaria (Ocurriendo/no-ocurriendo) con un valor "1/0" por un total de 46 observaciones. Los parámetros registrados fueron: a) Presente en el nido; b) Cobertura de las crías; c) Acicalamiento de las crías; d) Nido desatendido (ningún progenitor en el nido) y; e) Acicalamiento total, calculado como el acicalamiento del padre sumado al de la madre. En las familias monoparentales este representa únicamente el acicalamiento que realizó la madre.

### **10.5.2 Desarrollo de las crías**

Para evaluar el desarrollo de las crías se registró el día en que desplegaron la oreja externa y el día en que abrieron los ojos. Las crías no fueron identificadas individualmente para no incrementar el acicalamiento debido al marcaje, por esa razón los datos se expresan como el porcentaje de crías en cada caja para cada variable (n=8 cajas en cada grupo). Las crías fueron pesadas los DPP 21 y 65 (machos BP y MP, n=15; hembras BP n=17, hembras MP, n=11), edades que fueron seleccionadas para comparar con estudios previos (Ahern y Young, 2009).

## **10.6 EXPERIMENTO 2: DETECCIÓN, DISCRIMINACIÓN OLFATORIA Y PREFERENCIA POR OLORES SEXUALMENTE RELEVANTES.**

### **10.6.1 Capacidad olfatoria**

Para evaluar la capacidad olfatoria se escondió un trozo de manzana fresca de aproximadamente 1 mm<sup>3</sup> en la esquina de una caja hogar bajo 2-3 cm de aserrín, como ya fue realizado por Curtis *et al* (2001). Al inicio de la prueba, un topillo fue situado en el lado opuesto a la manzana (machos BP n=12; machos MP, n= 10; hembras BP, n=13; y hembras MP, n=11). La latencia en encontrar la fruta fue registrada manualmente y fue definida como el escarbado decidido en la esquina de la manzana. Si los animales fueron incapaces de encontrar la manzana en 60 seg esta latencia fue asignada para propósitos estadísticos. Las cajas fueron cambiadas después de cada prueba.

### **10.6.2 Discriminación olfatoria**

Para evaluar la capacidad de discriminar olores utilizamos la prueba de habituación-deshabitación basada en el paradigma descrito por Gregg y Thiessen (1981). En esta

prueba los animales exploran un olor novedoso cuando se les presenta por primera vez y dejan de explorarlo en exposiciones sucesivas. Una vez que están habituados al olor, se les presenta un olor nuevo. Si los animales incrementan el tiempo de olfateo hacia este nuevo olor, se determina que son capaces de discriminar entre ambos estímulos. Además, también se habituarán al nuevo olor en exposiciones sucesivas. Así pues, los animales (machos BP, n=7; machos MP, n=10; hembras BP n=10 y hembras MP, n=6) fueron situados individualmente en cajas acrílicas (27 X 16 X 10 cm) cubiertas por una rejilla metálica (0.5 mm<sup>2</sup> de apertura, aproximadamente). Los animales fueron habituados a la caja el día previo al experimento durante 15 min. Al inicio de la prueba los topillos fueron expuestos a papel de filtro limpio encima de la rejilla (control, aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>), seguido de tres exposiciones a vinagre de manzana (10 µL) y tres a esencia de vainilla (10 µL) en papeles de filtro similares. Los estímulos fueron empleados sin diluir. El orden de la presentación de estos odorantes fue alternado entre animales subsecuentes. Cada estímulo fue presentado durante 1 min y transcurrieron 2 min entre estímulos. En esta prueba los animales fueron expuestos únicamente a olores volátiles ya que el contacto con el olor fue prevenido por la rejilla. El tiempo que invirtieron olisqueando cada estímulo fue registrado.

### **10.6.3 Preferencia por olores sexualmente relevantes**

Los animales (machos BP y MP, n=12 en cada caso, hembras BP, n=16; hembras MP, n=19) fueron situados en una caja hogar con tres recipientes de plástico (7.5 X 7.5 X 2 cm) durante 10 min. Cada uno de los recipientes contenía aserrín impregnado con uno de los siguientes estímulos: a) Limpio, aserrín sin ningún tipo de olor de topillo; b) Hembra, aserrín impregnado por hembras sexualmente receptivas, y c) Macho, aserrín impregnado por machos sexualmente expertos. El aserrín de hembra fue obtenido de al

menos 2 cajas hogar con 2 a 5 hembras y el de macho de una mezcla de 4 a 5 machos aislados durante al menos 5 días. El comportamiento fue grabado y el tiempo sobre cada recipiente fue analizado automáticamente con el software SMART.

### **10.7 EXPERIMENTO 3: CONDUCTA SEXUAL EN MACHOS Y HEMBRAS MONO Y BIPARENTALES**

#### **10.7.1 Conducta sexual en machos**

La conducta sexual fue evaluada en topillos de la pradera que habían sido aislados durante al menos una semana (BP n=7, MP n=10). Las hembras estímulo fueron ovariectomizadas y cebadas con EB, como se describió previamente. Una hembra estímulo y un macho experimental fueron estabulados juntos y se les permitió copular durante 1 h. Las hembras fueron consideradas sexualmente receptivas si en los primeros 10 min de la prueba mostraron el reflejo de lordosis en respuesta a las montas. La lordosis fue definida como la dorsiflexión de la espalda para permitir la penetración del pene (Hardy y DeBold, 1971). Las hembras no receptivas fueron reemplazadas por una hembra diferente. Si la segunda hembra seguía sin mostrar receptividad se dio por terminada la prueba conductual.

Se registraron los siguientes parámetros: latencia y número de montas, intromisiones y eyaculaciones; Intervalo inter-intromisión (latencia de eyaculación/número de intromisiones) e intervalo post-eyaculatorio (latencia de intromisión menos latencia de eyaculación previa). Si un evento copulatorio no ocurrió durante la prueba se le asignó la máxima latencia por propósitos estadísticos. Las montas en los topillos de la pradera suelen consistir en movimientos pélvicos rápidos, mientras que las intromisiones son más lentas y pronunciadas. Además, después de la eyaculación la hembra suele rechazar la presencia del macho durante unos minutos. La receptividad sexual de la hembra fue

evaluada con el cociente de lordosis (número de lordosis / número de montas). Nótese que toda intromisión es, por definición, una monta, pero no todas las montas son intromisiones. Se asignó una latencia de 3600 seg a los machos que no montaron o que no eyacularon. Un macho de familia BP y otro de familia MP no montaron o entrometieron. Un macho BP y 6 machos MP no eyacularon, por lo que no se incluyeron en el análisis del intervalo inter-intromisión y post-eyaculatorio.

### **10.7.2 Conducta sexual en hembras**

Las hembras adultas del topillo de la pradera no muestran un ciclo estral y permanecen en diestro en su grupo familiar. Sin embargo, el contacto con machos extraños y la exploración activa de sus señales olfatorias es capaz de inducir el estro a las 48 h. Para inducir receptividad sexual seguimos un protocolo similar al descrito por Carter *et al.* (1987), el cual induce lordosis en aproximadamente un 60 % de las hembras, permitiéndonos buscar diferencias sutiles entre nuestros grupos que de otro modo podrían no ser encontradas debido a que con la administración de estradiol la receptividad rondaría en el 90 %.

El experimento consistió en dos sesiones, en la primera la hembra gonadalmente intacta y sexualmente no receptiva, es expuesta a un macho sexualmente experto, lo que desencadenará su entrada en estro a los 2 días. Posteriormente se las expone nuevamente al macho para evaluar la receptividad y la conducta sexual.

De esta forma, hembras BP y MP gonadalmente intactas y sin tratamiento hormonal o exposición previa a olores de macho fueron alojadas individualmente en la caja de un macho sexualmente experto durante 1 h. Después, fueron regresadas juntas a su caja hogar que había sido cubierta con aserrín impregnado por los machos estímulo a los que

habían sido expuestas. Después de 48 h, las hembras fueron situadas nuevamente con el mismo macho asignado y se les permitió copular libremente. Se registraron los siguientes parámetros: a) olisqueo anogenital de la hembra hacia el macho durante los primeros 10 min de la primera sesión; b) número de hembras sexualmente receptivas durante la segunda exposición; y c) cociente de lordosis de las hembras receptivas durante la segunda sesión.

Durante la segunda exposición, el macho fue reemplazado si la hembra no permitió la cópula en los primeros 10 min. Una hembra de cada grupo fue excluida porque mostró receptividad sexual durante la primera exposición al macho. Dos hembras BP y 3 MP no estuvieron sexualmente receptivas durante la segunda exposición y no se incluyeron en el análisis del cociente de lordosis (CL).

## **10.8 EXPERIMENTO 4: REFORZAMIENTO INDUCIDO POR LA COHABITACIÓN CON CÓPULA Y PREFERENCIA DE PAREJA.**

### **10.8.1 Preferencia de lugar condicionada**

Para evaluar si la cohabitación con cópula (CC) es reforzante e induce un estado afectivo positivo en machos BP y MP se utilizó la prueba de preferencia de lugar condicionada (PLC) siguiendo un protocolo ya reportado por nuestro grupo y otros laboratorios (Ulloa *et al.*, 2018; Aragona *et al.*, 2007). Un estado afectivo positivo se define como un estado emocional con valencia positiva. Nuestro grupo demostró que la CC es reforzante en topillos de la pradera machos, pero las hembras no muestran un cambio en la PLC (Ulloa *et al.*, 2018), por lo que no realizamos el experimento en hembras. El condicionamiento fue realizado en una caja con dos compartimentos opuestos, uno blanco y otro negro (23 X 37 X 32 cm cada uno) comunicados por un pequeño compartimento gris (23 X 24 X 32 cm). El acceso a las cámaras podía restringirse con puertas de guillotina, figura 3.

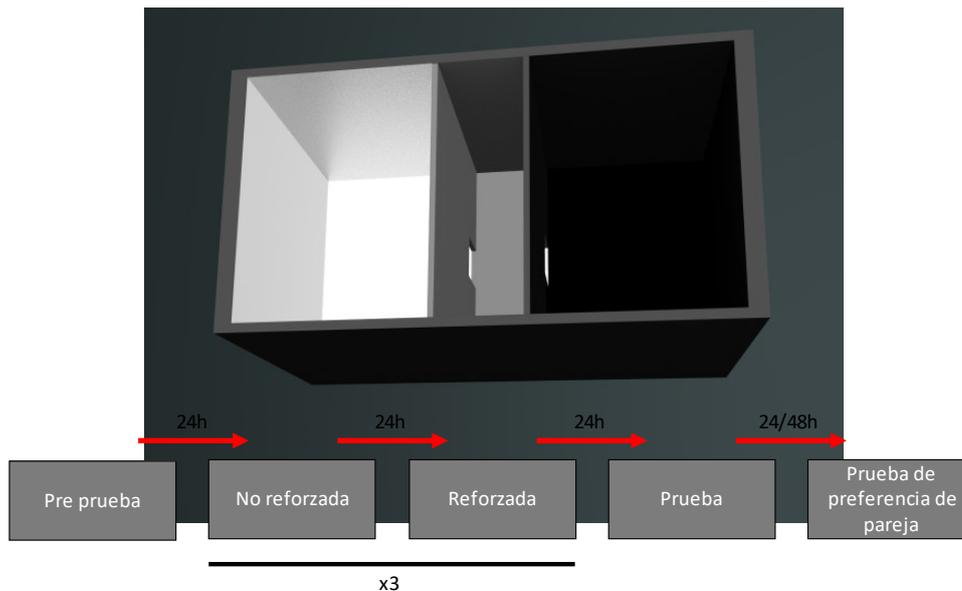


Figura 3. Protocolo de la prueba de preferencia de lugar condicionada. Los animales fueron evaluados en una caja con tres compartimentos, dos laterales (blanco y negro) y un compartimento (gris) que los comunica y separa mediante puertas de guillotina. En la preprueba los topillos de la pradera macho tienen acceso a los tres compartimentos y se determina el preferido (blanco o negro). Al día siguiente, tras 6 h en la sala de conducta, se les coloca en el compartimento preferido. Pasadas otras 24 h, copulan y cohabitan por 6 h con una hembra asignada tras las cuales se les coloca en el compartimento no preferido. El procedimiento se repite 3 veces. La prueba es similar a la preprueba y se evalúa el tiempo que pasan los topillos de la pradera en los compartimentos laterales. Después de 24 a 48 h, los machos realizaron una prueba de preferencia de pareja.

La prueba de PLC consiste en una preprueba, tres sesiones no reforzadas, tres sesiones reforzadas y una prueba, cada una en un día consecutivo. En la preprueba, los animales fueron situados en el compartimento gris y se les permitió explorar libremente los tres compartimentos durante 30 min, tras lo cuales fueron regresados a su caja hogar. El tiempo que pasaron en cada compartimento fue registrado. El compartimento preferido fue considerado aquel en que estuvieron más tiempo. El día posterior, después de permanecer 6 h en la sala de conducta, los animales fueron situados en el compartimento preferido con las puertas de guillotina colocadas para impedir que se desplazara a otros compartimentos. Al día siguiente, los machos cohabitaron durante 6 h con un hembra estímulo asignada sexualmente receptiva, inmediatamente después

fue colocado en el compartimento no-preferido (40 min en ambos casos). El procedimiento fue repetido 3 veces. Excepto en las sesiones de reforzamiento, los machos estuvieron aislados durante todo el experimento. El día posterior a la última sesión fueron evaluados de nuevo en las mismas condiciones que en la preprueba y el tiempo que pasaron en los tres compartimentos fue registrado. La PLC fue definida como un incremento significativo en el tiempo que pasaron en el compartimento reforzado (no-preferido) en la prueba comparado con el de la preprueba. Las hembras estímulo fueron cebadas con BE durante todo el procedimiento para asegurar su receptividad sexual. La cópula fue confirmada examinando visualmente la vagina. En todos los animales se observó cópula y acurrucamiento durante las sesiones de reforzamiento.

Se definió la diferencia de tiempo en el compartimento reforzado entre la prueba y la preprueba como  $\Delta T = \text{Prueba} - \text{Preprueba}$ .

### **10.8.2 Prueba de preferencia de pareja**

Uno o dos días después de la prueba de la PLC se realizó la prueba de preferencia de pareja siguiendo el procedimiento reportado por Ahern y Young (2009), con algunas modificaciones. Desde la finalización de la prueba de PLC hasta la sesión de preferencia de pareja los animales fueron alojados individualmente. La prueba se realizó en una caja acrílica (30 X 40 X 30 cm), con dos compartimentos cúbicos en lados opuestos (10 cm<sup>3</sup>). Estos se comunican con el compartimento principal por una pantalla acrílica con pequeños agujeros (0.5 cm de diámetro aproximadamente, figura 4). Antes del experimento, los machos fueron habituados a la caja por 30 min sin otros animales estímulo. El día del experimento, la pareja sexual del macho fue situada en uno de los

compartimentos cúbicos y, en el opuesto, una hembra desconocida (extraña), ambas sexualmente receptivas. La prueba duró 2h y el tiempo que pasaron los machos al lado de cada hembra se evaluó automáticamente con el programa SMART. Se registró el tiempo con los animales estímulo sumando el tiempo pasado junto a la pareja y el tiempo junto a la hembra extraña. Se consideró el índice de preferencia como  $IP = \text{tiempo junto a la pareja} / \text{tiempo con animales estímulo}$ .

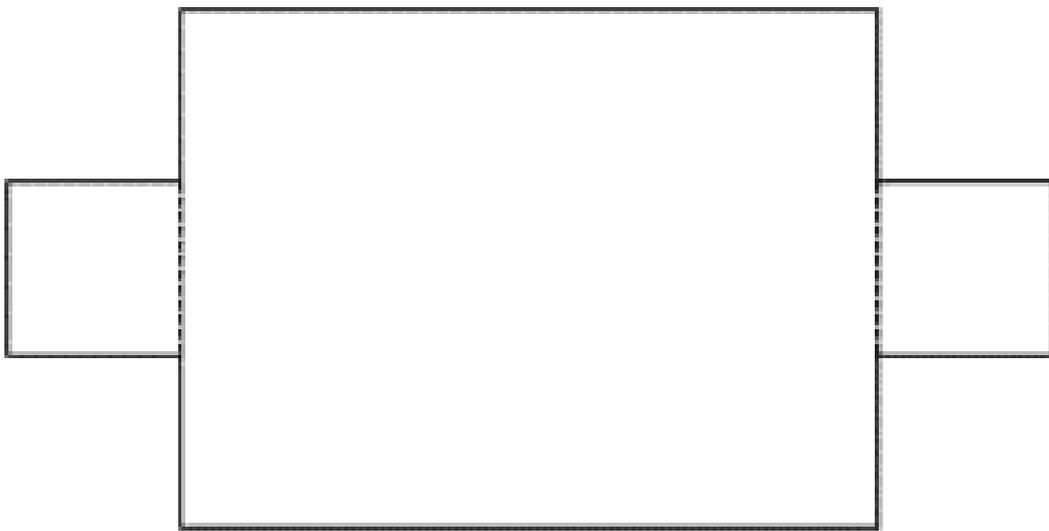


Figura 4. Prueba de preferencia de pareja. Los machos cohabitaron y copularon en tres sesiones de 6 h en la prueba de PLC y después 24 o 48 h realizaron la prueba de preferencia de pareja la cual se llevó a cabo en una caja de tres compartimentos que consiste en una arena central con dos compartimentos a los lados separados por una puerta con orificios que permite el intercambio de claves olfativas, auditivas y visuales. En uno de estos compartimentos fue colocada la pareja sexual y en el otro una hembra sexualmente receptiva. Se evaluó el tiempo que el macho experimental pasó junto a cada compartimento durante 2 h.

#### **10.9 EXPERIMENTO 5: CAMBIOS EN DOPAMINA Y SEROTONINA Y SUS METABOLITOS DESPUÉS DE LA COHABITACIÓN CON CÓPULA.**

Otra cohorte de machos BP y MP fue utilizada para evaluar los niveles de dopamina y sus metabolitos, DOPAC y HVA, así como de serotonina y su metabolito 5-HIAA. Se obtuvieron los siguientes grupos: a) Control, un grupo de machos BP y MP (n=6 en cada

caso) los cuales fueron estabulados individualmente; y b) Cohabitación con cópula, machos BP y MP que fueron estabulados con una hembra sexualmente receptiva durante 6 h (n=6 en cada grupo). En este grupo la conducta sexual fue videograbada y el número total de series copulatorias fue registrado. Todos los machos fueron aislados desde la semana previa a los experimentos.

Al finalizar la prueba conductual los machos fueron inmediatamente decapitados y sus cerebros fueron extraídos en hielo y procesados para obtener el NA y el estriado dorsal usando el método descrito por Glowinski (1966). El tejido fue congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento. Los neurotransmisores y sus metabolitos fueron medidos mediante la técnica de HPLC con detección electroquímica siguiendo el procedimiento descrito por Moreno *et al.* (2016). El tejido fue disgregado por sonicación en 500 mL de ácido perclórico 0.1 M. El homogeneizado fue centrifugado a 10,000 xg durante 40 min y los sobrenadantes fueron congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Los pellets fueron digeridos en NaOH para la cuantificación proteica mediante el método de Lowry (BioRad). Se utilizó una bomba PerkinElmer (serie de la bomba 200/Waltham, MA, USA) acoplada a una columna cromatográfica con adsorbosferas de catecolaminas (3  $\mu\text{m}$  tamaño de partícula, 100 X 4.8 mm; Grace Davison Discovery Sciences, Deerfield, IL, USA). Se utilizó un detector amperométrico Bioanalytical system LC-4C (West Lafayette, IN, USA) acoplado al HPLC. El potencial amperométrico fue configurado a 5 nA. La fase móvil utilizada fue una solución acuosa e isocrática de fosfato monobásico 0.1 M que contenía octil sulfato de sodio 0.5 mM, EDTA 0.03 mM y 12-14 % (v/v) de metanol. Los resultados fueron analizados con el programa TotalChrom Navigator version 6.3.1.0504 (PerkinElmer) y se expresan en ng/mg de proteínas en el tejido. El recambio dopaminérgico se expresa como la relación DOPAC/DA y HVA/DA, lo que proporciona un índice de la utilización

dopaminérgica (Blackburn *et al.*, 1989). El recambio serotoninérgico se expresa como la relación 5-HIAA/5-HT. Los reactivos fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Durante el procesamiento del tejido se dañaron y excluyeron dos muestras del estriado, correspondientes a un macho BP y un MP del grupo control, así como una muestra del NA de un macho BP del grupo cohabitación con cópula.

