



**Universidad Autónoma de Tlaxcala**

---

**Posgrado en Ciencias Biológicas**

Alteraciones En La Formación De Vínculos De  
Pareja En El Topillo De La Pradera Como Posible  
Modelo De Los Síntomas Negativos De La  
Esquizofrenia

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRO (A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

P r e s e n t a

Jesús Enrique Basurto Alvarado

Dr. Kurt Leroy Hoffman y Dr. Oscar Gonzales Flores

Tlaxcala, Tlax.

Septiembre, 2020





# Universidad Autónoma de Tlaxcala

---

Posgrado en Ciencias Biológicas

Alteraciones en la formación de vínculos de pareja en el  
topillo de la pradera como posible modelo de los  
síntomas negativos de la esquizofrenia

## T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRO (A) EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

P r e s e n t a

**Jesús Enrique Basurto Alvarado**

### Comité Tutorial

Dr. Kurt Leroy Hoffman y Dr. Oscar Gonzales Flores  
Dra. Verónica Reyes Meza y Dr. Jorge Vázquez

Tlaxcala, Tlax.

Septiembre, 2020

**Hoja de financiamiento.**

El proyecto de tesis de maestría *“Alteraciones en la formación de vínculos de pareja en el topillo de la pradera como posible modelo de los síntomas negativos de la esquizofrenia”* fue realizado en codirección de los doctores Kurt Hoffman y Oscar Gonzales Flores en el Centro de Investigación en Reproducción Animal, Dr. Carlos Beyer, Panotla, que pertenece al Centro de Estudios Avanzados (Cinvestav) y a la Universidad Autónoma de Tlaxcala.

El presente proyecto fue financiado gracias al Fondo Sectorial de Investigación para la Educación del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) número: CB-255936/2015.

El estudiante Jesús Enrique Basurto Alvarado recibió la beca nacional del CONACyT número de CVU: 671901 durante los estudios de maestría realizados en el Posgrado en Ciencias Biológicas, Maestría en Ciencias Biológicas, del Centro Tlaxcala de Biología de la conducta (CTBC), Universidad Autónoma de Tlaxcala.

La maestría en Ciencias Biológicas del CTBC forma parte del Programa Nacional de Posgrados de Calidad.

**Oficio de autorización.**



**Posgrado en Ciencias Biológicas**  
Coordinación de la División de Ciencias Biológicas  
Secretaría de Investigación Científica y Posgrado



**COORDINACIÓN POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA  
P R E S E N T E**

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del proyecto de tesis que **Jesús Enrique Basurto Alvarado** realiza para la obtención del grado de Maestro en Ciencias Biológicas, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es: **“Alteraciones en la formación de vínculos de pareja en el topillo de la pradera como posible modelo de los síntomas negativos de la esquizofrenia”.**

Sin otro particular, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
TLAXCALA, TLAX., SEPTIEMBRE 4 DE 2020

\_\_\_\_\_  
DRA. VERÓNICA REYES MEZA

\_\_\_\_\_  
DR. KURT LEROY HOFFMAN

\_\_\_\_\_  
DR. JORGE VÁZQUEZ PÉREZ

\_\_\_\_\_  
DRA. BIBIANA CAROLINA MONTOYA  
LOAIZA

\_\_\_\_\_  
DR. AMANCIO BAUTISTA ORTEGA



Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado bajo la Norma:  
ISO 9001:2015-NMX-CC-9001-IMNC-2015



### **Agradecimientos.**

Me gustaría agradecer en primer lugar a la maestría en Ciencias Biológicas del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala por todas las facilidades otorgadas durante el tiempo que curse mis estudios.

También al CONACyT por la beca nacional (número de CVU: 671901) que me fue otorgada y me permitió realizar mis estudios de maestría.

Al Dr. Hoffman por sus invaluable comentarios y enseñanzas a lo largo del proyecto; al Dr. Gonzales mi otro co-director por su gran aportación en el proyecto y las facilidades otorgadas en el laboratorio del CIRA, Panotla. A los miembros del comité tutorial la Dra. Verónica Reyes y el Dr. Jorge Vásquez por sus siempre enriquecedores comentarios; así como a los Dres. Bibiana Montoya y Amando Bautista que hicieron comentarios muy atinados a la tesis y participaron como sinodales.

**Agradecimientos a título personal.**

Gracias a Dios, mis padres, codirectores, tutores, *coach* y amigos. Sin olvidar a mis asesores académicos (Dres. Estela Cuevas, Sergio Ancona e Iztel Arias) y a la Mta. Socorro Romero.

## **Resumen.**

El vínculo de pareja tiene un papel esencial en la salud humana, debido a que permite a los individuos sobrellevar situaciones estresantes, reducir estados de ánimo negativos y atenuar ciertas patologías. Por el otro lado, la disolución del vínculo puede inducir alteraciones en la salud física y mental de los individuos. Además, es común observar en personas que padecen ciertos trastornos neuropsiquiátricos una baja capacidad para formar y mantener el vínculo de pareja. El estudio de las características biológicas del vínculo de pareja requiere de animales modelo, como el topillo de la pradera (*Microtus ochrogaster*), cuya conducta afiliativa es en cierta medida similar a la humana.

La conducta afiliativa de la formación del vínculo de pareja en el topillo de la pradera ha sido estudiada con detalle; sin embargo, los métodos de análisis conductual requieren de grandes periodos de observación y no aportan información sobre la expresión de conductas no afiliativas que también son parte del repertorio conductual de esta especie. Tampoco se ha caracterizado el patrón conductual de topillos macho enganchados en un vínculo de pareja duradero; ni se ha propuesto al topillo de la pradera como un modelo animal de los síntomas de la esquizofrenia para de una manera ventajosa mimetizar la baja capacidad para formar pareja observada en la esquizofrenia.

Por lo tanto, en el presente estudio se propone: 1) validar una nueva metodología para analizar la conducta afiliativa y no afiliativa del topillo de la pradera durante la prueba de preferencia; 2) caracterizar el patrón conductual desplegado, durante la prueba de preferencia, por machos provenientes de vínculos duraderos; y 3) determinar si el antagonismo crónico del receptor NMDA inducirá alteraciones persistentes en la conducta afiliativa del topillo de la pradera macho; las cuales mimeticen alteraciones psicosociales de la esquizofrenia.

En el primer experimento, para caracterizar el patrón conductual de un grupo de machos ( $n = 10$ ) que han cohabitado por más de un mes con una hembra, registramos las conductas desplegadas por los machos durante la prueba de preferencia. Cada prueba tiene una duración de 3 horas y evalúa la elección social de cada individuo focal (el macho) en relación con la familiaridad de dos individuos estímulo (la hembra de la pareja y otra desconocida). Para evaluar esta elección, el método de muestreo continuo, previamente validado, cuantificó la duración del tiempo en contacto lado a lado (CLaL) que permaneció el macho con cada

hembra a lo largo de las 3 horas de prueba. Mientras que el método de muestreo instantáneo, cuantificó en 30 observaciones de la última hora de prueba las conductas afiliativas, incluido el CLaL, y no afiliativas desplegadas por cada macho a cada hembra. En el segundo experimento, tratamos a un grupo de machos adultos ( $n = 10$ ) con MK-801 (un antagonista del receptor NMDA que en roedores induce alteraciones asociadas a la esquizofrenia) en una dosis diaria de 0.2mg/kg durante 7 días. Mientras, que el grupo control o salina ( $n = 8$ ) recibió un tratamiento con solución salina (0.9% NaCl) en un volumen equivalente. Después de 18 días cada uno de los topillos de ambos grupos fue aparejado con una hembra receptiva y 24 horas después evaluamos la formación del vínculo de pareja en la prueba de preferencia por medio del método de muestreo instantáneo.

Los resultados muestran que los machos desplegaron preferencialmente con la pareja una mayor duración o un número mayor de conductas afiliativas, mientras que a las hembras desconocidas les asignaron una menor duración de conductas afiliativas y/o un mayor número de conductas no afiliativas. En el segundo experimento se observó que los machos tratados salina, pero no los tratados con MK-801, asignaron de manera diferencial la conducta afiliativa y no afiliativa en relación con la familiaridad de la hembra. Este resultado implica que el antagonismo crónico del receptor NMDA indujo de manera persistente y selectiva alteraciones en la conducta afiliativa del topillo de la pradera macho.

Por lo tanto, es posible sugerir: a) nuestra propuesta metodológica complementa el registro de la conducta afiliativa durante la prueba de preferencia en un menor tiempo que el método previamente validado y que quizá represente con más veracidad la intrincada naturaleza de las interacciones sociales que toman lugar durante esta prueba; b) las conductas afiliativas como el CLaL y la preferencia de pareja indican no solo la formación del vínculo de pareja de larga duración, sino también el mantenimiento y/o reforzamiento del mismo; y c) las alteraciones en la conducta afiliativa del topillo de la pradera macho inducidas al antagonizar crónicamente el receptor NMDA guardan cierta relación con la baja capacidad para formar pareja observada en pacientes con esquizofrenia; por lo tanto este estudio podría representar el primer paso para validar un nuevo modelo de los síntomas de la esquizofrenia en el topillo de la pradera.

## ÍNDICE

|   | Pág. |
|---|------|
| 1. INTRODUCCIÓN.....  | 1    |
| 1.1. El papel de la conducta afiliativa en la salud animal.....                                   | 1    |
| 1.2. Implicaciones en el estudio de la conducta afiliativa de algunos mamíferos.....              | 2    |
| 1.3. El topillo de la pradera un animal modelo para estudiar la conducta afiliativa.....          | 5    |
| 1.4. La conducta afiliativa del topillo de la pradera en la etapa adulta.....                     | 8    |
| 1.5. La preferencia de pareja, un indicador conductual de la formación del vínculo de pareja..... | 11   |
| 1.6. Neurobiología de la preferencia de pareja y la monogamia en el topillo de la pradera.....    | 13   |
| 2. ANTECEDENTES.....  | 18   |
| 3. JUSTIFICACIÓN.....   | 27   |
| 4. HIPÓTESIS Y PREDICCIONES.....  | 28   |
| 5. OBJETIVOS.....   | 29   |
| 5.1. Objetivo general.....  | 29   |
| 5.2. Objetivos particulares.....  | 29   |
| 6. METODOLOGÍA.....   | 30   |
| 6.1. Animales.....  | 30   |
| 6.2. Prueba de preferencia.....   | 30   |
| 6.3. Análisis conductual.....   | 32   |
| 6.4. Metodología particular del experimento 1.....  | 36   |
| 6.5. Metodología particular del experimento 2.....  | 37   |
| 6.6. Estadística.....   | 38   |
| 7. RESULTADOS.....  | 41   |
| 7.1. Primer experimento.....  | 41   |
| 7.1.1. Resultados del análisis conductual provenientes del método de muestreo continuo.....       | 41   |
| 7.1.2. Resultados del análisis conductual provenientes del método de muestreo                     |      |

|  |    |
|--|----|
| instantáneo.....   | 44 |
| 7.2. Segundo experimento.....  | 48 |
| 7.2.1. Efecto del tratamiento crónico con MK-801 sobre el número de observaciones de conducta sin distinguir entre conducta dirigida a la pareja y conducta dirigida a la hembra desconocida (método de muestreo instantáneo)..... | 48 |
| 7.2.2. Efecto del tratamiento crónico con MK-801 sobre el número de observaciones de cada conducta dirigidas a la hembra familiar y a la hembra desconocida (método de muestreo instantáneo).....                                  | 49 |
| 7.2.3. Efecto del tratamiento crónico con MK-801 sobre el número de observaciones de conductas afiliativas (Categoría 2) y no afiliativas (Categoría 1) (método de muestreo instantáneo).....                                      | 52 |
| 7.2.4. Efecto de la familiaridad de la hembra sobre la asignación de la conducta de los machos tratados con salina y MK-801 (método de muestreo instantáneo)...  | 54 |
| 8. DISCUSIÓN.....  | 56 |
| 9. CONCLUSIONES.....   | 76 |
| 10. PERSPECTIVAS.....  | 78 |
| 11. REFERENCIAS.....   | 79 |

## 1. Introducción.

### 1.1. El papel de la conducta afiliativa en la salud animal.

Para los mamíferos adultos, incluido el ser humano, las conductas agresivas, sexuales y afiliativas son cruciales para su supervivencia y reproducción (Lukas y Jong 2015). La **conducta afiliativa** representa todas aquellas conductas que fomentan el desarrollo y mantenimiento de las relaciones sociales (o vínculos) de carácter positivo y larga duración; estos vínculos pueden ser formados entre miembros de una familia (ej. madre-hijo), pares de individuos del mismo sexo (compañeros) o conespecíficos del sexo opuesto (pareja socio-sexual) (Lim y Young 2006; Stoesz y cols. 2013; Lieberwirth y Wang 2016; Numan y Young 2016). Múltiples líneas de evidencia han mostrado cómo los vínculos afiliativos impactan la fisiología y psicología de los organismos, debido a que se ha observado que estos vínculos permiten a los individuos sobrellevar situaciones estresantes, reducir estados emocionales negativos (ej. ansiedad), atenuar ciertas patologías (ej. cardiovasculares), reducir el abuso de drogas en humanos e incrementar la adecuación al favorecer la cooperación grupal, en poblaciones de animales silvestres (Kiecolt-Glaser 1987; Kiecolt-Glaser y Newton 2001; Robles y Kiecolt-Glaser 2003; Bartz y Hollander 2006; Coan y Sbarra 2015; Lieberwirth y Wang 2016; Bales y cols. 2017).

El **vínculo de pareja** se define como la unión diádica entre individuos adultos del sexo opuesto; la pareja es distinguida –de otras y otros conespecíficos- por el despliegue de una serie de conductas afiliativas (Gangestad y Simpson 2000; Eastwick 2013; Stoesz y cols. 2013; Bales y cols. 2017). La conducta afiliativa de un vínculo de pareja incluye el “acurrucamiento”, el acicalamiento mutuo, el compartir comida, el apoyo de coalición (ej. cacería coordinada, quizás construcción del nido y división de tareas), la defensa coordinada de los recursos y la jerarquía social, la proximidad espacial, la preferencia de cópula, el cuidado biparental de la progenie, la vigilancia, protección y defensa del nido y los neonatos (ver Stoesz y cols. 2013).

En humanos, el vínculo de pareja socio-sexual tiene un significado funcional que se ha documentado en diferentes culturas debido a su importancia en promover la estabilidad social,

la salud física y mental de los individuos que conforman a la pareja pero también de su descendencia (Gangestad y Simpson 2000; Young y cols. 2011). El vínculo de pareja genera en los individuos un estado de pertenencia o conexión social el cual los “protege” de los efectos negativos de la soledad, la ansiedad y la depresión (Lee y Robbins 1998; Williams y Galliher 2006). De hecho, los individuos que forman parte de un vínculo de pareja estable viven más tiempo en comparación con individuos solteros (Lillard y Waite 1995) y muestran un buen funcionamiento del sistema inmune y cardiovascular (Waltz y cols. 1991).

Por otro lado, la disolución del vínculo de pareja tiene efectos profundos en la psico-fisiología humana (Bartz y Hollander 2006), debido a que este proceso promueve la aparición de estados psicológicos negativos como la depresión (Kiecolt-Glaser y Newton 2001; Robles y Kiecolt-Glaser 2003); además impacta la salud física de los individuos pues se ha asociado que los conflictos y la tensión prolongada en una relación inducen múltiples alteraciones en la función inmune (Kiecolt-Glaser y Newton 2001).

Adicionalmente, la baja capacidad para formar o mantener un vínculo de pareja es una característica común en diferentes trastornos neuropsiquiátricos como el autismo, la fobia social, el trastorno obsesivo-compulsivo, el trastorno de estrés post-traumático, el trastorno de la personalidad limítrofe y la esquizofrenia (American Psychiatric Association 2000; Volkmar 2001; Bartz y Hollander 2006; Lim y Young 2006). Entonces, tomando en consideración toda la evidencia anterior, la identificación de los factores biológicos que permiten la formación y mantenimiento del vínculo de pareja en diferentes especies animales puede ampliar nuestro conocimiento sobre las implicaciones de estos fenómenos en la fisiología y psicopatología humana.

## **1.2. Implicaciones en el estudio de la conducta afiliativa de algunos mamíferos.**

Para estudiar la conducta afiliativa se requiere de un enfoque comparativo, puesto que solo ciertas características (principalmente psicológicas) pueden analizarse directamente en el humano. Además, la investigación en humanos tiene limitantes éticas importantes (McNeill 1993). Por lo tanto, para entender los mecanismos biológicos que subyacen este tipo de conductas se utilizan otras alternativas, debido a que su identificación requiere el uso de

metodologías invasivas (ej. Bales y cols. 2017). Las alternativas para experimentación incluyen animales no humanos en los cuales se gana la posibilidad de realizar metodologías experimentales “duras” pero se pierde la posibilidad de estudiar el fenómeno directo de la fuente (van der Staay 2006). Entonces, para realizar las extrapolaciones congruentes con el humano se deben considerar que los animales de estudio compartan con este ciertas características conductuales, neurobiológicas, genéticas, etcétera (van der Staay 2006; Hoffman 2015; Lukas y Jong 2015).

El estudio comparativo de la conducta afiliativa tiene diferentes implicaciones, la primera de ellas es que no cualquier especie animal puede ser utilizada en la experimentación, debido a una serie de razones que directa o indirectamente complican su uso. Entre ellas se encuentra el tamaño del animal, la edad reproductiva o necesaria para ser admitido en el estudio, el periodo de la gestación, el acceso al que se tiene a la especie, las condiciones necesarias para su alojamiento, y el hecho que ciertas especies se encuentran en peligro de extinción (National Research Council, 1988). Entonces, se recurre a especies de un tamaño pequeño, de periodos de gestación cortos, con múltiples descendientes por periodo reproductivo y de preferencia que se adapten al cautiverio –en laboratorios, para reducir y/o controlar el número de factores que influyan en la expresión de los rasgos de estudio- (Lossi y cols. 2016). Actualmente, se utilizan en la experimentación a representantes de cada taxón animal, entre ellos los peces (ej. pez zebra), las aves (ej. la gallina), anfibios (ej. ranas del género *Xenopus*) pero principalmente mamíferos como los lagomorfos (ej. el conejo), el perro, el gato, los primates y principalmente los roedores (ej. el hámster, el cuyo, la rata y el ratón) aunque siempre que sea posible se sugiere utilizar taxones de organismos “menos complejos” (National Research Council 2010; Doke y Dhawale 2015; Lossi y cols. 2016).

Una segunda implicación radica en delimitar el fenómeno de estudio en el humano para poder ser extrapolado en un animal. Aunque las especies comúnmente utilizadas en el laboratorio son muy adecuadas para su alojamiento y manipulación experimental, lo cierto es que estas pocas especies no proveen las “contrapartes” adecuadas de todos los aspectos del fenotipo humano (Phelps y cols. 2010). De hecho, ninguna otra especie animal despliega de manera completa las mismas características humanas que buscamos estudiar; por lo tanto, se utiliza una especie en el entendido de representar uno o una parcialidad del rasgo para su estudio

(Phelps y cols. 2010; Hoffman 2015; Lukas y Jong 2015). Sin embargo, suele restringirse al empleo de ciertas especies animales, sin considerar otras quizá más “exóticas” que complementen la investigación preclínica (Aragona y Wang 2004; Phelps y cols. 2010). Por ejemplo, las alteraciones en la conducta afiliativa que permiten formar un vínculo de pareja comunes en muchos trastornos neuropsiquiátricos (American Psychiatric Association 2000; Bartz y Hollander 2006) son difíciles de mimetizar completamente en la rata o el ratón (posiblemente las especies más utilizadas en la investigación preclínica) debido a que no forman parte de su repertorio conductual “natural” (ej. Berry y cols. 2018; ver Phelps y cols. 2010; Lukas y Jong 2015). Una alternativa apropiada sería utilizar una especie del mismo grupo taxonómico que la rata y el ratón (para generalizar fácilmente el conocimiento y técnicas genéticas, moleculares y neurobiológicas) que exhiba en su repertorio social conductas afiliativas propias de un vínculo de pareja, como el topillo de la pradera (Aragona y Wang 2004; Phelps y cols. 2010). El topillo de la pradera es un animal modelo adecuado para entender los mecanismos de la conducta afiliativa (Young y Wang 2004; McGraw y Young 2010; Young y cols. 2011; Lieberwirth y Wang 2016) desde una perspectiva ecológica y evolutiva (que no es comúnmente considerada en otros animales de laboratorio) que implica la función adaptativa de la variación natural en el cerebro y la conducta (Phelps y cols. 2010).

Una tercera implicación, es qué tan adecuadamente se mimetiza el fenómeno de interés en el animal de laboratorio comparado con el humano. Es decir, en el caso de la conducta afiliativa, esta deberá ser un componente –relativamente- estable del fenotipo del sujeto; y no tanto un estado el cual solo se manifiesta en el tiempo que es artificialmente inducido y muestra una variación a lo largo del tiempo (Hoffman 2015). Esta implicación es entendida dentro de la investigación preclínica de trastornos neuropsiquiátricos como la elección de un animal modelo en lugar de desarrollar un modelo animal. Lo cual es importante considerar ya que en el modelo animal se replica de manera artificial el fenómeno para su estudio y el animal modelo refiere a un sujeto animal con ciertas características (accesibilidad genética, neurobiológica, conductual) que permiten identificar, seguir o acceder fácilmente al fenómeno de estudio (Hoffman 2015).

Emplear animales modelo tiene una implicación (la cuarta) sobre el estudio puntual de la conducta afiliativa, pues considera la historia evolutiva y ecología de la especie. Por lo tanto,

los rasgos (o fenómeno de estudio) deben ser producto de las presiones de selección que han favorecido el incremento de su adecuación y éxito reproductivo (Phelps y cols. 2010; Robinson 2015; Ophir 2017). Considerar el origen evolutivo y ecológico de un rasgo no es común en el laboratorio, pues muchos de los rasgos (bajos niveles de agresividad) que se observan en la rata de laboratorio han sido derivados de procesos de selección artificial (ver Lukas y Jong 2015).

Además, se debe estar seguro de que la conducta de estudio (que representa la variable dependiente a ser cuantificada) sea parte del repertorio “natural” de la especie y no un sub-producto o artefacto de la vida en cautiverio. En nuestro caso, la conducta afiliativa del vínculo de pareja se ha reportado en el topillo de la pradera en condiciones naturales, semi-naturales y de laboratorio (Young y Wang 2004; McGraw y Young 2010; Phelps y cols. 2010; Young y cols. 2011; Robinson 2015; Lieberwirth y Wang 2016; Ophir 2017) y no como un sub-producto del cautiverio como se observa en otras especies de roedores (como el “*singing mice*”, *Scotinomys xerampelinus*) que adoptan la “monogamia forzada” en condiciones de laboratorio (Blondel 2006).

### **1.3. El topillo de la pradera un animal modelo para estudiar la conducta afiliativa.**

El topillo de la pradera (*Microtus ochrogaster*) es un roedor de talla pequeña ( $\approx 40$  g) que se distribuye en América del Norte (Canadá y Estados Unidos) en ecosistemas como la pradera o los pastizales (Tamarin 1985). Los topillos de la pradera se han adaptado a fuentes de alimento con escaso valor calórico y poca agua disponible que caracterizan estos ecosistemas; suelen excavar madrigueras subterráneas poco profundas donde habitan y se desplazan en pasadizos o “corredores” que forman y mantienen despejados entre la vegetación (Birney y cols. 1976; Getz 1978; Thomas y Birney 1979).

En esta especie, el periodo de gestación dura aproximadamente 21 días, después de este tiempo nacen entre 3 y 5 críos que presentan características altriciales (ej. incapacidad de autorregular su temperatura corporal, ausencia de pelo e inmadurez en sus sistemas sensoriales y motrices) (Thomas y Birney 1979; González-Mariscal y Poindron 2002; Wolff y Dunlap 2002). Posterior al parto, los recién nacidos permanecen en el nido hasta desarrollarse por

completo; durante este tiempo reciben cuidados maternos, paternos y aloparentales en unidades de crianza conformadas por: *i*) múltiples hembras con su descendencia pero sin machos que brinden cuidados; *ii*) una pareja macho-hembra con diferentes generaciones de descendientes; *iii*) grupos de crianza comunal que comprenden múltiples parejas de macho-hembra con diferentes generaciones de sus descendientes y adultos no emparentados que a menudo brindan cuidados aloparentales (Thomas y Birney 1979; Getz y cols. 1993; McGuire y Getz 1995; Getz y Carter 1996; McGuire y cols. 2013).

Entre los 45 y 55 días post-nacimiento (DPN), los individuos alcanzan la madurez sexual lo cual se asocia a que los individuos abandonen el nido y se dispersen (Getz y cols. 1993; McGuire y cols. 1993; Mateo y cols. 1994; McGuire y cols. 2013; Prounis y cols. 2015); pero la mayoría (70-75 %) no lo hace y se convierte en miembros cooperativos de la pareja de progenitores y proporcionan cuidado aloparental a sus hermanos menores (Getz y Hoffman 1986; Carter y Getz 1993; Getz y cols. 1993). En esta etapa ocurre un cambio importante en las necesidades de los organismos, pues con la madurez sexual se abandona esa vulnerabilidad de etapas anteriores y ahora los organismos deberán competir con otros conespecíficos por hacerse de recursos (comida, territorios, pareja) que incrementen su adecuación (Shapiro e Insel 1990; Nelson y cols. 2013; McGuire y cols. 2013; Kelly y cols. 2018). Los topillos de la pradera que “deciden” dispersarse deberán adecuar su conducta para “hacer lo que los adultos de su especie”, esto implica establecer su propio territorio, defender el nido y/o la pareja, así como cuidar de la progenie (Getz y cols. 1993; McGuire y cols. 1993; Mateo y cols. 1994; McGuire y cols. 2013; Prounis y cols. 2015; Ophir 2017; Kelly y cols. 2018).

La defensa del nido y la pareja, el cuidado biparental, la proximidad espacial y el contacto físico por parte de una pareja de individuos del sexo opuesto son algunas conductas afiliativas que caracterizan a las especies monógamas (Kleiman 1977; Clutton-Brock 1989). El topillo de la pradera es una de las pocas especies de mamíferos (Kleiman 1977) que encaja en la definición de una especie monógama (Aragona y Wang 2004; Perkeybile y Bales 2017). Además, pertenece al género *Microtus* que tiene la bondad de adaptarse muy bien a las condiciones de laboratorio sin “perder” su repertorio social que se observa en la naturaleza (Ranson 1934; Aragona y Wang 2004). Entonces, debido a estas características y su compleja vida social a lo largo de su vida (McGuire y Novak 1984; Getz y cols. 1993; McGuire y Getz

1995; Getz y Carter 1996; Aragona y cols. 2006; Gobrogge y Wang 2016), el topillo de la pradera se considera un animal modelo para estudiar la conducta social compleja como la formación del vínculo de pareja (Aragona y Wang 2004; Young y Wang 2004; McGraw y Young 2010; Young y cols. 2011; Lieberwirth y Wang 2016).

La monogamia puede ser definida como un sistema de cópula, un sistema genético o un sistema social caracterizado por una unidad compuesta por una hembra-un macho y su descendencia (Kleiman 1977; Perkeybile y Bales 2017). Los sistemas o tácticas de cópula representan el arreglo social de todos o una parte de los individuos de una población o una especie (Oliveira y cols. 2008; Ophir 2017). En relación con el número de parejas reproductivas que tienen los machos o las hembras de una determinada población o especie se describen la monogamia, su “contraparte”, la promiscuidad o poligamia (múltiples machos-múltiples hembras) poliandria (una hembra-múltiples machos) y la poliginia (un macho-múltiples hembras) (Ophir 2017).

El sistema monógamo puede ser social o genético, el topillo de la pradera “opta” por la monogamia social la cual implica la existencia de un vínculo de pareja y una tendencia –pero no un encasillamiento estricto- a la exclusividad o fidelidad sexual (Carter y Getz 1993; Ophir y cols. 2008; McGraw y Young 2010; McGuire y cols. 2013; Blocker y Ophir 2016; Ophir 2017). Comúnmente la monogamia suele entenderse como su variante sexual, donde los individuos de la pareja copulan entre ellos de manera exclusiva y por ende todos los críos son sus descendientes (Clutton-Brock 1989; Carter y Getz 1993; Ophir y cols. 2008; McGraw y Young 2010; Ophir 2017). Sin embargo, es importante considerar que la formación de un vínculo de pareja y la cópula no son conceptos intercambiables y el hecho que exista un vínculo entre dos individuos del sexo opuesto no los imposibilita a copular con otros individuos fuera de la pareja (Blocker y Ophir 2016).