#### **10.10 Experimento 6: Efecto de la exposición a olores de macho y del cuidado bimarental en la formación del vínculo de pareja**

Para evaluar el efecto de la crianza por dos hembras, la madre y una hembra ayudante, y determinar la relevancia de los olores del padre en crías de familias monoparentales se obtuvieron los siguientes grupos: a) Biparental, topillos criados en familias con sus dos progenitores (n=7), b) Monoparental, topillos criados solo por su madre (n=7), c) Bimarental<sup>3</sup>, topillos criados por su madre y una tía ayudante sin experiencia aloparental (BM, n=8) y d) Monoparental enriquecido, topillos criados solo por su madre pero expuestos a aserrín impregnado con los olores de su padre (ME, n=8).

<sup>3</sup>. El término bimarental ha sido utilizado por medios públicos y prensa para referirse a familias humanas compuestas por dos mujeres. Estos términos nos ayudan a expresar con claridad el género de los cuidadores. Si bien podría considerarse que también son familias biparentales, decidimos mantener el término utilizado en nuestros artículos.

Los topillos criados en familias BP y MP se obtuvieron con el procedimiento descrito previamente en la sección 8.2. Para obtener a topillos criados en una familia BM se obtuvieron dos hembras estabuladas juntas, una fue destinada a ser la madre bimarental (MBM) y otra destinada a ser la hembra ayudante, a la que llamaremos comadre bimarental (CBM). La MBM fue estabulada junto a un macho tal como se

describió previamente para la familia BP. Después de 18 días se retiró al macho, de la misma forma que en la familia MP. Durante ese tiempo la CBM había sido estabulada en su caja hogar junto a otras hembras con las que cohabitaba previamente. La MBM fue colocada en un lado de una caja hogar dividida por la mitad por una rejilla plástica. En el lado opuesto se alojó a la CBM, esta disposición permitió la exploración, pero no la interacción física entre las hembras. Este proceso duró 24 h, posteriormente se las estabuló juntas y se permitió que ambas cuidaran de las crías hasta el destete.

Para obtener topillos criados en una familia ME se siguió el mismo procedimiento que para obtener una familia MP. En este caso, a partir del DPP1 se tomó aserrín diariamente de la caja hogar del padre y se distribuyó homogéneamente en la caja de la madre ME. Se seleccionó aserrín de aquella esquina de la caja en la que se observaran más deposiciones. En este grupo se conservó aproximadamente la mitad del aserrín durante la limpieza de las cajas para no interrumpir el protocolo. El procedimiento finalizó en el DPP21, en que las crías fueron destetadas y alojadas en una caja limpia.

#### **10.10.1 Prueba de cuidado parental**

Se evaluó el cuidado parental de todos los grupos experimentales al día DPP6 tal como se describió previamente en la sección 8.5.1.

#### **10.10.2 Prueba de preferencia de pareja**

La preferencia de pareja fue evaluada utilizando el protocolo previamente descrito, pero con una duración de 3 h. Los machos experimentales, fueron estabulados con una hembra ovariectomizada y cebada con BE, tal como se describió previamente. En el caso de las hembras, para evitar la gestación, utilizamos machos estímulo vasectomizados, los cuales fueron sexualmente expertos y habían sido aislados durante 5 días previos al

experimento. Machos y hembras cohabitaron con el individuo destinado a ser su pareja durante 24 h. Posteriormente los topillos experimentales realizaron la prueba de preferencia de pareja, tal como se describió previamente. Machos BP (n= 4), MP (n= 9), ME (n=12), BM (n=5); hembras BP (n=4), MP (n=11), ME (n= 14), BM (n=4). El número de sujetos de este experimento está en proceso de ser incrementado, pero para el propósito de esta tesis se presentarán los resultados preliminares.

#### **10.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los datos se analizaron utilizando el software IBM SPSS statistics v26. Se determinó la normalidad y la homocedasticidad de los datos con las pruebas de Kolmogorov-Smirnoff y de Levene, respectivamente. Se utilizó la prueba de t-student o ANOVAs de una, dos o tres vías si los datos cumplían con las condiciones de normalidad y homogeneidad de varianzas, en caso contrario se utilizaron las pruebas no paramétricas de Mann-Whitney o Kruskal-Wallis. Se utilizaron ANOVAs de más de una vía si los datos no seguían una distribución normal, pero eran simétricos. La prueba *post hoc* de Bonferroni se utilizó para las comparaciones por parejas. La prueba exacta de Fisher se utilizó para comparar valores binarios como el número de hembras receptivas o de machos que formaron vínculos de pareja. Se estableció un umbral de  $p < 0.05$  para la significatividad estadística.

# 11 RESULTADOS

---

## 11.1 EXPERIMENTO 1: CUIDADOS PARENTALES EN FAMILIAS MONO Y BIPARENTALES Y SU EFECTO EN

### EL DESARROLLO DE LAS CRÍAS

#### 11.1.1 Pruebas de cuidado parental

Las variables del comportamiento parental fueron evaluadas con un ANOVA de una vía con progenitor como factor intersujeto con tres niveles (madre BP, padre BP, madre MP). Se encontraron diferencias significativas en el factor progenitor en la frecuencia de acicalamiento ( $F_{2,21}=13.45$ ,  $p<0.05$ ), figura 5A. Las comparaciones *post hoc* muestran que los padres BP acicalan menos a las crías en comparación con los dos grupos de madres ( $p<0.001$ , en ambos casos). No se encontraron diferencias en la frecuencia de tiempo en el nido ( $F_{2,21}=0.79$ ,  $p=0.463$ ) o en la frecuencia de cobertura de las crías ( $F_{2,21}=2.46$ ;  $p=0.109$ ; figura 5A).

La prueba t student muestra que las crías BP recibieron más acicalamiento total que las MP ( $p<0.05$ ), figura 5B. No se encontraron diferencias significativas en la frecuencia en el nido desatendido ( $F_{1,14}=2,31$ ,  $p=0.416$ ).

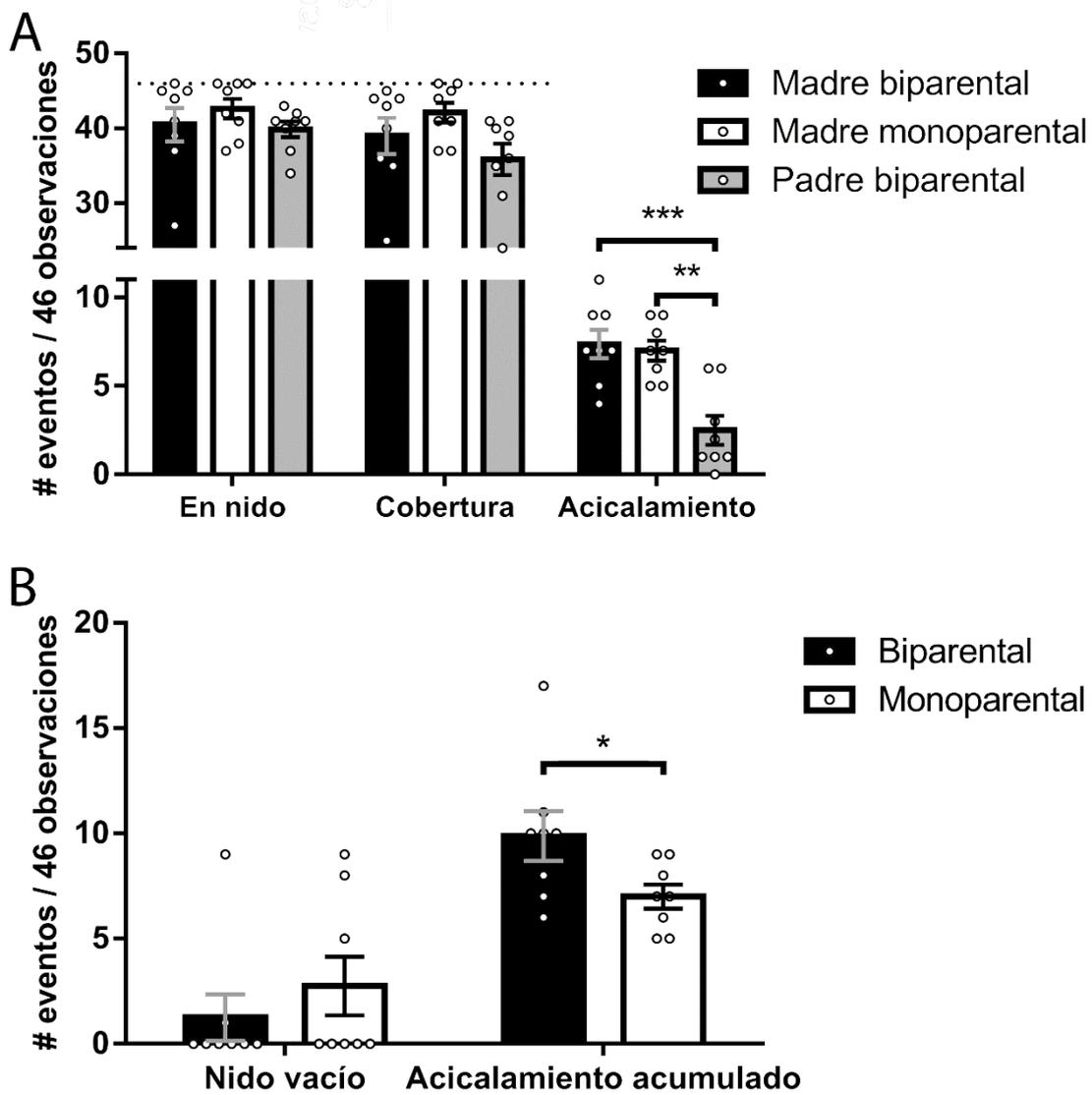


Figura 5. Cuidados parentales en familias biparentales y monoparentales. A) las madres biparentales, monoparentales, y los padres biparentales están en el nido y cubren a las crías con la misma frecuencia, pero los padres acicalan menos a las crías que ambos grupos de madres. B) El nido estuvo vacío sin ningún progenitor con la misma frecuencia en ambos tipos de familias, pero el acicalamiento acumulado es mayor en las familias biparentales que en las monoparentales. Los datos se expresan como la media  $\pm$  ESM. \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ , \*\*\* =  $p < 0.001$ .

### 11.1.2 Desarrollo

El despliegue del lóbulo de la oreja y la apertura de los ojos fue evaluado con una ANOVA de dos vías con medidas repetidas con grupo como factor intersujeto de dos niveles (BP y MP) y día como factor intrasujeto (0 a 5 para el lóbulo de la oreja; 5 a 12 para la apertura de los ojos). Los datos pasaron la prueba de la esfericidad de Mauchly. No

encontramos diferencias en el grupo en el despliegue del lóbulo de la oreja y la apertura de los ojos ( $F_{1,14}=0.05$ ,  $p=0.826$ ;  $F_{1,14}=0.59$ ,  $p=0.45$ , respectivamente) o en la interacción grupo X día ( $F_{7,98}=0.679$ ,  $p=0.69$ ;  $F_{5,70}=0.669$ ;  $p=0.64$ , respectivamente, figura 6A-B). El factor día representa las diferencias normales a medida que se desarrollan las crías, por lo que no lo reportaremos.

Las crías de ambos grupos fueron pesadas en los DPP 21 y 65, los datos se analizaron con una ANOVA de dos vías con grupo y sexo como factores intersujeto con dos niveles cada uno (MP y BP; macho y hembra respectivamente). No se encontraron diferencias en el DPP 21 en los factores grupo ( $F_{1,54}=0.21$ ,  $p=0.64$ ), sexo ( $F_{1,54}=0.93$ ,  $p=0.33$ ), ni en su interacción ( $F_{1,54}=0.19$ ,  $p=0.66$ ), figura 6C. Se encontró un efecto significativo del factor sexo en el DPP 65 ( $F_{54,1}=13,63$ ,  $p<0.01$ ). El análisis *post hoc* muestra que los machos pesan más que las hembras ( $p<0.01$ , figura 6D). No se encontraron diferencias significativas en el factor grupo ( $F_{1,54}=3.01$ ,  $p=0.08$ ) o en la interacción de ambos factores ( $F_{1,54}=1.23$ ,  $p=0.27$ ).

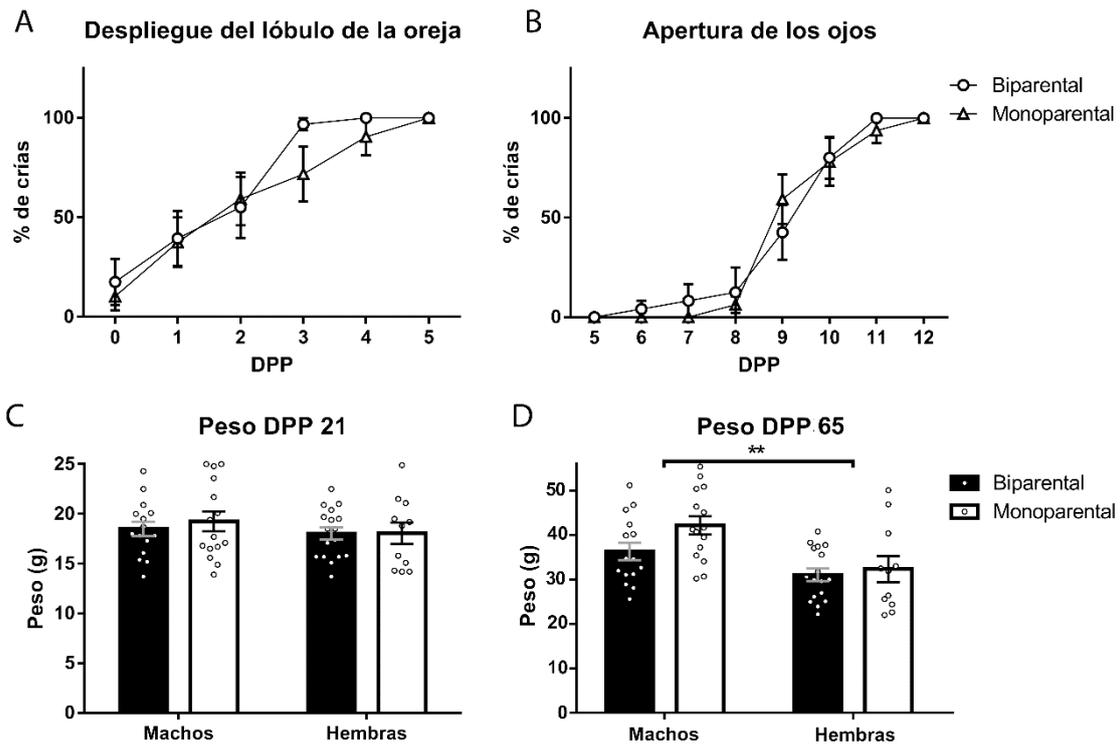


Figura 6. Pruebas de desarrollo y peso en topillos criados en familias biparentales y monoparentales. Los topillos criados en familias biparentales y monoparentales no muestran cambios significativos en su desarrollo. No se observan diferencias entre los topillos criados en familias biparentales y monoparentales en el día en el que las crías mostraban el lóbulo de la oreja desplegado (A) ni en el día en que abrieron los ojos (B). El día del destete, machos y hembras de ambos grupos tenían un peso similar (C), pero en la edad adulta observamos que los machos pesan más que las hembras (D), aunque sin mostrar diferencias entre los grupos. Los datos se expresan como la media  $\pm$  ESM. \*\* =  $p < 0.01$ .

## 11.2 EXPERIMENTO 2: PREFERENCIA POR OLORES SEXUALMENTE RELEVANTES.

### 11.2.1 Capacidad olfatoria

La latencia a encontrar la manzana fue analizada con una prueba U de Mann-Whitney para cada sexo. Como se muestra en la tabla 1, no se encontraron diferencias en la capacidad olfatoria entre los grupos BP y MP en machos ( $U=73.5$ ,  $p=0.38$ ) o en hembras ( $U=67.5$ ,  $p=0.82$ ).

Tabla 1. Capacidad olfatoria. Tiempo hasta que los topillos encontraron el trozo de manzana escondido en el lecho.

| Sexo    | Grupo        | media±ESM  | n  |
|---------|--------------|------------|----|
| Machos  | Biparental   | 30.8 ± 6.1 | 12 |
|         | Monoparental | 24.7 ± 6.7 | 10 |
| Hembras | Biparental   | 24.9 ± 5.8 | 13 |
|         | Monoparental | 26.7 ± 6.4 | 11 |

No se encontraron diferencias significativas entre los topillos criados en familias biparentales y monoparentales en la latencia de encontrar la manzana (seg). n = número de animales.

### 11.2.2 Discriminación olfatoria

Los datos de discriminación olfatoria fueron evaluados con un ANOVA de tres vías de medidas repetidas con grupo y sexo como factores intersujeto (BP y MP; machos y hembras) y olor como factor intrasujeto (control, vinagre 1, vinagre 3, vainilla 1, vainilla 3). Si los animales muestran un incremento significativo en el tiempo olisqueando un olor en su primera presentación en comparación con el tiempo olisqueando la última presentación del otro olor se interpreta como que el animal ha sido capaz de discriminar entre ambos. Dado que el vinagre y la vainilla fueron presentados de manera alterna entre animales tanto vinagre 1 contra vainilla 3, como vainilla 1 contra vinagre 3 son comparaciones relevantes. Las comparaciones con el mismo olor no serán descritas, pero todos los grupos se habituaron a los dos olores, es decir, redujeron la investigación en las exposiciones consecutivas ( $p \leq 0.001$ ).

Dado que los datos no pasan la prueba de la esfericidad ( $W=0.017$ ,  $gl=9$ ,  $p < 0.001$ ,  $\epsilon_G = 0.504$ ), utilizamos la corrección de los grados de libertad de Greenhouse-Geisser. Tanto el factor olor ( $F_{2,01,58.44}=19.1$ ,  $p < 0.001$ ), como la interacción olor X sexo

( $F_{2.01,58.44}=4.59$ ,  $p=0.014$ ) muestran un efecto significativo. No se encontró efecto en el factor grupo ( $F_{1,29}=0.26$ ,  $p=0.61$ ), sexo ( $F_{1,29}=2.05$ ,  $p=0.16$ ), ni en las interacciones grupo X sexo ( $F_{1,29}=1.74$ ,  $p=0.19$ ), olor X grupo ( $F_{2.01,58.44}=0.24$ ,  $p=0.78$ ), u olor X grupo X sexo ( $F_{2.01,58.44}=4.59$ ,  $p=0.79$ ). Las comparaciones *post hoc* muestran que tanto los machos como las hembras invirtieron más tiempo olisqueando vinagre-1 que el control o vainilla-3. Además, el tiempo olisqueando vainilla-1 fue mayor que el tiempo olisqueando tanto el control como vinagre-3 ( $p \leq 0.001$  en todos los casos, figura 7A).

Con respecto a la interacción olor X sexo, los machos invirtieron menos tiempo investigando el control y el vinagre-1 que las hembras ( $p=0.043$  y  $p=0.016$ , respectivamente).

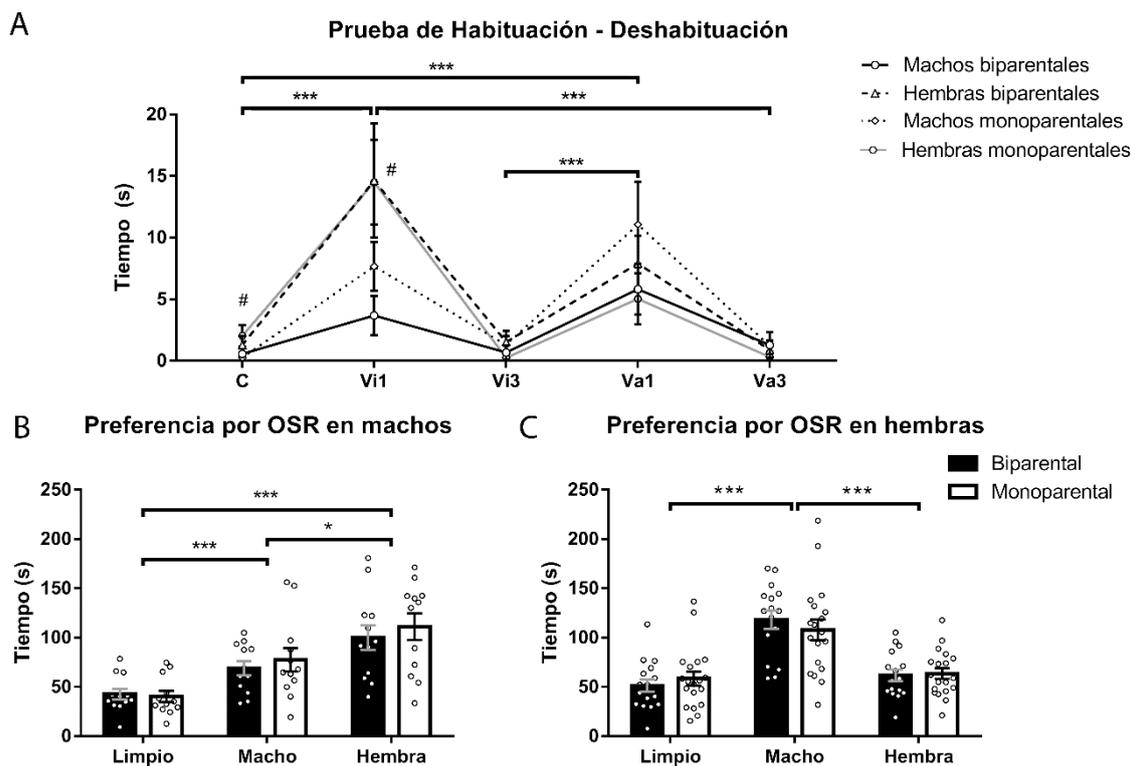


Figura 7. Prueba de habituación – deshabitución (A) y de preferencia por olores sexualmente relevantes (OSR) en machos (B) y hembras (C). A) Los topillos fueron expuestos a un trozo de papel limpio como control (C) y a presentaciones consecutivas de Vinagre (Vi) y esencia de Vainilla (Va). Todos los animales identificaron el olor nuevo en comparación con la última exposición primer olor y al control. B) Los machos

criados en familias biparentales y monoparentales prefirieron explorar olores de hembras a olores de macho o el aserrín limpio, también prefirieron el olor de otros machos al aserrín limpio. C) Las hembras prefirieron olor de machos al olor de otras hembras o al aserrín limpio. Los datos se expresan como la media  $\pm$  ESM. \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ , \*\*\* =  $p < 0.001$ , # representa diferencias entre los sexos,  $p < 0.05$ .

### **11.2.3 Preferencia por olores sexualmente relevantes**

Los datos fueron evaluados con una ANOVA de dos vías con olor y grupo como factores intersujeto. Con respecto a los machos, encontramos un efecto significativo en el factor olor ( $F_{66,2}=20.59$ ,  $p < 0.001$ ), pero no se encontró un efecto en el factor grupo ( $F_{1,66}=0.53$ ,  $p=0.46$ ) ni en la interacción de ambos factores ( $F_{2,66}=0.25$ ,  $p=0.77$ ). Las comparaciones *post hoc* muestran que los machos invirtieron más tiempo sobre el aserrín con secreciones de hembra en comparación con el tiempo sobre aserrín con secreciones de macho o limpio ( $p < 0.01$  y  $p < 0.001$ , respectivamente). También estuvieron más tiempo sobre el aserrín con secreciones de macho que en el aserrín limpio ( $p < 0.01$ , figura 7B).

Con respecto a las hembras, la prueba ANOVA muestra un efecto significativo en el factor olor ( $F_{99,2}=30.31$ ,  $p < 0.001$ ), pero no se encontró efecto en el factor grupo ( $F_{1,99} < 0.00$ ,  $p=0.96$ ) o en la interacción de los factores ( $F_{2,99}=0.74$ ,  $p=0.47$ ). Las comparaciones *post hoc* muestran que las hembras invirtieron más tiempo sobre el aserrín con secreciones de macho que sobre el aserrín con secreciones de hembra o el limpio ( $p < 0.001$  en ambos casos, figura 7C).

## **11.3 EXPERIMENTO 3: CONDUCTA SEXUAL EN MACHOS Y HEMBRAS MONO Y BIPARENTALES**

### **11.3.1 Conducta sexual en machos.**

En el análisis de los parámetros de conducta sexual masculina, utilizando la prueba exacta de Fisher encontramos que no hay diferencias significativas entre los grupos en el porcentaje de machos que mostraron montas, intromisiones o eyaculaciones. BP,

montas=6/7, intromisiones=6/7 y eyaculaciones=6/7; MP, montas=9/10, intromisiones=9/10 y eyaculaciones=4/10 ( $p=1$ ,  $p=1$  y  $p=0.134$ , respectivamente). No se encontraron diferencias significativas, utilizando la prueba de U de Mann Whitney, entre los grupos de machos en el número de montas ( $U=30.5$ ,  $p=1$ ), intromisiones ( $U=40$ ,  $p=0.66$ ) o eyaculaciones ( $U=51.5$ ,  $p=0.1$ ). Tampoco se encontraron diferencias en las latencias de monta ( $U=37.5$ ,  $p=0.8$ ), intromisión ( $U=31$ ,  $p=0.7$ ) o eyaculación ( $U=23$ ,  $p=0.27$ ). No se encontraron diferencias en los intervalos inter-intromisión ( $U=17$ ,  $p=0.35$ ) o post-eyaculatorio ( $U=15$ ,  $p=0.61$ ), tabla 2.

Tabla 2. Parámetros de conducta sexual en topillos de la pradera machos criados en familias biparentales y monoparentales.

|              |               | Biparental    | Monoparental   |
|--------------|---------------|---------------|----------------|
| Número       | Montas        | 22 ± 6.9      | 21 ± 4.5       |
|              | Intromisiones | 14.3 ± 4.3    | 12.5 ± 3.1     |
|              | Eyaculaciones | 1.5 ± 0.3     | 0.7 ± 0.3      |
| Latencia (s) | Montas        | 850.1 ± 476.7 | 813.6 ± 353.2  |
|              | Intromisiones | 888.7 ± 467.8 | 1466.8 ± 448.9 |
|              | Eyaculaciones | 1560.8 ± 484  | 2502.4 ± 475.2 |
| III (s)      |               | 101.2 ± 44.2  | 28.1 ± 6.7     |
| IPE (s)      |               | 784 ± 307.7   | 393 ± 177.4    |

No se encontraron diferencias significativas entre machos criados en familias biparentales y monoparentales en ninguno de los parámetros analizados. III, Intervalo inter-intromisión, IPE, Intervalo post-eyaculatorio. Machos criados en familias biparentales ( $n=7$ ), monoparentales ( $n=10$ ), para el III y el PEI biparental ( $n=6$ ) y monoparental ( $n=4$ ).

### 11.3.2 Conducta sexual en hembras.

La prueba U de Mann-Whitney no mostró diferencias significativas entre los grupos en la latencia al primer olisqueo anogenital o el tiempo total de exploración anogenital durante la primera exposición al macho ( $U=50$ ,  $p=1$ , en ambos casos), figura 8A.

Después de 48 h, las hembras fueron expuestas de nuevo al macho. En esta prueba no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de hembras sexualmente receptivas (prueba de Fisher,  $p=1$ ) o en el cociente de lordosis (prueba t de student,  $t=0.07$ ,  $gl=13$ ,  $p=0.94$ ), figura 8B.

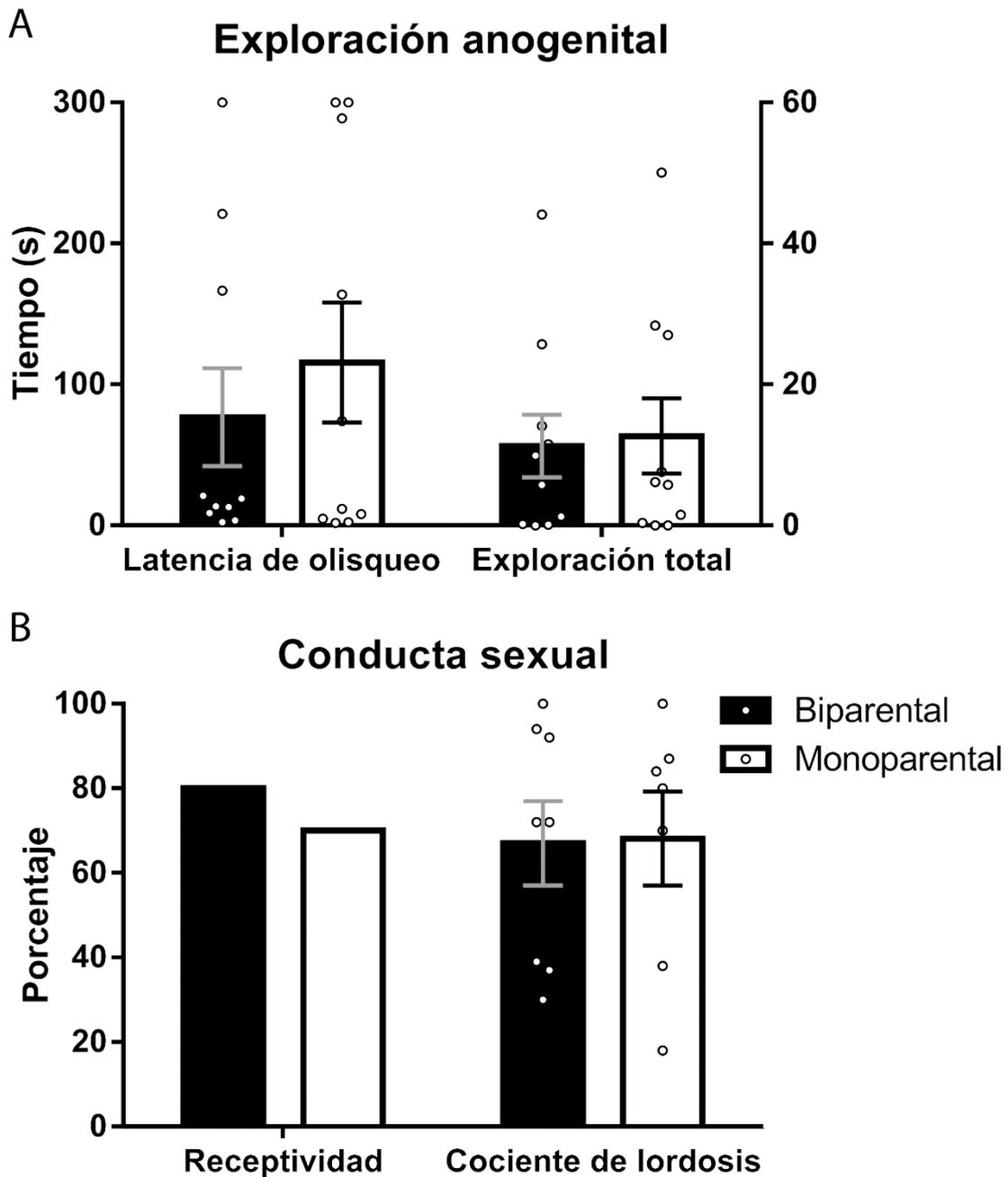


Figura 8. Pruebas de conducta sexual en topillos de la pradera hembra. A) Las hembras criadas en familias biparentales o monoparentales tardaron el mismo tiempo en comenzar a explorar a los machos e invirtieron el mismo tiempo explorándolos durante los primeros diez minutos de la primera sesión

conductual. B) Después de 2 días de exposición a los olores de macho, los topillos hembra no mostraron diferencias en el porcentaje de hembras receptivas ni en el cociente de lordosis. Los datos se expresan como la media  $\pm$  ESM.

#### **11.4 EXPERIMENTO 4: ESTADO AFECTIVO POSITIVO INDUCIDO POR LA COHABITACIÓN CON CÓPULA Y PREFERENCIA DE PAREJA.**

##### **11.4.1 Preferencia de lugar condicionada**

Se encontraron diferencias significativas en el tiempo en el compartimento reforzado (KW=12, gl=3,  $p=0.007$ ). Las comparaciones *post hoc* muestran un incremento significativo en los machos BP en el tiempo en el compartimento reforzado en la pre-prueba comparado con la prueba ( $p=0.031$ ). En cambio, no se encontraron diferencias significativas entre la pre-prueba y la prueba en los machos MP ( $p=0.32$ ), figura 9. Un macho MP fue excluido porque escapó de la caja de condicionamiento.

## Preferencia de lugar condicionada

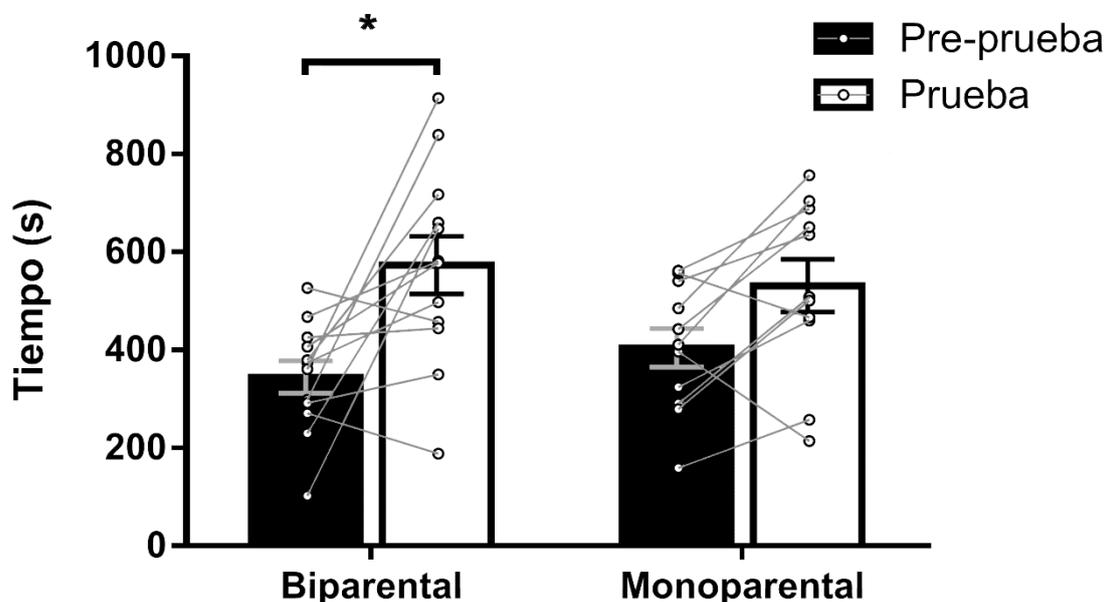


Figura 9. Prueba de preferencia de lugar condicionada. Los machos criados en familias biparentales incrementan el tiempo en el compartimento reforzado entre la pre-prueba y prueba. El compartimento reforzado se asoció con la cohabitación con cópula con la pareja sexual. Los machos criados en familias monoparentales no mostraron un incremento significativo entre la pre-prueba y prueba. Los datos se expresan como la media  $\pm$  ESM. \* =  $p < 0.05$ .

### 11.4.2 Preferencia de pareja

El tiempo en la proximidad de la pareja y de la hembra extraña fue evaluado utilizando un ANOVA de dos vías con grupo y estímulo como factores intersujeto de dos niveles (BP y MP; pareja y extraña, respectivamente). Se encontró un efecto significativo en la interacción grupo X estímulo ( $F_{4,1}=5.16$ ,  $p<0.028$ ). Sin embargo, no se encontró efecto en los factores grupo o estímulo ( $F_{1,44}=0.007$ ,  $p=0.9$ ;  $F_{1,44}=1.81$ ,  $p=0.18$ , respectivamente). Las comparaciones *post hoc* muestran que los machos BP estuvieron más tiempo al lado de su pareja sexual que al lado de la hembra extraña ( $p<0.014$ ). Los machos MP no muestran diferencias en el tiempo al lado de la hembra extraña o de su pareja sexual, figura 10.

Se realizó una prueba de correlación de Pearson entre el índice de preferencia y el incremento de tiempo en el compartimento preferido (IP y  $\Delta T$  respectivamente) con la finalidad de determinar si el cambio de preferencia de lugar se relaciona con la preferencia por la pareja ya que proponemos una relación causal entre ambas variables. Los análisis estadísticos demuestran que existe una correlación positiva entre estas dos variables ( $P=0.41$ ,  $p=0.049$ ).

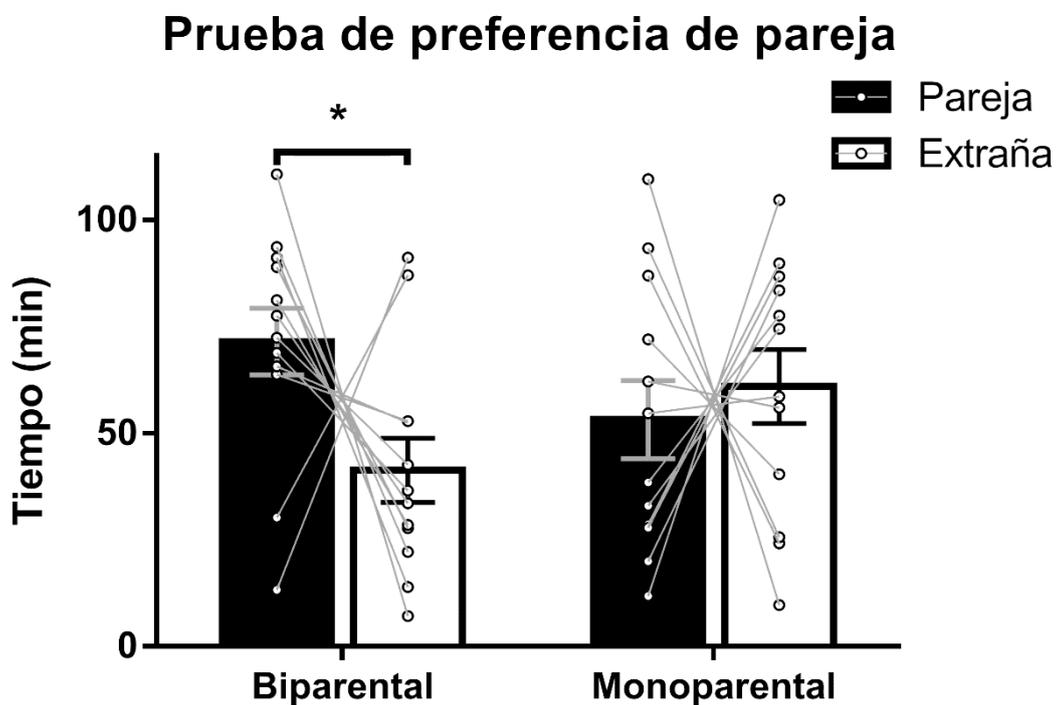


Figura 10. Prueba de preferencia de pareja. Los machos criados en familias biparentales formaron el vínculo de pareja después de 18 h de cohabitación con cópula, dado que el tiempo junto a su pareja es significativamente mayor que el tiempo con la hembra extraña. Los machos criados en familias monoparentales no prefirieron a su pareja sexual. Los datos se expresan como la media  $\pm$  ESM. \* =  $p < 0.05$ .

## **11.5 Experimento 5: Cambios en el metabolismo dopaminérgico y serotoninérgico después de la cohabitación con cópula**

### **11.5.1 Conducta copulatoria**

No se encontraron diferencias entre los grupos de machos en el número de series copulatorias durante las 6 h de cohabitación con cópula ( $U=18.5$ ,  $p=1$ ;  $BP=5.66 \pm 0.91$ ,  $MP=5.16 \pm 1.1$ ).

### **11.5.2 Núcleo accumbens**

Los datos de las concentraciones de DA, 5-HT, DOPAC, 5-HIAA, DOPAC/DA, HVA/DA y 5-HIAA/5-HT fueron analizados con una ANOVA de dos vías con grupo y tratamiento como factores intersujeto de dos niveles (BP y MP; Control y CC). Con respecto a la relación DOPAC/DA el factor grupo muestra un efecto significativo ( $F_{1,19}=5.08$ ,  $p=0.036$ ), tabla 3. No se encontraron diferencias significativas en el tratamiento o en la interacción grupo X tratamiento (valores de ANOVA en la tabla 4). Las comparaciones *post hoc* muestran que la relación DOPAC/DA es menor en los machos MP que en los BP ( $p<0.036$ ). Se encontró un efecto significativo en la relación HVA/DA en el factor grupo ( $F_{1,19}=5.08$ ,  $p=0.036$ ), pero no observamos diferencias en el factor tratamiento, ni en la interacción de ambos factores. Las comparaciones *post hoc* muestran que el recambio HVA/DA es mayor en machos BP que en machos MP ( $p<0.036$ ). Con respecto a DOPAC, se encontró un efecto significativo en el factor grupo X tratamiento ( $F_{1,19}=4.84$ ,  $p=0.04$ ) pero no en estos factores por separado. Las comparaciones *post hoc* muestran que los machos C del grupo BP tienen mayores concentraciones de DOPAC que los machos C del grupo MP ( $p=0.027$ ). Las concentraciones de DOPAC fueron menores en machos CC del grupo BP que en machos C del grupo BP ( $p=0.026$ ), tablas 3 y 4.

No se encontraron diferencias significativas en los factores grupo, tratamiento, ni en su interacción en las concentraciones de DA, HVA, 5-HT, 5-HIAA o 5-HIAA/5-HT, tablas 3 y 4.