Aunque no se ha clarificado como el encasillamiento con una sola pareja sexual supondría una ventaja para incrementar el éxito reproductivo de ciertos individuos, quizás el arreglo social monógamo sea favorecido en determinados contextos (Aragona y Wang 2004; Blocker y Ophir 2016; Ophir 2017). Por ejemplo, el cuidado biparental característico del sistema monógamo resultaría muy útil en un territorio con un recurso(s) amenazante / valioso el cual requiere los esfuerzos constantes de la pareja para hacerle frente / utilizarlo, o bien en un

ambiente físico riguroso que “exige” una inversión adicional en los cuidados parentales (Kleiman 1977; Clutton-Brock 1989; Aragona y Wang 2004; Young y cols. 2011; Blocker y Ophir 2016; Ophir 2017). Este tipo de presiones ambientales y de selección pueden explicar el origen de la conducta afiliativa y el vínculo de pareja observado en esta especie (Silk 2007); pero también de los elementos neurobiológicos que son necesarios para su expresión (Young y cols. 2011).

#### **1.4. La conducta afiliativa del topillo de la pradera en la etapa adulta.**

En la etapa adulta, el topillo de la pradera despliega una serie de conductas afiliativas asociadas a la monogamia social; estas pueden relacionarse directamente con la reproducción (la proximidad o afiliación selectiva entre los miembros de la pareja, el copular exclusiva o preferentemente con la pareja y el cuidado biparental de la progenie) o con la delimitación del territorio y defensa de la pareja (la agresividad selectiva) (Kleiman 1977; Young y cols. 2011; Ophir 2017; Perkeybile y Bales 2017). La **agresividad selectiva**, el **cuidado biparental** y la **preferencia de pareja** han sido estudiados en poblaciones silvestres, en condiciones semi-naturales o de laboratorio (Getz y cols. 1993; McGuire y cols. 1993; Mateo y cols. 1994; Ophir y cols. 2007; Ophir y cols. 2008; McGuire y cols. 2013; Ophir 2017; Kelly y cols. 2018); en trabajos de laboratorio suele conocerseles como indicadores conductuales del vínculo de pareja (Aragona y Wang 2004; Lim y Young 2006; McGraw y Young 2010; Young y cols. 2011; Lieberwirth y Wang 2014, 2016).

La expresión de estos indicadores es determinada por diferentes eventos –principalmente de carácter reproductivo- que permiten la persistencia del vínculo de pareja; es decir, la expresión de una determinada conducta facilita la formación, el establecimiento y el mantenimiento del vínculo de pareja con lo cual se promueve el carácter duradero del vínculo. En una manera secuencial, la preferencia de pareja es la primera en tomar lugar, pues se observa poco después de las primeras interacciones de los individuos que conforman la pareja; específicamente se ha observado después de 24 horas en machos (Aragona y cols. 2003; Lim y Young 2004; Aragona y Wang 2004, 2009), aunque en hembras basta con un periodo de 6 horas (Williams y cols. 1992).

La preferencia de pareja es facilitada por la cópula (Williams y cols. 1992) y, de manera sexualmente dimórfica, puede ser favorecida en machos e inhibida en hembras por la administración exógena de corticosterona (DeVries y cols. 1995, 1996). Además, la preferencia de pareja puede presentarse aun en ausencia de cópula (Aragona y Wang 2004); por ejemplo, en hembras cuando se extiende la cohabitación con un macho de 24 a 48 horas (Williams y cols. 1992). Por lo tanto, se puede sugerir que la preferencia de pareja es necesaria para la formación del vínculo de pareja, pero no es suficiente para su mantenimiento a largo plazo; entonces, el topillo de la pradera despliega las otras dos conductas afiliativas que aseguran en cierta medida la persistencia del vínculo y del sistema de cópula monógamo.

El segundo indicador, la agresividad selectiva, es expresado después de la cópula; pues se ha reportado que únicamente los machos que han copulado (y no solo los que han cohabitado, sin copular) con la hembra de su pareja por 24 horas muestran un incremento en la agresividad dirigida a un macho o una hembra intrusos (Wang y cols. 1997). De hecho, la agresividad selectiva se intensifica después de un periodo de cohabitación más prolongado (14 días), donde se asume que la gestación esta avanzada (Gobrogge y cols. 2007). Por lo tanto, la expresión de esta conducta se asocia con procesos que aseguran la estabilidad del vínculo inicialmente formado (Aragona y cols. 2006); dado que esta conducta anti-social tiene la "finalidad" de promover activamente la defensa de la pareja, el nido y/o el territorio (Aragona y cols. 2006; Aragona y Wang 2004, 2009; Gobrogge y cols. 2007; Gobrogge y Wang 2011, 2016).

Finalmente, conforme el periodo de gestación está por terminar y el parto se aproxima tiene lugar la expresión del tercer indicador del vínculo de pareja, el cuidado biparental (Solomon 1993; Young y cols. 2011; Gobrogge y Wang 2016; Lieberwirth y Wang 2016). El topillo de la pradera es una de las pocas especies de mamíferos donde los dos progenitores invierten la misma cantidad de cuidados parentales (Kleiman 1977; Clutton-Brock 1989), es decir el cuidado de la progenie es biparental (ver González-Mariscal y Poindron 2002). La expresión de este indicador parece estar más relacionada a los procesos de mantenimiento de largo plazo del vínculo de pareja (Gobrogge y Wang 2016; Lieberwirth y Wang 2016; Numan y Young 2016).

Aunque se asume que el topillo de la pradera como especie es socialmente monógama, lo cierto es que no todos los individuos adultos se enganchan en este sistema de cópula. De hecho, se ha documentado que entre un 60 y un 75 % de los individuos son “residentes”, esto significa que adoptaron la monogamia social, lo cual implica formar un vínculo con su pareja, defender un nido y conjuntamente cuidar de la progenie (Thomas y Birney 1979; Getz y cols. 1993; Salomon 1993; Salomon y Jacquot 2002; Ophir 2017). Pero el porcentaje restante de topillos ( $\approx 25 - 40 \%$ ) son conocidos como “deambuladores” los cuales prefieren copular de manera promiscua, tienen un rango hogareño más grande que los residentes y no son territoriales (Getz y cols. 1993; Salomon y Jacquot 2002; Ophir y cols. 2008; McGuire y Getz 2010; McGuire y cols. 2013; Ophir 2017). Este fenómeno limita el asumir que un individuo es socialmente monógamo solo por pertenecer a esta especie, pues podría ser también un individuo deambulador que ha adoptado la promiscuidad.

La variabilidad natural en el comportamiento de los individuos de una misma especie refleja que, aunque la “adopción” de un sistema de cópula es una propiedad emergente de las poblaciones y las especies; tiene su origen en las múltiples elecciones de carácter reproductivo de cada individuo (Oliveira y cols. 2008; Ophir 2017). Entonces, es posible que dentro de una misma especie o población cierto grupo de individuos opten por un sistema de cópula, mientras que el resto de la población adopte otro, incluso opuesto (Ophir y cols. 2008; Blocker y Ophir 2016). A este fenómeno se le conoce como flexibilidad social (Schradin y Pillay 2005; Snell-Rood 2013), la cual es una forma de plasticidad fenotípica (Ostfeld 1990; Blondel 2006; Snell-Rood 2013). Y tendría una razón muy lógica de persistir en la naturaleza si consideramos que la flexibilidad social puede ser influenciada por restricciones ecológicas como la abundancia y distribución de los recursos, la presión de depredación y la densidad poblacional (Luque-Larena y cols. 2004; Blondel 2006; Snell-Rood 2013). Por lo tanto, la “elección” particular de los individuos de un sistema de cópula deberá implicar la evaluación del paisaje en el cual se encuentra para subsecuentemente adoptar ese u otro sistema (Oliveira y cols. 2008; Snell-Rood 2013; Ophir 2017).

Quizá la flexibilidad social le confiere a la especie la capacidad para explotar un ambiente dinámico por medio de dos arreglos sociales diferentes. En el contexto de nuestro estudio, el conocer este tipo de evidencias resulta importante, pues debemos considerar adecuadamente el

comportamiento de esta especie en función de su ecología, historia evolutiva y su repertorio conductual en condiciones naturales, pues como especie no ha sufrido múltiples eventos de selección artificial como la mayoría de los animales de laboratorio. Con este tipo de abordaje se podrían explotar al máximo sus características conductuales e interpretar los resultados adecuadamente.

### **1.5. La preferencia de pareja, un indicador conductual de la formación del vínculo de pareja.**

Como vimos anteriormente, la preferencia de pareja es desplegada por los topillos de ambos sexos después de un periodo breve de cohabitación (aun en ausencia de cópula). El periodo de cohabitación es una consideración importante para el estudio de la conducta afiliativa en el topillo de la pradera macho, pues existen diferentes paradigmas donde varía el periodo de cohabitación. Estos paradigmas permiten evaluar de manera precisa los efectos que podría tener una manipulación experimental (ej. farmacológica) sobre la expresión de la conducta afiliativa. El primer paradigma involucra que la pareja cohabite por 24 horas, sin restricción para que los individuos copulen; con esta metodología se examina si las manipulaciones farmacológicas pueden prevenir -o alterar- la formación del vínculo de pareja que fue facilitado por la cópula. El segundo, involucra un periodo de cohabitación de 6 horas donde los individuos son restringidos y no se les permite copular; esta versión se utiliza para examinar (también en machos) si las manipulaciones experimentales pueden inducir una preferencia de pareja en ausencia de cópula (Aragona y Wang 2004, 2009).

Inmediatamente después que los miembros de una recién formada pareja han cohabitado, se evalúa en el individuo focal la preferencia de pareja; para ello se utiliza la prueba de preferencia que es una prueba de elección social simple preferencia (Williams y cols. 1992; Aragona y Wang 2009). Esta prueba implica básicamente evaluar la conducta - durante un periodo de tres horas- de uno de los miembros de la pareja que se encuentra en libre movimiento con respecto a dos individuos estímulo cuyo movimiento es restringido. Estos dos individuos se encuentran en cámaras separadas en cada extremo del aparato de prueba (conocido como arena de tres cámaras); aunque poseen características similares (peso, edad,

sexo, estatus reproductivo) su identidad es diferente, uno es el otro miembro de la su pareja (individuo familiar) y el otro es un conespecífico que representa una potencial pareja (individuo desconocido) (Williams y cols. 1992; Wolff y Dunlap 2002; Ophir y DelBarco-Trillo 2007; Aragona y Wang 2009; Blocker y Ophir 2016).

A lo largo del análisis de cada prueba de preferencia el (los) observadores cuantifican diferentes conductas, entre ellas el contacto lado a lado (CLaL) la cual se define como el contacto social próximo donde al menos el 50% de los flancos de cada individuo permanecen en contacto físico directo o una distancia no mayor a 2 cm (Williams y cols. 1992; McGraw y Young 2010). El CLaL o “acurrucamiento” (*huddling* en inglés) es una conducta afiliativa cuya expresión es dependiente de la familiaridad del individuo estímulo; pues en muchos trabajos se ha reportado que el tiempo que permanece el individuo focal en CLaL con el miembro de la pareja es mayor significativamente en comparación con el tiempo que permanece con el individuo desconocido (Williams y cols. 1992; Curtis y Wang 2005; Aragona y cols. 2006; Liu y cols. 2010; Young y cols. 2014; Blocker y Ophir 2015).

Posteriormente, considerando el tiempo que el individuo focal permaneció en CLaL con la pareja y/o el individuo desconocido, es posible determinar la preferencia social de cada individuo. La preferencia de pareja es un estado conductual que refleja la proximidad o afiliación selectiva entre los miembros de la pareja en periodos reproductivos y no reproductivos aun cuando se está en la presencia de otro compañero potencial (McGraw y Young 2010; Young y cols. 2011; Bales y cols. 2017). En el laboratorio la preferencia de pareja puede ser determinada con un criterio arbitrario, este implica la permanencia del individuo focal por al menos el doble de tiempo con el miembro de su pareja en comparación con el tiempo que permanece en CLaL con un individuo desconocido (Williams y cols. 1992; McGraw y Young 2010; Young y cols. 2011; Blocker y Ophir 2015; 2016).

Entonces, la expresión diferencial del CLaL en relación con la familiaridad del individuo estímulo que normalmente se representa como un mayor tiempo de permanencia con la pareja (o preferencia de pareja) son conductas que revelan la formación del vínculo de pareja después de un periodo de cohabitación. Es importante mencionar que: 1) estas conductas representan la elección social de un individuo por permanecer en la proximidad de un individuo en particular (normalmente el otro miembro de la pareja) lo cual se conoce como afiliación selectiva

(Stoesz y cols. 2013). 2) la preferencia de pareja no es un sub-producto del laboratorio, pues se ha reportado la afiliación selectiva como parte del repertorio conductual de esta especie en condiciones naturales y semi-naturales (Thomas and Birney 1979; Carter y Getz 1993; Carter y cols. 1995). 3) la preferencia a la familiaridad social exhibida por el topillo de la pradera es diferente a la conducta afiliativa de otros roedores, pues aunque los ratones (*Mus musculus*) son gregarios y coloniales en las pruebas de preferencia social prefieren la novedad social (Berry y cols. 2018).

### **1.6. Neurobiología de la preferencia de pareja y la monogamia en el topillo de la pradera.**

Los trabajos iniciales que describían la vasta conducta afiliativa exhibida por el topillo de la pradera (ej. Thomas and Birney 1979) hicieron pensar en los mecanismos neurobiológicos que subyacen estas conductas (ej. Gobrogge y Wang 2016), su similitud con la conducta humana (ej. Bales y cols. 2017) y la posibilidad de explorar algunas alteraciones sociales de los trastornos neuropsiquiátricos (ej. Bartz y Hollander 2006). Por medio de múltiples estudios que involucraron la administración de fármacos para inducir o interrumpir la formación del vínculo de pareja (paradigma de 6 o 24 horas de cohabitación sin y con cópula, respectivamente; ver sección anterior) se fueron identificando los mecanismos neuroquímicos que subyacen la conducta afiliativa del topillo de la pradera (ver Aragona y Wang 2004, 2009). Estos mecanismos involucran la participación de tres sistemas de neurotransmisión mediados por dopamina (DA), y los neuropéptidos oxitocina (OT) y vasopresina (AVP) (Aragona y Wang 2004, 2009; Young y cols. 2005; Young y cols. 2011; Lieberwirth y Wang 2014; Gobrogge y Wang 2016; Bales 2017; Ophir 2017).

Para determinar las regiones cerebrales que participan en los circuitos que regulan la conducta afiliativa en el topillo de la pradera, se utilizó la administración local (vía intracerebral) de estos compuestos. Por ejemplo, la administración de agonistas (apomorfina) y antagonistas (haloperidol) dopaminérgicos en el núcleo accumbens (NAcc) indujo, de manera respectiva, la precipitación de la preferencia de pareja (después de 6 h en ausencia de cópula) e impidió este mismo proceso después de un periodo de cohabitación de 24 h con

oportunidad de copular (Aragona y cols. 2003; Aragona y Wang 2009). Con relación a los neuropéptidos, los datos iniciales indicaban un mecanismo sexualmente dimórfico de OT/AVP en la regulación del vínculo de pareja en el topillo de la pradera (OT involucrado en hembras y AVP en machos) (ej. Insel y Hulihan 1995); pero en estudios más recientes se sugiere un mecanismo más complejo pues se requiere la participación de ambos sistemas en los dos sexos (ej. Cho y cols, 1999; Aragona y Wang 2004). De hecho, se propone que pueden regular la formación del vínculo de pareja del topillo macho actuando coordinadamente en una misma región. Pues la administración de AVP en el septo lateral (LS) induce la preferencia de pareja en el paradigma de ausencia de cópula, mientras que la administración de un antagonista de OT en esta misma región bloquea la preferencia de pareja inducida por AVP o por la cópula (Liu y cols. 2001). Este tipo de estudios llevaron a la identificación de las múltiples regiones cerebrales que participan en la regulación de la conducta afiliativa del topillo de la pradera y en particular de la preferencia de pareja.

Entonces, al unir la evidencia de la participación de diferentes sistemas de neurotransmisión en diferentes regiones cerebrales se propuso un modelo que explica los elementos neurobiológicos y su papel en la formación del vínculo de pareja en el topillo de la pradera. Este modelo incluye la participación de tres circuitos cerebrales para coordinar ciertos procesos que subyacen la compleja formación de pareja y fue propuesto principalmente por el Dr. Larry Young (Young y Wang 2004; Young y cols. 2005). Básicamente implica que cada uno de los circuitos cumplen con funciones diferentes pero su interconexión resulta en la formación del vínculo de pareja; el primer circuito se “ocupa” del **reconocimiento y la memoria social**, el cual se acopla con un segundo circuito involucrado en la **recompensa y el reforzamiento**. Mientras que un tercer circuito **procesa información somato-sensorial de regiones periféricas como los genitales y el sistema olfativo** para modular de manera ascendente a los otros dos circuitos. La interacción de estos circuitos en el momento de la cópula facilita una fuerte asociación entre el estímulo condicionado (la cópula) y el estímulo no condicionado (la pareja) lo cual permite la formación del vínculo de pareja o bien favorece la expresión de la conducta de preferencia de pareja para ambos sexos del topillo de la pradera. En líneas generales, se sugiere que los sistemas a OT y AVP regulan el circuito encargado de la memoria social; mientras que los receptores D1 y D2 a DA regulan el circuito encargado de

la recompensa (Perkeybile y Bales 2017). El modelo explica que la información somato-sensorial del pene o la vagina es recibida por los núcleos del tracto solitario (NTS) y el gris periacueductal (PAG) los cuales proyectan al NAcc y el núcleo paraventricular (PVN). La información olfativa es transportada por el bulbo olfatorio a la amígdala medial (MeA), donde la OT facilita el reconocimiento social. La MeA envía proyecciones mediadas por AVP al pálido ventral (VP) y el LS el cual se encarga de la formación de una memoria social. La activación del área ventral tegmental (VTA) resulta en una liberación de DA dentro de la corteza prefrontal (PFC) y el NAcc lo cual impacta el sistema de recompensa y la toma de decisiones (Young y Wang 2004; Young y cols. 2005). Entonces, se puede considerar que la formación del vínculo de pareja y la preferencia de pareja en el topillo de la pradera es una propiedad emergente de otros procesos cognitivos como el reconocimiento social, la memoria social, el aprendizaje asociativo (que involucra el sistema de recompensa) y la toma de decisiones –sociales-.

Estudios comparativos (principalmente en otros roedores) han confirmado que los mecanismos neurobiológicos que regulan estos procesos cognitivos implican la participación de OT, AVP y DA, al igual que en el topillo de la pradera (Wise 2002; Insel 2010; Perkeybile y Bales 2017). El aprendizaje asociativo es regulado de manera importante por la vía dopaminérgica mesolímbica, en particular la actividad del NAcc mediada por DA es crítica en el procesamiento de la recompensa (Wise 2002; Aragona y Wang 2009); lo cual puede subyacer el análisis del costo-beneficio relacionado a la elección del comportamiento y la toma de decisiones (Aragona y Wang 2009; O'Connell y Hofmann 2012). Aunque también se hipotetiza la participación de la DA en la cópula, pues en ese momento ocurre un incremento de la señalización mediada por DA (principalmente en el NAcc) la cual es necesaria para la formación de la preferencia de pareja (Aragona y cols. 2003).

Por otro lado, las razones que animaron el estudio de la participación de OT y AVP en la conducta afiliativa del topillo de la pradera que provienen de estudios comparativos, e incluyen: 1) estos neuropéptidos participan en la formación de otro vínculo afiliativo, el que implica a la madre y los críos (ver Numan y Young 2016). 2) La participación en la conducta sexual, lo cual es importante para la formación del vínculo de pareja pues la cópula tiene efectos facilitatorios; y 3) que AVP participa en regular la agresividad, lo cual tiene sentido al

considerar la agresividad selectiva como una conducta característica del vínculo de pareja (Aragona y Wang 2004; Insel 2010). Sin embargo, aunque estos mismos mecanismos son visualizados en especies no monógamas (ver Ko 2017), el topillo de la pradera muestra una distribución, densidad o regionalidad particular de los receptores a estos neurotransmisores lo cual impacta la adopción del sistema de cópula y la formación del vínculo de pareja (Young y Wang 2004; Young y cols. 2005; Insel 2010).

Si bien la participación de los diferentes sistemas de neurotransmisión hace mucho sentido con los mecanismos causales de la conducta afiliativa en el topillo de la pradera, recientemente se encontró evidencia que implica la participación de otros procesos cognitivos. Por ejemplo, la variabilidad en la fidelidad social (que implica el uso de territorios pequeños) ni la sexual (fertilizaciones fuera de la pareja) fueron asociadas con la expresión del receptor 1A a AVP en regiones “típicamente” ligadas a la formación del vínculo de pareja como el pálido ventral o el LS; pero si en regiones implicadas en la memoria espacial como el tálamo laterodorsal o la corteza retrosplenial-posterior cingulada (Ophir y cols. 2008). Esta evidencia pudiera replantear la importancia de ciertas regiones que participan en la adopción particular de un sistema de cópula en el topillo de la pradera, pero también en considerar otros mecanismos cognitivos que subyacen la monogamia.

Recientemente, esta idea ha sido propuesta por diferentes grupos de investigación (ej. Phelps y cols. 2010; Robinson 2015), entre ellos el del Dr. Alexander Ophir; quien en uno de sus trabajos reúne evidencia para proponer **la participación de la memoria socio-espacial (y el circuito cerebral asociado) en la elección de un determinado sistema de cópula** dentro del topillo de la pradera. En este trabajo (Ophir 2017) argumenta la capacidad de copular como individuos monógamos gracias a la habilidad de “seguir” a los individuos en el espacio. Lo cual es una propiedad emergente del procesamiento de la información social (ej. identidad de los individuos y sus características como el estatus reproductivo) y la memoria espacial (ej. ubicación de la propia madriguera y la de una potencial pareja). El procesamiento de la información espacial ocurre en regiones que se caracterizan por participar en este recurso cognitivo como el hipocampo, la corteza retrosplenial, el tálamo anterior y otras como el septo y los núcleos septohipocampales. La actividad de estas regiones es coordinada por OT y AVP lo cual facilita la integración de información social y espacial para moldear las decisiones que

llevan a la cópula en una manera contexto dependiente. Y finalmente, regiones como el NAcc y/o el LS funcionan como nodos de interconexión entre este circuito y los otros tres propuestos por el modelo clásico a fin de regular la expresión de la conducta afiliativa del topillo de la pradera. Pero ahora, gracias a esta incorporación, se explica que las concesiones evolutivas entre los beneficios de elegir alguno de los dos diferentes sistemas de cópula (monogamia / promiscuidad) reflejan la variabilidad conductual, neuronal y molecular de la especie (Okhovat y cols. 2015).

## 2. Antecedentes.

En el presente trabajo se pudo identificar que el estudio de la conducta afiliativa en el topillo de la pradera: 1) sigue las mismas metodologías de análisis de la conducta desde que se diseñaron las pruebas conductuales; 2) no se han explorado las características conductuales de un vínculo de pareja de larga duración; y 3) esta especie se ha utilizado para estudiar de manera ventajosa ciertas características de algunos trastornos neuropsiquiátricos (autismo, depresión y ansiedad), pero no se ha empleado para mimetizar síntomas de la esquizofrenia. Las consideraciones anteriores son la parte central del presente trabajo y se detallan a continuación.

### *Consideraciones metodológicas del análisis de la conducta afiliativa en el topillo de la pradera.*

Desde que la prueba de preferencia fue diseñada en el laboratorio de la doctora Sue Carter (Williams y cols. 1992), ésta ha sufrido muy pocos cambios, sobre todo en el método para cuantificar la conducta. La prueba es realizada en una arena de tres cámaras, donde por un periodo de tres horas se cuantifican las conductas de CLaL y preferencia de pareja (Williams y cols. 1992; Curtis y Wang 2005; Aragona y cols. 2006; Liu y cols. 2010; Young y cols. 2014; Blocker y Ophir 2015); aunque en algunos trabajos se añade el registro de otras conductas, como el tiempo que permanece el individuo focal en alguna de las cámaras (Liu y cols. 2001; Ahern y cols. 2009; Fukushiro y cols. 2015; Blocker y Ophir 2016; Beery y cols. 2018). Una importante desventaja que tiene esta prueba es que la expresión del CLaL se representa por su periodo de duración y, por lo tanto, las tres horas de la prueba deben ser analizadas.

Cada laboratorio hace modificaciones a la prueba según sus necesidades, pero el análisis conductual siempre depende de la observación humana; lo cual puede representar una limitante práctica debido a la considerable inversión de tiempo y recursos humanos (Ahern y cols. 2009). En su trabajo, Ahern y cols. (2009) intentaron reducir esta limitante por medio de la automatización del análisis de la conducta, para ello utilizaron dos sistemas automatizados y contrastaron sus resultados con el registro manual de la conducta. Encontraron que a pesar de que los dos sistemas automatizados mostraron resultados similares al método manual, el

segundo método automatizado reflejó mejor la conducta de CLaL. La ventaja del sistema del segundo sistema (tecnológicamente más moderno), en comparación con el primero, radica en su capacidad para recapitular los parámetros operacionales de la cuantificación manual del CLaL.

Aunque la automatización del análisis de la conducta resulta menos selectiva y precisa que la observación manual, la automatización tiene la ventaja de reducir considerablemente la inversión del esfuerzo humano. Sin embargo, se debe considerar que la automatización requiere de cierto equipamiento especializado. Pero también, el análisis automatizado de la conducta no distingue entre diferentes aspectos de la conducta afiliativa del topillo de la pradera, pues una postura corporal que es característica entre los individuos de una pareja, el abrazo (Thomas y Birney 1979), seguramente no podría ser distinguida por alguno de los análisis automatizados. Entonces, los métodos automatizados no necesariamente reflejan una conducta afiliativa, únicamente revelan si los individuos están en una proximidad cercana o si se encuentran inmóviles en un contacto cercano (ver Ahern y cols. 2009).

Por otro lado, tanto el método manual como los automatizados registran solo la conducta afiliativa del topillo de la pradera, sin considerar otras conductas que forman parte del repertorio conductual de la especie, como las conductas que permiten hacerse de información odorífera de otros conespecíficos. De hecho, se ha evidenciado que a pesar de que los machos formen un vínculo de pareja con una hembra, éstos exploran por más tiempo las pistas odoríferas de otras hembras (Parker y cols. 2011). Entonces, se debería considerar que durante la prueba de preferencia los machos no solo desplegarían conductas afiliativas, sino también otras conductas –no afiliativas- con distintos propósitos. Por lo tanto, el registro de la conducta no afiliativa podría revelar información importante sobre la naturaleza de las interacciones sociales.

Por lo tanto, en este trabajo se propone un nuevo método de análisis de la conducta que podría ser más ventajoso comparado con la metodología “estándar” o incluso a los sistemas computarizados, siempre y cuando: a) el método pueda “capturar” más cercanamente la complejidad de las interacciones desplegadas durante la prueba de preferencia, y b) pueda realizarse en una manera práctica y con un tiempo de observación accesible.

### *Caracterización conductual del vínculo de pareja duradero.*

En la naturaleza se ha evidenciado que el topillo de la pradera forma un vínculo de pareja de larga duración, debido a que: 1) las parejas permanecen juntas por diferentes temporadas reproductivas (Getz y Carter 1996): en condiciones de laboratorio la mayoría de las parejas prevalecieron por al menos tres periodos reproductivos (Thomas y Birney 1979) y en condiciones naturales se han recapturado una misma pareja de individuos después de 20 semanas (Getz y cols. 1981). 2) El porcentaje de los individuos que forma una pareja se mantiene estable entre temporadas reproductivas y no reproductivas (Getz y cols. 1981; Getz y Hofmann 1986). 3)  $\approx 75\%$  de las parejas persisten hasta que un miembro muere (Getz y Hofmann 1986; Getz y cols. 1990; Getz y Carter 1996); mientras que solo 26.5% de las parejas son “disueltas” por la dispersión de uno o ambos individuos del nido (Getz y cols. 1990). 4) Si muere el macho de la pareja, la hembra no vuelve a formar una pareja y permanece sola o se une a una unidad de crianza formada exclusivamente por hembras. Por otro lado, cuando la hembra muere, el macho deambula por el territorio (Getz y Carter 1996). 5) Cuando ocurrió la pérdida de un individuo, el conespecífico restante permaneció en el nido entre 8.4 y 26.3 días. Solo un 19% de los individuos que perdieron pareja formó una nueva (Getz y cols. 1990).