### **11.5.3 Estriado dorsal**

Los datos de la concentración de DA, 5-HT y sus metabolitos se evaluaron con una ANOVA de dos vías con grupo y tratamiento como factores inter sujeto de dos niveles (BP y MP; control y CC). No se encontró efecto en los factores grupo, tratamiento ni en la interacción de ambos en las variables DA, DOPAC, HVA, 5-HT, 5-HIAA, DOPAC/DA, HVA/DA y 5-HIAA/5-HT, tablas 3 y 4.

Tabla 3. Niveles de dopamina (DA), serotonina (5-HT) y sus metabolitos en el NA y el estriado dorsal de machos criados en familias biparentales y monoparentales.

|                 |    |    | DA          | DOPAC                   | HVA        | 5-HT        | 5-HIAA     | DOPAC/DA               | HVA/DA                 | 5-HT      |
|-----------------|----|----|-------------|-------------------------|------------|-------------|------------|------------------------|------------------------|-----------|
| Nucleo acumbens | BP | C  | 55 ± 28.7   | 102.5±30.4              | 23.9 ± 2.6 | 12.1 ± 7.3  | 7.6 ± 1.5  | 3.5 ± 1.3              | 1.2 ± 0.5              | 1.1 ± 0.3 |
|                 |    | CC | 30.7 ± 7.5  | 46.5± 10.5 <sup>a</sup> | 19.4 ± 5.6 | 6.2 ± 1.7   | 6.7 ± 2.2  | 2 ± 0.6                | 0.8 ± 0.3              | 1.1 ± 0.1 |
|                 | MP | C  | 41.9 ± 9.7  | 46.9 ± 8.1 <sup>a</sup> | 11.6 ± 4   | 5.5 ± 1.3   | 5.3 ± 0.6  | 1.3 ± 0.2 <sup>b</sup> | 0.3 ± 0.1 <sup>b</sup> | 1.2 ± 0.2 |
|                 |    | CC | 67.6 ± 14.7 | 61.6 ± 11.7             | 19.3 ± 4.9 | 12.4 ± 4.2  | 6.6 ± 0.5  | 1 ± 0.3 <sup>b</sup>   | 0.3 ± 0.1 <sup>b</sup> | 0.7 ± 0.1 |
| Estriado dorsal | BP | C  | 98.2 ± 35.5 | 132 ± 33.5              | 26.1 ± 6.9 | 53.6 ± 15.8 | 9.5 ± 2    | 2.4 ± 1.1              | 0.4 ± 0.2              | 0.2 ± 0.0 |
|                 |    | CC | 146.1 ± 51  | 97.6 ± 10.5             | 26.5 ± 5.1 | 90.1 ± 31.3 | 7.3 ± 3.6  | 1.2 ± 0.4              | 0.2 ± 0.0              | 0.1 ± 0.1 |
|                 | MP | C  | 145.9 ± 29  | 126.7 ± 21              | 26.11±3.4  | 53.2 ± 22.9 | 12.5 ± 2.2 | 1 ± 0.2                | 0.1 ± 0.0              | 0.3 ± 0.1 |
|                 |    | CC | 186.9 ± 48  | 121.1 ± 27              | 33.6 ± 5.8 | 51.8 ± 16.2 | 5.9 ± 2.2  | 0.7 ± 0.2              | 0.2 ± 0.0              | 0.1 ± 0.0 |

Los machos BP en la condición control (C) como los que cohabitaron y copularon con una hembra receptiva (CC) muestran un incremento en el recambio dopaminérgico (DOPAC/DA y HVA/DA) en el NA comparados con los machos criados en familias monoparentales. Los machos BP C también muestran mayores niveles de DOPAC en comparación a los machos MP C como con los machos BP CC. No se encontraron diferencias en la serotonina, sus metabolitos o en su tasa de recambio. Para NA BP (C y CC n=6, en cada caso), MP (C y CC n=6, en cada caso). En el estriado dorsal BP y MP (C n=5), en el NA BP (CC n=5). Ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), Ácido homovanílico (HVA) y Ácido 5-Hidroindoleacético (5-HIAA). Los datos se expresan como la media±ESM. a=Diferente con respecto a los machos C del grupo BP, b= Diferente con respecto a los machos BP, p<0.05.

Tabla 4. Valores de la prueba de ANOVA en el análisis de dopamina, serotonina y sus metabolitos en el NA y el estriado dorsal.

|                  |     | DA                          | DOPAC                       | HVA                         | 5-HT                        | 5-HIAA                      | DOPAC/DA                    | HVA/DA                      | 5-HT                        |
|------------------|-----|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Núcleo accumbens | g   | $F_{1,19}=0.55$<br>$p=0.46$ | $F_{1,19}=1.59$<br>$p=0.22$ | $F_{1,19}=1.79$<br>$p=0.19$ | $F_{1,19}=0.02$<br>$p=0.96$ | $F_{1,19}=0.67$<br>$p=0.42$ | $F_{1,19}=5.08$<br>$p=0.03$ | $F_{1,19}=5.08$<br>$p=0.03$ | $F_{1,19}=0.55$<br>$p=0.46$ |
|                  | t   | $F_{1,19}=0.00$<br>$p=0.96$ | $F_{1,19}=1.66$<br>$p=0.21$ | $F_{1,19}=0.11$<br>$p=0.74$ | $F_{1,19}=0.16$<br>$p=0.9$  | $F_{1,19}=0.02$<br>$p=0.88$ | $F_{1,19}=1.6$<br>$p=0.22$  | $F_{1,19}=0.37$<br>$p=0.54$ | $F_{1,19}=0.8$<br>$p=0.38$  |
|                  | gXt | $F_{1,19}=2.4$<br>$p=0.13$  | $F_{1,19}=4.84$<br>$p=0.04$ | $F_{1,19}=1.71$<br>$p=0.2$  | $F_{1,19}=2.53$<br>$p=0.12$ | $F_{1,19}=0.6$<br>$p=0.44$  | $F_{1,19}=0.84$<br>$p=0.36$ | $F_{1,19}=0.27$<br>$p=0.6$  | $F_{1,19}=1.36$<br>$p=0.25$ |
| Estriado dorsal  | g   | $F_{1,17}=1.16$<br>$p=0.29$ | $F_{1,17}=0.13$<br>$p=0.71$ | $F_{1,17}=0.43$<br>$p=0.51$ | $F_{1,17}=0.72$<br>$p=0.4$  | $F_{1,17}=0.08$<br>$p=0.77$ | $F_{1,17}=2.42$<br>$p=0.13$ | $F_{1,19}=2.23$<br>$p=0.15$ | $F_{1,17}=0.54$<br>$p=0.47$ |
|                  | t   | $F_{1,17}=1.17$<br>$p=0.29$ | $F_{1,17}=0.67$<br>$p=0.42$ | $F_{1,17}=0.55$<br>$p=0.46$ | $F_{1,17}=0.59$<br>$p=0.45$ | $F_{1,17}=2.79$<br>$p=0.11$ | $F_{1,17}=1.36$<br>$p=0.25$ | $F_{1,19}=0.64$<br>$p=0.43$ | $F_{1,17}=2.27$<br>$p=0.14$ |
|                  | gXt | $F_{1,17}=0.00$<br>$p=0.93$ | $F_{1,17}=0.34$<br>$p=0.56$ | $F_{1,17}=0.45$<br>$p=0.5$  | $F_{1,17}=0.69$<br>$p=0.41$ | $F_{1,17}=0.67$<br>$p=0.42$ | $F_{1,17}=0.64$<br>$p=0.43$ | $F_{1,19}=0.76$<br>$p=0.39$ | $F_{1,17}=0.59$<br>$p=0.45$ |

g, grupo; t, tratamiento y g X t, interacción grupo X tratamiento.

## 11.6 EXPERIMENTO 6: EFECTO DE LA EXPOSICIÓN A OLORES DE MACHO Y EL CUIDADO POR DOS

### HEMBRAS EN LOS CUIDADOS PARENTALES RECIBIDOS Y LA FORMACIÓN DEL VÍNCULO DE PAREJA.

#### 11.6.1 Pruebas de cuidado parental

Para evaluar el comportamiento parental de los progenitores y cuidadores se utilizaron ANOVAs de una vía con el factor grupo como factor intersujeto de 6 niveles (padre BP (PBP), madre BP (MBP), madre bimental (MBM), comadre bimental (CBM), madre MP (MMP) y madre monoparental enriquecido (MME)). Se evaluaron las variables acicalamiento, cobertura de las crías y presencia en el nido. Como se muestra en la figura 11, no se encontraron diferencias en ninguna de las tres variables entre los grupos de progenitores ( $F_{5,44}=1.93$ ,  $p=0.11$ ;  $F_{5,44}=1.93$ ,  $p=0.11$ ;  $F_{5,44}=1.83$ ,  $p=0.12$ ,

respectivamente). Las variables acicalamiento, cobertura de las crías y presencia en el nido se analizaron usando una prueba t-student con progenitor como factor intersujeto de dos niveles (madre, no madre). El nivel no-madre incluye a los machos biparentales y a las comadres, ya que ninguno de ellos experimenta los eventos hormonales de la gestación que facilitan el cuidado maternal. Con respecto al factor madre, se encontraron diferencias significativas en la cobertura de las crías ( $t=2.43$ ,  $p=0.004$ ,  $gl=16.89$ ) y en la presencia en el nido ( $t=2.45$ ,  $p=0.025$ ,  $gl=16.6$ ). No se observaron diferencias en el acicalamiento ( $t=1.11$ ,  $p=0.11$ ,  $gl=43$ ). Los datos muestran que las madres cubrían a las crías y estaban en el nido con mayor frecuencia que las no-madres. Finalmente, los cuatro grupos de familias fueron divididas en una matriz de 2x2 con los factores compañía de la madre y exposición a olores de macho, como se muestra en la tabla 5, para analizar el acicalamiento total y la frecuencia con la que el nido estaba vacío.

Tabla 5: Diseño factorial del experimento 6. Las crías fueron divididas en 4 grupos que pueden clasificarse en una matriz de 2x2 con dos factores: compañía de la madre y exposición a olores de macho.

|  | <b>Madre<br/>Acompañada</b> | <b>Madre no-<br/>acompañada</b> |
|--|-----------------------------|---------------------------------|
| <b>Expuestos a olores<br/>del padre</b>    | Biparental                  | Monoparental<br>Enriquecido     |
| <b>No-expuestos a<br/>olores del padre</b> | Bimarental                  | Monoparental                    |

El tiempo en el nido vacío y el acicalamiento total fueron analizados con una ANOVA de dos vías con los factores compañía y exposición como factores inter sujeto de dos niveles (acompañada, no-acompañada; expuesta, no-expuestas). Con respecto a la variable acicalamiento total, se observó un efecto significativo en el factor compañía ( $F_{1,30}=10.78$ ,  $p=0.003$ ), pero no se observó efecto en el factor exposición ( $F_{1,30}=3.25$ ,  $p=0.08$ ) ni en la interacción de ambos factores ( $F_{1,30}=0.18$ ,  $p=0.67$ ). La prueba *post hoc* muestra que las crías de familias de dos cuidadores reciben más acicalamiento en total en comparación con aquellas criadas en familias de un solo cuidador ( $p=0.003$ ). Con respecto a la variable nido vacío, se observó un efecto significativo en el factor compañía ( $F_{1,30}=24.54$ ,  $p<0.001$ ), pero no se observó un efecto en el factor exposición ( $F_{1,30}=0.004$ ,  $p=0.95$ ) ni en la interacción de ambos ( $F_{1,30}=1.36$ ,  $p=0.25$ ). Las pruebas *post hoc* muestran que el nido estaba vacío con mayor frecuencia en las crías cuidadas por un solo progenitor.

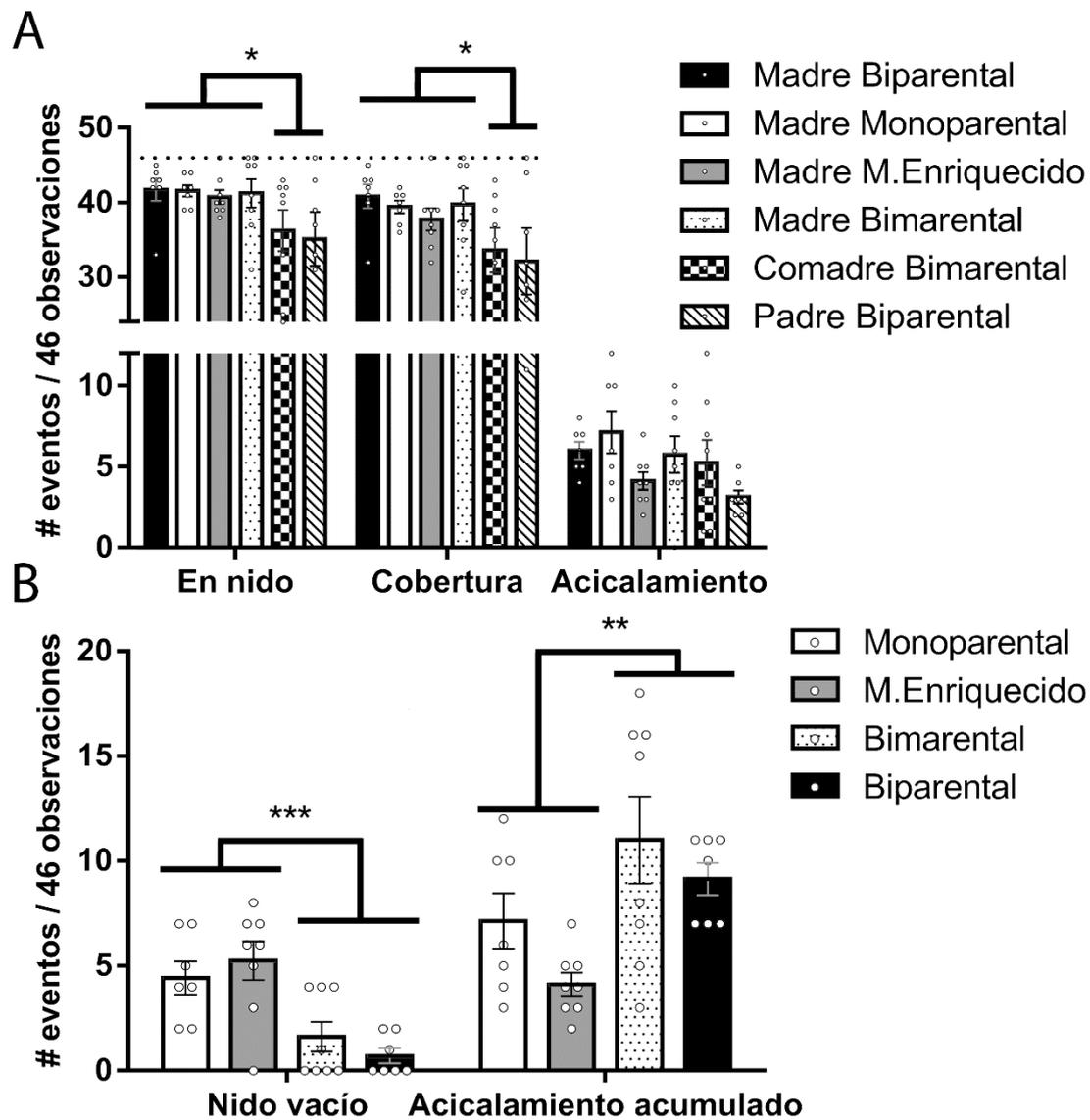


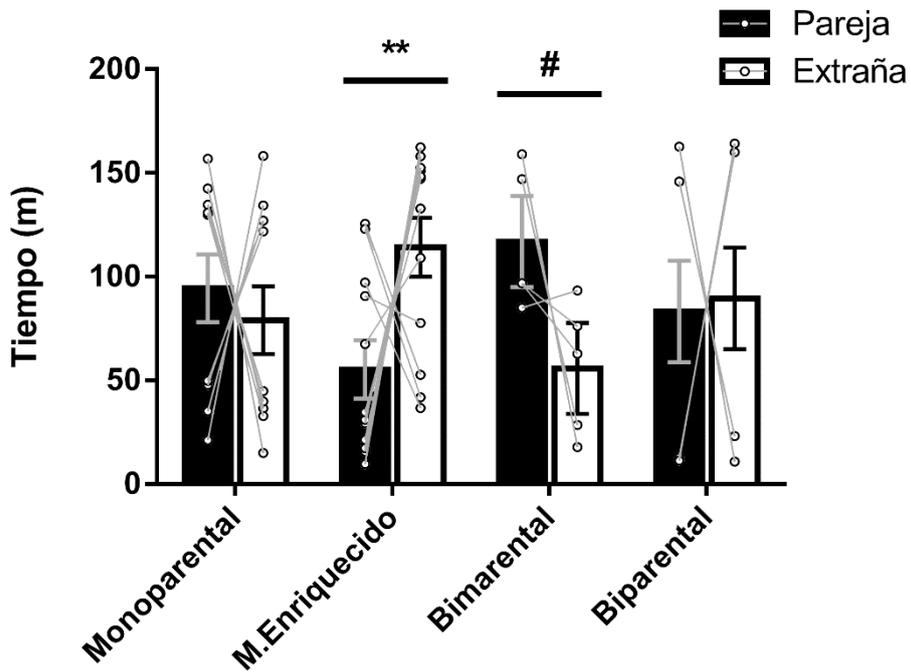
Figura 11. Cuidado parental en familias biparentales, monoparentales, bimarentales y monoparentales con olores del padre. Los cuidadores que no son madres, como las comadres de la familia bimarental y los padres de la familia biparental, están menos tiempo en el nido y realizan menos acicalamiento que las madres. El nido está vacío con menor frecuencia en las familias de dos cuidadores, como las familias bimarentales y biparentales. Además, las crías de este tipo de familias reciben más acicalamiento total. \* =  $p < 0.05$ . \*\* =  $p < 0.01$ . \*\*\* =  $p < 0.001$ .

### 11.6.2 Pruebas de preferencia de pareja

Para evaluar la preferencia por la pareja sexual se realizó una ANOVA de tres vías, siendo grupo un factor intersujeto de 4 niveles (biparental, monoparental, bimarental y monoparental enriquecido), sexo un factor intersujeto de 2 niveles (macho y hembra) y zona un factor intrasujeto de dos niveles (pareja y extraño).

Se encontró un efecto significativo en la interacción zona X sexo X grupo ( $F_{3,126}=4.3$ ,  $p=0.007$ ). No se encontró efecto en los factores zona ( $F_{1,126}=3.51$ ,  $p=0.063$ ), sexo ( $F_{1,126}=0.07$ ,  $p=0.78$ ), grupo ( $F_{3,126}=0.008$ ,  $p=0.99$ ) ni en las interacciones zona X sexo ( $F_{1,126}=0.11$ ), zona X grupo ( $F_{3,126}=1.11$ ,  $p=0.34$ ) ni sexo X grupo ( $F_{3,126}=0.02$ ,  $p=0.99$ ). Las comparaciones *post hoc* muestran que los machos enriquecidos invirtieron más tiempo con la hembra extraña que con su pareja ( $p=0.004$ ). A su vez, los machos criados en familias bimarentales invirtieron el mismo tiempo con su pareja que con la hembra extraña ( $p=0.051$ ), figura 12 A. En el caso de las hembras, tanto las hembras criadas en familias monoparentales enriquecidas con el olor de su padre como las hembras de familias biparentales invirtieron más tiempo con su pareja que con el macho extraño ( $p=0.015$ ,  $p=0.028$  respectivamente), figura 12B. Si bien los machos biparentales no muestran preferencia por su pareja sexual ( $p=0.85$ ) esto podría deberse al reducido número de sujeto.