Debido a la evidencia anterior, se puede asumir que en condiciones de laboratorio la mayoría ( $\approx 60-75\%$  basado en Getz y cols. 1993; Salomon 1993; Salomon y Jacquot 2002) de los machos que han permanecido por más de un mes con una hembra, han formado un vínculo de pareja de larga duración. Pero, si un macho ha formado un vínculo de larga duración con su pareja ¿qué conductas podrían indicar este proceso? En la naturaleza, los individuos de una especie monógama permanecen en la proximidad de su pareja durante temporadas reproductivas y no reproductivas lo cual se conoce como afiliación selectiva (Stoesz y cols. 2013). En el laboratorio, la afiliación selectiva puede ser representada cuantitativamente por la preferencia de pareja, ésta se determina para cada individuo como la permanencia del individuo focal al menos el doble de tiempo en CLaL con su pareja en comparación con el tiempo que permanece en CLaL con un individuo desconocido (Williams y cols. 1992; McGraw y Young 2010).

Sin embargo, el CLaL preferente a la pareja o preferencia de pareja son indicadores de la formación del vínculo (Aragona y Wang 2004; 2009) y en la mayoría de trabajos solo se han estudiado después de un periodo de cohabitación de 24 horas (Liu y cols. 2010; Young y cols. 2014; Blocker y Ophir 2015; ver Aragona y Wang 2004; 2009). Aunque es posible que la expresión del CLaL preferente a la pareja en el topillo de la pradera macho permanezca “activa” después de un periodo de tiempo más prolongado. Debido a que en dos de los pocos estudios que van más allá del periodo de cohabitación de 24 horas, se mostró que los machos permanecieron en CLaL significativamente por más tiempo con su pareja después de un periodo de cohabitación de 7 días (Ahern y cols. 2009; Ahern y Young 2009). También, es posible que los machos “sostengan” esta conducta para limitar la posibilidad de que la hembra de su pareja copule con un macho deambulador (que representan  $\approx 25 - 40\%$  de la población, basado en Getz y cols. 1993; Salomon y Jacquot 2002; Ophir y cols. 2008; McGuire y Getz 2010; McGuire y cols. 2013). Para un macho deambulador, copular con una hembra “aparejada” no sería difícil, pues las hembras ovulan de manera refleja o espontánea (Roberts y cols. 1999) entonces, el estro y la receptividad sexual podrían ser inducidas por la presencia de un macho novedoso (Richmond y Conaway 1969). Por lo anterior, preferir permanecer cerca de la hembra familiar no solo implicaría para el macho el defender de manera pasiva a la pareja, sino también representaría un mecanismo que aumenta las probabilidades que esta hembra solo copule con él.

De este modo, determinar la “prevalencia” de la preferencia de pareja en machos que han cohabitado por más de un mes con una hembra, podría reflejar que esta conducta refiera no solo a los procesos iniciales (como la formación), sino también a procesos como del mantenimiento del vínculo de pareja de larga duración. Se espera que entre 60 o 70% de los machos despliegue el CLaL preferentemente con la hembra de la pareja, debido a que podría compararse con el porcentaje de los individuos residentes que en condiciones naturales y semi-naturales adoptan la monogamia (Thomas y Birney 1979; Getz y cols. 1993; Salomon 1993; Salomon y Jacquot 2002; Ophir 2017). Además, identificar el patrón conductual de los machos permitirá conocer la variabilidad conductual de nuestra población de estudio.

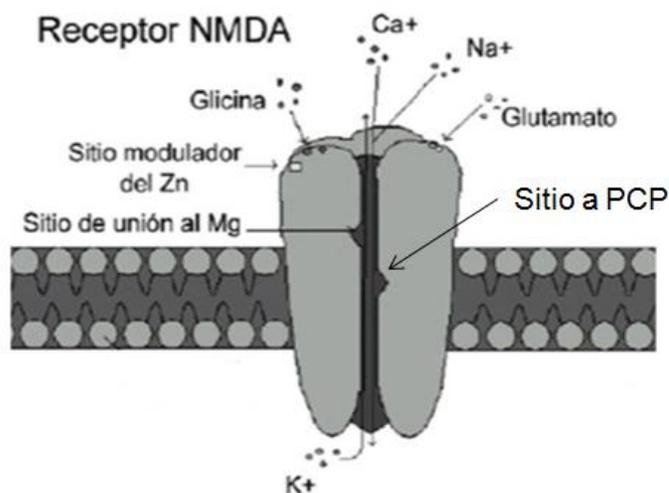
*El topillo de la pradera como modelo animal de la esquizofrenia, una posible aproximación a los síntomas negativos.*

Los déficits para formar y mantener vínculos de larga duración, en particular vínculos de pareja, son comunes en trastornos neuropsiquiátricos como la esquizofrenia (American Psychiatric Association 2000; Volkmar 2001; Bartz y Hollander 2006; Lim y Young 2006). Los pacientes con esquizofrenia muestran alteraciones clínicas que comprometen su rendimiento ante situaciones sociales cotidianas (Browne y Courtney 2007; Velligan y Alphas 2008; Harvey y Strassing 2012), lo cual puede impactar su capacidad para formar vínculos duraderos especialmente de pareja socio-sexual. De hecho, se ha reportado que entre 60-70% de las personas con esquizofrenia no se casan y tienen contactos sociales limitados (pp. 283, American Psychiatric Association 2000). Además, el estatus de soltería guarda una estrecha relación con la precipitación del trastorno; así como una asociación con características clínicas negativas una vez que se ha diagnosticado este padecimiento (Nyer y cols. 2010). Esta baja capacidad para formar un vínculo de pareja en pacientes con esquizofrenia afecta en mayor medida a los varones, debido a que son menos propensos a casarse que las mujeres (Nyer y cols. 2010); lo cual guarda relación con el hecho que los síntomas negativos son más prominentes en los varones (Díaz-Castro y cols. 2018).

Debido a su repertorio conductual que incluye un gran número de conductas afiliativas, el topillo de la pradera ha sido utilizado como animal modelo para entender los principios biológicos de las relaciones afectivas humanas (ej. Young y Wang 2004; McGraw e Young 2010), así como los mecanismos que subyacen alteraciones en este tipo de conductas observadas en el autismo, la ansiedad o la depresión (Bartz y Hollander 2006; Lim y Young 2006; Young y cols. 2011). Pero en nuestro conocimiento, no se ha interrumpido la formación del vínculo de pareja en el topillo de la pradera para mimetizar la baja capacidad de las personas con esquizofrenia para formar una pareja. Por lo tanto, el presente trabajo pretende inducir alteraciones en la conducta afiliativa del topillo de la pradera macho por medio del antagonismo crónico del receptor NMDA.

Evidencia empírica proveniente de estudios en seres humanos sugiere que la ocurrencia de una disfunción del receptor NMDA puede actuar como mecanismo patofisiológico de la esquizofrenia (Javitt y Zukin 1991; Javitt 2010; Lewis 2012; Sendt y cols. 2012). Esta

evidencia incluye los efectos conductuales de antagonistas del receptor NMDA como PCP (fenciclidina) o ketamina (ver figura 1), los cuales inducen en voluntarios sanos un síndrome psicótico similar a los síntomas de la esquizofrenia (ej. alucinaciones auditivas) y en pacientes diagnosticados, se observa un exacerbamiento de los síntomas (Luby y cols. 1959; Krystal y cols. 1994; Lahti y cols. 1995; Large, 2007).



**Figura 1. Sitios de unión y mecanismo de activación del receptor NMDA.**

El receptor NMDA tiene un mecanismo de activación poco común, pues requiere de la unión de su agonista obligado (NMDA o glutamato) en el sitio de unión a glutamato; así como la unión de su otro agonista dual (glicina o D-serina) en el sitio modulador a glicina. En un estado de reposo el receptor es naturalmente bloqueado por el ion magnesio (unido al sitio de magnesio), pero de manera artificial el receptor

puede ser antagonizado por medio de diferentes compuestos que ocupen los sitios a glutamato, glicina o bien bloqueen el poro del canal. El mecanismo de acción de los antagonistas no competitivos del receptor NMDA como PCP, ketamina o MK-801 (dizolcipina) implica bloquear el poro del canal ocupando el sitio de unión a PCP. El bloqueo del poro impide la entrada de los iones sodio (Na<sup>+</sup>) y calcio (Ca<sup>2+</sup>) al interior de la neurona lo cual antagoniza la actividad del receptor y hace que la neurona sea menos sensible a ser estimulada debido a que se hiperpolariza la membrana (Traynelis y cols. 2010). Modificado de Arias-Gutiérrez y cols. (2014).

En roedores del laboratorio (ratones y ratas), la administración crónica de PCP, ketamina y MK-801 (dizolcipina, el antagonista no competitivo más selectivo del receptor NMDA (Tricklebank y cols. 1989)) **mimetizan** la mayoría de las alteraciones asociadas a la esquizofrenia (Large 2007; Porsolt y cols. 2010; Jones y cols. 2011; Lim y cols. 2012; Neil y cols. 2014), las cuales incluyen:

- 1) *Alteraciones conductuales, emocionales y cognitivas.* En la rata macho (Sprague Dawley 225-272 g) el tratamiento crónico con MK-801 (0.5 mg/kg al día por 7 días) redujo el tiempo durante el cual desplegaron conductas afiliativas (interacciones pasivas: proximidad social menor a 20 cm; interacciones activas: olfateo, persecución,

acicalamiento, comportamiento agresivo; dirigidas a un conoespecífico del mismo sexo) (Dyck y cols. 2011), lo cual mimetiza el aislamiento social característico de los síntomas negativos de la esquizofrenia (Seillier y Giuffrida 2009; Porsolt y cols. 2010; Neil y cols. 2014; Wilson y Koenig 2014).

- 2) *Alteraciones neuroquímicas*. La administración de antagonistas del receptor NMDA (PCP, ketamina y MK-801) induce alteraciones en múltiples sistemas de neurotransmisión dependientes de glutamato, GABA, DA, y acetilcolina en una manera similar a las observadas en la esquizofrenia (Large 2007; Lisman y cols. 2008; Lewis 2012). Por ejemplo, en ratas hembra de la línea *hooded*-Lister la administración crónica de PCP (2 mg/kg dos veces por día, por 7 días y 7 días de descanso) indujo alteraciones conductuales (ej. disminución de la interacción social) y también neuroquímicas (ej. alteraciones de la neurotransmisión dopaminérgica en la corteza prefrontal) (Snigdha y Neill 2008; Neill y cols. 2010, 2014).
- 3) *Alteraciones neuroanatómicas*. Existen alteraciones volumétricas y morfométricas (ej. anormalidades en el número de neuronas, densidad de las espinas dendríticas y perturbaciones en el número tamaño o forma de las células) en regiones cerebrales como la corteza prefrontal, el hipocampo, la amígdala, el NAcc y el tálamo que se asocian con la esquizofrenia (Swerdlow 2011). Además, se han asociado diferentes alteraciones funcionales con los síntomas negativos de la esquizofrenia; una es hipo-activación prefrontal (en regiones como la corteza prefrontal) (Menon y cols. 2001) y otra es la hiper-activación del sistema límbico (regiones que incluyen la amígdala y el hipocampo/giro hipocampal) (Gur y cols. 2007).

La administración crónica de MK-801 (0.02 mg/kg/21 días) en ratas macho juveniles ( $\approx$  35 DPN) de la línea Long Evans indujo una reducción en la densidad de interneuronas GABAérgicas que expresan la proteína parvalbúmina en el hipocampo (Braun y cols. 2007). Mientras que la administración crónica de PCP (2.58 mg/kg de manera intermitente durante 14 días) en ratas macho *hooded* de la línea Long Evans (180-220 g) disminuyó la expresión de la proteína parvalbúmina en la corteza prefrontal (Cochran y cols. 2003). En humanos, además de las alteraciones activacionales observadas en el hipocampo y la corteza prefrontal; se ha determinado en estudios post-mortem una disminución en la

densidad de las interneuronas GABAérgicas que expresan la proteína parvalbúmina en el hipocampo y la corteza prefrontal (Reynolds y cols. 2001; Zhang y Reynolds 2002; pero considerar Tooney y Chahl 2004). Por lo tanto, se puede sugerir que el antagonismo crónico del receptor NMDA en roedores de laboratorio es un abordaje viable para mimetizar características neuropatológicas asociadas a la esquizofrenia humana, a lo cual haremos mención en el siguiente inciso.

Por el otro lado, en el topillo de la pradera, las regiones del hipocampo, la corteza prefrontal, la amígdala, el NAcc y el tálamo forman parte de los sustratos neurales que explican la formación del vínculo de pareja y la monogamia (Young y Wang 2004; Ophir 2017). Entonces, es posible que la administración de MK-801 pueda impactar la formación del vínculo de pareja en el topillo de la pradera macho al inducir alteraciones en regiones como la corteza prefrontal o el hipocampo. Además, estas alteraciones podrían guardar cierta relación con la patofisiología de la esquizofrenia.

- 4) *Alteraciones funcionales que subyacen el modelo de la administración crónica de antagonistas del receptor NMDA.* La administración crónica de antagonistas del receptor NMDA induce cambios en la producción enzimática (ej. disminución en las concentraciones de la enzima ácido glutámico descarboxilasa-67 (GAD-67) en diferentes líneas neuronales, como las interneuronas (GABAérgicas) inhibitorias en regiones como la CPF, tal como se observa en pacientes con esquizofrenia (Perry y cols. 1979; Bird 1985). Se hipotetiza que estas alteraciones originan una desinhibición de las células piramidales (glutamatérgicas) –aunque también se ha propuesto que la desinhibición es en parte por la hipofunción del receptor NMDA- en regiones como el hipocampo lo cual incrementa la liberación de DA, mediada por neuronas dopaminérgicas del VTA. Este desbalance en la liberación de DA podría explicar los síntomas psicóticos; mientras que la desinhibición las células piramidales pueden explicar el origen de los síntomas negativos de la esquizofrenia. Esta desinhibición implica una reducción en las oscilaciones de frecuencia gamma como producto de la actividad desorganizada de los grupos de células piramidales como se ha observado en la esquizofrenia y asociado específicamente a los síntomas negativos (Lisman y cols. 2008; Genius y cols. 2013).

En su conjunto, las evidencias anteriores hacen plausible la posibilidad que el antagonismo crónico del receptor NMDA induzca alteraciones en la conducta afiliativa del topillo de la pradera mimetizando ciertas alteraciones psicosociales –y neuroanatómicas- de la esquizofrenia. Entonces, aunque la administración crónica de MK-801 en otros roedores de laboratorio como la rata induzcan alteraciones en su conducta afiliativa mimetizando el aislamiento social observado en la esquizofrenia (Wilson y Koenig 2014); el topillo de la pradera podría representar la oportunidad de mimetizar la baja capacidad para formar un vínculo de pareja que acompaña a los síntomas negativos (Millan y cols. 2014). Pero también, gracias a su intrincado repertorio social el topillo de la pradera permite estudiar ciertas dinámicas sociales del humano en una manera más completa en comparación a otros roedores como el ratón o la rata (Lim y Young 2006; Young y cols. 2011; Bales y cols. 2017; Beery y cols. 2018).

### **3. Justificación.**

El presente estudio fue motivado por tres razones. Primera, el análisis de la conducta afiliativa del topillo de la pradera podría ser complementado con una nueva metodología, debido a que las metodologías actuales requieren de grandes periodos de observación y no aportan información sobre la expresión de conductas no afiliativas.

Segunda, no se ha caracterizado el patrón conductual de topillos macho enganchados en un vínculo de pareja duradero, caracterizar este patrón podría ayudar a entender la expresión de la conducta afiliativa de esta especie en los procesos de mantenimiento/reforzamiento del vínculo de pareja de larga duración.

Y finalmente, el topillo de la pradera podría ser utilizado como un modelo animal de los síntomas de la esquizofrenia, para de una manera ventajosa mimetizar alteraciones en conductas sociales complejas observadas en la esquizofrenia, como la baja capacidad para formar pareja. Este nuevo modelo animal podría suponer una herramienta de investigación para entender aspectos neurobiológicos de las alteraciones en la capacidad para formar pareja observadas en la esquizofrenia y además, representar una oportunidad para probar o desarrollar fármacos que atenúen estas alteraciones.

#### **4. Hipótesis y predicciones.**

##### **Hipótesis (1).**

En el topillo de la pradera macho, la expresión de conductas afiliativas dirigidas a la pareja (como la conducta de preferencia de pareja) puede caracterizar un vínculo de larga duración.

##### **Predicciones.**

- a) Entre el 60 y el 70% de los machos que han cohabitado por más de un mes con su pareja desplegarán la conducta de preferencia de pareja.
- b) Los topillos de la pradera macho que han cohabitado por más de un mes con su pareja dirigirán un mayor número de conductas afiliativas a la pareja; mientras que a la hembra desconocida dirigirán más conductas no afiliativas.

##### **Hipótesis (2).**

El antagonismo crónico del receptor NMDA induce alteraciones persistentes en la conducta afiliativa del topillo de la pradera macho, las cuales mimetizan alteraciones psicosociales de la esquizofrenia.

##### **Predicciones.**

- a) Los machos tratados con solución salina formarán un vínculo de pareja con una hembra después de cohabitar con esta por 24 horas; estos desplegarán con su pareja un mayor número de conductas afiliativas, mientras que con la hembra desconocida dirigirán más conductas no afiliativas.
- b) Los machos tratados con MK-801 mostraran déficits en la formación del vínculo de pareja después de cohabitar con una hembra por 24 horas. Estos déficits pueden incluir:
  - i. Una disminución en la conducta afiliativa total, la cual implicaría reemplazar la conducta afiliativa con interacciones no afiliativas y/o una preferencia por evitar la interacción social.
  - ii. Dirigir de manera preferencial conductas afiliativas con la hembra desconocida y conductas no afiliativas con la hembra de la pareja.
  - iii. Desplegar la conducta afiliativa y no afiliativa a ambas hembras, sin preferencia.

## **5. Objetivos.**

### **5.1. General.**

Determinar si el bloqueo crónico del receptor NMDA induce alteraciones persistentes en la conducta afiliativa del topillo de la pradera macho.

### **5.2. Específicos.**

- i. Proponer y probar una nueva metodología para analizar la conducta afiliativa y no afiliativa del topillo de la pradera durante la prueba de preferencia.
- ii. Caracterizar el patrón conductual desplegado durante la prueba de preferencia por machos provenientes de vínculos duraderos.
- iii. Determinar si el tratamiento crónico con MK-801 inducirá alteraciones persistentes en la conducta afiliativa del topillo de la pradera macho.

## **6. Metodología.**

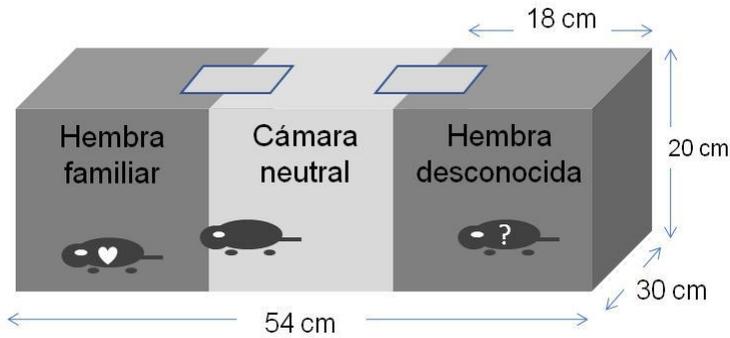
### **6.1. Animales.**

En el presente estudio se utilizaron topillos de la pradera (*Microtus ochrogaster*) provenientes de una colonia establecida en el Centro de Investigación en Reproducción Animal, CINVESTAV-Universidad Autónoma de Tlaxcala. Se utilizó un total de 65 individuos, de los cuales 28 fueron machos y 37 hembras; el número de los individuos utilizados en cada experimento se detalla más adelante. Los topillos fueron alojados en jaulas estándar para rata (37 x 27 x 16 cm) y mantenidos bajo condiciones controladas: ciclo de luz/oscuridad de 16:8 horas, alimento y agua ad libitum. Cada topillo fue cuidado, manejado y utilizado experimentalmente en apego a las normas de cuidado animal y a los lineamientos contenidos en la guía de cuidado de animales de laboratorio del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (o *National Institute of Health (NIH)*, National Research Council 2010).

### **6.2. Prueba de preferencia.**

Para evaluar la conducta afiliativa del topillo de la pradera utilizamos la prueba de preferencia que fue descrita inicialmente por Williams y colaboradores (1992), la cual permite evaluar si un individuo ha formado un vínculo con su pareja (Williams y cols. 1992; Getz y cols. 1993; Solomon y Jacquot 2002; Aragona y Wang 2004; Ophir y cols. 2008; Young y cols. 2011; Blocker y Ophir 2016).

El aparato de prueba consta de una arena de tres cámaras rectangular (54 x 30 x 20 cm) subdividida en tres compartimentos (18 x 30 x 20 cm cada uno). Las dos barreras intermedias que hacen las subdivisiones tienen una abertura cuadrangular (6 cm de lado) que permitieron la entrada del individuo focal a las cámaras de los extremos (ver figura 2). El hecho de que cada cámara fuera del mismo tamaño redujo la posibilidad que el individuo focal hubiera permanecido por más tiempo en una cámara debido a una diferencia en el tamaño. La arena fue construida totalmente de vidrio transparente de 6 mm de grosor y se limpió con alcohol entre cada prueba a fin de evitar la permanencia de pistas odoríferas.



**Figura 2. Características de la arena de tres cámaras utilizada en la prueba de preferencia.**

Evaluamos la conducta afiliativa del topillo de la pradera macho en esta arena (54 x 30 x 20 cm) subdividida en tres cámaras (18 x 30 x 20 cm cada una). El macho interactuó libremente (al atravesar

la abertura (6 cm x lado) entre las cámaras) con las dos hembras (la hembra de la pareja o familiar y una hembra desconocida) que se alojaron en cada una de las cámaras de los extremos de la arena.

En los tres compartimentos se colocó aserrín (aproximadamente 25 g por cámara) en el suelo, mismo que fue reemplazado al final de cada prueba; a fin de proveer a la arena un sustrato al cual los animales estaban acostumbrados. Con ello se aseguró, en cierta medida, que la conducta general de los individuos no fuera modificada por un cambio en el sustrato; mientras que el recambio de aserrín tuvo la finalidad de eliminar el olor que dejaron en el piso alguno de los individuos.

Las cámaras de los extremos retuvieron a dos hembras “estímulo”, una en cada cámara; mientras que la cámara neutra o central no alojó a ningún individuo. Las hembras deberían ser muy similares entre sí, únicamente deberían diferir en si han cohabitado previamente o no con el macho focal (Zheng y cols. 2013; Blocker y Ohir 2015). Por lo tanto, los criterios de inclusión y exclusión para las dos hembras estímulo de la misma prueba, fueron: 1) no estar emparentadas con el macho, 2) que guardaran parentesco entre ellas, 3) tener un estatus reproductivo similar, y 4) tener un peso y edad similar a la del macho. Con estos criterios se aseguró, en cierta medida, que la única característica distintiva entre las dos hembras estímulo fuera la cohabitación previa con el macho. A la hembra que ha cohabitado previamente con el macho se le denominó como hembra de la pareja o hembra “familiar” y en el caso de la hembra que no había cohabitado previamente con el macho se le refirió como hembra “desconocida”. El tiempo de cohabitación para la pareja son descritos de manera particular para cada experimento.

En cada prueba se asignó una cámara (del extremo izquierdo o derecho) para cada hembra (familiar/desconocida) en una manera contrabalanceada; es decir, se alternó entre pruebas la

ubicación de las hembras (ver figura 2). Por ejemplo, para realizar dos pruebas de preferencia, en una de ellas se colocó a la hembra de la pareja en la cámara del extremo izquierdo y a la desconocida en la cámara del extremo derecho. Para la segunda prueba, las hembras ocuparon los lugares contrarios el extremo derecho para la hembra de la pareja y la cámara del extremo izquierdo para la hembra desconocida. Se optó por este arreglo para evitar un sesgo en la conducta de los machos, el cual pudiera ser originado por una preferencia hacia un determinado lugar, el seguir una pista espacial o algún otro factor extraño. Solo dos pruebas fueron realizadas cada día, para ello utilizamos dos arenas de prueba de las mismas características.

En cada prueba el individuo focal (un macho) se movió libremente por toda la arena e interactuó a voluntad con cualquiera de las hembras. Para limitar el contacto hembra-hembra, un día antes de la prueba a cada una de las hembras se les colocaron cinchos de plástico alrededor del cuello, a manera de collar. Luego, en el día de la prueba un clip metálico unido a una cadena ligera era enganchado y asegurado en el collar, el otro extremo de la cadena estuvo “anclado” al muro de la cámara por una ventosa de plástico. Este procedimiento fue empleado en una manera similar a la reportada para limitar la interacción hembra-hembra, pero no macho-hembra; sin inducir alteraciones en el acicalamiento, la interacción social o la copula de los individuos (Ophir y DelBarco-Trillo 2007; Wolff y Dunlap 2002; Blocker y Ophir 2016).

El inicio de la prueba fue marcado cuando el macho focal tocó con sus cuatro patas la cámara neutra y el final de la prueba tuvo lugar tres horas después. Durante ese periodo se registró la actividad en dos arenas de prueba exactamente iguales, a fin de realizar dos diferentes pruebas en un mismo día, por medio de una video-cámara (una de la marca Sony® y otra Panasonic®). Las cámaras fueron colocadas en tripiés de la marca Solidex® a una distancia, altura y ángulo apropiados para registrar las actividades en toda la arena.

### **6.3. Análisis conductual.**

Para el presente trabajo se propuso que un método de muestreo instantáneo puede ofrecer ventajas sobre el método de muestreo continuo (previamente publicado, ej. Williams y cols. 1992; McGraw y Young 2010) en el análisis de la conducta afiliativa del topillo de la pradera

durante la prueba de preferencia. Para validar que este método de muestreo refleja en cierta medida los resultados del método previamente publicado, primero se evaluó en 7 machos (del primer experimento, ver más adelante) las conductas que son cuantificadas por el método de muestreo continuo, estas incluyen:

A) El *contacto lado a lado* (CLaL), referente al contacto corporal cercano (menor a 2 cm) de más de la mitad de la longitud de cada flanco entre el individuo focal y cualquiera de los dos individuos estímulo (Williams y cols. 1992; Ahern y cols. 2009; McGraw y Young 2010; Young y cols. 2011).

B) La *preferencia de pareja*, que es determinada cuando el individuo focal permaneció más del doble de tiempo en CLaL con el miembro de la pareja, en comparación con el desconocido (Williams y cols. 1992; McGraw y Young 2010; Young y cols. 2011; Blocker y Ophir 2015; 2016). Aunque estas dos conductas son indicativas de la formación del vínculo de pareja (ej. Aragona y Wang 2004; 2009); suele incorporarse el registro de otras conductas.

C) El *tiempo en cada cámara* o la duración en minutos que el individuo focal permaneció realizando cualquier actividad en cada una de las cámaras. Se comienza a cuantificar cuando el topillo focal ha introducido sus cuatro patas a la cámara y concluye cuando tiene las cuatro patas en otra cámara. Esta conducta indica si el individuo focal prefiere compartir un mismo espacio con un conespecífico (Liu y cols. 2001; Ahern y cols. 2009; Blocker y Ophir 2016; Beery y cols. 2018).

D) El *número de entradas a cada cámara* que refleja la frecuencia con la cual el topillo focal visitaba las cámaras que contenían a los conespecíficos. Para registrar un evento como entrada, se debía observar que el individuo introdujo sus cuatro patas a la cámara; por medio de esta conducta se cuantifica de manera indirecta la “motivación” para entrar en una determinada cámara y puede ser un indicativo de la ambulación del individuo focal (ej. Curtis y Wang 2005; Liu y cols. 2010; Donaldson y cols. 2010).

E) El *número de montas*, se registró la frecuencia con la que el individuo focal “montó” y realizó una serie de movimientos pélvicos asociados a la intromisión del pene con cada uno de los conespecíficos estímulo. Esto para determinar la “fidelidad” sexual (Robinson 2015; Ophir 2017) exhibida durante la exposición a una potencial pareja o únicamente la conducta sexual de los individuos focales (Donaldson y cols. 2010; Liu y cols. 2010).

F) El *número de veces que roe la cadena*, se incorporó esta conducta pro-social –posiblemente de ayuda (Stetzik y cols 2018)- para probar si su expresión es dependiente de la identidad del conoespecífico estímulo. Para ello se cuantificó la frecuencia con la que el individuo focal roía a alguna de las partes de los dos sistemas que limitan las interacciones hembra-hembra (como el cincho o la cadena).