### A Preferencia de pareja en machos



### B Preferencia de pareja en hembras

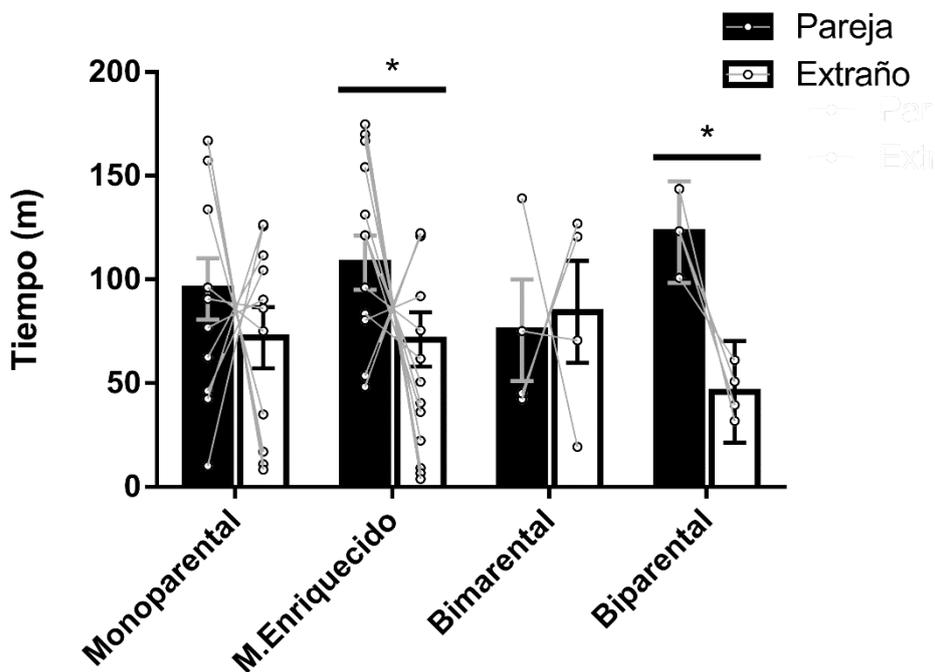


Figura 12. Formación de vínculo de pareja en topillos criados en familias biparentales, monoparentales, bimarentales y monoparentales enriquecidos con los olores del padre. Los machos criados en familias monoparentales enriquecidos con los olores del padre prefieren a la hembra extraña sobre su pareja sexual. Las hembras criadas en familias biparentales y monoparentales enriquecidos con los olores del padre prefieren a su pareja sexual que al macho extraño. \* =  $p < 0.05$ . \*\* =  $p < 0.01$ . # =  $p = 0.051$ .

## 12 DISCUSIÓN

---

En el presente trabajo hemos abordado los efectos en los cuidados parentales sobre el desarrollo, la expresión de conductas sexuales, los vínculos de pareja y el metabolismo dopaminérgico y serotoninérgico. Nuestros principales resultados son:

1. Los padres realizan menos acicalamiento a sus crías que las madres, pero permanecen el mismo tiempo en el nido y el mismo tiempo cubriendo a las crías que las madres.
2. Los topillos criados en familias monoparentales reciben menos cuidado parental, en la forma de acicalamiento, que los criados por dos progenitores.
3. En nuestras condiciones experimentales, esta reducción de los cuidados posnatales no resulta en cambios en el peso de la progenie o en las variables de desarrollo que observamos.
4. Los topillos criados en familias monoparentales no muestran cambios en la discriminación ni capacidad olfatoria. Tampoco en su preferencia por olores sexualmente relevantes del sexo opuesto, por lo que muestran una preferencia innata.
5. La conducta sexual y la inducción de receptividad sexual no varían en función del tipo de crianza en machos, ni en hembras de topillo de la pradera.
6. La cohabitación con cópula induce un estado reforzante en los topillos macho criados en familias biparentales. Este estado reforzante no se observa en los machos criados en familias monoparentales.
7. La cohabitación con cópula durante tres sesiones de 6 h induce formación de vínculos de pareja en machos criados en familias biparentales. Sin embargo, esta

estimulación no induce la formación de vínculos de pareja en topillos machos criados en familias monoparentales.

8. Los machos criados en familias biparentales muestran un incremento general en el metabolismo dopaminérgico en el núcleo accumbens en comparación con los machos criados en familias monoparentales.
9. La exposición a olores del padre no modifica el cuidado parental de las madres en el topillo de la pradera.
10. El cuidado por dos cuidadores (madre-padre o madre-comadre) incrementa el acicalamiento recibido por las crías y disminuye el tiempo en el que el nido está desatendido.
11. Las madres pasan más tiempo en el nido y cubriendo a sus crías que el padre o la comadre.
12. El cuidado por la madre junto a una hembra ayudante no restaura la formación del vínculo de pareja en machos, ni en hembras.
13. La estimulación con los olores del padre resulta en la formación de vínculos de pareja en 24 horas en las hembras cuando son adultas, pero los machos no muestran esta preferencia, sino que la muestran por la hembra extraña.

Estos resultados serán discutidos ampliamente en las siguientes secciones de la tesis.

#### **12.1 EL CUIDADO PARENTAL EN FAMILIAS MONO Y BIPARENTALES Y SU EFECTO EN EL DESARROLLO DE LAS CRÍAS**

Los progenitores de las familias biparentales y monoparentales no difieren en la frecuencia en el nido o cubriendo a las crías, de forma que las crías permanecieron desatendidas con la misma frecuencia en ambos grupos. Sin embargo, las crías de

familias monoparentales recibieron menos acicalamiento que las criadas en familias biparentales. Esto se debe a que las madres de las familias monoparentales no compensaron la falta del padre incrementando su frecuencia de acicalamiento, como otros grupos han demostrado previamente (Ahern *et al.*, 2011; pero consúltese Rogers *et al.*, 2018 ya que los machos pueden incrementarla en camadas subsecuentes)

En lo referente a los parámetros de desarrollo de las crías, nuestros datos demuestran que no hay diferencias entre los topos criados en familias biparentales o monoparentales en la edad en que desplegaron el lóbulo de la oreja ni en la que comenzaron a abrir los ojos. Tampoco hay diferencias en el peso corporal en el destete ni en la edad adulta. Nuestros resultados concuerdan con otros reportes que muestran que la ausencia del padre no afecta la edad en la que las crías abren los ojos (Wang y Novak, 1992) o su peso en el destete (Rogers y Bales, 2019).

Por otro lado, Ahern y Young (2009) reportaron que los topos monoparentales pesan menos en el destete que los biparentales, aunque estas diferencias desaparecen en la edad adulta. Sin embargo, ya que nuestros resultados son coherentes con la ausencia de diferencias en otras variables de desarrollo y además concuerdan con los obtenidos por otros grupos como Wang y Novak (1992) y Rogers y Bales (2019), consideramos que, en conjunto se debe concluir que no hay diferencia en el peso en los topillos criados en familias monoparentales y que no existen cambios relevantes en su desarrollo y maduración física.

De nuestros resultados se concluye que, en condiciones de laboratorio, la madre monoparental es capaz de proveer a las crías con todo lo necesario para su desarrollo normal. Sin embargo, es importante notar que en nuestro experimento la madre no

necesita abandonar su territorio para obtener recursos. En cambio, en condiciones de campo, la madre abandona el nido hasta ocho veces por día para obtener alimento (Halle, 2000) y estos periodos podrían incrementar el efecto de la ausencia del padre. Esto podría resultar, por ejemplo, en un incremento de la tasa de mortalidad de las crías, un efecto que ha sido reportado en otras especies biparentales como el ratón californiano (Gubernick y Teferi, 2000).

## **12.2 EL CUIDADO PARENTAL Y LA ESTIMULACIÓN SOMATOSENSORIAL COMO MECANISMOS DE CAMBIOS CONDUCTUALES EN LA EDAD ADULTA**

Existe mucha evidencia científica sobre el efecto de las experiencias tempranas en la conducta adulta de las crías. En animales polígamos, como la rata o el ratón, la intensa estimulación parental resulta en cambios en el comportamiento de las crías en la edad adulta. Estos incluyen disminución de la ansiedad y en las conductas sexuales apetitivas y/o consumatorias, retraso del inicio de la pubertad e incremento del cuidado parental a sus crías, entre otros cambios conductuales (Pedersen *et al.*, 2011; Champagne, 2011; Meaney, 2001; Champagne *et al.*, 2003). Muchos de estos cambios en el comportamiento han sido reportados también en especies monógamas (Arias del Razo y Bales, 2016; Perkeybile *et al.*, 2013, Perkeybile y Bales, 2017; Ahern y Young, 2009; Ahern *et al.*, 2011). Estos cambios parecen estar relacionados con la disminución de la estimulación somatosensorial que reciben las crías, ya que al estimularlas manualmente con un pincel se revierten los efectos de la deprivación parental (van Oers *et al.*, 1998; González *et al.*, 2001; Barret *et al.*, 2015). De esta forma, la inversión parental en las crías no solo incrementa sus probabilidades de supervivencia, sino que además les provee con experiencias relevantes para su conducta adulta.

En roedores, la estimulación maternal modula la respuesta del eje hipotálamo-hipofisiario-adrenal, reduce la ansiedad e incrementa la conducta maternal cuando las crías son adultas (Liu *et al.*, 1997; Pedersen *et al.*, 2011; Caldji *et al.*, 1998). En consecuencia, la ansiedad y la conducta maternal son transmitidas a la descendencia a través de los cuidados maternos (Meaney, 2001; Francis *et al.*, 1999; Champagne, 2011; Perkeybile y Bales, 2017; Fleming *et al.*, 2002). De esta forma, los topos criados en familias biparentales, que reciben más estimulación parental, a su vez proporcionan altos cuidados parentales a sus crías cuando son adultos (Ahern y Young, 2011). Por otro lado, los machos adolescentes que han sido criados en familias que proveen de alto contacto a sus crías muestran también un aumento en su contacto con crías (Perkeybile *et al.*, 2013). Por otro lado, los topillos de los prados (*Microtus pennsylvanicus*), una especie polígama que no muestra cuidado paternal (Gruder-Adams y Getz, 1985), incrementan su contacto con las crías e incluso despliegan cuidados paternales cuando llegan a la edad adulta si son criados por topillos de la pradera (McGuire, 1988). Este ejemplo demuestra lo bien conservada que está la transmisión intergeneracional del cuidado parental entre las especies, lo que podría ser un mecanismo de respuesta a la presión ambiental que permitiría desarrollar estrategias de alta o baja inversión en las crías en función del ambiente (Champagne, 2011; Perkeybile y Bales, 2017).

Gromov (2011) propuso que la estimulación somatosensorial por parte de los progenitores afecta no solamente a la conducta parental/aloparental de las crías, sino también su habilidad de formar vínculos de pareja, lo que afectaría de manera sinérgica a su estrategia reproductiva a través de una alta o baja inversión parental. Además, se ha propuesto que el vínculo de pareja es una adaptación de los circuitos del vínculo maternal, ya que comparten redes en el encéfalo, como la vía del estriado – amígdala –

pálido ventral – núcleo acumbens (Numan, 2014; Numan y Young, 2016). De acuerdo con esta propuesta, los topillos criados en familias monoparentales no solamente tienen un retraso en la formación del vínculo de pareja, sino que además muestran menos cuidados parentales y aloparentales (Ahern y Young, 2009). AQUÍ PONER LO DE OTRAS ESPECIES Y DISCUTIR CON RESPECTO A LOS TOPILLOS. Cabe mencionar que en los topillos de la pradera el acicalamiento no se dirige prioritariamente hacia un sexo en particular, por lo que probablemente nuestros resultados se deban como en otras especies de roedores a una preferencia por el acicalamiento a los machos (Mcguire *et al.*, 2014).

Nuestros datos demuestran un retraso en la formación del vínculo de pareja en topillos criados en familias monoparentales, el cual está posiblemente relacionado con la reducción en la estimulación somatosensorial durante su crianza. En el mismo sentido, hembras del topillo de la pradera aisladas (3 horas diarias de su madre y hermanos) durante su desarrollo posnatal temprano, en la edad adulta después de la cohabitación con machos por 48 horas no muestran conducta afiliativa por su pareja sexual. Estas alteraciones conductuales no se deben a una disminución en la densidad a los receptores a oxitocina en el NA, pero si existe una correlación entre las conductas afiliativas y la densidad a receptores a oxitocina en esta región neuronal. Las hembras aisladas posnatalmente y que fueron estimuladas con un pincel muestran un incremento en la expresión del gen de respuesta temprana EGR-1 (gen de respuesta temprana al crecimiento 1) en neuronas oxitocinérgicas del núcleo paraventricular del hipotálamo. De la misma forma, se demostró que la estimulación farmacológica de la secreción de oxitocina de estas neuronas en la edad temprana reduce el efecto del aislamiento en la formación del vínculo de pareja (Barret *et al.*, 2015). De esta manera,

es posible que los cambios en la edad adulta sean consecuencia de modificaciones en la actividad de neuronas oxitocinérgicas del núcleo paraventricular generados por la estimulación somatosensorial parental. Por otro lado, un estudio reciente demostró que las hembras criadas por su madre y por una hermana mayor reciben altos niveles de cuidado parental durante su desarrollo posnatal. Estas hembras forman un vínculo de pareja después de 24 h de cohabitación cuando son adultas, tal como hacen las hembras criadas en familias biparentales (Rogers y Bales, 2019). Sin embargo, a pesar de que Rogers y Bales evitaron el estrés de la madre con su elegante diseño experimental, para ello usaron hembras multíparas y hembras ayudantes con experiencia aloparental, las cuales realizan más cuidados parentales que las hembras primíparas (Wang y Novak, 1994). En cambio, tanto nosotros como Ahern y Young (2009) utilizamos progenitores primerizos, de esta forma los animales recibieron más estimulación en el experimento de Roger y Bales, haciendo que la comparación de nuestros resultados sea complicada. Además, cabe mencionar que los cuidados por parte de la hermana mayor fueron incapaces de restaurar la formación del vínculo de pareja en los machos, de forma que algunas señales exclusivas del padre contribuyen también a estos, como evaluamos en el experimento 6.

### 12.3 LOS TOPILLOS MONOPARENTALES NO MUESTRAN DIFERENCIAS EN SU PREFERENCIA POR OLORES SEXUALMENTE RELEVANTES

Nuestros datos muestran que los topillos criados en familias biparentales y monoparentales son capaces de detectar y discriminar olores volátiles relacionados con comida. Estos olores son detectados principalmente por el bulbo olfatorio principal (Curtis *et al.*, 2001; Laurent, 1999; Leon and Johnson, 2003).

En nuestro estudio hipotetizamos que los topillos criados en familias monoparentales mostrarían una preferencia reducida por los componentes volátiles y/o no-volátiles de las secreciones del sexo opuesto. Nuestros datos demuestran que no hay diferencias en los topillos machos y hembras criados en familias biparentales y monoparentales en su preferencia por olores sexualmente relevantes. Así pues, discutiremos estos resultados con respecto a cada sexo.

### 12.3.1 Machos

Los machos sexualmente inexpertos criados en familias biparentales y monoparentales prefirieron el olor de hembras sexualmente receptivas al de machos sexualmente expertos o al aserrín limpio. Dado que los topillos macho prefieren los olores de las hembras, este comportamiento puede resultar en un incremento de las probabilidades de buscar y explorar una hembra, eventualmente copular, dispersarse del nido y establecerse con ella en un nido conjunto.

Nuestros resultados contrastan con lo reportado en otras especies como la rata, ya que los machos sexualmente inexpertos no prefieren el olor de las hembras en comparación al olor de machos (Stern, 1970; Lydell y Doty, 1972). De manera similar, los topillos montanos (*Microtus montanus*) no prefieren olores de hembras sobre el olor de machos (Sawrey y Dewsbury, 1994). Sin embargo, otras especies como el ratón muestran preferencia innata por los olores de las hembras (Hayashi y Kimura, 1974). De esta forma, los topillos de la pradera macho muestran una preferencia innata por olores sexualmente relevantes del sexo opuesto. Taylor y Dewsbury (1988) demostraron que los topillos de la pradera con experiencia sexual prefieren el olor de hembras en estro en comparación con el olor de hembras en diestro. Sin embargo, ya que no compararon

con un olor neutro ni con olores de macho, no se puede concluir si prefieren el olor de hembra sobre el de macho.

Por otro lado, el presente trabajo demuestra que los machos mostraron preferencia por el olor de machos sexualmente expertos sobre el aserrín limpio, aunque lo exploraron menos que el aserrín impregnado con secreciones de hembras. Esta preferencia puede ser interpretada de dos formas no mutuamente excluyentes: A) Los machos están explorando e interpretando las señales de un macho cercano, B) Los machos están sobremarcando los olores de otros machos cercanos (Ferkin *et al.*, 2001). Debido a que nuestro protocolo no diferencia el olisqueo del marcaje, por la perspectiva del video, no es posible inferir si se trata de un interés pro-social o territorial.

### 12.3.2 Hembras

Nuestro estudio demuestra que las hembras sexualmente inexpertas, principalmente en diestro, prefieren el olor de machos sexualmente expertos al olor de otras hembras y al aserrín limpio, independientemente de si fueron criadas en familias biparentales o monoparentales. Es importante recordar que la exploración olfatoria anogenital es crucial en los topillos de la pradera para su reproducción, ya que las hembras requieren exponerse a olores de macho para entrar en receptividad sexual (Carter *et al.*, 1987). Además, las hembras exploran activamente a los machos y evitan explorar a machos familiares para evitar la activación reproductiva y, por ende, la endogamia (Carter *et al.*, 1980). De esta manera, esta conducta representa la inducción activa de la receptividad sexual.

En comparación con nuestros resultados, las hembras de los topillos de los prados (*Microtus montanus*) prefieren los olores de machos durante el verano, época en la que

buscan una pareja reproductiva, y los olores de hembras durante el invierno, cuando buscan grupos comunales donde establecerse (Ferkin y Seamon, 1987). Este comportamiento puede optimizar la utilización de recursos durante el invierno (Getz, 1978). Sin embargo, ya que estos experimentos fueron realizados en el campo no es posible inferir si esta preferencia es innata ya que las hembras pudieron estar expuestas a machos y/o sus secreciones previamente. Así pues, nuestras hembras sexualmente inexpertas y estabuladas en ciclos similares al verano prefieren explorar olores del sexo opuesto a olores de otras hembras. De esta forma, demostramos que los topillos hembra prefieren de forma innata los olores de machos sexualmente expertos, independientemente de su tipo de crianza. Esta preferencia representa un interés activo por la reproducción y puede interpretarse como que ambos grupos de hembras buscan activamente su activación reproductiva si tienen la oportunidad.

#### **12.4 EL CUIDADO PARENTAL NO AFECTA A LA CONDUCTA COPULATORIA EN MACHOS O HEMBRAS, NI A LA INDUCCIÓN DE RECEPTIVIDAD SEXUAL EN HEMBRAS**

La cópula acelera la formación del vínculo de pareja tanto en machos como en hembras (Winslow *et al.*, 1993; Williams *et al.*, 1992). Ahern y Young (2009) mostraron que la formación del vínculo de pareja está retrasada en machos y hembras criados en familias monoparentales. Este grupo reportó que las hembras criadas en familias biparentales y monoparentales comenzaron a copular pasadas después de 48 horas. Sin embargo, no analizaron los parámetros copulatorios, solo el enrojecimiento de la vagina como una medida indirecta de la actividad sexual. Por esta razón nos planteamos que era posible encontrar diferencias finas entre los grupos en la conducta sexual que pudieran relacionarse con el retraso en la formación del vínculo de pareja. Nuestra hipótesis fue

que los topillos criados en familias monoparentales tendrían un retraso tanto en el inicio de la actividad sexual, el número de parámetros copulatorios y en la receptividad sexual.

Nuestros datos demuestran que no existen diferencias entre las hembras de topillo de la pradera criadas en familias biparentales y monoparentales en la latencia del inicio de la exploración anogenital, la exploración total, la inducción de receptividad o en el cociente de lordosis.

En contraste con nuestros resultados, en otros roedores hay evidencia de la modulación de la conducta sexual a través de la conducta maternal. De esta manera, ratas hembra criadas por madres que realizan poco acicalamiento muestran mayores niveles de receptividad sexual, un inicio acelerado de la pubertad y un incremento en la tasa de gestación en comparación con hembras criadas por madres que les proporcionaron altos niveles de acicalamiento (Cameron *et al.*, 2008a, b; Champagne, 2011). Además, como se ha dicho previamente, estas ratas también cuidan menos de sus propias crías (Champagne, 2011). De esta forma, ya que estas ratas muestran una tasa mayor de gestación, maduran antes y cuidan menos de las crías, observamos una tendencia a incrementar la tasa reproductiva y a reducir los cuidados parentales cuando han recibido menos cuidados en la infancia (Champagne, 2011). En los topillos de la pradera no hay evidencia de cambios en la conducta sexual o en la tasa de gestación, pero sí en la formación del vínculo de pareja y en el cuidado a las crías. De esta manera, los cambios conductuales que observamos van en la misma dirección: reducir la inversión en las crías. A pesar de no encontrar los cambios en la conducta sexual que se observan en otras especies, observamos los mismos cambios generales en la estrategia reproductiva.

## 12.5 LA COHABITACIÓN CON CÓPULA NO INDUCE UN CAMBIO EN LA PREFERENCIA DE LUGAR

### CONDICIONADA EN MACHOS MONOPARENTALES Y ESTOS NO FORMAN EL VÍNCULO DE PAREJA

En nuestro grupo de investigación demostramos que la cohabitación con cópula induce un estado afectivo positivo en machos de topillo de la pradera, evaluado con una prueba de preferencia de lugar condicionada. Este estado de reforzamiento depende de los opioides endógenos, ya que la administración de un antagonista no selectivo de los receptores de opioides como la naloxona antes de la cohabitación inhibe los estados afectivos positivos inducidos por la conducta sexual (Ulloa *et al.*, 2018).

Como se ha explicado previamente, se ha propuesto que la activación del Pálido ventral (PV) es necesaria para formar el vínculo de pareja. Este dirige conductas motivadas a través de proyecciones al tálamo y a los núcleos motores. El PV es activado por proyecciones glutamatérgicas y vasopresinérgicas provenientes de la amígdala (Am) y es inhibido por proyecciones GABAérgicas de las neuronas medias espinosas del NA. El NA a su vez recibe proyecciones oxitocinérgicas del NPV y dopaminérgicas del AVT, lo que se conoce como vía mesolímbica dopaminérgica. Se ha propuesto que, durante la cópula, la oxitocina y la dopamina interactúan en el NA, generando una inhibición sobre las neuronas medias espinosas, que a su vez estaban inhibiendo al PV. Este proceso hace que el PV sea más sensible a ser activado por las proyecciones amigdalinas que responden a los estímulos de la pareja. Finalmente, estas últimas proyecciones podrían reforzarse selectivamente, formando una memoria social específica de la pareja (Numan y Young, 2016; Numan, 2014; Walum y Young, 2018).

Una vez que el proceso ya se ha establecido, las proyecciones de la Am serían capaces de activar el PV en ausencia de cópula, haciendo que las señales de la pareja fueran

reforzantes por sí mismas y resultando en una preferencia por la pareja sexual (Lim y Young, 2004; Numan y Young, 2016; Walum y Young, 2018). De acuerdo con esta hipótesis, nuestro grupo ha encontrado que la conectividad funcional entre la Am y el PV correlaciona con el índice de preferencia de pareja en topillos de la pradera (López-Gutiérrez, 2021). De esta forma, la formación del vínculo de pareja sería un proceso de aprendizaje donde los estímulos de la pareja se asociarían con el reforzamiento sociosexual inducido por la cohabitación y la cópula.

De esta manera, nuestros datos demuestran que, en machos criados en familias biparentales, la cohabitación con cópula induce un estado afectivo positivo asociado a un contexto (prueba de preferencia de lugar condicionada, PLC). Sin embargo, en machos de familias monoparentales, este procedimiento no induce un cambio en la preferencia de lugar. Además, los machos biparentales que cohabitaron y copularon durante la prueba de PLC formaron vínculos de pareja, no así los machos criados en familias monoparentales. Finalmente, hay una correlación positiva entre ambas variables, por lo que al parecer el mecanismo causal del cambio en la preferencia de lugar es el reforzamiento que induce la cohabitación con la pareja.

Proponemos que, en los machos criados en familias biparentales, los efectos reforzantes de la cohabitación con cópula generan que formen un vínculo de pareja, este proceso puede deberse a una mayor desinhibición del VP asociada a la cópula. De esta forma, nuestros resultados se integran en el modelo propuesto por Michael Numan (2014) y corroboran la hipótesis de que el vínculo de pareja es un proceso de reforzamiento social.

En lo referente a los vínculos de pareja, observamos que los topillos criados en familias biparentales prefieren a su pareja sexual sobre una hembra extraña. En cambio, los machos monoparentales muestran todas las posibles estrategias, desde preferir a su pareja sexual, no tener preferencia, hasta preferir a la hembra extraña. Este tipo de variabilidad interindividual es común en esta especie y parece estar relacionada con los receptores a oxitocina. Por ejemplo, se ha reportado que las hembras con alta concentración de receptores a oxitocina en el estriado son resilientes al efecto del aislamiento neonatal sobre la formación del vínculo de pareja (Barret *et al.*, 2015). Sin embargo, estos estudios no se han realizado en machos, pero en base a nuestros resultados proponemos que los machos monoparentales que formaron rápidamente el vínculo de pareja podrían ser resilientes a la falta de cuidados paternos gracias a una alta densidad de receptores a oxitocina.

De la misma manera, esta variabilidad es de alto interés adaptativo para los topillos de la pradera, de forma que podrían adaptarse y formar vínculos de pareja rápidamente si las condiciones ambientales lo favorecen, ya que esta estrategia sigue presente en muchos de los animales.

Por otro lado, es importante notar que los machos realizaron la prueba de preferencia de pareja después de 18 h de cohabitar con cópula, pero la interacción con la hembra fue intermitente y la prueba se realizó 6 días después de la primera interacción. Desconocíamos si este protocolo induciría la formación de un vínculo de pareja en los machos criados en familias monoparentales, que habrían estado expuestos solo por 18 horas, pero durante muchos días. Sin embargo, parece que es el tiempo total de interacción lo que determina la formación del vínculo de pareja, que requeriría de una

cohabitación conjunta durante largos periodos. Este punto es importante porque, tal como describieron Getz y Hoffman (1986), los topillos visitan nidos ajenos, a los que regresan tras unos días. Nuestros resultados indican que estos breves viajes pueden resultar en la formación de un vínculo de pareja en topillos de familias biparentales, pero en los topillos monoparentales representarían solamente cópula ocasional y requerirían más interacción para establecer el vínculo de pareja.

Finalmente, nuestro grupo demostró previamente que la cohabitación con cópula no induce un cambio en la preferencia de lugar condicionada en hembras, posiblemente porque la prueba no es suficientemente sensible o porque el reforzamiento no se extiende al contexto (Ulloa *et al.*, 2018). En cambio, Goodwin *et al.* (2019) demostraron que la cohabitación con la pareja sexual puede inducir preferencia de lugar condicionada en hembras. Sin embargo, existen numerosas diferencias entre nuestras metodologías. En primer lugar, en el estudio de Goodwin el macho con el cual cohabitaron era su pareja desde hacía meses y habían procreado varias camadas juntos. De esta forma, sus experimentos no dan información sobre la formación del vínculo de pareja sino sobre la etapa en la que ya está consolidado. Además, las hembras cohabitaron con el macho durante 12 h. Asimismo, durante el condicionamiento utilizaron el aserrín de su nido como pista contextual, de forma que el reforzamiento se asocia también a su propio hogar.

En cambio, Getz y Hofmann (1986) describieron que los machos son los visitantes más comunes de nidos ajenos, pero esta conducta no es habitual en hembras. Típicamente las hembras residen en un nido, donde son visitadas por los machos. En esta situación el aprendizaje contextual es muy importante para los machos, que deben recordar las

referencias contextuales y el camino al nido, lo que explica porque es fácil reforzarles contextualmente. En cambio, estas claves no son muy relevantes para las hembras, que podrían estar en su propio nido. De esta forma, incluso cuando la cohabitación con cópula es probablemente reforzante de alguna forma para las hembras, esta no se extiende al contexto. De acuerdo con esta propuesta, en el topillo de la pradera macho se observa un incremento en la proliferación celular en el giro dentado, que se relaciona con el aprendizaje contextual, después de 48 h de cohabitación con hembras (Castro *et al.*, 2020) pero las hembras no muestran cambios en la proliferación celular después de 48 h de exposición a machos (Fowler *et al.*, 2002). De esta forma, estas células nuevas podrían estar relacionadas con el aprendizaje contextual en el topillo macho.

## **12.6 SIGNIFICADO BIOLÓGICO DEL CAMBIO EN LA ESTRATEGIA EN LOS TOPILLOS DE LA PRADERA QUE RECIBEN MENOS CUIDADOS**

Como propuso Getz (1978) y fue discutido posteriormente por Perkeybile y Bales (2017) la estrategia monógama/polígama de los topillos de la pradera podría variar junto a sus fluctuaciones poblacionales. En bajas densidades poblacionales, la monogamia social y el alto cuidado parental podrían ayudar a evitar la endogamia y el derroche de recursos. En cambio, en altas densidades poblacionales la endogamia puede ser fácilmente evitada y se esperaría una menor inversión parental. En concordancia, las parejas monógamas son encontradas más comúnmente en bajas densidades poblacionales (Getz y Hofmann, 1986). Para adaptarse rápidamente a los cambios ambientales, es necesario que los animales sean capaces de variar su estrategia reproductiva en pocas generaciones, o incluso de una generación a otra. Este tipo de mecanismos se han

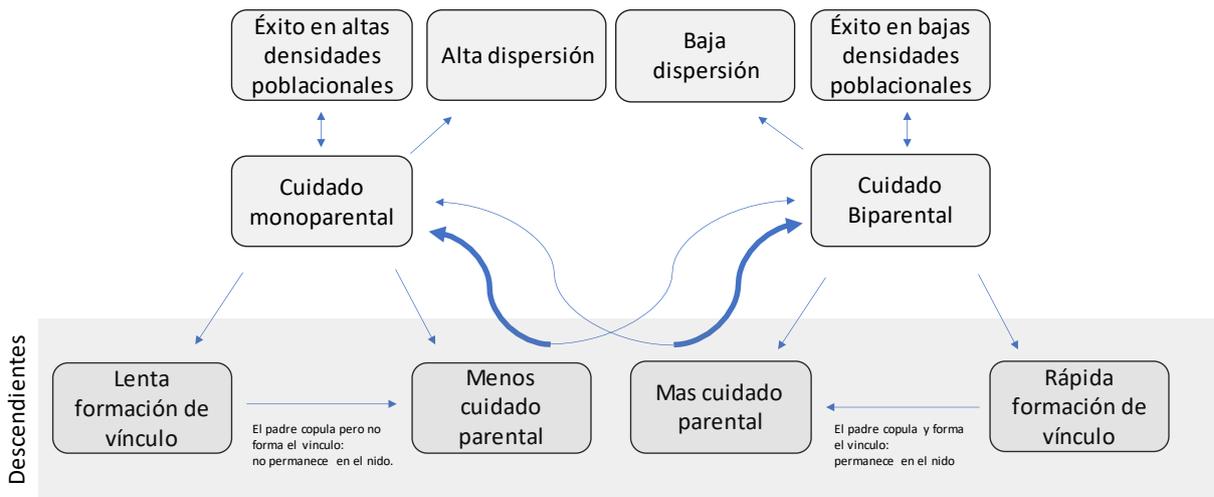
discutido previamente en esta tesis, ya que el cuidado parental modula la conducta adulta y se transmite no-genómicamente a las crías.

Así pues, el cuidado parental induce cambios en el comportamiento de las crías mediante modificaciones epigenéticas y otros cambios de plasticidad cerebral (Stolzenberg y Champagne, 2016). Además, estos se perpetúan, ya que las madres que invierten mucho en sus crías a través del cuidado parental tienen crías que también realizan más cuidados parentales cuando llegan a la edad adulta (Fleming, 2002; Meaney, 2001; Champagne, 2011).

Sin embargo, gracias a la gran variabilidad interindividual, los animales podrían cambiar la estrategia predominante en la población de una generación a otra. Así pues, esta estrategia reproductiva es muy flexible y se modula con las condiciones ambientales en que han sido criados de una forma poco estricta, como representamos en la figura 12. Esto lo podemos observar en nuestro estudio ya que algunos machos biparentales no forman el vínculo rápidamente y, de la misma manera, algunos monoparentales si lo hacen. De esta forma la población puede adaptarse fácilmente a los cambios en el hábitat en función de cuál de las conductas expresadas en la población sea más eficaz en cada momento. De esta manera los topillos serían muy resilientes a las variaciones

ambientales, a pesar de que estas resultan en drásticos cambios poblacionales cíclicos (Getz, 1978).

Figura 12: Cambios en las estrategias reproductivas intergeneracionales en topillos de la pradera. La estrategia de no monogamia social tiene un alto éxito en altas densidades poblacionales y favorece la



dispersión de las crías. Los descendientes de estas familias reciben menos cuidados y forman más lentamente el vínculo, de forma que la mayoría de las crías perpetuará este modelo al no permanecer con la pareja después de la cópula. Aunque algunos sujetos si formarán el vínculo de pareja y pasarán a la estrategia de monogamia social. La monogamia social se favorece en bajas densidades poblacionales con poca dispersión. Los descendientes de este tipo de familias reciben más cuidado parental y forman rápidamente el vínculo de pareja, de manera que sus crías despliegan monogamia social en la edad adulta. De la misma manera, algunos no forman rápidamente el vínculo y podrían pasar a la estrategia de no monogamia social.

## **12.7 LOS MACHOS BIPARENTALES MUESTRAN UN INCREMENTO EN EL METABOLISMO DOPAMINÉRGICO EN EL NÚCLEO ACCUMBENS**

La DA se metaboliza en DOPAC y este producto en HVA (Pycock y Taberner, 1981), las relaciones DOPAC/DA o HVA/DA se utilizan como medida de la liberación y utilización de DA (Blackburn *et al.*, 1989). Las proyecciones dopaminérgicas del área ventral tegmental liberan DA en el NA en respuesta a diversas conductas motivadas, como el acicalamiento de las crías o la cópula (Shahrokh *et al.*, 2010; Aragona *et al.*, 2003). Esta liberación, junto a la de otros neurotransmisores como la oxitocina o los opioides endógenos, codifica la recompensa y el valor hedónico de estas conductas (Liu y Wang, 2003; Resendez *et al.*, 2013).

Se ha propuesto que la formación del vínculo de pareja es una forma de aprendizaje de tipo recompensante ya que tanto su formación como su mantenimiento dependen de múltiples áreas del circuito de reforzamiento (Liu y Wang, 2003; Liu *et al.*, 2011; Burkett *et al.*, 2011; Resendez *et al.*, 2013, 2016; Aragona *et al.*, 2006; Lim y Young 2004, Lim *et al.*, 2004). Aragona *et al.*, (2003) demostraron que la liberación de DA en el NA es necesaria para la formación del vínculo de pareja. En la misma línea, la administración de apomorfina en el NA, un agonista de DA, acelera la formación del vínculo, pero este efecto no aparece si se administra en el estriado dorsal. Por otro lado, hay evidencia de un incremento en la actividad de receptores D2 en el NA después de la formación del vínculo de pareja, pero no en el estriado dorsal (Aragona *et al.*, 2006).

Dado que la cohabitación con cópula induce estados afectivos positivos en machos criados en familias biparentales, pero no en los monoparentales, hipotetizamos que encontraríamos un incremento en el metabolismo dopaminérgico en el NA, pero no en

el estriado dorsal, que sería exclusivo de los machos criados en familias biparentales. Nuestros datos muestran que las concentraciones de DA y HVA no varían entre machos criados en familias biparentales o monoparentales. Además, tampoco cambian en animales que cohabitaron con cópula por 6 h en relación con los sujetos control. Sin embargo, encontramos un incremento general en el metabolismo dopaminérgico en el NA en los machos biparentales en comparación con los machos monoparentales. Este cambio podría deberse al incremento de las concentraciones basales de DOPAC, que indicarían una mayor liberación y utilización de dopamina. Estos datos sugieren que la rápida formación del vínculo de pareja en machos criados en familias biparentales podría estar relacionada con la mayor utilización de DA en el NA. Dado que este cambio en el metabolismo de la DA no depende de la cohabitación con cópula, hipotetizamos que está relacionado con otras conductas motivadas, como la conducta parental, que también varía en topillos biparentales (Ahern *et al.*, 2011).

Con respecto a la serotonina, esta está relacionada con la conducta parental (Villalba *et al.*, 1997), puede modular la liberación de DA (Yadid *et al.*, 1994; Zhou *et al.*, 2005) e intervenir en la recompensa de interacciones sociales (Dolen *et al.*, 2013). Por lo que evaluamos si tenía una función en la formación de vínculos de pareja. Nuestros datos muestran que no hay diferencias en la serotonina o en su metabolito 5-HIAA en el NA o el estriado dorsal entre machos criados en familias biparentales y monoparentales. Además, la cohabitación con cópula tampoco los modifica. Estos resultados concuerdan con otros estudios que muestran que la formación de vínculos de pareja y la cópula no conllevan cambios en el sistema serotoninérgico (Walum y Young, 2018; Aragona *et al.*, 2003). Nuestros datos apoyan que la serotonina no tiene una función específica en la formación del vínculo de pareja en topillos de la pradera.

## **12.8 EL CUIDADO CON DOS CUIDADORES Y EL ENRIQUECIMIENTO CON LOS OLORES DEL PADRE RESULTA EN CAMBIOS SEXUALMENTE DIMÓRFICOS EN LA FORMACIÓN DEL VÍNCULO DE PAREJA**

Rogers y Bales (2019) demostraron que las hembras de topillo de la pradera criadas por su madre y una hembra ayudante forman vínculos de pareja en el mismo tiempo que las hembras criadas por sus dos progenitores. Sin embargo, los machos criados por dos hembras no forman el vínculo de pareja después de 24 h de cohabitación. De esta forma, los cuidados del padre influyen en la formación del vínculo de pareja de sus crías macho de alguna forma en particular (Roger y Bales, 2019). Si bien la estimulación somatosensorial de la madre resulta en cambios conductuales en la descendencia (Champagne, 2011; Fleming *et al.*, 2002; Barret *et al.*, 2015), nadie ha tenido en cuenta el efecto de las señales olfatorias que aporta el padre.

Varios grupos de investigación han reportado que existe un aprendizaje olfativo temprano de los olores de la madre (Wilson y Sullivan, 1994; Sullivan *et al.*, 2000, Shah *et al.*, 2002; Moriceau y Sullivan, 2004). Si este aprendizaje tiene efectos en el comportamiento de las crías en la vida adulta ha sido una pregunta ignorada durante las últimas décadas. En cambio, Shah *et al.*, 2002 demostraron en el modelo de la rata que, si se impregna esencia de limón en el vientre de la madre, sus crías muestran una preferencia por este olor en la adolescencia. Además, estas crías realizan más cuidados parentales a sus propias crías si las impregnan con la misma esencia. Es importante mencionar que, si a las crías se les presentaba la esencia de limón fuera del contexto del nido, este efecto desaparecía. Por otro lado, Fillion y Blass (1986) mostraron que los machos criados por madres impregnadas de un aroma muestran una preferencia por hembras impregnadas con el mismo. Así pues, el aprendizaje olfativo podría generar cambios en los circuitos cerebrales, lo que resultaría en modificaciones conductuales en

la edad adulta. A pesar de estas evidencias, si los olores del padre tienen una influencia relevante en las conductas de las crías es una pregunta que, en nuestro conocimiento, ningún grupo ha evaluado.

En el presente estudio evaluamos los efectos de la crianza por dos hembras y los cuidados en familias monoparentales expuestos a los olores del padre impregnados en el aserrín de su caja hogar. Nuestros resultados demuestran que la crianza con dos cuidadores, independientemente del sexo de estos, incrementa los cuidados recibidos por las crías. Por otro lado, la exposición a los olores del padre no afecta a la conducta de las madres de familias monoparentales, por lo que las conductas de estas no parecen ser el mecanismo de los cambios que observamos en las crías.

A diferencia de los estudios de Rogers y Bales (2019), ni nuestros machos ni nuestras hembras criadas en familias bimarentales forman el vínculo después de 24 h de cohabitación con cópula. Sin embargo, como hemos discutido previamente, las madres y hembras ayudantes que usaban Rogers y Bales son multíparas, de forma que su cuidado parental no es comparable al de nuestras hembras. Además, nuestro protocolo experimental utiliza animales que copularon desde el primer momento de cohabitación, a diferencia de lo realizado por Ahern y Young (2009) y Rogers y Bales (2019). De esta forma, debemos ser cautos a la hora de interpretar estos resultados y esperar confirmaciones independientes, con los mismos procedimientos experimentales, para poder concluir con certeza que tipo de influencia tiene el enriquecimiento parental con dos hembras como cuidadoras en los topillos de la pradera.

Por otro lado, encontramos que las hembras criadas en familias monoparentales enriquecidas con olores del padre formaron el vínculo de pareja 24 h después de la

cohabitación con cópula, al igual que las hembras criadas en familias biparentales. Así pues, parece ser que es la influencia olfativa del padre lo que determina la rapidez en la formación del vínculo en hembras de topillo de la pradera, ya que las hembras biparentales también están expuestas a estos olores. Como se ha explicado previamente, la formación del vínculo de pareja es un proceso que requiere de la asociación de los estímulos de la pareja con las propiedades reforzantes de la cohabitación con cópula. Numan (2014) propone que las sinapsis que responden a la pareja y proyectan al PV se ven fortalecidas al activarse los circuitos de reforzamiento gracias a la cópula, lo que resultaría en que las primeras serían capaces de activar el PV sin ayuda de la cópula. Debido a la influencia de los olores del padre en la formación del vínculo, es posible que la exposición temprana a los olores del macho genere cambios persistentes en el circuito BO – Am – PV que faciliten la respuesta a los olores de la pareja macho y la rápida formación del vínculo una vez que las hembras sean adultas. Algunos estudios en rata apoyan esta hipótesis, ya que los circuitos que procesan información olfatoria se modifican por aprendizajes tempranos (Leon *et al.*, 1987; Woo *et al.*, 1987). Además, las células que procesan información olfatoria son más responsivas si han sido expuestas previamente a dichos olores (Leon y Rangel, 1995; Sullivan *et al.*, 2000). De esta manera, serían los olores, y no necesariamente el cuidado parental, el mecanismo de cambio comportamental en hembras de topillo de la pradera.