Por el otro lado, con el método de muestreo instantáneo se cuantificó un nuevo *set* de conductas, el cual incluyó el registro de dos conductas afiliativas y fue complementado por el registro de tres conductas no afiliativas, como se describe a continuación:

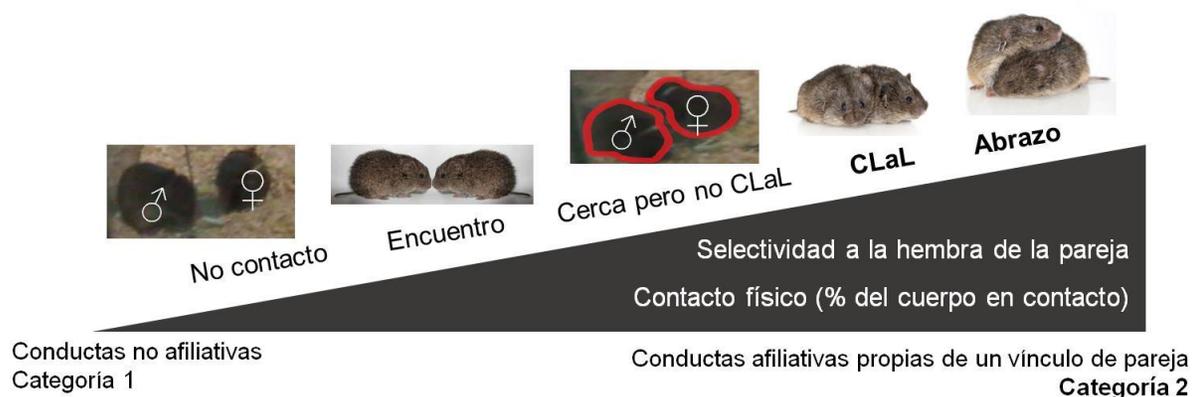
A) *No contacto*, cualquier actividad o conducta realizada por el macho (individuo focal) que no involucró un contacto físico directo o cercano (menor a 5 cm) con ninguna de las dos hembras (ej. auto-acicalamiento, exploración y olfateo a la arena). Estas interacciones pudieron ocurrir en alguna de las dos cámaras que contenía a cualquier hembra o bien en la cámara neutra que no aloja a ningún individuo de forma permanente.

B) *Encuentro/investigación social*, cualquier actividad o conducta realizada por el macho que implicó un contacto físico donde una parte del cuerpo (no mayor al 25%) de un individuo está en contacto directo con una parte del cuerpo (no mayor al 25%) del otro individuo. Las conductas cuantificadas como este tipo de interacción fueron la inspección/olfacción anogenital, la exploración social y/o el olfateo dirigido a un individuo.

C) *Cerca pero no CLaL*, este tipo de interacciones reflejaron la proximidad “social” en ausencia de contacto físico. Se caracterizó por una postura similar al CLaL, pero difiere de ésta al no existir un contacto físico directo entre los individuos, es decir ambos individuos están cercanos uno del otro (menos de 5 cm de separación), pero no en contacto físico o una cercanía menor a 2 cm.

D) *CLaL*, el contacto corporal (menor a 2 cm) que involucra más de la mitad de la longitud de cada flanco entre el topillo macho y cualquiera de las dos hembras (Williams y cols. 1992; Ahern y cols. 2009; McGraw y Young 2010; Young y cols. 2011). E) *Abrazo*, uno de los individuos (principalmente el macho) posó su abdomen en torno al cuello o la mitad superior del tronco del otro individuo (comúnmente la hembra), simulando un “abrazo” (Thomas y Birney 1979).

Las primeras tres conductas (no contacto, encuentro y cerca pero no CLaL) se agruparon en la categoría 1 que refiere a conductas no afiliativas; mientras que las dos últimas son conductas afiliativas (CLaL y abrazo) que se agruparon en la categoría 2. Se determinaron estas categorías conductuales de acuerdo al porcentaje de contacto físico que se observa en cada conducta y a que la expresión de algunas de ellas se ha asociado a la formación del vínculo de pareja (ver figura 3, Thomas y Birney 1979; Williams y cols. 1992; Ahern y cols. 2009; McGraw y Young 2010; Young y cols. 2011; Stoesz y cols. 2013; Blocker y Ophir 2016; Bales y cols. 2017).



**Figura 3. Set de conductas cuantificadas por el método de registro instantáneo**

Durante la prueba de preferencia, el método de registro instantáneo (nuestra propuesta metodológica) registró un *set* de cinco conductas (no contacto, encuentro / investigación social, cerca pero no CLaL, CLaL y abrazo); las cuales se agruparon en conductas afiliativas (categoría 2: CLaL y abrazo) y no afiliativas (categoría 1: (no contacto, encuentro / investigación social y cerca pero no CLaL), según el porcentaje de superficie corporal puesta en contacto y la especificidad de su expresión en relación con la familiaridad de la hembra.

El método de muestreo instantáneo propuesto realizó 30 observaciones conductuales “instantáneas”, en las cuales se registró el comportamiento del macho dirigido, o no, a alguna de las dos hembras. Cada observación se realizó en intervalos de dos minutos a lo largo de la última hora de la prueba de preferencia, cuando la observación instantánea fue ambigua o la calidad del video fue deficiente se dejó “correr” la grabación cinco segundos o se retrocedió la misma cantidad de tiempo, esto con la intención de clarificar la observación que tiene lugar en el preciso instante de los dos minutos. Se determinó analizar solo la última hora de la prueba conductual debido a que cuando se evaluaba la conducta con el método de muestreo continuo notamos que el CLaL fue desplegado casi exclusivamente durante la última hora de la prueba

de preferencia. Entonces al analizar solo la última hora (en lugar de las tres horas de duración de la prueba), el muestreo instantáneo no se “perdió” de la expresión de esta conducta tan importante, pero pudo reducir sustancialmente el tiempo de observación.

#### **6.4. Metodología particular del experimento 1.**

*Muestra.* Ninguna otra prueba conductual fue realizada previamente en este grupo de individuos. En este experimento se utilizaron 10 hembras y 10 machos adultos vírgenes, sexualmente maduros, de una edad entre los 70 y 100 (día post-nacimiento (DPN)). Solo un macho fue tratado con solución salina (administración intraperitoneal (i.p.) por siete días) un mes y medio antes de la prueba conductual, como parte de otro experimento.

*Formación de parejas.* Cada pareja de topillos fue formada de manera arbitraria, por un macho y una hembra no emparentados, un mes antes (como mínimo) de ser evaluados en la prueba de preferencia.

*Selección de la hembra desconocida para la prueba de preferencia.* Para asegurar, en cierta medida, que el macho interactuara con hembras de características muy similares y que solo difieran en si existe o no una cohabitación previa. Por lo tanto, se utilizó una hembra desconocida con un estatus reproductivo similar al de la hembra de la pareja.

*Determinación del estatus reproductivo de las hembras estímulo.* Utilizando la bitácora de registro, fue posible inferir el estatus reproductivo de cada hembra (ej. gestante, lactante) y categorizar las parejas en reproductivas (a aquellas parejas que han tenido críos al menos una vez aunque estos hayan muerto) y no reproductivas (aquellas a las cuales no se les ha registrado ningún nacimiento).

*Criterios de inclusión / exclusión de las hembras estímulo.* Cada una de las hembras fue utilizada en una prueba de preferencia como hembra familiar, pero también “ocupó el papel” de hembra desconocida en otra prueba. Las hembras no fueron utilizadas entre pruebas por al menos siete días, para no inducir un estrés crónico producto de la manipulación constante. Tampoco se utilizaron hembras con críos amamantando permanentemente (críos de una edad menor de los 21 DPN), para evitar inducir estrés a la hembra y a los críos.

## 6.5. Metodología particular del experimento 2.

*Muestra.* La selección de los topillos de la pradera macho ( $n = 18$ ) fue de manera arbitraria de las parejas reproductoras de la colonia. Fueron separados de sus padres y sus hermanos una vez que la identificación del sexo era totalmente clara entre los 35 y 40 DPN. Solo se incluyeron dos machos de la misma camada y pareja progenitora por cada grupo experimental. Al momento de la prueba conductual, los machos tenían una edad de 70 DPN.

*Tratamiento farmacológico.* Cuando los machos alcanzaron la edad de 45 DPN se asignaron en dos grupos para recibir un determinado tratamiento farmacológico. El grupo experimental o MK-801 ( $n = 10$ ), recibió inyección i.p. diaria durante siete días de 0.2 mg / kg de un antagonista selectivo no competitivo del receptor NMDA, MK-801 (Sigma-Aldrich, previamente diluido en solución salina 0.9% NaCl). Mientras que el grupo salina o control ( $n = 8$ ), recibió una administración similar a la del grupo experimental que involucró solución salina (0.9% NaCl) en lugar de MK-801.

*Formación de parejas.* Cuando los machos tratados (con salina y / o MK-801) alcanzaron la madurez reproductiva (69 DPN) fueron colocados en una jaula con una hembra. Esta hembra (su pareja) tuvo las siguientes características: no estuvo emparentada con el macho, adulta, de casi la misma edad que el macho, sexualmente madura y posiblemente receptiva. Una vez alojado el macho en la misma caja que la hembra (con aserrín limpio, comida y agua *ad libitum*), se permitió que cohabitaran libremente por 24 horas. Este tiempo se ha reportado como suficiente para que los machos formen una preferencia y muy posiblemente un vínculo con la pareja; de hecho, representa el periodo “estándar” para evaluar el impacto de una manipulación sobre la formación del vínculo con la pareja (Williams y cols. 1992; Aragona y Wang 2004; 2009).

*Selección de la hembra desconocida.* Después del periodo de cohabitación (24 h), se desarrolló la prueba de preferencia como se describió antes. La hembra desconocida fue casi de la misma edad y peso que la hembra de la pareja, tampoco estuvo emparentada con el macho, fue sexualmente madura y posiblemente receptiva. Estos criterios de inclusión/exclusión virtualmente garantizan que la única diferencia entre hembras sea la cohabitación previa con el macho (Zheng y cols. 2013; Blocker y Ohir 2015).

*Inducción de la receptividad sexual.* Aunque la cópula no es necesaria para la formación del vínculo de pareja, se ha asociado con un efecto facilitatorio (Williams y cols. 1992). Por lo tanto, se indujo la receptividad sexual a la hembra de la pareja antes de la cohabitación con el macho y a la desconocida antes de la prueba de preferencia. Se utilizó un método previamente validado, el cual involucra la exposición durante 48 horas a aserrín proveniente de un grupo de machos, dentro de los cuales uno era el macho con el cual se permitirá cohabitar o interactuar durante la prueba de preferencia (Blocker y Ophir 2015, 2016).

### **6.6. Estadística.**

La cuantificación de las conductas analizadas, tanto por el muestreo continuo como por el instantáneo, se realizó en hojas de registro conductual impresas. Posteriormente, los datos de la conducta para ambos métodos de muestreo según el experimento fueron digitalizados y compilados en un libro electrónico del programa Excel™ para Windows™ para luego ser contrastados estadísticamente y graficados por el programa de cómputo GraphPad PRISM™, versión 5.01 para Windows™.

En el experimento 1, los datos del muestro continuo (duración del CLaL y del tiempo en cada cámara; número de eventos observados para las entradas a la cámara, montas y veces que el macho roe la cadena) fueron contrastados en relación con la familiaridad del macho con las hembras (hembra familiar vs. hembra desconocida). Para realizar estas comparaciones utilizamos las pruebas estadísticas no paramétricas para muestras no independientes de Wilcoxon y Friedman, cuando eran dos o tres niveles de una misma variable, respectivamente. El análisis *post hoc* que siguió a la prueba de Friedman implicó una comparación múltiple de Dunn.

Luego, los datos obtenidos por el muestreo instantáneo en ambos experimentos involucraron comparaciones de dos niveles para una misma variable, por lo tanto, cuando las comparaciones se hacían dentro del mismo grupo se utilizó la prueba de medidas no independientes de Wilcoxon; en cambio cuando los datos provenían de diferentes sujetos o se hacían comparaciones entre tratamientos se recurrió a la prueba de medidas independientes de Mann Whitney.

Las 30 observaciones conductuales registradas por el método de muestreo instantáneo para las cinco conductas (no contacto, encuentro/investigación social, cerca pero no CLaL, CLaL y abrazo) desplegadas por los machos pudieron ser contrastadas de manera individual (número de observaciones para cada conducta) o de manera agrupada (número de observaciones para cada categoría conductual) en relación con la familiaridad de la hembra (familiar vs. desconocida). Además, se calculó la conducta general del macho sin distinguir entre conducta dirigida a la pareja y conducta dirigida a la hembra desconocida, al sumar el número de observaciones para la hembra familiar con el de la hembra desconocida para cada conducta o categoría conductual (categoría 1- conducta no afiliativa; categoría 2- conducta afiliativa). Finalmente, se determinó la asignación de cada categoría conductual del macho en relación con la familiaridad de la hembra, para ello se calcularon los “cocientes de interacción social” (CIS) de la siguiente manera:

$$CIS = \frac{\text{categoría conductual } X \text{ dirigida a hembra } Y}{\text{conducta } X \text{ dirigida a hembra } Y + \text{conducta } X \text{ dirigida a hembra } Z}$$

Donde:

$X$  = categoría conductual para analizar su asignación (Categoría 1 / Categoría 2)

$Y$  = hembra familiar

$Z$  = hembra desconocida

Los CIS representaron la proporción de observaciones de una categoría conductual que fueron asignadas por el macho a una determinada hembra, en relación con el total de interacciones de esta categoría que fueron desplegadas por el macho a ambas hembras. Determinar los CIS tuvo el propósito de normalizar el número de los eventos u observaciones con la actividad general de cada macho, al tomar en cuenta las diferencias inter-individuales en la actividad general.

Considerando que el indicativo de la formación del vínculo de pareja en el topillo de la pradera macho es que los individuos de una pareja permanezcan por más tiempo en CLaL (ej. Williams y cols. 1992; McGraw y Young 2010); pero que a pesar que los topillos machos que hayan formado un vínculo de pareja estos exploran por más tiempo las pistas odoríferas de otras hembras (Parker y cols. 2011). Entonces, pudimos sugerir que los machos que han formado un vínculo afiliativo con una hembra le asignarían (preferencialmente) a esta hembra

un mayor número de conductas afiliativas; esto implicaría que el CIS de la categoría 2 dirigido a la hembra familiar será significativamente más grande en comparación con el CIS de la categoría 1. Mientras que estos machos asignarían más conductas no afiliativas a hembras desconocida, lo cual sería representado por CIS de la categoría 1 más grandes en comparación con CIS de la categoría 2 desplegados a las hembras desconocidas.

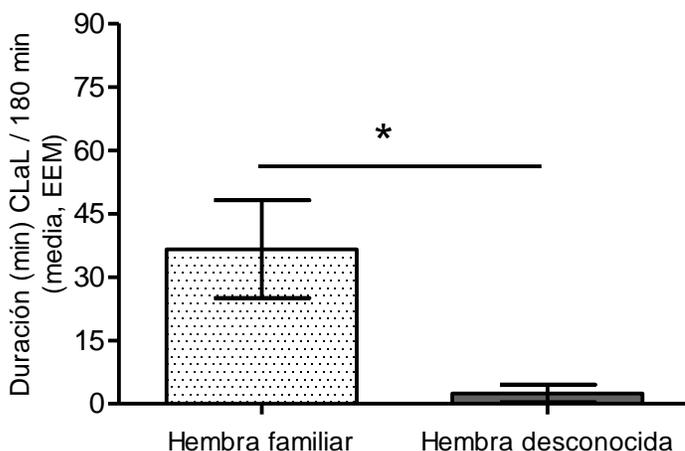
## 7. Resultados.

### 7.1. Primer experimento.

Se analizaron las conductas desplegadas durante la prueba de preferencia por topillos macho, que han cohabitado por más de un mes con su pareja, utilizando dos métodos de muestreo distintos, uno continuo (como lo reporta la literatura) y otro instantáneo (una nueva propuesta) para validar la utilidad de nuestra metodología al analizar la conducta afiliativa –y no afiliativa- del topillo de la pradera durante esta prueba (objetivo 1); y caracterizar el patrón conductual desplegado por machos provenientes de vínculos duraderos (objetivo 2).

#### 7.1.1. Resultados del análisis conductual provenientes del método de muestreo continuo.

*Duración total del CLaL durante 3 horas de observación (método de muestreo continuo).* La familiaridad de la hembra (familiar-desconocida) tuvo un efecto significativo sobre la expresión del CLaL desplegada por el macho. Se observó que la duración del CLaL, determinada por el método de muestreo continuo, fue mayor con la hembra de la pareja en comparación con la desconocida ( $p = 0.031$ , prueba de Wilcoxon, ver gráfica 1). Las medias del tiempo que permanecieron los machos ( $n = 7$ ) con cada hembra son claramente diferentes, pues con la hembra familiar la media fue de 36.57 min (11.58 error estándar de la media, (EEM)); mientras que con la hembra desconocida solo permanecieron una media de 2.42 min (2.1 EEM) (ver tabla 1).



#### **Gráfica 1. Duración total del CLaL durante la prueba de preferencia**

Los topillos de la pradera macho ( $n = 7$ ), que han cohabitado por más de un mes con una hembra, permanecieron por más tiempo en contacto lado a lado (CLaL) con la hembra familiar en comparación con la hembra desconocida ( $p = 0.031$ , prueba de Wilcoxon, valor denotado por el asterisco). Las barras de la gráfica representan la media de la

duración (min) del CLaL que desplego el grupo de machos con cada hembra, los bigotes refieren al error estándar de la media (EEM).

| ID del topillo   | CLaL con la hembra familiar (min) | CLaL con la hembra desconocida (min) | Preferencia del macho |
|--|-----------------------------------|--------------------------------------|-----------------------|
| 1  | 67                                | 0                                    | A la pareja           |
| 2  | 64                                | 1                                    | A la pareja           |
| 3  | 0                                 | 15                                   | A la desconocida      |
| 4  | 0                                 | 0                                    | No hay preferencia    |
| 5  | 28                                | 0                                    | A la pareja           |
| 6  | 70                                | 0                                    | A la pareja           |
| 7  | 27                                | 1                                    | A la pareja           |
| Media (EEM)  | 36.57 (11.58)                     | 2.42 (2.1)                           | --                    |
| Porcentaje de machos que expresan una preferencia de pareja    |                                   |                                      | 71 %                  |
| Porcentaje de machos que NO expresan una preferencia de pareja |                                   |                                      | 29 %                  |

**Tabla 1. Proporción de topillos de la pradera que mostraron una preferencia a la pareja**

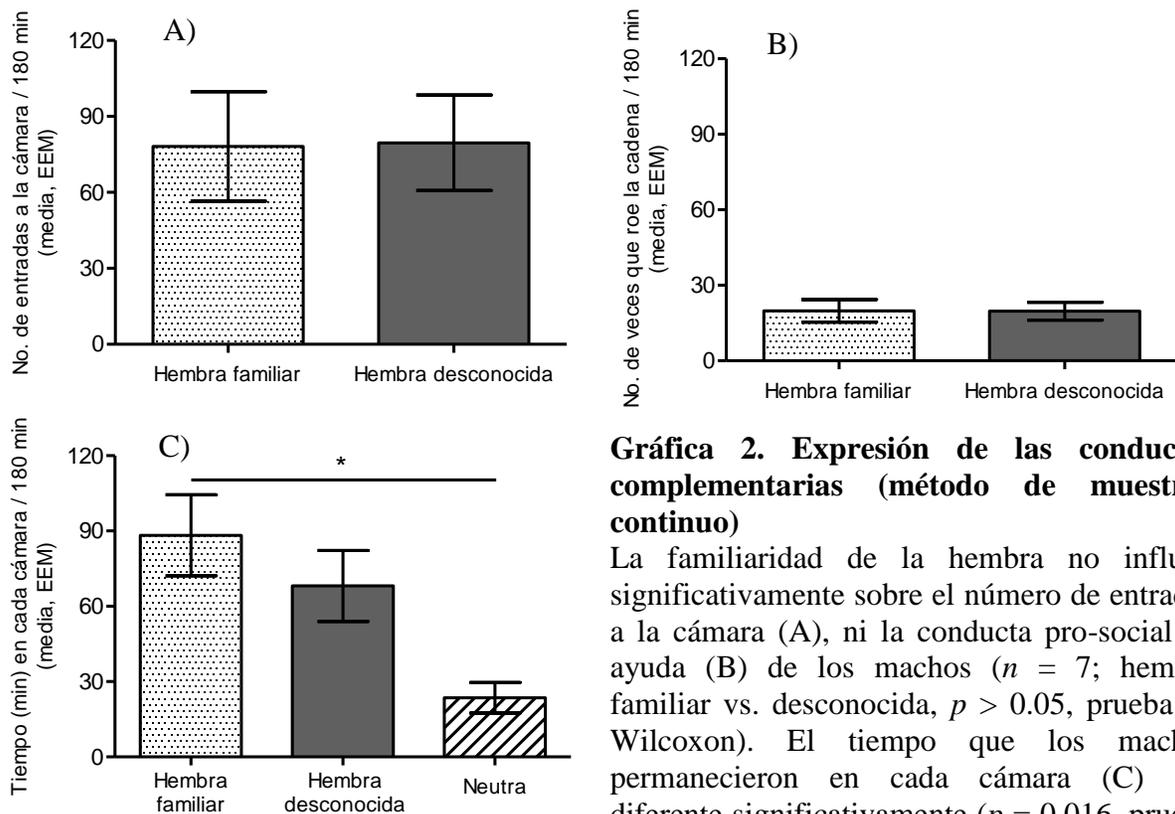
De los machos provenientes de un vínculo de pareja duradero ( $n = 7$ ), el 71% ( $n = 5$ ) exhibieron una preferencia de pareja, de acuerdo al criterio establecido en estudios anteriores (la permanencia en CLaL con la pareja por una duración mayor al doble en comparación con la hembra desconocida; McGraw y Young 2010); del 29% restante ( $n = 2$ ) un macho mostró una preferencia a la hembra desconocida y otro no tuvo preferencia.

La tabla muestra la preferencia social de cada macho pero también la media y entre paréntesis el EEM del tiempo que permaneció en CLaL con cada hembra.

*Proporción de machos que mostraron una preferencia de pareja (método de muestreo continuo).* En estudios previamente publicados, la preferencia de pareja fue determinada cuando un macho permaneció en CLaL con su pareja por una duración mayor al doble en comparación con la hembra desconocida (McGraw y Young 2010). Considerando esta definición, se encontró que 71% de los machos ( $n = 5$ ) exhibió una preferencia de pareja; mientras que en el restante 29% ( $n = 2$ ) no desplegó este tipo de preferencia (ver tabla 1).

*Cuantificación complementaria de otras conductas (método de muestreo continuo).* La familiaridad de la hembra no afectó significativamente el número de entradas a cada cámara o el número de veces que el macho roe la cadena (hembra familiar vs. hembra desconocida,  $p > 0.05$ , prueba de Wilcoxon, ver gráfica 2 A y B). Al analizar la duración que el macho permaneció en cualquiera de las tres cámaras, se observó un efecto significativo de la cámara

( $p = 0.016$ , prueba de Friedman). Tras realizar el análisis *post hoc*, comparación múltiple de Dunn, se observó que el macho no permaneció por más tiempo en la cámara de una hembra en particular (duración en la cámara, familiar vs. desconocida,  $p > 0.05$ ). Pero, se observó una diferencia significativa al comparar el tiempo que el macho permaneció en la cámara neutra con respecto a la cámara que contenía a la hembra familiar ( $p < 0.05$ ), más no a la hembra desconocida ( $p > 0.05$ ) (ver gráfica 2 C).



**Gráfica 2. Expresión de las conductas complementarias (método de muestreo continuo)**

La familiaridad de la hembra no influyó significativamente sobre el número de entradas a la cámara (A), ni la conducta pro-social de ayuda (B) de los machos ( $n = 7$ ; hembra familiar vs. desconocida,  $p > 0.05$ , prueba de Wilcoxon). El tiempo que los machos permanecieron en cada cámara (C) fue diferente significativamente ( $p = 0.016$ , prueba

de Friedman); el análisis *post hoc*, comparación múltiple de Dunn, reveló que los machos no permanecieron por más tiempo en la cámara de una hembra en particular (duración en la cámara, familiar vs. desconocida,  $p > 0.05$ ). Pero, prefirieron permanecer más tiempo en la cámara de la hembra familiar, más no en la cámara de la desconocida, a permanecer solos en la cámara neutra ( $p < 0.05$ , valor denotado por el asterisco). Las barras de las gráficas representan la media y los bigotes refieren al EEM.

Por último, durante las tres horas de videgrabación no se registraron intentos de cópula (montas) por parte de los machos dirigidos a alguna de las dos hembras.

7.1.2. Resultados del análisis conductual provenientes del método de muestreo instantáneo.

El análisis de la conducta utilizando el método de muestreo continuo permitió conocer cuáles conductas desplegadas por el macho fueron influenciadas significativamente por la familiaridad de la hembra. Con esta referencia en mente, se utilizó el método de muestreo instantáneo para determinar si la familiaridad de la hembra influye en la expresión de la conducta afiliativa y no afiliativa del macho. La expresión de estas conductas fue analizada en diferentes niveles, desde la expresión de cada conducta independiente, la agrupación de conductas entre dos categorías (categoría 1- conducta no afiliativa; categoría 2- conducta afiliativa), hasta la asignación diferencial de la conducta (afiliativa vs. no-afiliativa) del macho, dependiendo de la familiaridad de la hembra. Para el muestreo continuo se utilizaron datos de siete machos, provenientes de igual número de parejas; mientras que en el muestreo instantáneo se analizó la conducta de esos mismos machos y se amplió el número de individuos a diez.

*Efecto de la familiaridad de la hembra sobre el número de observaciones de cada conducta (método de muestreo instantáneo).* La familiaridad de la hembra no afectó significativamente el número de observaciones de los siguientes estados conductuales (ver metodología para definiciones operacionales de cada conducta): no contacto, encuentro, cerca pero no CLaL, CLaL y abrazo) (hembra familiar vs. hembra desconocida,  $p > 0.05$ , prueba de Wilcoxon, ver tabla 2). Sin embargo, al revisar la expresión promediada de cada conducta (valores en negritas de las medias en tabla 2) se pudo observar una tendencia general del macho para expresar ciertas conductas en relación con la familiaridad de la hembra.

| Conducta                         | <u>Hembra familiar</u><br>(# observaciones del muestreo instantáneo) | <u>Hembra desconocida</u><br>(# observaciones del muestreo instantáneo) | Valor de $p$ |
|----------------------------------|--|---|--------------|
| No contacto                      | 2.3 (1.012)  | 5.6 (2.023)   | 0.109        |
| Encuentro / investigación social | <b>0.5</b> (0.223)   | <b>2.4</b> (1.097)  | 0.070        |
| Cerca pero no CLaL               | 0.6 (0.221)  | 1.9 (0.887)   | 0.116        |
| CLaL                             | <b>5.9</b> (2.052)   | <b>2.3</b> (1.325)  | 0.146        |
| Abrazo                           | <b>4.9</b> (2.312)   | <b>2.6</b> (1.681)  | 0.250        |

**Tabla 2. Efecto de la familiaridad de la hembra sobre la expresión particular de la conducta del macho (método de muestreo instantáneo)**

La familiaridad de la hembra no modificó estadísticamente el número de observaciones de ninguna de las conductas cuantificadas por el método de muestreo instantáneo que fueron desplegadas por el grupo de machos ( $n = 10$ ) que han cohabitado por más de un mes con una hembra. Sin embargo, al considerar las medias se observó una tendencia de los machos por exhibir más conductas afiliativas con la hembra familiar y más conductas no afiliativas con la desconocida (valores en negritas).

Las comparaciones fueron hechas con la prueba de Wilcoxon, considerando como a  $p < 0.05$  como valor estadísticamente significativo. En la tabla se representa la media del número de observaciones para cada conducta y entre paréntesis se representa el EEM.

El macho realizó un mayor número de conductas no afiliativas (no contacto, encuentro, cerca pero no CLaL) con la hembra desconocida; y de manera contraria, realizó más conductas afiliativas (CLaL y abrazo) con su pareja. Estos despliegues van en el sentido de nuestra predicción que señala la expresión diferencial de conductas afiliativas influidas por la familiaridad de la hembra.

*Efecto de la familiaridad de la hembra sobre el número de observaciones de conductas afiliativas (Categoría 2) y no afiliativas (Categoría 1) (método de muestreo instantáneo).* Para determinar si la familiaridad de la hembra influyó en la expresión de las conductas no afiliativas (no contacto, encuentro y cerca pero no CLaL agrupadas en la categoría 1) y afiliativas (CLaL y abrazo agrupadas en la categoría 2) desplegadas por el macho, se utilizaron dos comparaciones. En la primera, se probó el efecto de la familiaridad de la hembra (variable independiente) sobre el número de observaciones de cada categoría conductual; estas comparaciones aparecen de manera horizontal en la tabla 3. En la segunda, se probó el efecto de la categoría conductual (variable independiente) sobre el número de observaciones dirigidas a la hembra familiar y a la hembra desconocida; estas comparaciones aparecen de manera vertical en la tabla 3. No se encontró un efecto significativo de la familiaridad de la hembra (familiar vs. desconocida) sobre el número de observaciones de cada categoría conductual (categoría 1 / categoría 2); ni tampoco de la categoría conductual (categoría 1 vs. categoría 2) sobre el número de observaciones dirigidas a la hembra familiar y a la hembra desconocida ( $p > 0.05$ , prueba de Wilcoxon). No obstante, se observaron algunas tendencias que permiten suponer que la familiaridad de la hembra indujo un *efecto sutil* (pero no estadísticamente significativo) sobre la frecuencia con la cual el macho desplego la conducta afiliativa y no

afiliativa. Estas tendencias involucran, como lo muestran las medias en la tabla 3, una mayor frecuencia de conductas afiliativas desplegadas por los machos a su pareja; mientras que con las hembras desconocidas este grupo de machos desplegaron una mayor frecuencia de conductas no afiliativas. Al comparar la conducta del macho desplegada a la hembra de la pareja, la conducta afiliativa resultó muy cercana a ser estadísticamente mayor en comparación la conducta no afiliativa ( $p = 0.053$ , prueba de Wilcoxon, valor en negritas tabla 3).

| Categoría conductual                    | <u>Hembra familiar</u><br>(# observaciones del muestreo instantáneo) | <u>Hembra desconocida</u><br>(# observaciones del muestreo instantáneo) | Valor de $p$ |
|---|--|---|--------------|
| Conducta no afiliativa<br>(categoría 1) | 3.4 (1.127)  | 9.9 (3.278)   | 0.082        |
| Conducta afiliativa<br>(categoría 2)    | 10.8 (3.705)   | 4.9 (2.979)   | 0.153        |
| Valor de $p$                            | <b>0.053</b>   | 0.156   | --           |

**Tabla 3. Efecto de la familiaridad de la hembra sobre la expresión de la conducta afiliativa y no afiliativa del macho (método de muestreo instantáneo).**

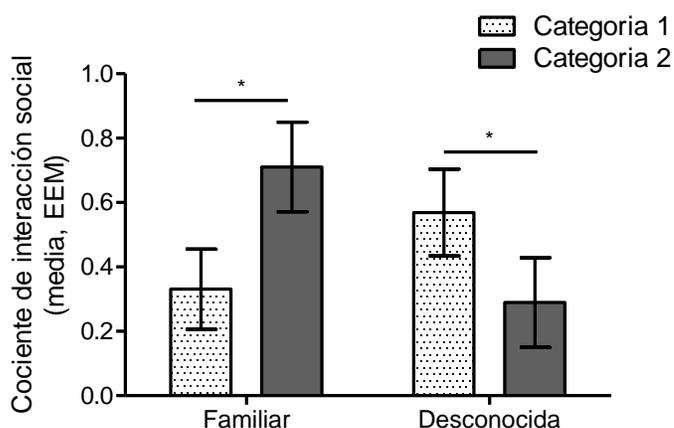
La familiaridad de la hembra no modificó estadísticamente el número de observaciones de ninguna de las categorías conductuales, registradas por el método de muestreo instantáneo, las cuales fueron desplegadas por el grupo de machos ( $n = 10$ ) que han cohabitado por más de un mes con una hembra.

Sin embargo, los machos mostraron una tendencia para desplegar más conductas de la categoría 2 con la hembra de la pareja y más conductas de la categoría 1 con la hembra desconocida. Además, al comparar la expresión de las dos categorías conductuales para la hembra familiar esta casi fue estadísticamente significativa (categoría 1 vs. categoría 2;  $p = 0.053$ , en negritas).

Las comparaciones fueron hechas con la prueba de Wilcoxon, considerando como a  $p < 0.05$  como valor estadísticamente significativo. En la tabla se representa la media del número de observaciones para cada categoría conductual y entre paréntesis se representa el EEM.

*Efecto de la familiaridad de la hembra sobre la asignación de la conducta del macho (método de muestreo instantáneo).* El ambiente impone a los individuos una serie de requerimientos para sobrevivir y reproducirse, entonces los organismos deben tomar decisiones para adecuarse a estos “desafíos”. Una manera de hacerlo es al asignar su conducta de manera diferencial; es decir, favorecer un determinado despliegue conductual sobre otro en un determinado momento o contexto (Silk 2007; Snell-Rood 2013). La comparación cuantitativa de la asignación conductual entre individuos requiere considerar las diferencias entre

individuos inherentes a su actividad total. Por ello, en el presente análisis, se calculó y comparó la proporción de observaciones de cada categoría conductual (afiliativa y no afiliativa) dirigida a la hembra familiar, así como la proporción dirigida a la hembra desconocida del total observaciones de cada categoría. Entonces, al considerar las proporciones de observaciones asignadas a cada hembra por medio de los cocientes de interacción social (CIS, ver metodología) fueron eliminados ciertos efectos estadísticos derivados de variaciones inter-individuales en la expresión general de la conducta. A continuación se probó el efecto de la familiaridad de la hembra sobre la expresión de los CIS para la conducta afiliativa (categoría 2) y no afiliativa (categoría 1), considerando el supuesto que los machos que han formado un vínculo afiliativo con una hembra le asignarían a ésta una mayor proporción de su conducta afiliativa; mientras que con una hembra desconocida el macho asignaría a ésta una mayor proporción de su conducta no afiliativa. Los resultados indican que este supuesto se cumple, dado que los machos que han cohabitado por más de un mes con la hembra de la pareja ( $n = 10$ ) desplegaron a esta hembra un CIS de la categoría 2 significativamente más grande en comparación con el CIS de la categoría 1 ( $p = 0.019$ , prueba de Wilcoxon, ver gráfica 3). Mientras que en el caso de la hembra desconocida se observó lo contrario, el CIS de la categoría 1 fue significativamente más grande que el de la categoría 2 ( $p = 0.039$ , prueba de Wilcoxon). Este patrón confirma que el macho asignó de manera diferencial la conducta afiliativa y no afiliativa, en razón de la familiaridad con la hembra; lo cual podría ser equivalente a la preferencia de pareja cuantificada por el método de muestreo continuo, en este mismo grupo de machos.



**Gráfica 3. Efecto de la familiaridad de la hembra sobre la asignación de la conducta del macho (método de muestreo instantáneo).**

La familiaridad de la hembra tuvo un efecto significativo sobre la asignación de la conducta afiliativa y no afiliativa de los machos ( $n = 10$ ) que cohabitaron por más de un mes con una hembra. Así, el CIS de

la categoría 2 dirigido a la pareja fue mayor en comparación con el CIS de la categoría 1 ( $p = 0.019$ , prueba de Wilcoxon); mientras que para la hembra desconocida, el CIS de la categoría 1 fue estadísticamente más grande que el de la categoría 2 ( $p = 0.039$ , prueba de Wilcoxon). El CIS reflejó la proporción de observaciones de una misma categoría conductual asignadas por el macho a una hembra definida, en relación con el total de observaciones de esta categoría (ver metodología). Las barras de la gráfica representan la media de cada CIS y los bigotes al EEM. Los asteriscos denotan un valor estadísticamente significativo,  $p < 0.05$ .

## 7.2. Segundo experimento.

Para determinar los efectos del antagonismo crónico del receptor NMDA sobre la conducta afiliativa del topillo de la pradera macho (objetivo 3) se analizó la conducta desplegada, durante la prueba de preferencia, por un grupo de machos control y otro grupo tratado crónicamente con MK-801. La conducta fue analizada por el método de muestreo instantáneo que contempló el número observaciones para: a) cada conducta y categoría conductual sin distinguir entre la conducta dirigida a la pareja o la hembra desconocida; ó bien para: b) cada conducta, b) categoría conductual; y e) la asignación de cada categoría en relación con la familiaridad de la hembra.

### 7.2.1. Efecto del tratamiento crónico con MK-801 sobre el número de observaciones de conducta sin distinguir entre conducta dirigida a la pareja y conducta dirigida a la hembra desconocida (método de muestreo instantáneo).

Para determinar si el tratamiento con MK-801 indujo alteraciones sobre la conducta afiliativa y no afiliativa dirigida por el macho sin considerar la familiaridad de la hembra, primero se sumó el número de observaciones para la hembra familiar con el de la hembra desconocida para cada conducta (no contacto, encuentro, cerca pero no CLaL, CLaL y abrazo) o categoría conductual (categoría 1- conducta no afiliativa; categoría 2- conducta afiliativa); y después se comparó esta interacción total para cada conducta o categoría conductual entre tratamientos (machos salina ( $n = 8$ ) vs. machos MK-801 ( $n = 10$ )), pero no encontramos diferencias significativas ( $p > 0.05$ ; prueba de Mann Whitney, ver tabla 4).

Por lo tanto, estos resultados no cumplen con la primera predicción sobre los posibles efectos de MK-801, debido a que no observamos una disminución (pero tampoco un incremento) en la expresión de la conducta afiliativa y no afiliativa ni tampoco un incremento en la conducta

antisocial (actividad en la cámara neutra) desplegada por los machos MK-801 con relación con los salina.

| Tipo de conducta                 | # total de observaciones (muestreo instantáneo) |              | Valor de $p$ |
|----------------------------------|---|--------------|--------------|
|                                  | Salina  | MK-801       |              |
| Cámara neutra                    | 2.25 (0.674)                                    | 2.0 (0.494)  | 0.481        |
| No contacto                      | 9.625 (2.666)                                   | 8.4 (1.796)  | 0.500        |
| Encuentro / investigación social | 2.375 (0.263)                                   | 2.8 (0.727)  | 0.500        |
| Cerca pero no CLaL               | 2.25 (0.75)                                     | 4.5 (1.035)  | 0.075        |
| CLaL                             | 9.75 (2.576)                                    | 9.8 (2.070)  | 0.482        |
| Abrazo                           | 3.375 (1.558)                                   | 2.4 (0.819)  | 0.410        |
| Conducta no afiliativa (ctg. 1)  | 14.25 (2.603)                                   | 15.7 (1.978) | 0.344        |
| Conducta afiliativa (ctg. 2)     | 13.13 (3.061)                                   | 12.2 (2.250) | 0.411        |

**Tabla 4. Efecto del tratamiento con MK-801 sobre el número de observaciones de la conducta sin distinguir la familiaridad de la hembra (método de muestreo instantáneo).**

Al comparar el número total de observaciones para cada conducta o categoría conductual desplegada por los machos tratados con MK-801 ( $n = 8$ ) con los tratados con salina ( $n = 8$ ) no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ , prueba de Mann Whitney).

La tabla muestra la media del total de observaciones para cada conducta o categoría conductual (sin considerar la familiaridad de la hembra) desplegada por los machos de ambos grupos experimentales y entre paréntesis se representa el EEM.

#### 7.2.2. Efecto del tratamiento crónico con MK-801 sobre el número de observaciones de cada conducta dirigidas a la hembra familiar y a la hembra desconocida (método de muestreo instantáneo).

Primero, para determinar si la familiaridad de la hembra afectó la conducta de machos tratados con MK-801, y/o de machos tratados con salina, se consideró la familiaridad de la hembra como variable independiente, y la conducta desplegada por los machos tratados con salina, así como la conducta de los machos tratados con MK-801 como variables dependientes. El analizar de los datos del tratamiento MK-801 y del tratamiento salina por separado muestra que tanto en el grupo de machos del grupo salina ( $n = 8$ ) como en el grupo MK-801 ( $n = 10$ ) la familiaridad de la hembra no afectó el número de observaciones de las conductas individuales

(no contacto, encuentro, cerca pero no CLaL, CLaL y abrazo; familiar vs. desconocida,  $p > 0.05$ , prueba de Wilcoxon, tabla 5).

| Tratamiento                      | Salina<br>(# observaciones del muestreo instantáneo) |                         | Valor de $p$ | MK-801<br>(# observaciones del muestreo instantáneo) |                       | Valor de $p$ |
|----------------------------------|--|-------------------------|--------------|--|-----------------------|--------------|
|                                  | Hembra familiar                                      | Hembra desconocida      |              | Hembra familiar                                      | Hembra desconocida    |              |
| No contacto                      | 4.125<br>(1.329)                                     | 5.5<br>(1.861)          | 0.286        | 4.5<br>(1.285)                                       | 3.9<br>(0.795)        | 0.198        |
| Encuentro / investigación social | 1.5<br>(0.327)                                       | 0.875<br>(0.350)        | 0.286        | 0.8<br>(0.326)                                       | 2.0<br>(0.760)        | 0.130        |
| Cerca pero no CLaL               | 1.875<br>(0.742)                                     | 0.375<br>(0.263)        | 0.053        | 2.6<br>(1.024)                                       | 1.9<br>(0.912)        | 0.264        |
| CLaL                             | 7.0<br>(2.138)                                       | 2.75<br>(2.234)         | 0.070        | 7.0<br>(2.436)                                       | 2.8<br>(1.541)        | 0.166        |
| Abrazo                           | <b>3.0</b><br>(1.5)                                  | <b>0.375</b><br>(0.263) | 0.071        | <b>1.4</b><br>(0.67)                                 | <b>1.0</b><br>(0.516) | 0.417        |

**Tabla 5. Efecto de la familiaridad de la hembra sobre la expresión particular de la conducta de machos tratados con salina y MK-801.**

En el grupo de machos tratados con salina ó MK-801 ( $n = 8$  y  $10$ , respectivamente), la familiaridad de la hembra no indujo una diferencia significativa en el número de observaciones para alguna conducta en particular. Sin embargo, se presentaron algunas tendencias que apuntan en el sentido de la hipótesis; debido a que los machos salina, pero no los tratados con MK-801, desplegaron más interacciones de abrazo con la hembra de la pareja que con la hembra desconocida (valores en negritas). Las comparaciones fueron hechas con la prueba de Wilcoxon, consideramos el valor de  $p < 0.05$  como estadísticamente significativo. En la tabla se representa la media del número de observaciones cada conducta y entre paréntesis se representa el EEM.

De manera similar, al considerar el tratamiento (MK-801 o salina) como la variable independiente, no se encontró un efecto estadísticamente significativo del tratamiento sobre el número de observaciones de cada conducta dirigida a la pareja ni a la hembra desconocida (salina vs. MK-801,  $p > 0.05$ , prueba de Mann Whitney, ver tabla 6).

Sin embargo, al considerar las medias, se pudo observar las siguientes tendencias: 1) los machos del grupo salina desplegaron más conductas de abrazo con la hembra de la pareja, en comparación con la desconocida; pero el grupo de machos MK-801 desplegó un número similar de esta conducta a la hembra familiar y a la desconocida (valores en negritas tabla 5). Esta tendencia sigue la dirección de la predicción iii, que implica el que un macho MK-801

dirigiría la conducta afiliativa (y no afiliativa) de manera indistinta según la familiaridad de la hembra. 2) los machos del grupo salina dirigieron más conductas de abrazo a la hembra de la pareja, en comparación con los machos del grupo MK-801; mientras que de manera opuesta, los machos del grupo MK-801 desplegaron más conductas de abrazo con la hembra desconocida en comparación con los machos salina (valores en negritas tabla 6). Dicha tendencia apuntó en el sentido de la predicción ii, que implica que los machos desplegarían conductas afiliativas a la hembra desconocida.

| Familiaridad de la hembra           | Hembra familiar<br>(# observaciones del muestreo instantáneo) |                      | Valor de $p$ | Hembra desconocida<br>(# observaciones del muestreo instantáneo) |                       | Valor de $p$ |
|-------------------------------------|---|----------------------|--------------|--|-----------------------|--------------|
|                                     | Salina  | MK-801               |              | Salina   | MK-801                |              |
| Conducta                            |   |                      |              |  |                       |              |
| No contacto                         | 4.125<br>(1.329)  | 4.5<br>(1.285)       | 0.464        | 5.5<br>(1.861)   | 3.9<br>(0.795)        | 0.343        |
| Encuentro /<br>investigación social | 1.5<br>(0.327)  | 0.8<br>(0.326)       | 0.063        | 0.875<br>(0.350)   | 2.0<br>(0.760)        | 0.272        |
| Cerca pero no CLaL                  | 1.875<br>(0.742)  | 2.6<br>(1.024)       | 0.325        | 0.375<br>(0.263)   | 1.9<br>(0.912)        | 0.122        |
| CLaL                                | 7.0<br>(2.138)  | 7.0<br>(2.436)       | 0.429        | 2.75<br>(2.234)  | 2.8<br>(1.541)        | 0.356        |
| Abrazo                              | <b>3.0</b><br>(1.5)   | <b>1.4</b><br>(0.67) | 0.210        | <b>0.375</b><br>(0.263)  | <b>1.0</b><br>(0.516) | 0.306        |

**Tabla 6. Efecto del tratamiento con MK-801 sobre la expresión particular de la conducta en relación con la familiaridad de la hembra**

No se presentaron diferencias significativas al comparar el número de observaciones para cada conducta en relación con la familiaridad de la hembra por los machos tratados con salina ( $n = 8$ ) en comparación con los MK-801 ( $n = 10$ ). Pero, cuando se consideraron las medias se observó la tendencia de los machos tratados con MK-801 a dirigir más conductas de abrazo, que los machos tratados con salina, a la hembra desconocida; y menos conductas de abrazo en el grupo tratado con MK-801 en comparación con los machos tratados con salina para la hembra familiar (valores en negritas).

Las comparaciones fueron hechas con la prueba de Mann Whitney, consideramos el valor de  $p < 0.05$  como estadísticamente significativo. En la tabla se representa la media del número de observaciones para cada conducta y entre paréntesis se representa el EEM.

En conjunto, estos resultados no apoyan estadísticamente un efecto significativo del tratamiento farmacológico. Sin embargo, los datos sugieren un efecto sutil del tratamiento sobre la expresión de la conducta del topillo macho en relación con la familiaridad de la hembra.

7.2.3. Efecto del tratamiento crónico con MK-801 sobre el número de observaciones de conductas afiliativas (Categoría 2) y no afiliativas (Categoría 1) (método de muestreo instantáneo).

Para determinar si el tratamiento crónico con MK-801 indujo una alteración sobre la expresión de la conducta no afiliativa (categoría 1) y afiliativa (categoría 2), se establecieron tres tipos de comparaciones según: el tratamiento, la categoría conductual y la familiaridad de la hembra como variables independientes.

*Tratamiento (Salina vs. MK-801) como variable independiente.* Primero probamos si hubo un efecto del tratamiento sobre el número de observaciones de conductas de la categoría 1 ó la categoría 2. En este análisis se consideró de manera independiente la conducta dirigida a la hembra pareja y a la hembra desconocida. Ninguna comparación resultó ser estadísticamente significativa (salina vs. MK-801,  $p > 0.05$ ; prueba de Mann Whitney, ver tabla 7).

| Categoría conductual                 | <u>Hembra familiar</u><br>(# observaciones del muestreo instantáneo) |                | Valor de $p$ | <u>Hembra desconocida</u><br>(# observaciones del muestreo instantáneo) |                | Valor de $p$ |
|--------------------------------------|--|----------------|--------------|---|----------------|--------------|
|                                      | Salina   | MK-801         |              | Salina  | MK-801         |              |
| Conducta no afiliativa (categoría 1) | 7.5<br>(1.861)   | 7.9<br>(1.670) | 0.500        | 6.750<br>(1.567)  | 7.8<br>(1.576) | 0.280        |
| Conducta afiliativa (categoría 2)    | 10.0<br>(2.940)  | 8.4<br>(2.857) | 0.296        | 3.125<br>(2.460)  | 3.8<br>(1.659) | 0.312        |

**Tabla 7. Efecto del tratamiento crónico con MK-801 sobre la expresión de la conducta afiliativa y no afiliativa del macho**

Los machos tratados con MK-801 ( $n = 10$ ) en comparación con los tratados con salina ( $n = 8$ ), no mostraron alteraciones significativas en la expresión de alguna de las categorías conductuales dirigidas a una hembra en particular ( $p > 0.05$ ; prueba de Mann Whitney).

La tabla muestra la media del número de observaciones para cada categoría conductual y entre paréntesis se representa el EEM.

*Categoría conductual (categoría 1- conducta no afiliativa; categoría 2- conducta afiliativa) como variable independiente.* En segundo lugar, se analizó de manera independiente la conducta expresada por machos tratados con MK-801 y la conducta expresada por los machos tratados con salina, considerando la categoría conductual como variable independiente

(categoría 1 vs. categoría 2, ver comparaciones verticales en la tabla 8). Los datos muestran que la categoría conductual no afectó significativamente el número de observaciones dirigidas a la hembra familiar dentro del grupo de machos tratados con salina ni en los tratados con MK-801 ( $p > 0.05$ ; prueba de Wilcoxon, ver tabla 8; comparaciones verticales). Pero, sí se observó un efecto significativo de la categoría conductual en la respuesta de los machos tratados con MK-801 dirigida a la hembra desconocida, este efecto representa un incremento significativo en la expresión de la conducta no afiliativa (categoría 1) comparada a la conducta afiliativa (categoría 2) ( $p = 0.018$ , prueba de Wilcoxon, comparación denotada con asteriscos, ver tabla 8). Para el grupo de machos tratados con salina se observó una tendencia similar, que no alcanzó la significancia estadística ( $p = 0.102$ , prueba de Wilcoxon, ver tabla 8).

*Familiaridad de la hembra (familiar / desconocida) como variable independiente.* En tercer lugar, dentro de cada tratamiento se contrastó la expresión de la misma categoría conductual (categoría 1 / categoría 2) dirigida a la hembra familiar en comparación con la desconocida (ver comparaciones horizontales en la tabla 8). Se encontró que los machos tratados con salina, pero no los tratados con MK-801, desplegaron la categoría 2 preferentemente con la hembra de la pareja (categoría 2, familiar vs. desconocida,  $p = 0.054$ , prueba de Wilcoxon, valor de  $p$  en negritas). Este resultado apoya la predicción iii, que implica el que un macho MK-801 no dirigiría preferencialmente la conducta afiliativa.

| Categoría conductual                 | <u>Salina</u>                              |                    | Valor de $p$ | <u>MK-801</u>                              |                    | Valor de $p$ |
|--------------------------------------|--|--------------------|--------------|--|--------------------|--------------|
|                                      | (# observaciones del muestreo instantáneo) |                    |              | (# observaciones del muestreo instantáneo) |                    |              |
|                                      | Hembra familiar                            | Hembra desconocida |              | Hembra familiar                            | Hembra desconocida |              |
| Conducta no afiliativa (categoría 1) | 7.5<br>(1.861)                             | 6.750<br>(1.567)   | 0.342        | 7.9<br>(1.670)                             | 7.8 *<br>(1.576)   | 0.500        |
| Conducta afiliativa (categoría 2)    | 10.0<br>(2.940)                            | 3.125<br>(2.460)   | <b>0.054</b> | 8.4<br>(2.857)                             | 3.8 *<br>(1.659)   | 0.153        |
| Valor de $p$                         | 0.311                                      | 0.102              | --           | 0.269                                      | 0.018 *            | --           |

**Tabla 8. Expresión de la conducta afiliativa y no afiliativa de los machos tratados con salina y MK-801 en relación con la familiaridad de la hembra.**

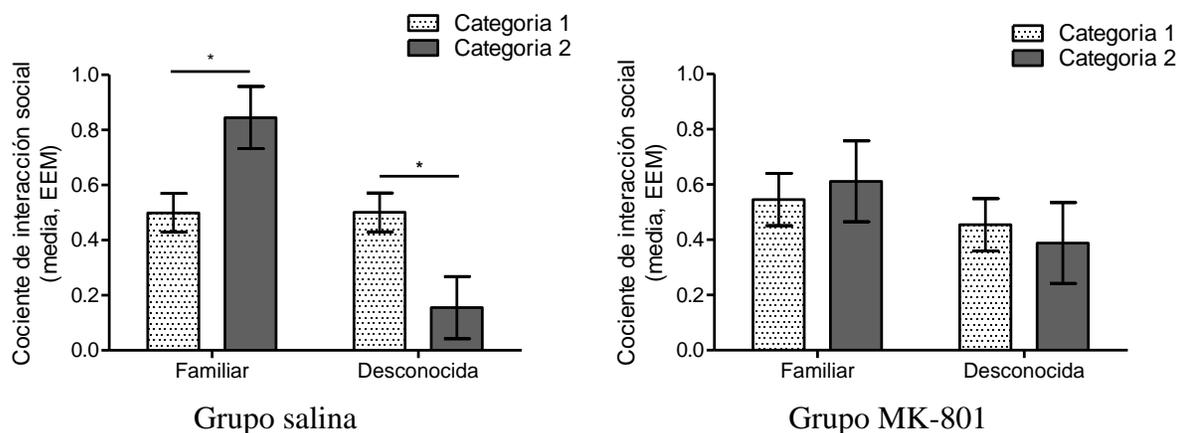
Para el grupo salina ( $n = 8$ ), pero no para el MK-801 ( $n = 10$ ), la expresión de la conducta afiliativa tiende a ser influenciada por la familiaridad de la hembra ( $p = 0.054$ , prueba de

Wilcoxon, valor en negritas). Mientras que solo en el grupo MK-801 se observó un despliegue estadísticamente diferente de las categorías conductuales en relación con la hembra desconocida ( $p = 0.018$ , prueba de Wilcoxon, denotada por el asterisco).

La tabla muestra la media del número de observaciones para cada categoría conductual y entre paréntesis se representa el EEM.

#### 7.2.4. Efecto de la familiaridad de la hembra sobre la asignación de la conducta de los machos tratados con salina y MK-801 (método de muestreo instantáneo).

En el grupo de machos tratados con salina se observó un efecto significativo de la familiaridad de la hembra sobre la asignación de la conducta afiliativa y no afiliativa, debido a que se observó un CIS de la categoría 2 significativamente más grande en comparación que el de la categoría 1, dirigido a la hembra de la pareja ( $p = 0.029$ , prueba de Wilcoxon, ver gráfica 4 A). Mientras que para la hembra desconocida, el CIS fue significativamente mayor para la categoría 1 en comparación con la 2 ( $p = 0.029$ , prueba de Wilcoxon). Este resultado confirmó el supuesto de la asignación diferencial de la conducta afiliativa y no afiliativa del topillo de la pradera macho en relación con la familiaridad de la hembra (también observado en el grupo de machos del experimento 1).



**Gráfica 4. Asignación de la conducta afiliativa y no afiliativa en relación con la familiaridad de la hembra en los machos tratados con salina y MK-801**

El grupo de machos tratados con salina ( $n = 8$ ) mostró un CIS de la categoría 2 estadísticamente más grande en comparación que el de la categoría 1, para la hembra familiar ( $p = 0.029$ ); mientras que para la hembra desconocida, el CIS de la categoría 1 fue estadísticamente más grande con respecto al de la categoría 2 ( $p = 0.029$ ). Estos resultados

sugieren la asignación diferencial de conductas afiliativas y no afiliativas en relación con la familiaridad de la pareja en el grupo de machos tratados con salina. Pero, el grupo de machos tratados con MK-801 ( $n = 10$ ) no asignó de manera diferencial su conducta, ya que ninguna de estas mismas comparaciones resultó ser estadísticamente significativa ( $p > 0.05$ ).

El CIS reflejó la proporción de conductas de una misma categoría asignadas por los machos (de un mismo grupo salina / MK-801) a una hembra definida (familiar – desconocida), en relación con el total de observaciones de esta categoría (ver metodología). Las barras de la gráfica representan la media de cada CIS y los bigotes al EEM. Las comparaciones estadísticas fueron hechas con la prueba de Wilcoxon, los asteriscos denotan un valor estadísticamente significativo,  $p < 0.05$ .

Al contrario, el grupo de machos tratados con MK-801 no mostró este patrón conductual, pues los CIS no difieren significativamente en relación con alguna hembra en particular, incluso los datos ni siquiera muestran una tendencia ( $p > 0.05$ , prueba de Wilcoxon, ver gráfica 4 B).

Por lo tanto, es muy probable que los efectos del tratamiento crónico con MK-801 involucren una alteración en la asignación diferencial de la conducta afiliativa y no afiliativa del topillo de la pradera macho en relación con la familiaridad de la hembra.