Con respecto a los machos, nos encontramos con un resultado sorprendente. Tanto en los experimentos de Rogers y Bales (2019), Ahern *et al.*, (2011), como en nuestro experimento 4, los machos criados en familias biparentales, monoparentales y bimarentales no prefieren a su pareja, pero tampoco a la hembra extraña. En cambio, los topillos macho criados en una familia monoparental enriquecidos con los olores del

padre muestran una clara preferencia por la hembra extraña. Además, esta preferencia se mantiene después de una semana de cohabitación (datos no mostrados, n=7). Desde el punto de vista de las crías, este tipo de estimulación podría estar indicando la presencia de machos nómadas cercanos que no forman vínculos de pareja. Getz y Carter (1996) describen que aproximadamente el 40% de los machos son nómadas en el campo. De nuestros machos criados en familias monoparentales, aproximadamente el 40% prefiere la compañía de la hembra extraña, lo que sube a aproximadamente al 60% en los machos criados en familia monoparentales enriquecidos con el olor del padre. Una hipótesis plausible sería que estos machos que prefieren explorar a la hembra extraña serían similares a los machos nómadas. Es posible que estos machos estén adoptando esta táctica para imitar a la estrategia predominante en el ambiente, como discuten Madrid *et al.* (2020).

Los datos del grupo monoparental enriquecido con olores del padre abren numerosas e interesantes preguntas de investigación. Por ejemplo, es necesario evaluar si los cambios en el vínculo de pareja dependen del olor del padre o si son sustituibles por los de cualquier otro macho con experiencia sexual. Por otro lado, es necesario un control con olores no-sexualmente relevantes, ya que es posible que sea el enriquecimiento olfatorio en sí mismo lo que facilita la activación de las vías olfatorias. También se requiere determinar si otras conductas socio-sexuales como la conducta aloparental/parental están modificadas ya que nuestra hipótesis es que existe un cambio sinérgico en la estrategia reproductiva.

## 13 CONCLUSIÓN

---

En el presente trabajo analizamos la influencia del padre, sus cuidados y estímulos olfatorios sobre las crías de topillo de la pradera. Confirmamos que las madres monoparentales no compensan la ausencia del padre, de forma que cuando los topillos se crían por un solo progenitor reciben menos acicalamiento. Esta reducción de cuidados no se traduce en déficits en el desarrollo como la apertura de los ojos, el despliegue de las orejas y el peso corporal. La ausencia del cuidado paterno tampoco induce cambios conductuales que afecten la preferencia por olores sexualmente relevantes o a la conducta sexual en sus aspectos apetitivos o consumatorios. Interesantemente, la cohabitación con cópula durante 18 h induce un estado reforzante y la formación de un vínculo de pareja en los machos criados en familias biparentales, pero no en los machos criados en familias monoparentales. Estas diferencias pueden deberse a que el metabolismo dopaminérgico está incrementado en el NA de los machos biparentales. Finalmente, demostramos que los topillos criados por dos cuidadores reciben más cuidados, independientemente del sexo del cuidador adicional. Sin embargo, ni machos y hembras criados en familias biparentales forman vínculos de pareja en 24 horas, mientras que las hembras criadas en familias monoparentales enriquecidas con el olor de su padre forman vínculo de pareja en el mismo tiempo que las criadas en familias biparentales. Sorprendentemente, los machos de familias monoparentales enriquecidas con los olores del padre muestran una preferencia por la hembra extraña en lugar de por la pareja.

## 14 REFERENCIAS

---

- Ahern, T. H., Hammock, E. A., & Young, L. J. (2011). Parental division of labor, coordination, and the effects of family structure on parenting in monogamous prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Developmental Psychobiology*, *53*(2), 118-131. doi:10.1002/dev.20498 [doi]
- Ahern, T. H., & Young, L. J. (2009). The impact of early life family structure on adult social attachment, alloparental behavior, and the neuropeptide systems regulating affiliative behaviors in the monogamous prairie vole (*Microtus ochrogaster*). *Front. Behav. Neurosci.*, *3*:17. doi, 17. doi:10.3389/neuro.08.017.2009 [doi]
- Allen, M., & Burrell, N. (1996). Comparing the impact of homosexual and heterosexual parents on children: Meta-analysis of existing research. *Journal of Homosexuality*, *32*(2), 19-35. doi:10.1300/j082v32n02\_02 [doi]
- Aragona, B. J., Detwiler, J. M., & Wang, Z. (2007). Amphetamine reward in the monogamous prairie vole. *Neuroscience Letters*, *418*(2), 190-194. doi:S0304-3940(07)00311-4 [pii]; 10.1016/j.neulet.2007.03.019 [doi]
- Aragona, B. J., Liu, Y., Curtis, J. T., Stephan, F. K., & Wang, Z. (2003). A critical role for nucleus accumbens dopamine in partner-preference formation in male prairie voles. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *23*(8), 3483-3490. doi:23/8/3483 [pii]

- Aragona, B. J., Liu, Y., Yu, Y. J., Curtis, J. T., Detwiler, J. M., Insel, T. R., & Wang, Z. (2006). Nucleus accumbens dopamine differentially mediates the formation and maintenance of monogamous pair bonds. *Nature Neuroscience*, *9*(1), 133-139. doi:nn1613 [pii]; 10.1038/nn1613 [doi]
- Arias Del Razo, R., & Bales, K. L. (2016). Exploration in a dispersal task: Effects of early experience and correlation with other behaviors in prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Behavioural Processes*, *132*:66-75. doi, 66-75. doi:S0376-6357(16)30282-0 [pii]; 10.1016/j.beproc.2016.10.002 [doi]
- Barrett, C. E., Arambula, S. E., & Young, L. J. (2015). The oxytocin system promotes resilience to the effects of neonatal isolation on adult social attachment in female prairie voles. *Transl. Psychiatry*, *5*:e606. doi, e606. doi:tp201573 [pii]; 10.1038/tp.2015.73 [doi]
- Batzli, G. O., Getz, L. L., & Hurley, S. S. (1977). Suppression of growth and reproduction of microtine rodents by social factors. *Journal of Mammalogy*, *58*(4), 583-591.
- Blackburn, J. R., Phillips, A. G., Jakubovic, A., & Fibiger, H. C. (1989). Dopamine and preparatory behavior: II. A neurochemical analysis. *Behavioral Neuroscience*, *103*(1), 15-23. doi:10.1037//0735-7044.103.1.15 [doi]
- Brady, D., & Burroway, R. (2012). Targeting, universalism, and single-mother poverty: A multilevel analysis across 18 affluent democracies. *Demography*, *49*(2), 719-746. doi:10.1007/s13524-012-0094-z [doi]

- Burkett, J. P., Spiegel, L. L., Inoue, K., Murphy, A. Z., & Young, L. J. (2011). Activation of  $\mu$ -opioid receptors in the dorsal striatum is necessary for adult social attachment in monogamous prairie voles. *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, *36*(11), 2200-2210. doi:npp20111117 [pii]; 10.1038/npp.2011.117 [doi]
- Caldji, C., Tannenbaum, B., Sharma, S., Francis, D., Plotsky, P. M., & Meaney, M. J. (1998). Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(9), 5335-5340.
- Cameron, N. M., Fish, E. W., & Meaney, M. J. (2008). Maternal influences on the sexual behavior and reproductive success of the female rat. *Hormones and Behavior*, *54*(1), 178-184.
- Cameron, N., Del Corpo, A., Diorio, J., McAllister, K., Sharma, S., & Meaney, M. J. (2008). Maternal programming of sexual behavior and hypothalamic-pituitary-gonadal function in the female rat. *PLoS One*, *3*(5), e2210. doi:07-PONE-RA-03062R1 [pii]; 10.1371/journal.pone.0002210 [doi]
- Carelli, R. M. (2004). Nucleus accumbens cell firing and rapid dopamine signaling during goal-directed behaviors in rats. *Neuropharmacology*, *47*, 180-189.
- Carter, C. S., Devries, A. C., & Getz, L. L. (1995). Physiological substrates of mammalian monogamy: The prairie vole model. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *19*(2), 303-314.

Carter, C. S., & Getz, L. L. (1993). Monogamy and the prairie vole. *Scientific American*, 268(6), 100-106.

Carter, C. S., Getz, L. L., Gavish, L., McDermott, J. L., & Arnold, P. (1980). Male-related pheromones and the activation of female reproduction in the prairie vole (*Microtus ochrogaster*). *Biology of Reproduction*, 23(5), 1038-1045. doi:10.1095/biolreprod23.5.1038 [doi]

Carter, C. S., Witt, D. M., Schneider, J., Harris, Z. L., & Volkening, D. (1987). Male stimuli are necessary for female sexual behavior and uterine growth in prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Hormones and Behavior*, 21(1), 74-82. doi:10.1016/0018-506x(87)90032-8 [doi]

Castro, A., Young, L., Camacho, F., Paredes, R., Diaz, N., & Portillo, W. (2020). Effects of mating and social exposure on cell proliferation in the adult male prairie vole (*Microtus ochrogaster*). *Neural Plasticity*, 2020

Champagne, F., Diorio, J., Sharma, S., & Meaney, M. J. (2001). Naturally occurring variations in maternal behavior in the rat are associated with differences in estrogen-inducible central oxytocin receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(22), 12736-12741. doi:10.1073/pnas.221224598 [doi]

Champagne, F. A. (2011). Maternal imprints and the origins of variation. *Hormones and Behavior*, 60(1), 4-11. doi:S0018-506X(11)00057-2 [pii]; 10.1016/j.yhbeh.2011.02.016 [doi]

- Champagne, F. A., Francis, D. D., Mar, A., & Meaney, M. J. (2003). Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. *Physiology & Behavior, 79*(3), 359-371. doi:S0031938403001495 [pii]; 10.1016/s0031-9384(03)00149-5 [doi]
- Crowl, A., Ahn, S., & Baker, J. (2008). A meta-analysis of developmental outcomes for children of same-sex and heterosexual parents. *Journal of GLBT Family Studies, 4*(3), 385-407. doi:10.1080/15504280802177615
- Curtis, J. T., Liu, Y., & Wang, Z. (2001). Lesions of the vomeronasal organ disrupt mating-induced pair bonding in female prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Brain Research, 901*(1-2), 167-174. doi:S0006-8993(01)02343-5 [pii]; 10.1016/s0006-8993(01)02343-5 [doi]
- Cushing, B. S., Razzoli, M., Murphy, A. Z., Epperson, P. M., Le, W. W., & Hoffman, G. E. (2004). Intraspecific variation in estrogen receptor alpha and the expression of male sociosexual behavior in two populations of prairie voles. *Brain Research, 1016*(2), 247-254. doi:S0006899304007346 [pii]; 10.1016/j.brainres.2004.05.010 [doi]
- Dolen, G., Darvishzadeh, A., Huang, K. W., & Malenka, R. C. (2013). Social reward requires coordinated activity of nucleus accumbens oxytocin and serotonin. *Nature, 501*(7466), 179-184. doi:nature12518 [pii]; 10.1038/nature12518 [doi]
- Ellis, B. J., Bates, J. E., Dodge, K. A., Fergusson, D. M., Horwood, L. J., Pettit, G. S., & Woodward, L. (2003). Does father absence place daughters at special risk for early

sexual activity and teenage pregnancy? *Child Development*, 74(3), 801-821.  
doi:10.1111/1467-8624.00569 [doi]

Feinberg, M. E. (2002). Coparenting and the transition to parenthood: A framework for prevention. *Clinical Child and Family Psychology Review*, 5(3), 173-195.

Ferkin, M. H., Leonard, S. T., Bartos, K., & Schmick, M. K. (2001). Meadow voles and prairie voles differ in the length of time they prefer the top-scent donor of an over-mark. *Ethology*, 107(12), 1099-1114. doi:10.1046/j.1439-0310.2001.00745.x

Fillion, T. J., & Blass, E. M. (1986). Infantile experience with suckling odors determines adult sexual behavior in male rats. *Science (New York, N.Y.)*, 231(4739), 729-731.  
doi:10.1126/science.3945807 [doi]

Fleming, A. S., Kraemer, G. W., Gonzalez, A., Lovic, V., Rees, S., & Melo, A. (2002). Mothering begets mothering: The transmission of behavior and its neurobiology across generations. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 73(1), 61-75.  
doi:S0091305702007931 [pii]; 10.1016/s0091-3057(02)00793-1 [doi]

Fowler, C. D., Liu, Y., Ouimet, C., & Wang, Z. (2002). The effects of social environment on adult neurogenesis in the female prairie vole. *Journal of Neurobiology*, 51(2), 115-128. doi:10.1002/neu.10042 [pii]; 10.1002/neu.10042 [doi]

Francis, D., Diorio, J., Liu, D., & Meaney, M. J. (1999). Nongenomic transmission across generations of maternal behavior and stress responses in the rat. *Science*, 286(5442), 1155-1158. doi:7973 [pii]; 10.1126/science.286.5442.1155 [doi]

- Getz, L. (1978). Speculation on social structure and population cycles of microtine rodents. *Biologist*, 60(4), 134.
- Getz, L., McGuire, B., Hofmann, J., Pizzuto, T., & Frase, B. (1994). Natal dispersal and philopatry in prairie voles (*Microtus ochrogaster*): Settlement, survival, and potential reproductive success. *Ethology Ecology & Evolution*, 6(3), 267-284.
- Getz, L. L., & Carter, C. S. (1996). Prairie-vole partnerships. *American Scientist*, 84(1), 56-62.
- Getz, L. L., Dluzen, D., & McDermott, J. L. (1983). Suppression of reproductive maturation in male-stimulated virgin female *Microtus* by a female urinary chemosignal. *Behavioural Processes*, 8(1), 59-64.
- Getz, L. L., & Hofmann, J. E. (1986). Social organization in free-living prairie voles, *Microtus ochrogaster*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 18(4), 275-282.
- Getz, L. L., Hofmann, J. E., & Carter, C. S. (1987). Mating system and population fluctuations of the prairie vole, *Microtus ochrogaster*. *American Zoologist*, 27(3), 909-920.
- Getz, L. L., McGuire, B., Pizzuto, T., Hofmann, J. E., & Frase, B. (1993). Social organization of the prairie vole (*Microtus ochrogaster*). *Journal of Mammalogy*, 74(1), 44-58.
- Getz, L. L., McGuire, B., Pizzuto, T., Hofmann, J. E., & Frase, B. (1993). Social organization of the prairie vole (*Microtus ochrogaster*). *Journal of Mammalogy*, 74(1), 44-58.

- Gier, H. T., & Cooksey, B. F. (1967). *Microtus ochrogaster* in the laboratory. *Transactions of the Kansas Academy of Science (1903-),* 70(2), 256-265.
- Glowinski, J. (1966). Regional studies of catecholamines in the rat brain. *J Neurochem,* 13, 655-669.
- Gonzalez, A., Lovic, V., Ward, G. R., Wainwright, P. E., & Fleming, A. S. (2001). Intergenerational effects of complete maternal deprivation and replacement stimulation on maternal behavior and emotionality in female rats. *Developmental Psychobiology,* 38(1), 11-32. doi:10.1002/1098-2302(2001)38:1<11::AID-DEV2>3.0.CO;2-B [pii]; 10.1002/1098-2302(2001)38:1<11::aid-dev2>3.0.co;2-b [doi]
- Goodwin, N. L., Lopez, S. A., Lee, N. S., & Beery, A. K. (2019). Comparative role of reward in long-term peer and mate relationships in voles. *Hormones and Behavior,* 111:70-77. doi:10.1016/j.yhbeh.2018.10.012 [doi]
- Goto, Y., & Grace, A. A. (2005). Dopaminergic modulation of limbic and cortical drive of nucleus accumbens in goal-directed behavior. *Nature Neuroscience,* 8(6), 805-812.
- Gregg, B., & Thiessen, D. D. (1981). A simple method of olfactory discrimination of urines for the mongolian gerbil, *Meriones unguiculatus*. *Physiology & Behavior,* 26(6), 1133-1136. doi:10.1016/0031-9384(81)90221-3 [pii]; 10.1016/0031-9384(81)90221-3 [doi]
- Gromov, V. S. (2011). Biparental care, tactile stimulation and evolution of sociality in rodents. *Journal of Evolutionary Biology Research,* 3(4), 33-43.

- Gruder-Adams, S., & Getz, L. L. (1985). Comparison of the mating system and paternal behavior in *Microtus ochrogaster* and *M. pennsylvanicus*. *Journal of Mammalogy*, *66*(1), 165-167. doi:10.2307/1380976
- Gubernick, D. J., & Teferi, T. (2000). Adaptive significance of male parental care in a monogamous mammal. *Proc. Biol. Sci.*, *267*(1439), 147-150. doi:10.1098/rspb.2000.0979 [doi]
- Hall, E., & Kelson, K. R. (1959). *The mammals of north america*. 2 vols. Ronald Press.
- Halle, S. (2000). Voles—small graminivores with polyphasic patterns. *Activity patterns in small mammals* (pp. 191-215) Springer.
- Hardy, D. F., & DeBold, J. F. (1971). *The relationship between levels of exogenous hormones and the display of lordosis by the female rat* doi:[https://doi.org/10.1016/0018-506X\(71\)90003-1](https://doi.org/10.1016/0018-506X(71)90003-1)
- Hasler, M. J., & Nalbandov, A. (1974). The effect of weanling and adult males on sexual maturation in female voles (*Microtus ochrogaster*). *General and Comparative Endocrinology*, *23*(2), 237-238.
- Hayashi, S., & Kimura, T. (1974). Sex-attractant emitted by female mice. *Physiology & Behavior*, *13*(4), 563-567.
- Hennessy, M. B., Kaiser, S., & Sachser, N. (2009). Social buffering of the stress response: Diversity, mechanisms, and functions. *Frontiers in Neuroendocrinology*, *30*(4), 470-482.