## **8. Discusión.**

En el presente estudio, se caracterizó el patrón conductual de un grupo de topillos de la pradera machos que cohabitaron por más de un mes con su pareja, por medio de dos métodos de muestreo conductual. El primero, un método de muestreo continuo, permitió identificar que la familiaridad de la hembra influyó significativamente sobre el tiempo que permanecieron los machos en contacto lado a lado (CLaL) y también que la mayoría de machos (71%) exhibieron una preferencia de pareja. El segundo fue un método de muestreo instantáneo, que redujo notablemente el tiempo de colección de datos y permitió reportar que la familiaridad de la hembra indujo una asignación diferencial de la conducta afiliativa y no afiliativa del topillo macho. La asignación diferencial en los machos fue caracterizada por una mayor proporción de conductas afiliativas en comparación con la proporción de conductas no afiliativas dirigidas a la hembra de la pareja, mientras que asignaron un mayor número de conductas no afiliativas en comparación con las conductas afiliativas a la hembra desconocida. Los resultados de ambos métodos de muestreo fueron similares en relación con la conducta afiliativa desplegada por los machos. Por lo tanto, es posible proponer que las conductas afiliativas como el CLaL y la preferencia de pareja pueden caracterizar a vínculos de pareja duraderos.

En el segundo experimento, se utilizó el método de muestreo instantáneo para determinar los efectos de antagonizar crónicamente el receptor NMDA (con MK-801) sobre la conducta afiliativa del topillo de la pradera macho. Se encontró un efecto selectivo de MK-801 que impidió que este grupo de machos asignaran diferencialmente su conducta afiliativa y no afiliativa en relación con la familiaridad de la hembra. Por el otro lado, se observó la asignación diferencial de la conducta afiliativa y no afiliativa en relación con la familiaridad de la hembra en los machos tratados con solución salina (grupo control). Entonces, es posible sugerir que el bloqueo artificial del receptor NMDA en la etapa adulta y sus consecuencias neurobiológicas indujeron alteraciones en la asignación diferencial de la conducta afiliativa y no afiliativa del topillo de la pradera macho en relación con la identidad de una hembra.

*Caracterización de la conducta afiliativa del topillo de la pradera macho que pertenece a un vínculo de pareja duradero, según el método (de registro continuo) previamente publicado.*

Para evaluar la preferencia de pareja, un indicador de la formación del vínculo de pareja en el topillo de la pradera, se requiere que dos individuos del sexo opuesto hayan cohabitado por un determinado tiempo; normalmente este periodo es corto (6 o 24 horas) y según su duración se puede o no impedir la cópula (Aragona y cols. 2006; Liu y cols. 2010; Young y cols. 2014; Blocker y Ophir 2015; ver Aragona y Wang 2004; 2009). En el paradigma de cohabitación de 24 horas, no se impide la copula e inmediatamente después de que transcurrió este periodo se evalúa la elección social del individuo focal (en el presente caso, un macho) por medio de la prueba de preferencia (Williams y cols. 1992; Aragona y Wang 2004, 2009). Durante esta prueba se cuantifica por medio de un método de registro continuo la *duración* del CLaL dirigido por el individuo focal a cualquiera de los dos individuos estímulo, y posteriormente se determina si existe una preferencia individual por permanecer en CLaL con alguno de los individuos estímulo (en el presente caso, la hembra de la pareja y una hembra desconocida que pertenece a otra pareja con un mismo estatus reproductivo, ver metodología). La preferencia es determinada cuando el individuo focal permaneció por más del doble de tiempo en CLaL con un individuo focal en comparación con el otro; una preferencia de pareja indica que el individuo focal ha formado un vínculo de pareja con el individuo que previamente cohabitó (Williams y cols. 1992; McGraw y Young 2010; Young y cols. 2011; Blocker y Ophir 2015; 2016).

En el primer experimento se evaluó la preferencia de pareja del grupo de machos que han cohabitado por más de un mes con una hembra. Comparando la duración del CLaL, los machos permanecieron significativamente por más tiempo con la hembra de su pareja en comparación con la desconocida (gráfica 1); mientras que al determinar la preferencia de cada individuo (de acuerdo al criterio antes mencionado) determinamos que el 71% ( $n = 5$ ) de los machos mostró una preferencia de pareja (tabla 1). Por lo tanto, podemos sugerir que los machos pertenecientes a un vínculo de pareja duradero despliegan el CLaL de manera preferencial con la hembra de su pareja.

Con base en estos resultados, podría proponerse que la expresión preferencial del CLaL representa un indicador conductual de los vínculos de pareja duraderos, y no solo de los

procesos iniciales como la formación del vínculo (Aragona y Wang 2004, 2009). Entonces, para los topillos macho la expresión “sostenida” –a lo largo de periodos prolongados- del CLaL puede participar en la facilitación de procesos como el mantenimiento/reforzamiento del vínculo, lo cual era exclusivo de otros indicadores conductuales como la agresividad selectiva (Aragona y cols. 2006; Gobrogge y cols. 2007; Gobrogge y Wang 2011, 2016) y el cuidado biparental (Gobrogge y Wang 2016; Lieberwirth y Wang 2016; Numan y Young 2016).

En la naturaleza, los individuos que adoptan la monogamia “deben” distinguir a su pareja de otras por medio de la expresión de ciertas conductas afiliativas; por ejemplo, la afiliación selectiva (contacto físico y proximidad social) distingue a los miembros de una pareja durante temporadas reproductivas y no reproductivas (Stoesz y cols. 2013). La afiliación selectiva y otras conductas afiliativas que distinguen a los miembros de una pareja se han observado en condiciones naturales y semi-naturales en el topillo de la pradera (Thomas y Birney 1979; Getz y Hofmann 1986; Getz y cols. 1990; Getz y Carter 1996). En el laboratorio, la expresión diferencial del CLaL puede reflejar en cierta medida la afiliación selectiva, pero únicamente se había reportado después de un periodo de cohabitación de 24 horas (ej. Aragona y cols. 2006) y en dos estudios después de una cohabitación de 7 días (Ahern y cols. 2009; Ahern y Young 2009). En el presente trabajo, se mostró que los topillos de la pradera machos expresaron de manera diferencial el CLaL (una mayor duración con la pareja) después de más de un mes de cohabitación. Entonces, se sugiere que la expresión diferencial del CLaL puede reflejar en condiciones de laboratorio la afiliación selectiva observada en la naturaleza a lo largo de periodos de tiempo considerables.

Además, la proporción de los machos que desplegaron la preferencia de pareja (71 %) fue muy similar a las proporciones previamente reportadas de individuos que adoptan la monogamia ( $\approx$  60-75% basado en Getz y cols. 1993; Salomon 1993; Salomon y Jacquot 2002). También, la proporción de machos que no mostraron una preferencia de pareja (29%) en el presente trabajo, corresponde con el porcentaje de topillos ( $\approx$  25 - 40 %) conocidos como “deambuladores” que prefieren copular de manera promiscua (Getz y cols. 1993; Salomon y Jacquot 2002; Ophir y cols. 2008; McGuire y Getz 2010; McGuire y cols. 2013; Ophir 2017). Por lo tanto, podríamos sugerir que la preferencia de pareja quizá distinga a los individuos (en este caso machos) que adopten la monogamia. Es decir, la preferencia de pareja no solo sería

un indicador de la formación del vínculo de pareja, sino que podría asociarse a un indicador individual de la elección de un sistema de copula. Sin embargo, se requieren de experimentos puntuales para probar esta idea.

Por otro lado, la familiaridad de la hembra no influyó significativamente en: 1) el número de veces que el topillo macho entró a cada cámara; 2) el tiempo que permaneció el macho en cada cámara; 3) la conducta pro-social de ayuda (el número de veces que el macho roe la cadena que sujetaba a uno de sus conespecíficos; ver gráfica 2). Tampoco se registraron intentos de copula dirigidos a la hembra de la pareja ni a la desconocida. Estos resultados negativos sugieren que ninguno de estos indicadores complementarios puede ser utilizado en la prueba de preferencia para identificar un vínculo de pareja duradero.

*Caracterización de la conducta afiliativa del topillo de la pradera macho que pertenece a un vínculo de pareja duradero, según una nueva propuesta metodológica.*

En la sección anterior se discutieron los resultados obtenidos del método de muestreo continuo que permitieron caracterizar la conducta afiliativa de un grupo de topillos macho que han cohabitado con una hembra por más de un mes. Aunque este método evaluó adecuadamente la conducta afiliativa, notamos que resultó poco práctico ya que implicó un “gasto” considerable en el análisis de la conducta, pues la expresión del CLaL se representa por su periodo de duración y, por lo tanto, las tres horas de la prueba fueron analizadas. Además, el análisis conductual se centró exclusivamente en analizar la conducta afiliativa, dejando “perder” información sobre conductas no afiliativas, como las conductas de exploración social y espacial, que forman parte del repertorio conductual de la especie.

Para lidiar con estas dos limitantes se implementó un método de muestreo instantáneo, el cual analizó en 30 eventos u observaciones la conducta desplegada por los machos a alguna de las dos hembras, únicamente durante la última hora de la prueba de preferencia (ver metodología). Este método de muestreo contó con un *set* de conductas que incluyó el principal indicador de la formación del vínculo de pareja, el CLaL y añadió otra conducta afiliativa: la postura conocida como “abrazo” que es desplegada casi exclusivamente por miembros de una pareja (Thomas y Birney 1979). También incorporó la cuantificación de tres conductas no afiliativas

(no contacto, encuentro y cerca pero no CLaL) que están relacionadas con la exploración social, territorial y la proximidad social.

Utilizando este método de muestreo, se encontró que la identidad de la hembra no indujo un efecto significativo sobre la conducta de los machos que han permanecido por más de un mes con una pareja, dado que el número de observaciones para cada conducta (ver tabla 2) o alguna categoría conductual (ver tabla 3) no fue estadísticamente diferente para la hembra familiar en comparación con la desconocida. Sin embargo, los datos mostraron una tendencia en el sentido de nuestra predicción: los machos expresaron un mayor número de conductas afiliativas con la hembra de su pareja, mientras que con la hembra desconocida dirigieron un mayor número de conductas no afiliativas (valores en negritas de ambas tablas). Esto sugiere que puede existir un efecto sutil de la identidad de la hembra sobre la expresión de la conducta afiliativa y no afiliativa del topillo de la pradera macho. Consideramos que es más probable que la ausencia de una diferencia estadísticamente significativa se debió a que el número de observaciones (30) fue bajo en relación con el número de conductas cuantificadas (5). Pudimos haber manejado este inconveniente al duplicar el número de observaciones (a 60), ya sea al analizar dos horas de la prueba (en lugar de una) con el mismo intervalo entre cada observación o bien al reducir el intervalo de tiempo a la mitad y realizar el doble de observaciones en la última hora. Sin embargo, no exploramos estas opciones, debido a que se encontró un efecto significativo de la familiaridad de la hembra sobre la *asignación diferencial* de la conducta afiliativa y no afiliativa del macho (ver gráfica 3).

La asignación de la conducta refiere a la proporción de observaciones de cada categoría (categoría 1- conducta no afiliativa; categoría 2- conducta afiliativa) que dirigió el macho a cada hembra del total de observaciones para cada categoría (ver metodología). Este índice fue representado numéricamente por medio de los *cocientes de interacción social* o *CIS*. Se observó como los machos asignaron más conductas afiliativas con la hembra de la pareja y más conductas no afiliativas con la hembra desconocida, debido a que el CIS de la categoría 2 dirigido a la pareja fue significativamente mayor en comparación con el CIS de la categoría 1. En contraste, para la hembra desconocida el CIS de la categoría 1 fue estadísticamente más grande que el de la categoría 2 (ver gráfica 3). Estos resultados confirman: 1) las tendencias observadas anteriormente donde los machos dirigieron de manera diferencial de la conducta

afiliativa y no afiliativa de acuerdo a la identidad de cada hembra; 2) el supuesto de la formación de un vínculo afiliativo de larga duración, el cual implicó una asignación de conductas afiliativas a la hembra de la pareja y una asignación de conductas no afiliativas a la hembra desconocida por parte de machos que han cohabitado por más de un mes con una hembra. Además, estos resultados recapitulan aquellos obtenidos por el muestreo continuo, donde también se muestra un efecto significativo de la familiaridad de la hembra sobre la expresión de la conducta afiliativa del macho, y añaden información al patrón conductual de los machos que se han enganchado en un vínculo de larga duración, pues muestra como estos individuos desplegaron preferencialmente conductas no afiliativas con una hembra desconocida.

El método instantáneo redujo el tiempo empleado para analizar la conducta en comparación con el método de muestreo continuo, pues con el primero las 30 observaciones conductuales a lo largo de la última hora de la prueba de preferencia pudieron ser realizadas en un periodo no mayor a 15 minutos; mientras que registrar la duración del CLaL (por medio del método de muestreo continuo) implicó el análisis ininterrumpido de las tres horas de la prueba. Aunque el uso de sistemas computarizados que automaticen el análisis de la conducta afiliativa del topillo de la pradera durante la prueba de preferencia permite una reducción del tiempo empleado para analizar la conducta (Ahern y cols. 2009). Emplear estos sistemas tiene ciertos requisitos (infraestructura, equipo y entrenamiento), y limitantes como la imposibilidad de distinguir conductas afiliativas sutiles, pero altamente informativas como la postura de abrazo. Finalmente, los sistemas automatizados agudizan la limitante del método de registro (manual) continuo que radica en analizar únicamente la conducta afiliativa.

En la naturaleza, los individuos modifican su conducta en función del contexto social, reproductivo y ecológico, es decir favorecen un despliegue conductual sobre otro (Silk 2007; Snell-Rood 2013). Por lo tanto, si un macho pudiera interactuar simultáneamente con la hembra de su pareja y con otra hembra desconocida, debería dirigir una serie de conductas que distingan a su pareja (conductas afiliativas, principalmente) y otras que le permitan conocer/interactuar con la nueva hembra (ej. conductas de reconocimiento social). Entonces, tendría sentido que durante la prueba de preferencia se evaluaran no solo las conductas afiliativas sino también interacciones no afiliativas que tienen sentido biológico para los

machos a pesar que hayan formado un vínculo de pareja. Por ejemplo, dentro de las conductas de encuentro, cuantificadas por el método de muestreo instantáneo, se encuentra la olfacción a los individuos (incluida la anogenital); este tipo de conductas favorece el reconocimiento social (conocer la identidad de cada individuo y responder adecuadamente). En este sentido, se ha reportado que los machos exploran por más tiempo las pistas odoríferas de hembras desconocidas, en comparación con las pistas odoríferas de su pareja, a pesar de que estos machos hayan formado un vínculo de pareja (Parker y cols. 2011). Además, para los machos que han formado un vínculo de pareja resulta importante poder reconocer la identidad de otras hembras, que quizá representen posibles oportunidades de copula fuera de la pareja (Zheng y cols. 2013; Blocker y Ophir 2015; Kelly y cols. 2018).

*Características de los efectos del antagonismo crónico del receptor NMDA sobre la conducta del topillo de la pradera macho.*

Para determinar los efectos de antagonizar crónicamente el receptor NMDA en la etapa adulta sobre de la conducta afiliativa del topillo de la pradera macho, se utilizó el método de muestreo instantáneo que describimos anteriormente. Con este método, realizamos 30 observaciones conductuales a lo largo de la última hora de la prueba de preferencia. Estas observaciones registraron la conducta (afiliativa y no afiliativa) de dos grupos de machos, el primero tratado con salina ( $n = 8$ ) y un segundo tratado con MK-801 ( $n = 10$ ), dirigidas a hembras con las que cohabitaron por 24 horas o a hembras desconocidas (ver metodología). Las observaciones fueron registradas para cada conducta (no contacto, encuentro/investigación social, cerca pero no CLaL, CLaL y abrazo) o categoría conductual (categoría 1- conducta no afiliativa; categoría 2- conducta afiliativa). Se calculó el número total de observaciones para cada conducta y cada categoría conductual (sin importar la familiaridad de la hembra), así como la asignación diferencial de las conductas de cada categoría a la hembra pareja o a la hembra desconocida.

Se encontró que la administración crónica de MK-801 no modificó estadísticamente el número total de observaciones para cada conducta y cada categoría conductual (ver tabla 4), lo cual sugiere que el tratamiento no interfiere con la capacidad motora o motivacional de los individuos para desplegar la conducta (afiliativa o no afiliativa) de manera general (sin

importar la familiaridad de la hembra). Tampoco se encontraron efectos estadísticamente significativos del tratamiento con MK-801 sobre el número de observaciones para cada conducta (tablas 5 y 6) ni para cada categoría conductual (tablas 7 y 8) desplegadas por los machos relación con la familiaridad de la hembra. Sin embargo, al considerar las medias en algunas tablas observamos la tendencia de los machos tratados con MK-801 a comportarse en una manera similar a lo expuesto por la hipótesis general y sus predicciones; es decir, el tratamiento con MK-801 modificó el número de conductas afiliativas y no afiliativas desplegadas por los machos en relación con la familiaridad de la hembra (ver valores en negritas en las tablas 5, 6 y 8). Considerando estos resultados, al parecer el tratamiento con MK-801 indujo *efectos sutiles* sobre el despliegue de la conducta (afiliativa y no afiliativa) que no podían ser detectados como estadísticamente significativos por el método de análisis de los datos que se aplicó.

Finalmente, caracterizamos por separado la asignación de la conducta afiliativa y no afiliativa en relación con la familiaridad de la hembra, para los machos del grupo control y para los individuos del grupo MK-801. Encontramos que los machos tratados con salina asignaron una mayor proporción de conductas afiliativas que no afiliativas a su pareja; en contraste, asignaron un mayor número de conductas no afiliativas que afiliativas a la hembra desconocida (ver gráfica 4). Este patrón conductual cumple con el supuesto que el macho ha formado un vínculo de pareja con la hembra familiar, en una manera muy similar al grupo de machos que cohabitaron por más de un mes con sus parejas (comparar los valores de los CIS en la gráfica 3 del primer experimento y la gráfica 4 (grupo salina) del segundo experimento). Por lo tanto, se sugiere la replicabilidad del método de análisis de muestreo instantáneo, debido a que es capaz de obtener resultados replicables que aluden a la formación del vínculo de pareja en el topillo de la pradera. Pero también, se propone que el topillo macho enganchado en un vínculo duradero (más de un mes de cohabitación) o potencialmente duradero (24 horas de cohabitación) asigna de manera preferencial conductas afiliativas (ej. CLaL) a la hembra de su pareja y conductas no afiliativas (algunas de las cuales posiblemente tengan que ver con la investigación social) a una hembra desconocida.

Por el otro lado, los machos tratados con MK-801 no desplegaron el patrón conductual que caracteriza a los individuos que han formado un vínculo de pareja; es decir, no asignaron de

manera preferencial ni su conducta afiliativa ni su conducta no afiliativa en relación con la familiaridad de las hembras (ver gráfica 4). Considerando los resultados anteriores, se puede sugerir que el déficit inducido por antagonizar crónicamente el receptor NMDA sobre la conducta afiliativa del topillo de la pradera macho fue relativamente circunscrito: el tratamiento con MK-801 indujo efectos significativos únicamente en la asignación diferencial de la conducta afiliativa y no afiliativa en relación con la identidad de la hembra. Además, este déficit fue persistente, ya que después de 17 días de concluir el tratamiento crónico con MK-801 (0.2 mg/kg / 1 vez al día / 7 días) se observaron las alteraciones conductuales.

Pero, la baja capacidad para formar el vínculo de pareja en los machos tratados con MK-801 ¿podrá observarse aun después que la pareja se mantenga junta por más de 24 horas? Dado que el tratamiento crónico con MK-801 indujo déficits en la conducta social de otros roedores (ej. Dyck y cols. 2011), favorecemos la interpretación que los topillos machos tratados con MK-801 no pueden formar un vínculo de pareja (en una manera permanente). Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad que los machos MK sí puedan formar el vínculo, pero la formación es retrasada comparada con los animales no tratados. De hecho, un efecto similar fue reportado por Ahern y Young (2009) dado que una manipulación experimental, en este caso la estructura social temprana, puede “aplazar” de manera persistente la capacidad de los machos para desplegar el CLaL de manera preferencial con la hembra de la pareja. Por lo tanto, es necesario evaluar si el déficit en la asignación de la conducta afiliativa (inducido por MK-801) se “mantiene” después que la pareja permanezca junta por un periodo de tiempo prolongado.

A continuación discutiremos la posibilidad que los machos MK exhibieron déficits en procesos cognitivos que subyacen la formación del vínculo de pareja (ej. reconocimiento social y no son capaces de distinguir entre individuos) y en las alteraciones neurobiológicas (neuroquímicas y funcionales) inducidas por el tratamiento con MK-801 que favorecen la adopción de la estrategia polígama que pudiera reflejar rasgos esquizoides.

*Posibles alteraciones cognitivas que subyacen los déficits en la formación del vínculo de pareja en el topillo de la pradera macho inducidos por la administración crónica de MK-801*

Debido a que pocos trabajos han explorado la participación del receptor NMDA en la conducta afiliativa del topillo de la pradera, los resultados del presente trabajo serán discutidos en relación con los efectos de manipulaciones similares sobre la conducta afiliativa de otros roedores. En la rata, la conducta afiliativa dirigida a un conoespecífico del mismo sexo puede ser evaluada durante la prueba de interacción social al cuantificar: el número y la duración de interacciones activas (olfateo, acicalamiento social, persecución y conductas agresivas) y/o interacciones pasivas (proximidad social menor a 20 cm) desplegadas por el individuo focal (File 1988; Sams-Dodd 1998). En la mayoría de trabajos se antagoniza aguda o crónicamente el receptor NMDA para posteriormente evaluar la interacción social; en cambio, son pocos los estudios que involucran el antagonismo crónico de este receptor seguido de un periodo libre del fármaco que separa al tratamiento de la prueba conductual (tratamiento crónico con retiro) (Neill y cols. 2014).

En tres estudios realizados en la rata, que implican un periodo de retiro, observamos diferentes efectos del antagonismo crónico del receptor NMDA sobre la conducta afiliativa. El primero, realizado en la rata macho de la cepa Sprague Dawley (225 - 272 g) el tratamiento con MK-801 (0.5 mg/kg /día / 7 días; con retiro de 1 día) redujo significativamente la duración y el número de las interacciones pasivas, pero no la duración ni el número de las interacciones activas (Dyck y cols. 2011). El segundo, en la rata macho de la cepa Wistar (200- 225 g) el tratamiento con MK-801 (0.5 mg/kg / 2 veces al día / 7 días; con retiro de 7 días) redujo significativamente la duración de las interacciones activas (no se registraron las interacciones pasivas); pero la disminución relativa de la interacción social se debió más a un incremento en las interacciones activas del grupo control en un intervalo específico de tiempo, que a un decremento en el grupo tratado con MK-801 (Seillier y Giuffrida 2009). Finalmente, en el tercer trabajo se reportó en la rata macho de la cepa Wistar (3 meses de edad; 320 - 420 g) que el tratamiento crónico con MK-801 (0.03 o 0.5 mg/kg / día / 7 días; con retiro de 21 días) no disminuyó significativamente la duración de las interacciones pasivas ni activas (Sams-Dodd 2004). Tomando estos resultados en conjunto, se podría considerar que en la rata macho el antagonismo crónico del receptor NMDA induce efectos conductuales que persisten entre 1 y 7 días.

En el topillo de la pradera macho (edad: 45 DPN) el tratamiento con MK-801 (0.2 mg/kg / 1 vez al día / 7 días; retiro de 17 días) indujo alteraciones en la conducta afiliativa, observadas como la incapacidad del macho para asignar de manera diferencial su conducta (afiliativa / no afiliativa) en relación con la familiaridad de la hembra. Entonces, se puede sugerir que el antagonismo crónico (con retiro) del receptor NMDA induce alteraciones en la conducta afiliativa de algunos roedores; pero estas alteraciones persisten por más tiempo en el topillo de la pradera macho en comparación con la rata macho.

Por otro lado, la incapacidad para asignar la conducta en los topillos macho tratados con MK-801 pudo ser originada por un déficit en el reconocimiento de la identidad de las hembras durante la prueba de preferencia. El reconocimiento social es un proceso cognitivo que permite a los individuos identificar entre conespecíficos para posteriormente responder de manera adecuada a su identidad (Ferguson y cols. 2002). En los roedores, incluido el topillo de la pradera, el reconocimiento social se puede evaluar por la prueba de discriminación social (basada en el paradigma de habituación / deshabituación); en esta prueba se cuantifica el tiempo de investigación / exploración (olfateo o indicadores de olfacción social) dirigido por un individuo focal a dos individuos estímulo, uno con el cual ha previamente interactuado (“familiar”) y otro novedoso. El reconocimiento social del individuo focal es interpretado como una discriminación social motivada por la novedad social; es decir, el tiempo de exploración será mayor para el individuo novedoso en comparación con el familiar (Engelmann y cols. 1995; Zheng y cols. 2013).

Para el topillo de la pradera, el reconocimiento social es un recurso cognitivo necesario para la formación del vínculo de pareja (Young y Wang 2004; Young y cols. 2005), e incluso también para la adopción de la monogamia (Blocker y Ophir 2015). De hecho, el reconocimiento social puede ser influenciado por la formación del vínculo de pareja en esta especie, debido a que los machos “solteros” pueden discriminar la identidad de varios machos pero no de diferentes hembras (Zheng y cols. 2013); mientras que los machos que han cohabitado por 48 horas con una hembra (pero no los machos solteros) son capaces de distinguir la identidad de diferentes hembras (Blocker y Ophir 2015). Por lo tanto, el reconocimiento social podría ser el recurso cognitivo inmediato para que exista la asignación diferencial de la conducta afiliativa y no afiliativa en el topillo macho.

Entonces, se puede sugerir que los machos tratados con MK-801 exhibieron déficits en el reconocimiento social que les impidieran reconocer la identidad de las hembras, debido a ello no asignaron de manera diferencial su conducta afiliativa y no afiliativa. De hecho, se puede sustentar esta idea con la evidencia que el antagonismo agudo o crónico del receptor NMDA induce déficits en el reconocimiento social en la rata. Por ejemplo, en la rata macho de la cepa Hannover-Wistar (120 DPN; 250 – 300 g) el tratamiento agudo con MK-801 (0.2 mg/kg; 5 minutos después de iniciar la prueba) redujo la discriminación social; el grupo de machos tratados con MK-801 no disminuyó el tiempo de exploración dirigido a los individuos familiares, por lo tanto no se observó una diferencia significativa al contrastarlo con el tiempo de exploración a los individuos novedosos (Hlíňák y Krejčí 2003). Por otro lado, en la rata macho de la cepa Wistar (200 – 225 g) el tratamiento crónico con PCP (5 mg/kg / 2 veces al día / 7 días; con retiro de 7 días) disminuyó significativamente la discriminación social motivada por la novedad (Seillier y Giuffrida 2016). Sin embargo, para confirmar este supuesto se requieren experimentos donde se muestre que el tratamiento crónico con MK-801 pueda inducir déficits en el reconocimiento social del topillo macho.

*Posibles alteraciones neurobiológicas que subyacen los déficits en la formación del vínculo de pareja en el topillo de la pradera macho inducidos por la administración crónica de MK-801.*

En la sección anterior, se especuló la posibilidad que el antagonismo crónico del receptor NMDA haya originado alteraciones cognitivas (déficits en el reconocimiento social) que subyacen la incapacidad de los machos tratados con MK-801 para asignar de manera diferencial su conducta (afiliativa y no afiliativa). En esta sección, se especulan las posibles alteraciones neurobiológicas inducidas por el antagonismo crónico del receptor NMDA que puedan promover la incapacidad del macho para asignar de manera diferencial su conducta.

Los posibles “blancos” del antagonismo crónico del receptor NMDA pueden ser los sistemas de neurotransmisión dependientes de DA, OT y AVP (ej. Aragona y Wang 2004; 2009) y las regiones cerebrales (como los núcleos del tracto solitario, el gris periacueductal, el NAcc, el núcleo paraventricular, la amígdala medial, el pálido ventral, el septo lateral, la corteza prefrontal, el bulbo olfatorio, el VTA; el hipocampo, la corteza retrosplenial, el tálamo anterior y otras como el septo y los núcleos septohipocampales) que participan en la

regulación de la formación del vínculo de pareja (Young y Wang 2004; Young y cols. 2005) y la adopción particular de un sistema de copula (Phelps y cols. 2010; Robinson 2015; Ophir 2017) en el topillo de la pradera. Pero, para hacer más particular la especulación, se consideró en concreto a ciertas regiones y neurotransmisores donde sea más probable observar un “daño” o alteración producto del antagonismo crónico del receptor NMDA.

Para identificar las regiones y neurotransmisores más susceptibles a los efectos del antagonismo crónico del receptor NMDA se utilizó evidencia proveniente de estudios en otros roedores de laboratorio (como la rata o el ratón), pues en el topillo de la pradera se ha estudiado muy poco las consecuencias conductuales o neurobiológicas del antagonismo (crónico o agudo) de este receptor. De hecho, solo encontramos el trabajo de Kirkpatrick y Kakoyannis (2004) donde mostraron que la administración aguda de MK-801 en una dosis dependiente (0.001 – 0.1 mg/kg) modificó de manera dimórfica la expresión del cuidado aloparental del topillo macho y hembra. En los machos (40- 50 DPN), las dosis de 0.01 y 0.02 mg/kg de MK-801 incrementaron el cuidado aloparental; mientras que la dosis más alta (0.1 mg/kg) y más baja (0.001 mg/kg) de MK-801 disminuyeron el cuidado aloparental. Al únicamente estudiar las consecuencias conductuales no pudieron identificar puntualmente las regiones donde “actuó” MK-801, pero se especuló que el antagonismo agudo del receptor NMDA pudo afectar regiones corticales que participan en el cuidado parental. En comparación con el estudio de Kirkpatrick y Kakoyannis donde utilizaron un tratamiento farmacológico agudo para evaluar la participación del receptor NMDA sobre la conducta aloparental del topillo de la pradera; en nuestro estudio se empleó un tratamiento crónico (con retiro) de MK-801 para determinar si los efectos persistentes de antagonizar crónicamente el receptor NMDA incluían alteraciones en la formación del vínculo de pareja.

Una posibilidad en concreto, es que el antagonismo crónico del receptor NMDA pudo modificar la neurotransmisión dopaminérgica en regiones asociadas a la formación del vínculo de pareja. Esta idea es sustentada por la siguiente evidencia: a) neuronas dopaminérgicas provenientes del VTA proyectan al NAcc donde liberan DA (Young y Wang 2004); b) la activación del receptor D2 a DA en el VTA facilita la formación del vínculo de pareja en el topillo de la pradera macho (Aragona y cols. 2006); c) en el topillo de la pradera macho ( $\approx$  90 DPN) la administración de anfetamina (1 o 5 mg/kg / día / 3 días; 24 horas antes de la

cohabitación con una hembra receptiva) incrementó la liberación de DA la cual ocupó los receptores D1 en el NAcc, lo cual impidió la formación del vínculo de pareja (Liu y cols. 2010); d) la administración de anfetamina (1 o 5 mg/kg / día / 3 días) en etapas tempranas del desarrollo (13 – 15 DPN) indujo en la adultez (80 DPN) alteraciones en la conducta social de topillos de la pradera machos dirigidas a conespecíficos del mismo sexo; además el tratamiento indujo alteraciones persistentes en la síntesis de DA en el VTA y su liberación en el NAcc (Fukushiro y cols. 2015). e) la administración de MK-801 (acumulativa de 1.875 mg/kg) en la rata macho de la cepa Sprague-Dawley (adultos, 250-350 g) anestesiada incrementó la síntesis y subsecuente liberación de DA en neuronas (dopaminérgicas) del VTA; este incremento supone un estado híper-dopaminérgico en regiones mesolímbicas como el NAcc (French y cols. 1993; reportes similares: French y Ceci 1990; Meltzer y cols. 1997). Entonces, al incrementar la síntesis de DA en el VTA se puede originar un desbalance en la liberación de DA en el NAcc lo cual puede modificar la conducta afiliativa del topillo de la pradera; en la rata, el antagonismo del receptor NMDA puede modular la actividad neuronal y la síntesis de DA en el VTA y causar un desbalance en la liberación de DA en el NAcc. Por lo tanto, la evidencia anterior apoya el supuesto que el antagonismo crónico del receptor NMDA pudo modificar la neurotransmisión dopaminérgica en regiones asociadas a la formación del vínculo de pareja (ej. NAcc) al incrementar la síntesis de DA en el VTA.

En segundo lugar, es posible que el antagonismo crónico del receptor NMDA pudiera inducir alteraciones metabólicas que comprometieran la funcionalidad de regiones asociadas a la formación del vínculo de pareja y por lo tanto los machos tratados con MK-801 presentaran un circuito “deficiente”. Se ha encontrado en la rata macho de la cepa Sprague Dawley (peso promedio 250 g) que la administración de MK-801 (0.1 o 0.5 mg/kg / día / 6 días; sin retiro) indujo alteraciones en el metabolismo de neuronas y de células gliales en la corteza frontal, cingulada y retrosplenial así como en los lóbulos temporales (Eyjolfsson y cols. 2006). En el topillo de la pradera, la amígdala es una estructura (parte de los lóbulos temporales) que participa en la formación del vínculo de pareja (ej. Young y Wang 2004); mientras que la corteza retrosplenial participa en el procesamiento de la información visuo-espacial, la cual tiene relación con la fidelidad sexual, el uso del territorio (Ophir y cols. 2008b) y la adopción de la monogamia (Ophir 2017). Entonces, es posible que los efectos del antagonismo crónico

del receptor NMDA incluyeran alteraciones metabólicas en regiones asociadas a la formación del vínculo de pareja como la amígdala y/o la corteza retrosplenial, lo cual pudo comprometer la capacidad de los topillos de la pradera machos tratados con MK-801 para asignar su conducta en relación con la identidad de la hembra.

Quizá, tanto los desbalances en el sistema dopaminérgico como las alteraciones metabólicas en regiones que participan en la formación del vínculo de pareja expliquen los efectos conductuales inducidos por el antagonismo crónico del receptor NMDA en el topillo de la pradera, como se reportó en el presente estudio; sin embargo, se requieren experimentos puntuales para comprobar la idea anterior.

*Las alteraciones en la conducta afiliativa del topillo de la pradera macho inducidas al antagonizar crónicamente el receptor NMDA y su relación con la esquizofrenia*

La especulación realizada en las dos secciones anteriores sobre las alteraciones cognitivas y neurobiológicas inducidas por el antagonismo crónico del receptor NMDA guarda una estrecha relación con la “construcción” de un modelo animal de los síntomas de la esquizofrenia. En esta sección, se considera la evidencia que permite suponer que las alteraciones persistentes en la conducta afiliativa del topillo de la pradera macho inducidas por el antagonismo crónico del receptor NMDA mimetizan características sociales y posiblemente neurobiológicas asociadas a la esquizofrenia.

En primer lugar, los déficits en la formación del vínculo de pareja en el topillo de la pradera macho que fueron inducidos por el antagonismo crónico del receptor NMDA mimetizan la baja capacidad para formar un vínculo de pareja observada en personas con esquizofrenia. La mayoría de estas personas (60 – 70 %) no se casan y tienen contactos sociales limitados (pp. 283, American Psychiatric Association 2000); además, la soltería tiene una asociación con características clínicas negativas en las personas que fueron diagnosticadas (Nyer y cols. 2010). La baja capacidad para formar un vínculo de pareja afecta principalmente a los varones con esquizofrenia, dado que son menos propensos a casarse que las mujeres (Nyer y cols. 2010), y también corresponde a que los síntomas negativos son más prominentes en hombres (Díaz-Castro y cols. 2018).

Por otro lado, los déficits en la conducta afiliativa del topillo de la pradera inducidos por el antagonismo crónico del receptor NMDA tienen una notable relación con la patofisiología de la esquizofrenia. La hipótesis glutamatérgica de los síntomas de la esquizofrenia soporta esta idea, debido a que la disfunción del receptor NMDA es un posible mecanismo patofisiológico del trastorno (Javitt y Zukin 1991; Javitt 2010; Lewis 2012; Sendt y cols. 2012; Genius y cols. 2013). La evidencia que sustenta a la hipótesis glutamatérgica fue derivada de estudios como el nuestro, donde se mostró que la administración aguda de antagonistas del receptor NMDA induce en humanos un síndrome difícil de distinguir de los síntomas de la esquizofrenia (Luby y cols. 1959; Krystal y cols. 1994; Lahti y cols. 1995) y en animales su administración aguda y crónica mimetiza ciertas alteraciones (neurobiológicas y cognitivo-conductuales) relevantes a este padecimiento (Large 2007; Porsolt y cols. 2010; Jones y cols. 2011; Lim y cols. 2012; Neil y cols. 2014).

Una consideración importante de este posible modelo, es que a pesar de la existencia de modelos animales de los síntomas negativos que mimetizan el aislamiento social (Wilson y Koenig 2014), en el topillo de la pradera se puede mimetizar/evaluar la baja capacidad para formar pareja que acompaña a los síntomas negativos (Millan y cols. 2014). Esta ventaja radica en utilizar a un roedor que posee un intrincado abanico de interacciones sociales como parte de su repertorio conductual “natural”, el topillo de la pradera (McGuire y Novak 1984; Getz y cols. 1993; McGuire y Getz 1995; Getz y Carter 1996; Aragona y cols. 2006; Gobrogge y Wang 2016). De hecho, la vasta conducta afiliativa desplegada por el topillo de la pradera lo coloca como un animal modelo para estudiar características de la conducta social compleja de los humanos, como la formación del vínculo de pareja (Aragona y Wang 2004; Young y Wang 2004; McGraw y Young 2010; Young y cols. 2011; Lieberwirth y Wang 2016).

En el apartado anterior, se discutió la posibilidad que la dinámica de algunas regiones cerebrales y ciertos neurotransmisores que participan en la formación del vínculo de pareja en el topillo de la pradera pudieran ser afectados por el antagonismo crónico del receptor NMDA. Ahora, se analiza la posible relación entre las alteraciones neurobiológicas producto del antagonismo del receptor NMDA con aquellas observadas en la esquizofrenia. En personas con esquizofrenia, se han encontrado alteraciones volumétricas y/o morfométricas (número,

tamaño o forma de las células, fibras o elementos extraparenquimales) en más de 20 regiones cerebrales incluidas la corteza prefrontal, el hipocampo, la amígdala, el NAcc y el tálamo (Swerdlow 2011). En dos regiones en particular, el hipocampo y la CPF, los estudios post-mortem indican una disminución en la densidad de las interneuronas GABAérgicas que expresan la proteína parvalbúmina en personas que padecieron esquizofrenia (Reynolds y cols. 2001; Zhang y Reynolds 2002; pero considerar Tooney y Chahl 2004), así como una disminución en las concentraciones de la enzima ácido glutámico descarboxilasa-67 (GAD-67) en las interneuronas (GABAérgicas) inhibitorias en la CPF (Perry y cols. 1979; Bird 1985). Las evidencias anteriores sustentan la idea que, en el humano, la desinhibición de las células piramidales (glutamatérgicas) en regiones como el hipocampo incrementa la liberación de DA, mediada por neuronas dopaminérgicas del VTA, este estado híper-dopaminérgico (en regiones como el NAcc) podría explicar los síntomas psicóticos; pero la desinhibición las células piramidales también es responsable de una reducción en las oscilaciones de frecuencia gamma como producto de la actividad desorganizada de los grupos de células piramidales o hipo-activación prefrontal la cual puede explicar el origen de los síntomas negativos de la esquizofrenia (Menon y cols. 2001; Gur y cols. 2007; Lisman y cols. 2008; Genius y cols. 2013).

En los roedores de laboratorio, como la rata macho, se han inducido alteraciones similares a las observadas en personas con esquizofrenia. Por ejemplo, en ratas macho juveniles ( $\approx$  35 DPN; 121 – 148 g) de la línea Long Evans la administración crónica de MK-801 (0.02 mg/kg / día / 21 días; con un retiro de 1 día) redujo significativamente la densidad de interneuronas GABAérgicas que expresan la proteína parvalbúmina en el hipocampo (Braun y cols. 2007). En ratas macho *hooded* de la línea Long Evans (180-220 g) el tratamiento crónico con PCP (2.58 mg/kg de manera intermitente durante 14 días; con retiro de 3 días) disminuyó la expresión de la proteína parvalbúmina en neuronas de la corteza prefrontal (Cochran y cols. 2003). En la en ratas macho juveniles ( $\approx$  35 DPN; 121 – 148 g) de la línea Long Evans la administración crónica de MK-801 (0.02 mg/kg / día / 21 días; con un retiro de 1 día) incremento significativamente la liberación de glutamato, así como la producción de especies de oxígeno reactivo; las alteraciones mencionadas se originaron de la desinhibición de las células piramidales como resultado del control deteriorado de las interneuronas inhibitorias

gabaérgicas (Genius y cols. 2013). Por lo tanto, la administración crónica de antagonistas del receptor NMDA en roedores de laboratorio es un buen modelo para inducir alteraciones neurobiológicas (ejemplo: desbalances en la liberación de dopamina, desinhibición las células piramidales) que son características de la condición patológica humana, la esquizofrenia.

En el topillo de la pradera, se ha evidenciado la participación de regiones como la CPF, el hipocampo, el NAcc, la corteza retrosplenial en regular la formación del vínculo de pareja y la adopción de la monogamia (Young y Wang 2004; Ophir 2017). En el presente estudio, mostramos que el antagonismo crónico del receptor NMDA inducido por la administración de MK-801 (0.2 mg/kg / día / 7 días; con retiro de 17 días) redujo la capacidad de los individuos para formar pareja, debido a que mostraron déficits para asignar su conducta en relación a la identidad de la hembra. Es posible que al igual que en la rata macho, el antagonismo crónico del receptor NMDA en el topillo de la pradera refleje una aproximación experimental útil para investigar los mecanismos patológicos asociados a la esquizofrenia, incluidos los desbalances en la liberación de dopamina y la desinhibición las células piramidales. Sin embargo, se requieren experimentos futuros para continuar con la validación de este posible modelo, principalmente estudios que identifiquen puntualmente las alteraciones neurobiológicas inducidas al antagonizar crónicamente el receptor NMDA y su similitud con las alteraciones observadas en la esquizofrenia.

Finalmente, se especula sobre el valor predictivo que podría tener este posible modelo, en relación al desarrollo de fármacos que atenúen los síntomas de la esquizofrenia. Se ha evidenciado que la administración exógena de oxitocina (10 – 40 IU / día) disminuye algunos de los síntomas positivos y negativos en pacientes con esquizofrenia (revisado por Iovino y cols. 2018); presuntamente el potencial antipsicótico de OT radica en atenuar la desregulación dopaminérgica mesolímbica asociada a la esquizofrenia (MacDonald y Feifel 2012). El desbalance dopaminérgico observado en la esquizofrenia (Grace 1991; Lisman y cols. 2008), puede ser mimetizado en cierta medida por la administración de anfetaminas en humanos y roedores de laboratorio (Jones y cols. 2011; Howes y cols. 2017). En el topillo de la pradera, la administración de anfetamina (1 o 5 mg/kg / día / 3 días; 24 horas antes de la cohabitación) impide la formación del vínculo de pareja al incrementar la liberación de DA en el NAcc (Liu y cols. 2010). Pero, de manera interesante, la administración de OT (1 ng; directamente en la

corteza prelámbica) pudo atenuar los déficits en la conducta afiliativa inducidos por la administración sucesiva de anfetamina (Young y cols. 2014). En conjunto esta evidencia, permite sugerir que el topillo de la pradera la administración de fármacos psicotomiméticos (anfetamina o MK-801) induce alteraciones conductuales asociadas a la esquizofrenia, como se observa en otros roedores. Este tipo de manipulaciones resultan útiles para entender aspectos biológicos de la esquizofrenia, pero también como una posible una plataforma de análisis farmacológico. En el topillo de la pradera, se podría evaluar el potencial terapéutico de compuestos que atenúen los síntomas de la esquizofrenia (principalmente alteraciones sociales) al modificar la neurotransmisión oxitocinérgica.

*El antagonismo crónico del receptor NMDA podría explicar la aparición de rasgos esquizoides en relación a la adopción de un sistema de copula*

En la siguiente sección se discute la posibilidad que el antagonismo crónico del receptor NMDA pudo inducir en el topillo de la pradera macho una serie de características neurobiológicas y conductuales que pueden asociarse a la esquizofrenia y quizá subyacer la variabilidad en la adopción de un sistema de copula. Del Giudice y colaboradores (2010) proponen una hipótesis sobre la evolución de las características esquizoides y del espectro autista (EA) en relación a la selección sexual. En ella argumentan que los rasgos esquizoides y del EA contribuyen de maneras opuestas a la prevalencia de las diferencias individuales en las estrategias reproductivas; mientras que los “rasgos positivos” esquizoides facilitan en los individuos un gran esfuerzo para copular y asignar recursos a corto plazo, los rasgos del EA se orientan a un bajo esfuerzo para copular y la asignación de recursos a largo plazo donde existe una alta inversión en el cuidado parental (Del Giudice y cols. 2010). Entonces, los rasgos del EA pudieron favorecer ciertas conductas que favorecen el sistema de copula monógamo (fidelidad sexual o cúpula preferencial con la pareja, cuidado biparental); pero los rasgos esquizoides favorecen a la promiscuidad.

El topillo de la pradera es una especie que muestra diferencias individuales en la adopción de un determinado sistema de copula, pues entre el 60-75% adoptan la monogamia social (individuos residentes) y entre el 25 – 40% de la población “prefieren” la poligamia (individuos deambuladores (Getz y cols. 1993; Salomon 1993; Salomon y Jacquot 2002;

Ophir y cols. 2008; McGuire y Getz 2010; McGuire y cols. 2013). Pero, ¿será posible que los topillos de la pradera residentes tengan un fenotipo parecido al EA, mientras que los topillos deambuladores tengan ciertos “rasgos positivos esquizoides”? Posiblemente, el sistema de copula promiscuo es adoptado por individuos que tienen déficits en la memoria visuo-espacial (Robinson 2015; Ophir 2017). Curiosamente, este tipo de déficits cognitivos se presentan de manera continua en pacientes con esquizofrenia (American Psychiatric Association, 2013; Millan y cols. 2014) incluso en fases prodrómicas (Miret y cols. 2016) y guardan cierta relación con la hipofunción del receptor NMDA y sus consecuencias neurobiológicas (Cannon 2015; Millan y cols. 2014).

Como se discutió anteriormente, el antagonismo crónico del receptor NMDA pudo inducir una serie de déficits cognitivos (por ejemplo, en el reconocimiento social y/o en la memoria visuo-espacial) que alteraron la capacidad del topillo de la pradera macho para asignar su conducta en relación con la familiaridad de la hembra. Entonces, se podría suponer que en los machos tratados con MK-801 se favorecería –de manera artificial- la elección de un determinado sistema de copula. Por lo tanto, las consecuencias neurobiológicas del antagonismo del receptor NMDA podrían representar un mecanismo que favorezca la variabilidad conductual en el topillo de la pradera, pero también favorecería en esos individuos cierta vulnerabilidad a la esquizofrenia. Esta vulnerabilidad sería observada como individuos que presenten –por ejemplo- algunos déficits cognitivos, aunque no necesariamente síntomas patológicos; también los individuos serían más susceptibles a ciertos procesos patológicos asociados a la esquizofrenia. Esta aproximación para entender los mecanismos patológicos de los trastornos neuropsiquiátricos se basa en los principios de la medicina evolutiva, que asumen la prevalencia de las patologías desde la vulnerabilidad como un sub-producto de la variación natural en rasgos que fueron favorecidos por procesos evolutivos y de selección sexual (ver Grunspan y cols. 2018).

## 9. Conclusiones.

Primero, se probó la utilidad de una nueva metodología para analizar la conducta afiliativa del topillo de la pradera durante la prueba de preferencia. La nueva propuesta implicó dos cambios con respecto al método previamente publicado, uno en el tipo de muestreo y otro en el registro de conductas no afiliativas. Entonces, se registró la conducta por un método de muestreo instantáneo, en lugar de continuo, lo cual permitió un ahorro sustancial del tiempo empleado para cuantificar la conducta y supuso una clara ventaja de nuestra propuesta. Por la otra parte, se complementó el análisis de la conducta afiliativa con el registro de conductas no afiliativas desplegadas durante la prueba de preferencia. Para este segundo cambio, se tomó en cuenta el repertorio social del topillo de la pradera en condiciones naturales, el cual no solo implica el despliegue de conductas afiliativas desplegadas preferencialmente al otro miembro de la pareja, sino que también incluye la expresión de conductas (ej. exploración social) que permiten identificar a miembros fuera de la pareja. Por lo tanto, al cuantificar la conducta no afiliativa el método de registro instantáneo podría representar con más veracidad la intrincada naturaleza de las interacciones sociales –posiblemente tripartitas- que toman lugar durante esta prueba.

Luego, utilizando ambas metodologías de análisis conductual se caracterizó el patrón conductual de los machos que se han enganchado en un vínculo duradero; este patrón incluyó una expresión diferencial de conductas afiliativas y no afiliativas en relación con la familiaridad de la hembra. Se observó que los machos desplegaron preferencialmente con la pareja una mayor duración o un número mayor de conductas afiliativas, mientras que a la hembra desconocida dirigieron una menor duración de conductas afiliativas y/o un mayor número de conductas no afiliativas. Por lo tanto, se pudo proponer que el CLaL y la preferencia de pareja indican no solo la formación del vínculo de pareja de larga duración, sino también el mantenimiento y/o reforzamiento del mismo.

Finalmente, empleando el método de muestreo instantáneo (nueva metodología) se determinaron los efectos del antagonismo crónico del receptor NMDA sobre la conducta afiliativa del topillo de la pradera macho. Las características de estos efectos son la persistencia, debido a que se observaron después de 17 días de terminar el tratamiento; y la

selectividad, dado que solo se afectó la capacidad de los machos para asignar la conducta afiliativa y no afiliativa en relación con la familiaridad de la hembra.

Especulamos que el antagonismo crónico del receptor NMDA en el topillo de la pradera: a) indujo alteraciones cognitivas (ej. déficits en el reconocimiento social) que impidieron a los machos tratados con MK-801 asignar diferencialmente su conducta en relación con la familiaridad de la hembra; b) favoreció alteraciones neurobiológicas (ej. desbalances dopaminérgicos y alteraciones metabólicas) en regiones cerebrales (ej. CPF, NAcc, corteza retrosplenial) que participan en la formación del vínculo de pareja, lo cual pudo originar un “circuito deficiente” en los machos tratados con MK-801; c) debido a la relación con la patofisiología y síntomas de la esquizofrenia, puede representar el primer paso para validar un nuevo modelo animal de los síntomas de este trastorno.

Posiblemente, el topillo de la pradera pueda resultar ventajoso respecto a otros modelos similares, pues ninguno de los que actualmente se utilizan para mimetizar los síntomas de la esquizofrenia mimetizan las alteraciones en la formación del vínculo de pareja.

## 10. Perspectivas.

El presente trabajo abre una serie de oportunidades de estudio en el campo de la conducta afiliativa comparativa y el desarrollo de nuevos modelos animales para entender alteraciones en la conducta social de algunos trastornos neuropsiquiátricos, como la esquizofrenia.

El primer experimento permitió caracterizar el patrón conductual de machos enganchados en un vínculo de pareja duradero. Pero ¿podría el éxito reproductivo de la pareja determinar el despliegue conductual del macho? O ¿la expresión preferencial del CLaL con la hembra de la pareja predecirá si un macho adopta la monogamia? Ambas preguntas abonarían información sobre los factores que ha favorecido la expresión de ciertas conductas en relación al contexto ecológico y reproductivo de la especie.

Por el otro lado, en el segundo experimento se probó que el antagonismo crónico del receptor NMDA indujo alteraciones persistentes sobre la asignación de la conducta del topillo de la pradera macho en relación con la familiaridad de la hembra. Pero, no se determinó si estos efectos son pasajeros o duraderos, es decir los machos tratados con MK-801 podrían eventualmente formar un vínculo de pareja si se incrementa el tiempo de cohabitación por ejemplo. Tampoco identificamos puntualmente ¿cuáles son los mecanismos conductuales (ej. reconocimiento social, interacción social) alterados al antagonizar de manera crónica el receptor NMDA? Ni ¿cuáles regiones o circuitos cerebrales son alterados al antagonizar de manera crónica el receptor NMDA? El responder estas preguntas permitirá continuar con la validación del modelo animal, dado que se vería una relación entre las alteraciones inducidas por MK-801 y aquellas observadas en la esquizofrenia.

Finalmente, sería importante validar que las alteraciones observadas guardan una relación cercana con la medicación, por lo tanto cabría la pregunta ¿las alteraciones en la conducta afiliativa inducidas al antagonizar crónicamente el receptor NMDA en el topillo de la pradera pueden ser atenuadas por los antipsicóticos? Esta pregunta permitiría cumplir con un tercer criterio para validar nuestro modelo, el criterio predictivo.

## 11. Referencias.

- Ahern TH y Young LJ. 2009. The impact of early life family structure on adult social attachment, alloparental behavior, and the neuropeptide systems regulating affiliative behaviors in the monogamous prairie vole (*Microtus ochrogaster*). *Front Behav Neurosci* 3: 17.
- Ahern TH, Modi ME, Burkett JP y Young LJ. 2009. Evaluation of two automated metrics for analyzing partner preference tests. *J Neurosci Methods* 182: 180-188.
- American Psychiatric Association. 2000. Diagnostic and statistical manual of mental disorders 4th edition (DSM-IV). Washington, DC.
- American Psychiatric Association. 2013. Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-5®). American Psychiatric Pub.
- Aragona BJ y Wang Z. 2004. The prairie vole (*Microtus ochrogaster*): an animal model for behavioral neuroendocrine research on pair bonding. *ILAR J* 45: 35-45.
- Aragona BJ y Wang Z. 2009. Dopamine regulation of social choice in a monogamous rodent species. *Front in Behav Neurosci* 3: 15.
- Aragona BJ, Liu Y, Curtis JT, Stephan FK y Wang Z. 2003. A critical role for nucleus accumbens dopamine in partner-preference formation in male prairie voles. *J Neurosci* 23: 3483-3490.
- Aragona BJ, Liu Y, Yu YJ, Curtis JT, Detwiler JM, Insel TR y Wang Z. 2006. Nucleus accumbens dopamine differentially mediates the formation and maintenance of monogamous pair bonds. *Nat neurosci* 9: 133-139.
- Arias-Gutiérrez M, Cabrejos-Novoa C, Núñez-Moscoso P, Valera-Guerrero V y Cruzado L. 2014. Psicosis inducida por fármacos antituberculosos: un caso asociado a cicloserina. *Rev Neuro-Psiq* 77: 179-183.
- Audet MC, Goulet S, y Doré FY. 2009. Impaired social motivation and increased aggression in rats subchronically exposed to phencyclidine. *Physiol Behav* 96: 394-398.
- Bales KL, y Carter CS. 2003. Developmental exposure to oxytocin facilitates partner preferences in male prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Behav Neurosci* 117: 854.

Balu DT, y Coyle JT. 2015. The NMDA receptor ‘glycine modulatory site’ in schizophrenia: D-serine, glycine, and beyond. *Curr Opin Pharmacol* 20: 109-115.

Bartz JA, y Hollander E. 2006. The neuroscience of affiliation: forging links between basic and clinical research on neuropeptides and social behavior. *Horm Behav* 50: 518-528.

Beery AK, Christensen JD, Lee NS y Blandino KL. 2018. Specificity in sociality: mice and prairie voles exhibit different patterns of peer affiliation. *Front Behav Neurosci* 12: 50.

Bird JM. 1985. Computed tomographic brain studies and treatment response in schizophrenia. *Can J Psychiat* 30: 251-254.

Birney EC, Grant WE y Baird DD. 1976. Importance of vegetative cover to cycles of *Microtus* populations. *Ecology* 57: 1043-1051.

Blocker TD y Ophir AG. 2015. Social recognition in paired, but not single, male prairie voles. *Anim Behav* 108: 1-8.

Blocker TD y Ophir AG. 2016. A preference to bond? Male prairie voles form pair bonds even in the presence of multiple receptive females. *Anim Behav* 122: 89-97.

Blondel DV. 2006. Social organization of a species of singing mouse, *Scotinomys xerampelinus* Tesis de doctorado. University of Florida.

Braun I, Genius J, Grunze H, Bender A, Möller HJ y Rujescu D. 2007. Alterations of hippocampal and prefrontal GABAergic interneurons in an animal model of psychosis induced by NMDA receptor antagonism. *Schizophr Res* 97: 254-263.

Buchanan RW, Javitt DC, Marder SR, Schooler NR, Gold JM, McMahon RP, Heresco-Levy U y Carpenter WT. 2007. The Cognitive and Negative Symptoms in Schizophrenia Trial (CONSIST): the efficacy of glutamatergic agents for negative symptoms and cognitive impairments. *Am J Psychiatry* 164:1593–1602.

Cannon TD. 2015. How schizophrenia develops: cognitive and brain mechanisms underlying onset of psychosis. *Trends Cogn Sci* 19: 744-756.

Carter CS y Getz LL. 1993. Monogamy and the prairie vole. *Sci Am* 268: 100-106.

Carter CS, Devries AC y Getz LL. 1995. Physiological substrates of mammalian monogamy: the prairie vole model. *Neurosci Biobehav Rev* 19: 303-314.