- Horton, L. W., & Shepherd, B. A. (1979). Effects of olfactory bulb ablation on estrus-induction and frequency of pregnancy. *Physiology & Behavior*, 22(5), 847-850. doi:0031-9384(79)90326-3 [pii]; 10.1016/0031-9384(79)90326-3 [doi]
- House, J. S., Landis, K. R., & Umberson, D. (1988). Social relationships and health. *Science (New York, N.Y.)*, 241(4865), 540-545. doi:10.1126/science.3399889 [doi]
- Instituto nacional de estadística. (2018). Encuesta continua de hogares (ECH). [https://www.ine.es/prensa/ech\\_2018.Pdf](https://www.ine.es/prensa/ech_2018.Pdf),
- Jameson, E. W. (1946). *Natural History of the Prairie Vole (Mammalian Genus Microtus)*,
- Kappeler, P. M., & van Schaik, C. P. (2002). Evolution of primate social systems. *International Journal of Primatology*, 23(4), 707-740.
- Kasumovic, M. M. (2013). The multidimensional consequences of the juvenile environment: Towards an integrative view of the adult phenotype. *Animal Behaviour*, 85(5), 1049-1059.
- Kirkpatrick, B., Williams, J. R., Slotnick, B. M., & Carter, C. S. (1994). Olfactory bulbectomy decreases social behavior in male prairie voles (*M. ochrogaster*). *Physiology & Behavior*, 55(5), 885-889. doi:0031-9384(94)90075-2 [pii]; 10.1016/0031-9384(94)90075-2 [doi]
- Kleiman, D. G. (1977). Monogamy in mammals. *The Quarterly Review of Biology*, 52(1), 39-69. doi:10.1086/409721 [doi]

- Krein, S. F., & Beller, A. H. (1988). Educational attainment of children from single-parent families: Differences by exposure, gender, and race. *Demography*, *25*(2), 221-234.
- Laurent, G. (1999). A systems perspective on early olfactory coding. *Science (New York, N.Y.)*, *286*(5440), 723-728. doi:7929 [pii]
- Leon, M., Coopersmith, R., Lee, S., Sullivan, R. M., Wilson, D. A., & Woo, C. C. (1987). Neural and behavioral plasticity induced by early olfactory learning.
- Leon, M., & Johnson, B. A. (2003). Olfactory coding in the mammalian olfactory bulb. *Brain Research Reviews*, *42*(1), 23-32.
- Lepri, J. J., & Wysocki, C. J. (1987). Removal of the vomeronasal organ disrupts the activation of reproduction in female voles. *Physiology & Behavior*, *40*(3), 349-355. doi:0031-9384(87)90058-8 [pii]; 10.1016/0031-9384(87)90058-8 [doi]
- Lieberwirth, C., & Wang, Z. (2016). The neurobiology of pair bond formation, bond disruption, and social buffering. *Current Opinion in Neurobiology*, *40*, 8-13.
- Lim, M. M., Wang, Z., Olazábal, D. E., Ren, X., Terwilliger, E. F., & Young, L. J. (2004). Enhanced partner preference in a promiscuous species by manipulating the expression of a single gene. *Nature*, *429*(6993), 754-757. doi:nature02539 [pii]; 10.1038/nature02539 [doi]
- Lim, M. M., & Young, L. J. (2004). Vasopressin-dependent neural circuits underlying pair bond formation in the monogamous prairie vole. *Neuroscience*, *125*(1), 35-45. doi:10.1016/j.neuroscience.2003.12.008 [doi]; S0306452203009187 [pii]

- Liu, D., Diorio, J., Tannenbaum, B., Caldji, C., Francis, D., Freedman, A., . . . Meaney, M. J. (1997). Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science*, *277*(5332), 1659-1662.
- Liu, Y., & Wang, Z. X. (2003). Nucleus accumbens oxytocin and dopamine interact to regulate pair bond formation in female prairie voles. *Neuroscience*, *121*(3), 537-544. doi:S0306452203005554 [pii]; 10.1016/s0306-4522(03)00555-4 [doi]
- Liu, Y., Young, K. A., Curtis, J. T., Aragona, B. J., & Wang, Z. (2011). Social bonding decreases the rewarding properties of amphetamine through a dopamine D1 receptor-mediated mechanism. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *31*(22), 7960-7966. doi:31/22/7960 [pii]; 3698581 [pii]; 10.1523/JNEUROSCI.1006-11.2011 [doi]
- López-Gutiérrez, M. F., Gracia-Tabuenca, Z., Ortiz, J. J., Camacho, F. J., Young, L. J., Paredes, R. G., . . . Alcauter, S. (2021). Brain functional networks associated with social bonding in monogamous voles. *Elife*, *10*, e55081.
- Lukas, D., & Clutton-Brock, T. (2014). Costs of mating competition limit male lifetime breeding success in polygynous mammals. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *281*(1786), 20140418.
- Lukas, D., & Clutton-Brock, T. H. (2013). The evolution of social monogamy in mammals. *Science (New York, N.Y.)*, *341*(6145), 526-530. doi:10.1126/science.1238677 [doi]

- Lydell, K., & Doty, R. L. (1972). Male rat of odor preferences for female urine as a function of sexual experience, urine age, and urine source. *Hormones and Behavior*, 3(3), 205-212. doi:10.1016/0018-506x(72)90033-5 [doi]
- Madrid, J. E., Parker, K. J., & Ophir, A. G. (2020). Variation, plasticity, and alternative mating tactics: Revisiting what we know about the socially monogamous prairie vole. *Advances in the Study of Behavior*, 52, 203-242.
- Martin-Sanchez, A., Valera-Marin, G., Hernandez-Martinez, A., Lanuza, E., Martinez-Garcia, F., & Agustin-Pavon, C. (2015). Wired for motherhood: Induction of maternal care but not maternal aggression in virgin female CD1 mice. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 9:197. doi, 197. doi:10.3389/fnbeh.2015.00197
- Mateo, J., Holmes, W. G., Bell, A. M., & Turner, M. (1994). Sexual maturation in male prairie voles: Effects of the social environment. *Physiology & Behavior*, 56(2), 299-304.
- McGuire, B. (2001). A possible function of the preference for hind nipples in prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Journal of Comparative Psychology*, 115(4), 439.
- McGuire, B., Russell, K. D., Mahoney, T., & Novak, M. (1992). The effects of mate removal on pregnancy success in prairie voles (*Microtus ochrogaster*) and meadow voles (*Microtus pennsylvanicus*). *Biology of Reproduction*, 47(1), 37-42. doi:10.1095/biolreprod47.1.37 [doi]

- McGuire, B., Bemis, W. E. & Vermeulen, F. 2014. Parental behaviour of prairie voles (*Microtus ochrogaster*) and meadow voles (*M. pennsylvanicus*) in relation to sex of offspring. *Behaviour*, 151, 535-553.
- McGuire, B. (1988). Effects of cross-fostering on parental behavior of meadow voles (*Microtus pennsylvanicus*). *Journal of Mammalogy*, 69(2), 332-341.
- McLanahan, S. S. (1983). Family structure and stress: A longitudinal comparison of two-parent and female-headed families. *Journal of Marriage and the Family*, 45(2), 347-357. doi:10.2307/351513
- McLean, J. H., & Harley, C. W. (2004). Olfactory learning in the rat pup: A model that may permit visualization of a mammalian memory trace. *Neuroreport*, 15(11), 1691-1697. doi:00001756-200408060-00001 [pii]
- Meaney, M. J. (2001). Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Annual Review of Neuroscience*, 24(1), 1161-1192.
- Meaney, M. J. (2001). Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Annual Review of Neuroscience*, 24(1), 1161-1192.
- Mehta, M. A., Golembo, N. I., Nosarti, C., Colvert, E., Mota, A., Williams, S. C., . . . Sonuga-Barke, E. J. (2009). Amygdala, hippocampal and corpus callosum size following severe early institutional deprivation: The english and romanian adoptees study

pilot. *Journal of Child Psychology and Psychiatry, and Allied Disciplines*, 50(8), 943-951. doi:JCPP2084 [pii]; 10.1111/j.1469-7610.2009.02084.x [doi]

Miller, W. B., & Rodgers, J. L. (2001). *The ontogeny of human bonding systems: Evolutionary origins, neural bases, and psychological manifestations* Springer Science & Business Media.

Mock, D. W., & Fujioka, M. (1990). Monogamy and long-term pair bonding in vertebrates. *Trends in Ecology & Evolution*, 5(2), 39-43.

Moreno Ávila, C. L., Limón-Pacheco, J. H., Giordano, M., & Rodríguez, V. M. (2016). Chronic exposure to arsenic in drinking water causes alterations in locomotor activity and decreases striatal mRNA for the D2 dopamine receptor in CD1 male mice. *Journal of Toxicology*, 2016

Moriceau, S., & Sullivan, R. M. (2004). Unique neural circuitry for neonatal olfactory learning. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(5), 1182-1189. doi:10.1523/JNEUROSCI.4578-03.2004 [doi]

Mulder, M. B. (1988). The relevance of the polygyny threshold model to humans. *Human mating patterns* () Cambridge University Press, Cambridge.

Newman, K. S., & Halpin, Z. T. (1988). *Individual odours and mate recognition in the prairie vole, *Microtus ochrogaster** doi:https://doi.org/10.1016/S0003-3472(88)80117-9

Numan, M., & Insel, T. R. (2006). *The neurobiology of parental behavior* Springer Science & Business Media.

Numan, M., & Young, L. J. (2016). Neural mechanisms of mother-infant bonding and pair bonding: Similarities, differences, and broader implications. *Hormones and Behavior*, 77:98-112. doi, 98-112. doi:S0018-506X(15)00103-8 [pii]; 10.1016/j.yhbeh.2015.05.015 [doi]

Numan, M. (2014). *Neurobiology of social behavior: Toward an understanding of the prosocial and antisocial brain* Academic Press.

Ophir, A. G., Phelps, S. M., Sorin, A. B., & Wolff, J. O. (2008). Social but not genetic monogamy is associated with greater breeding success in prairie voles. *Animal Behaviour*, 75(3), 1143-1154.

Pedersen, C. A., Vadlamudi, S., Boccia, M. L., & Moy, S. S. (2011). Variations in maternal behavior in C57BL/6J mice: Behavioral comparisons between adult offspring of high and low pup-licking mothers. *Front.Psychiatry.*, 2:42. doi, 42. doi:10.3389/fpsyt.2011.00042 [doi]

Perkeybile, A. M., & Bales, K. L. (2017). Intergenerational transmission of sociality: The role of parents in shaping social behavior in monogamous and non-monogamous species. *The Journal of Experimental Biology*, 220(Pt 1), 114-123. doi:220/1/114 [pii]; JEB142182 [pii]; 10.1242/jeb.142182 [doi]

Perkeybile, A. M., Griffin, L. L., & Bales, K. L. (2013). Natural variation in early parental care correlates with social behaviors in adolescent prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Front.Behav.Neurosci.*, 7:21. doi, 21. doi:10.3389/fnbeh.2013.00021 [doi]

- Perry, A. N., Carter, C. S., & Cushing, B. S. (2016). Chronic social isolation enhances reproduction in the monogamous prairie vole (*Microtus ochrogaster*). *Psychoneuroendocrinology*, *68*:20-8. doi, 20-28. doi:S0306-4530(16)30046-4 [pii]; 10.1016/j.psyneuen.2016.02.016 [doi]
- Phillips, M. L., & Tang-Martinez, Z. (1998). Parent-offspring discrimination in the prairie vole and the effects of odors and diet. *Canadian Journal of Zoology*, *76*(4), 711-716.
- Pinneau, S. R. (1955). The infantile disorders of hospitalism and anaclitic depression. *Psychological Bulletin*, *52*(5), 429.
- Pryce, C. R., Bettschen, D., & Feldon, J. (2001). Comparison of the effects of early handling and early deprivation on maternal care in the rat. *Developmental Psychobiology*, *38*(4), 239-251. doi:10.1002/dev.1018 [pii]
- Pycock, C. J., & Taberner, P. V. (1981). *Central neurotransmitter turnover* Springer.
- Rangel, S., & Leon, M. (1995). Early odor preference training increases olfactory bulb norepinephrine. *Developmental Brain Research*, *85*(2), 187-191.
- Resendez, S. L., Dome, M., Gormley, G., Franco, D., Nevárez, N., Hamid, A. A., & Aragona, B. J. (2013).  $\mu$ -Opioid receptors within subregions of the striatum mediate pair bond formation through parallel yet distinct reward mechanisms. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *33*(21), 9140-9149. doi:33/21/9140 [pii]; 4123-12 [pii]; 10.1523/JNEUROSCI.4123-12.2013 [doi]
- Resendez, S. L., Keyes, P. C., Day, J. J., Hambro, C., Austin, C. J., Maina, F. K., . . . Aragona, B. J. (2016). Dopamine and opioid systems interact within the nucleus accumbens

to maintain monogamous pair bonds. *Elife*, 5:e15325. doi, 10.7554/eLife.15325.  
doi:e15325 [pii]; 15325 [pii]; 10.7554/eLife.15325 [doi]

Resendez, S. L., Kuhnmuench, M., Krzywosinski, T., & Aragona, B. J. (2012).  $\kappa$ -Opioid receptors within the nucleus accumbens shell mediate pair bond maintenance. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 32(20), 6771-6784. doi:32/20/6771 [pii]; 3775020 [pii]; 10.1523/JNEUROSCI.5779-11.2012 [doi]

Robles, T. F., & Kiecolt-Glaser, J. K. (2003). The physiology of marriage: Pathways to health. *Physiology & Behavior*, 79(3), 409-416.

Rogers, F. D., & Bales, K. L. (2019). Revisiting paternal absence: Female alloparental replacement of fathers recovers partner preference formation in female, but not male prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Developmental Psychobiology*, doi:10.1002/dev.21943 [doi]

Rogers, F. D., Rhemtulla, M., Ferrer, E., & Bales, K. L. (2018). Longitudinal trajectories and inter-parental dynamics of prairie vole biparental care. *Front.Ecol.Evol.*, 6:73. doi, 10.3389/fevo.2018.00073. Epub 2018 Jun 5. doi:73 [pii]; 10.3389/fevo.2018.00073 [doi]

Romero-Fernandez, W., Borroto-Escuela, D., Agnati, L., & Fuxe, K. (2013). Evidence for the existence of dopamine d2-oxytocin receptor heteromers in the ventral and dorsal striatum with facilitatory receptor–receptor interactions. *Molecular Psychiatry*, 18(8), 849-850.

Rutter, M., Kumsta, R., Schlotz, W., & Sonuga-Barke, E. (2012). Longitudinal studies using a "natural experiment" design: The case of adoptees from romanian institutions. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry, 51*(8), 762-770. doi:S0890-8567(12)00373-5 [pii]; 10.1016/j.jaac.2012.05.011 [doi]

Salo, A. L., Shapiro, L. E., & Dewsbury, D. A. (1994). Comparisons of nipple attachment and incisor growth among four species of voles (*Microtus*). *Developmental Psychobiology: The Journal of the International Society for Developmental Psychobiology, 27*(5), 317-330.

Sarkadi, A., Kristiansson, R., Oberklaid, F., & Bremberg, S. (2008). Fathers' involvement and children's developmental outcomes: A systematic review of longitudinal studies. *Acta Paediatrica (Oslo, Norway : 1992), 97*(2), 153-158. doi:APA572 [pii]; 10.1111/j.1651-2227.2007.00572.x [doi]

Sawrey, D. K., & Dewsbury, D. A. (1994). Conspecific odor preferences in montane voles (*Microtus montanus*): Effects of sexual experience. *Physiology & Behavior, 56*(2), 339-344. doi:0031-9384(94)90204-6 [pii]; 10.1016/0031-9384(94)90204-6 [doi]

Shah, A., Oxley, G., Lovic, V., & Fleming, A. S. (2002). Effects of preweaning exposure to novel maternal odors on maternal responsiveness and selectivity in adulthood. *Developmental Psychobiology, 41*(3), 187-196.

Shahrokh, D. K., Zhang, T. Y., Diorio, J., Gratton, A., & Meaney, M. J. (2010). Oxytocin-dopamine interactions mediate variations in maternal behavior in the

rat. *Endocrinology*, 151(5), 2276-2286. doi:en.2009-1271 [pii]; 5337 [pii]; 10.1210/en.2009-1271 [doi]

Smale, L., Pedersen, J. M., Block, M. L., & Zucker, I. (1990). Investigation of conspecific male odours by female prairie voles. *Animal Behaviour*, 39(4), 768-774.

Snell-Rood, E. C. (2013). An overview of the evolutionary causes and consequences of behavioural plasticity. *Animal Behaviour*, 85(5), 1004-1011.

Spitz, R. (1945). A.(1945), hospitalism. *Psychoanalytic Study of the Child*, 2, 113-117.

Stern, J. M. (1996). Somatosensation and maternal care in norway rats. *Advances in the study of behavior* (pp. 243-294) Elsevier.

Stern, J. J. (1970). Responses of male rats to sex odors. *Physiology & Behavior*, 5(4), 519-524. doi:0031-9384(70)90260-X [pii]; 10.1016/0031-9384(70)90260-x [doi]

Stolzenberg, D. S., & Champagne, F. A. (2016). Hormonal and non-hormonal bases of maternal behavior: The role of experience and epigenetic mechanisms. *Hormones and Behavior*, 77, 204-210.

Stolzenberg, D. S., & Numan, M. (2011). Hypothalamic interaction with the mesolimbic DA system in the control of the maternal and sexual behaviors in rats. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 35(3), 826-847. doi:S0149-7634(10)00163-6 [pii]; 10.1016/j.neubiorev.2010.10.003 [doi]

- Stone, A. I., Mathieu, D., Griffin, L., & Bales, K. L. (2010). Alloparenting experience affects future parental behavior and reproductive success in prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Behavioural Processes*, *83*(1), 8-15.
- Sullivan, R., Stackenwalt, G., Nasr, F., Lemon, C., & Wilson, D. (2000). Association of an odor with an activation of olfactory bulb noradrenergic  $\beta$ -receptors or locus coeruleus stimulation is sufficient to produce learned approach responses to that odor in neonatal rats. *Behavioral Neuroscience*, *114*(5), 957.
- Sun, P., Smith, A., Lei, K., Liu, Y., & Wang, Z. (2014). Breaking bonds in male prairie vole: Long-term effects on emotional and social behavior, physiology, and neurochemistry. *Behavioural Brain Research*, *265*, 22-31.
- Tang-Martínez, Z., & Bixler, A. (2009). Individual discrimination by odors in sibling prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Journal of Chemical Ecology*, *35*(4), 400-404.
- Taylor, S. A., & Dewsbury, D. A. (1988). Effects of experience and available cues on estrous versus diestrous preferences in male prairie voles, *Microtus ochrogaster*. *Physiology & Behavior*, *42*(4), 379-388. doi:0031-9384(88)90280-6 [pii]; 10.1016/0031-9384(88)90280-6 [doi]
- U.S: Census bureau. (2019). *C2. Household Relationship and Living Arrangements of Children Under 18 Years, by Age and Sex: 2019*, , <https://www.census.gov/topics/families/families-and-households.html>.
- Ulloa, M., Portillo, W., Díaz, N. F., Young, L. J., Camacho, F. J., Rodríguez, V. M., & Paredes, R. G. (2018). Mating and social exposure induces an opioid-dependent

- conditioned place preference in male but not in female prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Hormones and Behavior*, *97*:47-55. doi, 47-55. doi:S0018-506X(17)30236-2 [pii]; 10.1016/j.yhbeh.2017.10.015 [doi]
- van Oers, H. J., de Kloet, E. R., Whelan, T., & Levine, S. (1998). Maternal deprivation effect on the infant's neural stress markers is reversed by tactile stimulation and feeding but not by suppressing corticosterone. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *18*(23), 10171-10179. doi:2563 [pii]; 10.1523/JNEUROSCI.18-23-10171.1998 [doi]
- Villalba, C., Boyle, P. A., Caliguri, E. J., & De Vries, G. J. (1997). Effects of the selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine on social behaviors in male and female prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Hormones and Behavior*, *32*(3), 184-191. doi:S0018-506X(97)91420-3 [pii]; 10.1006/hbeh.1997.1420 [doi]
- Voorn, P., Vanderschuren, L. J. M. J., Groenewegen, H. J., Robbins, T. W., & Pennartz, C. M. A. (2004). Putting a spin on the dorsal–ventral divide of the striatum. *Trends in Neurosciences*, *27*(8), 468-474. doi:https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.06.006
- Walum, H., & Young, L. J. (2018). The neural mechanisms and circuitry of the pair bond. *Nature Reviews. Neuroscience*, *19*(11), 643-654. doi:10.1038/s41583-018-0072-6 [doi]; 10.1038/s41583-018-0072-6 [pii]
- Wang, Z., & Novak, M. A. (1994). Parental care and litter development in primiparous and multiparous prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Journal of Mammalogy*, *75*(1), 18-23.

- Wang, Z., & Novak, M. A. (1992). Influence of the social environment on parental behavior and pup development of meadow voles (*Microtus pennsylvanicus*) and prairie voles (*M. ochrogaster*). *Journal of Comparative Psychology*, *106*(2), 163-171. doi:10.1037/0735-7036.106.2.163
- Washburn, S. L., & Lancaster, G. (2017). The evolution of hunting. *Man the hunter* (pp. 293-303) Routledge.
- Weinraub, M., & Wolf, B. M. (1983). Effects of stress and social supports on mother-child interactions in single-and two-parent families. *Child Development*, *54*, 1297-1311.
- Wekesa, K. S., & Lepri, J. J. (1994). Removal of the vomeronasal organ reduces reproductive performance and aggression in male prairie voles. *Chemical Senses*, *19*(1), 35-45. doi:10.1093/chemse/19.1.35 [doi]
- Williams, J. R., Catania, K. C., & Carter, C. S. (1992). Development of partner preferences in female prairie voles (*Microtus ochrogaster*): The role of social and sexual experience. *Hormones and Behavior*, *26*(3), 339-349. doi:0018-506X(92)90004-F [pii]; 10.1016/0018-506x(92)90004-f [doi]
- Wilson, D. A., & Sullivan, R. M. (1994). Neurobiology of associative learning in the neonate: Early olfactory learning. *Behavioral and Neural Biology*, *61*(1), 1-18. doi:10.1016/s0163-1047(05)80039-1 [doi]

- Winslow, J. T., Hastings, N., Carter, C. S., Harbaugh, C. R., & Insel, T. R. (1993). A role for central vasopressin in pair bonding in monogamous prairie voles. *Nature*, *365*(6446), 545-548. doi:10.1038/365545a0 [doi]
- Woo, C. C., Coopersmith, R., & Leon, M. (1987). Localized changes in olfactory bulb morphology associated with early olfactory learning. *Journal of Comparative Neurology*, *263*(1), 113-125.
- Yadid, G., Pacak, K., Kopin, I. J., & Goldstein, D. S. (1994). Endogenous serotonin stimulates striatal dopamine release in conscious rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *270*(3), 1158-1165.
- Zheng, D., Foley, L., Rehman, A., & Ophir, A. G. (2013). Social recognition is context dependent in single male prairie voles. *Animal Behaviour*, *86*(5), 1085-1095.
- Zhou, F. M., Liang, Y., Salas, R., Zhang, L., De Biasi, M., & Dani, J. A. (2005). Corelease of dopamine and serotonin from striatal dopamine terminals. *Neuron*, *46*(1), 65-74. doi:S0896-6273(05)00126-1 [pii]; 10.1016/j.neuron.2005.02.010 [doi]