- Cho MM, DeVries AC, Williams JR y Carter CS. 1999. The effects of oxytocin and vasopressin on partner preferences in male and female prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Behav Neurosci* 113: 1071.
- Clutton-Brock TH. 1989. Review lecture: mammalian mating systems. *Proc R Soc Lond B* 236: 339-372.
- Coan JA y Sbarra DA. 2015. Social baseline theory: The social regulation of risk and effort. *Curr Opin Psychol* 1: 87-91.
- Cochran SM, Kennedy M, McKerchar CE, Steward LJ, Pratt JA y Morris BJ. 2003. Induction of metabolic hypofunction and neurochemical deficits after chronic intermittent exposure to phencyclidine: differential modulation by antipsychotic drugs. *Neuropsychopharmacol* 28: 265-275.
- Curtis JT y Wang Z. 2005. Ventral tegmental area involvement in pair bonding in male prairie voles. *Physiol Behav* 86: 338-346.
- Del Giudice M, Angeleri R, Brizio A y Elena MR. 2010. The evolution of autistic-like and schizotypal traits: A sexual selection hypothesis. *Front Psychol* 1: 41.
- Dere E, Huston JP y Silva MADS. 2007. The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents. *Neurosci Biobehav Rev* 31: 673-704.
- DeVries AC, DeVries MB, Taymans S y Carter CS. 1995. Modulation of pair bonding in female prairie voles (*Microtus ochrogaster*) by corticosterone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(17), 7744-7748.
- DeVries AC, DeVries MB, Taymans SE y Carter CS. 1996. The effects of stress on social preferences are sexually dimorphic in prairie voles. *PNAS* 93: 11980-11984.
- Doke SK y Dhawale SC. 2015. Alternatives to animal testing: A review. *Saudi Pharm J* 23: 223-229.
- Donaldson ZR, Spiegel L y Young LJ. 2010. Central vasopressin V1a receptor activation is independently necessary for both partner preference formation and expression in socially monogamous male prairie voles. *Behav Neurosci* 124: 159.
- Dyck B, Guest K, Sookram C, Basu D, Johnson R y Mishra RK. 2011. PAOPA, a potent analogue of Pro-Leu-glycinamide and allosteric modulator of the dopamine D2 receptor, prevents NMDA receptor antagonist (MK-801)-induced deficits in social interaction in the rat:

implications for the treatment of negative symptoms in schizophrenia. *Schizophr res* 125: 88-92.

Eastwick PW. 2013. The psychology of the pair-bond: Past and future contributions of close relationships research to evolutionary psychology. *Psychol Inq* 24: 183-191.

Engelmann M, Wotjak CT y Landgraf R. 1995. Social discrimination procedure: an alternative method to investigate juvenile recognition abilities in rats. *Physiol Behav* 58: 315-321.

Eyolfsson EM, Brenner E, Kondziella D y Sonnewald U. 2006. Repeated injection of MK801: an animal model of schizophrenia?. *Neurochem Int* 48: 541-546.

Ferguson JN, Young LJ y Insel TR. 2002. The neuroendocrine basis of social recognition. *Front Neuroendocrin* 23: 200-224.

File SE. 1988. How good is social interaction as a test of anxiety. *Anim Models Psychiatr Dis* 1: 151-166.

French ED y Ceci A. 1990. Non-competitive N-methyl-D-aspartate antagonists are potent activators of ventral tegmental A10 dopamine neurons. *Neurosci Lett* 119: 159-162.

French ED, Mura A y Wang T. 1993. MK-801, phencyclidine (PCP), and PCP-like drugs increase burst firing in rat A10 dopamine neurons: Comparison to competitive NMDA antagonists. *Synapse* 13: 108-116.

Fukushiro DF, Olivera A, Liu Y y Wang Z. 2015. Neonatal exposure to amphetamine alters social affiliation and central dopamine activity in adult male prairie voles. *Neurosci* 307: 109-116.

Gangestad SW, y Simpson JA. 2000. The evolution of human mating: Trade-offs and strategic pluralism. *Behav Brain Sci* 23: 573-587.

Gao XM, Elmer GI, Adams-Huet B y Tamminga CA. 2009. Social memory in mice: disruption with an NMDA antagonist and attenuation with antipsychotic drugs. *Pharm Biochem Behav* 92: 236-242.

Genius J, Geiger J, Dölzer AL, Benninghoff J, Giegling I, Hartmann AM... y Rujescu D. 2013. Glutamatergic dysbalance and oxidative stress in in vivo and in vitro models of psychosis based on chronic NMDA receptor antagonism. *PLoS One* 8: 7.

Getz LL y Carter CS. 1996. Prairie-vole partnerships. *Am Sci* 84: 56-62.

- Getz LL y Hofmann JE. 1986. Social organization in free-living prairie voles, *Microtus ochrogaster*. *Behav Ecol Sociobiol* 18: 275-282.
- Getz LL, Carter CS y Gavish L. 1981. The mating system of the prairie vole, *Microtus ochrogaster*: field and laboratory evidence for pair-bonding. *Behav Ecol Sociobiol* 189-194.
- Getz LL, McGuire B, Hofmann J, Pizzuto T y Frase B. 1990. Social organization and mating system of the prairie vole, *Microtus ochrogaster*. En *Social systems and population cycles in voles* (pp. 69-80). Birkhäuser, Basel.
- Getz LL, McGuire B, Pizzuto T, Hofmann JE y Frase B. 1993. Social organization of the prairie vole (*Microtus ochrogaster*). *J Mammal* 74: 44-58.
- Getz LL. 1978. Speculation on social structure and population cycles of microtine rodents. *Biologist* 60: 134.
- Gobrogge KL y Wang Z. 2011. Genetics of aggression in voles. En *Advances in genetics* (Vol. 75, pp. 121-150). Academic Press.
- Gobrogge KL y Wang Z. 2016. The ties that bond: neurochemistry of attachment in voles. *Curr Opin Neurobiol* 38: 80-88.
- Gobrogge KL, Liu Y, Jia X y Wang Z. 2007. Anterior hypothalamic neural activation and neurochemical associations with aggression in pair-bonded male prairie voles. *J Comp Neurol* 502: 1109-1122.
- Goff DC, Cather C, Gottlieb JD, Evins AE, Walsh J y cols. 2008. Once-weekly D-cycloserine effects on negative symptoms and cognition in schizophrenia: an exploratory study. *Schizophr res* 106: 320-327.
- González-Mariscal G y Poindron P. 2002. Parental care in mammals: immediate internal and sensory factors of control. *Horm Brain Behav* 215-298.
- Grace AA. 1991. Phasic versus tonic dopamine release and the modulation of dopamine system responsivity: a hypothesis for the etiology of schizophrenia. *Neuroscience* 41: 1-24.
- Harvey PD y Strassn M. 2012. Predicting the severity of everyday functional disability in people with schizophrenia: cognitive deficits, functional capacity, symptoms, and health status. *World Psychiatry* 11: 73-79.

Heresco-Levy U, Javitt DC, Ermilov M, Mordel C, Silipo G y Lichtenstein M. 1999. Efficacy of high-dose glycine in the treatment of enduring negative symptoms of schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 56: 29-36

Hlišák Z y Krejčí I. 2003. Kynurenic acid prevented social recognition deficits induced by MK-801 in rats. *Physiol Res* 52: 805-808.

Hoffman KL. 2015. Modeling neuropsychiatric disorders in laboratory animals. Woodhead Publishing.

Howes OD, McCutcheon R, Owen MJ y Murray RM. 2017. The role of genes, stress, and dopamine in the development of schizophrenia. *Biol Psychiatry* 81: 9-20.

Insel TR y Hulihan TJ. 1995. A gender-specific mechanism for pair bonding: oxytocin and partner preference formation in monogamous voles. *Behavioral neuroscience*, 109(4), 782.

Insel TR. 2010. The challenge of translation in social neuroscience: a review of oxytocin, vasopressin, and affiliative behavior. *Neuron*, 65: 768-779.

Iovino M, Messina T, De Pergola G, Iovino E, Dicuonzo F, Guastamacchia E... y Triggiani V. 2018. The role of neurohypophyseal hormones vasopressin and oxytocin in neuropsychiatric disorders. *Endocr Metab Immune* 18: 341-347.

Javitt DC y Zukin SR. 1991. Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *Am J Psychiatry*.

Javitt DC. 2010. Glutamatergic theories of schizophrenia. *Isr J Psychiatr Rel* 47: 4.

Johnson ZV, Walum H, Jamal YA, Xiao Y, Keebaugh AC, Inoue K y Young LJ. 2016. Central oxytocin receptors mediate mating-induced partner preferences and enhance correlated activation across forebrain nuclei in male prairie voles. *Horm Behav* 79: 8-17.

Jones CA, Watson DJG y Fone KCF. 2011. Animal models of schizophrenia. *Br J Pharmacol* 164: 1162-1194.

Kantrowitz JT, Malhotra AK, Cornblatt B, Silipo G, Balla A y cols. 2010. High dose D-serine in the treatment of schizophrenia. *Schizophr Res* 121: 125-130.

Kelly AM, Saunders AG y Ophir AG. 2018. Mechanistic substrates of a life history transition in male prairie voles: Developmental plasticity in affiliation and aggression corresponds to nonapeptide neuronal function. *Horm Behav* 99: 14-24.

Kew JN, Richards JG, Mutel V y Kemp JA. 1998. Developmental changes in NMDA receptor glycine affinity and ifenprodil sensitivity reveal three distinct populations of NMDA receptors in individual rat cortical neurons. *J Neurosci* 18: 1935-1943.

Kiecolt-Glaser JK y Newton TL. 2001. Marriage and health: his and hers. *Psychol Bull* 127: 472.

Kiecolt-Glaser JK, Fisher LD, Ogrocki P, Stout JC, Speicher CE y Glaser R. 1987. Marital quality, marital disruption, and immune function. *Psychosom Med* 49: 13-34.

Kirkpatrick B y Kakoyannis A. 2004. Sexual dimorphism and the NMDA receptor in alloparental behavior in juvenile prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Behav Neurosci* 118: 584.

Kleiman DG. 1977. Monogamy in mammals. *Q Rev Biol* 52: 39-69.

Ko J. 2017. Neuroanatomical substrates of rodent social behavior: the medial prefrontal cortex and its projection patterns. *Front Neural Circuit* 11: 41.

Krystal JH, Karper LP, Seibyl JP, Freeman GK, Delaney R, y cols. 1994. Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans: psychotomimetic, perceptual, cognitive, and neuroendocrine responses. *Arch Gen Psychiatry* 51: 199-214.

Lahti AC, Koffel B, LaPorte D y Tamminga CA. 1995. Subanesthetic doses of ketamine stimulate psychosis in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 13: 9-19.

Large CH. 2007. Do NMDA receptor antagonist models of schizophrenia predict the clinical efficacy of antipsychotic drugs?. *J Psychopharmacol* 21: 283-301.

Lee RM y Robbins SB. 1998. The Relationship between Social Connectedness and Anxiety, Self-Esteem, and Social Identity. *J Couns Psychol* 45: 338-345.

Lewis DA. 2012. Cortical circuit dysfunction and cognitive deficits in schizophrenia—implications for preemptive interventions. *Eur J Neurosci* 35: 1871-1878.

Lieberman JA, Stroup TS, McEvoy JP, Swartz MS, Rosenheck RA y cols. 2005. Effectiveness of antipsychotic drugs in patients with chronic schizophrenia. *N Engl J Med* 353: 1209-1223.

Lieberwirth C y Wang Z. 2014. Social bonding: regulation by neuropeptides. *Front Neurosci* 8: 171.

Lieberwirth C y Wang Z. 2016. The neurobiology of pair bond formation, bond disruption, and social buffering. *Curr Opin Neurobiol* 40: 8-13.

- Lillard LA y Waite LJ. 1995. 'Til death do us part: Marital disruption and mortality. *Am J Sociol* 100: 1131-1156.
- Lim AL, Taylor DA y Malone DT. 2012. Consequences of early life MK-801 administration: long-term behavioural effects and relevance to schizophrenia research. *Behav Brain Res* 227: 276-286.
- Lim MM y Young LJ. 2006. Neuropeptidergic regulation of affiliative behavior and social bonding in animals. *Horm Behav* 50: 506-517.
- Lisman JE, Coyle JT, Green RW, Javitt DC, Benes FM, Heckers S y Grace AA. 2008. Circuit-based framework for understanding neurotransmitter and risk gene interactions in schizophrenia. *Trends Neurosci* 31: 234-242.
- Liu Y, Aragona BJ, Young KA, Dietz DM, Kabbaj M y cols. 2010. Nucleus accumbens dopamine mediates amphetamine-induced impairment of social bonding in a monogamous rodent species. *PNAS* 107: 1217-1222.
- Liu Y, Curtis JT y Wang Z. 2001. Vasopressin in the lateral septum regulates pair bond formation in male prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Behav Neurosci* 115: 910.
- Lossi L, D'Angelo L, De Girolamo P y Merighi A. 2016. Anatomical features for an adequate choice of experimental animal model in biomedicine: II. Small laboratory rodents, rabbit, and pig. *Ann Anat. Anatomischer Anzeiger* 204: 11-28.
- Luby ED, Cohen BD, Rosenbaum G, Gottlieb JS y Kelley R. 1959. Study of a new schizophrenomimetic drug—Sernyl. *AMA Arch Neurol Psychiatry* 81: 363-369.
- Lukas M y de Jong TR. 2015. Conspecific interactions in adult laboratory rodents: friends or foes?. In *Social Behavior from Rodents to Humans* (pp. 3-24). Springer, Cham.
- Luque-Larena JJ, López P y Gosálbez J. 2004. Spacing behavior and morphology predict promiscuous mating strategies in the rock-dwelling snow vole, *Chionomys nivalis*. *Can J Zool* 82: 1051-1060.
- MacDonald K y Feifel D. 2012. Oxytocin in schizophrenia: a review of evidence for its therapeutic effects. *Act Neuropsychiatr* 24: 130-146.
- Martin P, Bateson PPG y Bateson P. 1993. *Measuring behaviour: an introductory guide*. Cambridge University Press.

- Mateo JM, Holmes WG, Bell AM y Turner M. 1994. Sexual maturation in male prairie voles: effects of the social environment. *Physiol Behav* 56: 299-304.
- Matsuoka T, Tsunoda M, Sumiyoshi T, Takasaki I, Tabuchi Y, y cols. 2008. Effect of MK-801 on gene expressions in the amygdala of rats. *Synapse* 62: 1-7.
- McGraw LA y Young LJ. 2010. The prairie vole: an emerging model organism for understanding the social brain. *Trends Neurosci* 33: 103-109.
- McGuire B y Getz LL. 1995. Communal nesting in prairie voles (*Microtus ochrogaster*): an evaluation of costs and benefits based on patterns of dispersal and settlement. *Can J Zoo* 73: 383-391.
- McGuire B y Novak M. 1984. A comparison of maternal behaviour in the meadow vole (*Microtus pennsylvanicus*), prairie vole (*M. ochrogaster*) and pine vole (*M. pinetorum*). *Anim Behav* 32: 1132-1141.
- McGuire B, Getz LL, Bemis WE y Oli MK. 2013. Social dynamics and dispersal in free-living prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *J Mammal* 94: 40-49.
- McNeill PM. 1993. The ethics and politics of human experimentation. CUP Archive.
- Medoff DR, Holcomb HH, Lahti AC y Tamminga CA. 2001. Probing the human hippocampus using rCBF: contrasts in schizophrenia. *Hippocampus* 11: 543-550.
- Meltzer LT, Christoffersen CL y Serpa KA. 1997. Modulation of dopamine neuronal activity by glutamate receptor subtypes. *Neurosci Biobehav R* 21: 511-518.
- Menon V, Anagnoson RT, Mathalon DH, Glover GH y Pfefferbaum A. 2001. Functional neuroanatomy of auditory working memory in schizophrenia: relation to positive and negative symptoms. *Neuroimage* 13: 433-446.
- Millan MJ, Fone K, Steckler T y Horan WP. 2014. Negative symptoms of schizophrenia: clinical characteristics, pathophysiological substrates, experimental models and prospects for improved treatment. *Eur Neuropsychopharm* 24: 645-692.
- Miret S, Fatjó-Vilas M, Peralta V y Fañanás L. (2016). Síntomas básicos en la esquizofrenia, su estudio clínico y relevancia en investigación. *Rev Psiquiatr Salud* 9: 111-122.
- Molnar E y Isaac JT. 2002. Developmental and activity dependent regulation of ionotropic glutamate receptors at synapses. *Sci World J* 2: 27-47.

Nakazawa K, McHugh TJ, Wilson MA y Tonegawa S. 2004. NMDA receptors, place cells and hippocampal spatial memory. *Nat Rev Neurosci* 5: 361-372.

National Research Council. 1988. Use of laboratory animals in biomedical and behavioral research. National Academies Press.

National Research Council. 2010. Guide for the care and use of laboratory animals. National Academies Press.

Neill JC, Barnes S, Cook S, Grayson B, Idris NF, McLean SL... y Harte MK. 2010. Animal models of cognitive dysfunction and negative symptoms of schizophrenia: focus on NMDA receptor antagonism. *Pharmacol Therapeut* 128: 419-432.

Neill JC, Harte MK, Haddad PM, Lydall ES y Dwyer DM. 2014. Acute and chronic effects of NMDA receptor antagonists in rodents, relevance to negative symptoms of schizophrenia: a translational link to humans. *Eur Neuropsychopharm* 24: 822-835.

Nelson AC, Colson KE, Harmon S y Potts WK. 2013. Rapid adaptation to mammalian sociality via sexually selected traits. *BMC Evol Biol* 13: 81.

Noldus LP, Spink AJ y Tegelenbosch RA. 2001. EthoVision: a versatile video tracking system for automation of behavioral experiments. *BRMIC* 33: 398-414.

Numan M y Young LJ. 2016. Neural mechanisms of mother–infant bonding and pair bonding: similarities, differences, and broader implications. *Horm Behav* 77: 98-112.

O’Connell LA y Hofmann HA. 2012. Evolution of a vertebrate social decision-making network. *Science* 336: 1154-1157.

Okhovat M, Berrio A, Wallace G, Ophir AG y Phelps SM. 2015. Sexual fidelity trade-offs promote regulatory variation in the prairie vole brain. *Science* 350: 1371-1374.

Oliveira RF, Taborsky M y Brockmann HJ. (Eds.). 2008. Alternative reproductive tactics: an integrative approach. Cambridge University Press.

Ophir AG y Delbarco-Trillo J. 2007. Anogenital distance predicts female choice and male potency in prairie voles. *Physiol Behav* 92: 533-540.

Ophir AG, Phelps SM, Sorin AB y Wolff JO. 2007. Morphological, genetic, and behavioral comparisons of two prairie vole populations in the field and laboratory. *J Mammal* 88: 989-999.

Ophir AG, Phelps SM, Sorin AB y Wolff JO. 2008. Social but not genetic monogamy is associated with greater breeding success in prairie voles. *Anim Behav* 75: 1143-1154.

Ophir AG, Wolff JO y Phelps SM. 2008b. Variation in neural V1aR predicts sexual fidelity and space use among male prairie voles in semi-natural settings. *PNAS* 105: 1249-1254.

Ophir AG. 2017. Navigating monogamy: nonapeptide sensitivity in a memory neural circuit may shape social behavior and mating decisions. *Front Neurosci* 11: 397.

Ostfeld RS. 1990. The ecology of territoriality in small mammals. *Trends Ecol Evol* 5: 411-415.

Parker JT, Rodriguez N, Lawal B, Delevan CJ y Bamshad M. 2011. Mating increases male's interest in other females: A cognitive study in socially monogamous prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Behav Process* 88: 127-134.

Perkeybile AM y Bales KL. 2017. Intergenerational transmission of sociality: the role of parents in shaping social behavior in monogamous and non-monogamous species. *J Exp Biol* 220: 114-123.

Perry T, Buchanan J, Kish S y Hansen S. 1979.  $\gamma$ -Aminobutyric-acid deficiency in brain of schizophrenic patients. *Lancet* 313: 237-239.

Phelps SM, Campbell P, Zheng DJ y Ophir AG. 2010. Beating the boojum: comparative approaches to the neurobiology of social behavior. *Neuropharmacology* 58: 17-28.

Porsolt RD, Moser PC y Castagné V. 2010. Behavioral indices in antipsychotic drug discovery. *J Pharmacol Exp Ther* 333: 632-638.

Prounis GS, Foley L, Rehman A y Ophir AG. 2015. Perinatal and juvenile social environments interact to shape cognitive behaviour and neural phenotype in prairie voles. *Proc R Soc B* 282: 2015-2236.

Ranson RM. 1934. The field vole (*Microtus*) as a laboratory animal. *J Anim Ecol*: 70-76.

Reynolds GP, Zhang ZJ y Beasley CL. 2001. Neurochemical correlates of cortical GABAergic deficits in schizophrenia: selective losses of calcium binding protein immunoreactivity. *Brain Res Bull* 55: 579-584.

Richmond M. 1969. Induced ovulation and oestrus in *Microtus ochrogaster*. *J Reprod Fert Suppl* 6: 357-376.

Roberts R L, Wolf KN, Sprangel ME, Rall WF y Wildt DE. 1999. Prolonged mating in prairie voles (*Microtus ochrogaster*) increases likelihood of ovulation and embryo number. *Biol Reprod* 60: 756-762.

Robinson GE. 2015. Dissecting diversity in the social brain. *Science* 350: 1310-1312.

Robles TF y Kiecolt-Glaser JK. 2003. The physiology of marriage: Pathways to health. *Physiol Behav* 79 409-416.

Rung JP, Carlsson A, Markinhuhta KR y Carlsson ML. 2005. (+)-MK-801 induced social withdrawal in rats; a model for negative symptoms of schizophrenia. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 29: 827-832.

Sams-Dodd F. 1998. Effects of continuous D-amphetamine and phencyclidine administration on social behaviour, stereotyped behaviour, and locomotor activity in rats. *Neuropsychopharmacology* 19: 18-25.

Sams-Dodd F. 2004. (+) MK-801 and Phencyclidine Induced Neurotoxicity do Not Cause Enduring Behaviours Resembling the Positive and Negative Symptoms of Schizophrenia in the Rat. *Basic Clin Pharmacol* 95: 241-246.

Schradin C y Pillay N. 2005. Intraspecific variation in the spatial and social organization of the African striped mouse. *J Mammal* 86: 99-107.

Seillier A y Giuffrida A. 2009. Evaluation of NMDA receptor models of schizophrenia: divergences in the behavioral effects of sub-chronic PCP and MK-801. *Behav Brain Res* 204: 410-415.

Seillier A y Giuffrida A. 2016. Disruption of social cognition in the sub-chronic PCP rat model of schizophrenia: possible involvement of the endocannabinoid system. *Eur Neuropsychopharmacol* 26: 298-309.

Sendt KV, Giaroli G y Tracy DK. 2012. Beyond dopamine: glutamate as a target for future antipsychotics. *ISRN Pharmacol* 2012.

Shapiro LE y Insel TR. 1990. Infant's response to social separation reflects adult differences in affiliative behavior: A comparative developmental study in prairie and montane voles. *Dev Psychobiol* 23: 375-393.

Shimazaki T, Kaku A y Chaki S. 2010. D-Serine and a glycine transporter-1 inhibitor enhance social memory in rats. *Psychopharmacology* 209: 263-270.

- Silk JB. 2007. The adaptive value of sociality in mammalian groups. *Philos T R Soc B* 362: 539-559.
- Snell-Rood EC. 2013. An overview of the evolutionary causes and consequences of behavioural plasticity. *Anim Behav* 85: 1004-1011.
- Snigdha S y Neill JC. 2008. Efficacy of antipsychotics to reverse phencyclidine-induced social interaction deficits in female rats—a preliminary investigation. *Behav Brain Res* 187: 489-494.
- Solomon NG y Jacquot JJ. 2002. Characteristics of resident and wandering prairie voles, *Microtus ochrogaster*. *Can J Zoo* 80: 951-955.
- Solomon NG. 1993. Comparison of parental behavior in male and female prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Can J Zoo* 71: 434-437.
- Stoesz BM, Hare JF y Snow WM. 2013. Neurophysiological mechanisms underlying affiliative social behavior: insights from comparative research. *Neurosci Biobehav Rev* 37: 123-132.
- Swerdlow NR. 2011. Are we studying and treating schizophrenia correctly?. *Schizophr Res* 130: 1-10.
- Tamarin RH. (Ed.). 1985. *Biology of new world Microtus*. American Society of Mammalogists.
- Thomas JA y Birney EC. 1979. Parental care and mating system of the prairie vole, *Microtus ochrogaster*. *Behav Ecol Sociobiol* 171-186.
- Tinbergen N. 1963. On aims and methods of ethology. *Zeitschrift für tierpsychologie*, 20: 410-433.
- Tomotake M. 2011. Quality of life and its predictors in people with schizophrenia. *J Med Investig* 58: 167-174.
- Tooney PA y Chahl LA. 2004. Neurons expressing calcium-binding proteins in the prefrontal cortex in schizophrenia. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiatry* 28: 273-278.
- Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK... y Dingledine R. 2010. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev* 62: 405-496.

Tricklebank MD, Singh L, Oles RJ, Preston C y Iversen SD. 1989. The behavioural effects of MK-801: a comparison with antagonists acting non-competitively and competitively at the NMDA receptor. *Eur J Pharmacol* 167: 127-135.

Tuominen HJ, Tiihonen J y Wahlbeck K. 2005. Glutamatergic drugs for schizophrenia: a systematic review and meta-analysis. *Schizophr Res* 72: 225-234.

van der Staay FJ. 2006. Animal models of behavioral dysfunctions: basic concepts and classifications, and an evaluation strategy. *Brain Res Rev* 52: 131-159.

Van Os J y Kapur S. 2009. Schizophrenia. *Lancet* 634-645.

Vanderschuren LJ, Niesink RJ y Van Pee JM. 1997. The neurobiology of social play behavior in rats. *Neurosci Biobehav Rev* 21: 309-326.

Volkmar FR. 2001. Pharmacological interventions in autism: theoretical and practical issues. *J Clin Child Adolesc Psychol* 30: 80-87.

Waltz M, Badura B, Pfaff H y Schott T. 1991. Marriage and the psychological consequences of heart attack: a longitudinal study of adaptation to chronic illness after 3 years. In *Public health* (pp. 16-36). Springer, Berlin, Heidelberg.

Wang Z, Hulihian TJ y Insel TR. 1997. Sexual and social experience is associated with different patterns of behavior and neural activation in male prairie voles. *Brain Res* 767: 321-332.

Watson DJ y Stanton ME. 2009. Medial prefrontal administration of MK-801 impairs T-maze discrimination reversal learning in weanling rats. *Behav Brain Res* 205: 57-66.

Williams JR, Catania KC y Carter CS. 1992. Development of partner preferences in female prairie voles (*Microtus ochrogaster*): the role of social and sexual experience. *Horm Behav* 26: 339-349.

Williams KL y Galliher RV. 2006. Predicting depression and self-esteem from social connectedness, support, and competence. *J Soc Clin Psychol* 25: 855-874.

Wilson CA y Koenig JI. 2014. Social interaction and social withdrawal in rodents as readouts for investigating the negative symptoms of schizophrenia. *Eur Neuropsychopharm* 24: 759-773.

Wise RA. 2002. Brain reward circuitry: insights from unsensed incentives. *Neuron* 36: 229-240.

- Wolff JO y Dunlap AS. 2002. Multi-male mating, probability of conception, and litter size in the prairie vole (*Microtus ochrogaster*). *Behav Process* 58: 105-110.
- Young KA, Gobrogge KL, Liu Y y Wang Z. 2011. The neurobiology of pair bonding: insights from a socially monogamous rodent. *Front Neuroendocrin* 32: 53-69.
- Young KA, Liu Y, Gobrogge KL, Wang H y Wang Z. 2014. Oxytocin reverses amphetamine-induced deficits in social bonding: evidence for an interaction with nucleus accumbens dopamine. *J Neurosci* 34: 8499-8506.
- Young LJ y Wang Z. 2004. The neurobiology of pair bonding. *Nat Neurosci* 7: 1048.
- Young LJ, Murphy AZ y Hammock EA. 2005. Anatomy and neurochemistry of the pair bond. *J Comp Neurol* 493: 51-57.
- Zhang ZJ y Reynolds GP. 2002. A selective decrease in the relative density of parvalbumin-immunoreactive neurons in the hippocampus in schizophrenia. *Schizophr Res* 55: 1-10.
- Zheng DJ, Foley L, Rehman A y Ophir AG. 2013. Social recognition is context dependent in single male prairie voles. *Anim Behav* 86: 1085-1095.
- Zou H, Zhang C, Xie Q, Zhang M, Shi J, Jin M y Yu L. 2008. Low dose MK-801 reduces social investigation in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 90: 753-757.