

**Facultad de Ciencias Naturales
Maestría en Ciencias Recursos Bióticos**

**EFFECTOS DE LA CONDUCTA SEXUAL EN LA SUPERVIVENCIA DE LAS CÉLULAS
NUEVAS EN EL BULBO OLFATORIO DE LA RATA MACHO ADULTA**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Maestra en Ciencias

Presenta:

Biol. Nancy Marisol Unda Díaz

Dirigido por:


Dra. Wendy Portillo Martínez

SINODALES

Dra. Wendy Portillo Martínez
Presidente


Firma

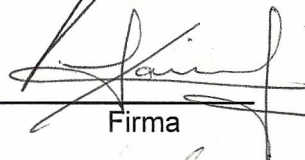
Dr. Fausto Arellano Carbajal
Secretario


Firma

Dr. Marco Antonio Sánchez Ramos
Vocal


Firma

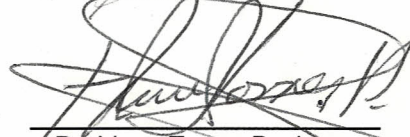
Dra. Karina Acevedo Whitehouse
Suplente


Firma

Dr. Raúl G. Paredes Guerrero
Suplente


Firma


Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca
Director de la Facultad


Dr. Irineo Torres Pacheco
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Junio de 2013
Querétaro, Qro.
México D.F.

RESUMEN

En la rata macho, la conducta sexual es modulada por el sistema olfatorio. El bulbo olfatorio (BO) es una de las estructuras que en la edad adulta presenta neurogénesis (generación de neuronas nuevas). La neurogénesis constituye un proceso biológico dinámico y depende de la estimulación que el animal recibe. El objetivo del presente trabajo es evaluar si la conducta sexual incrementa el número de neuronas nuevas en el BO accesorio (BOA) y principal (BOP) de la rata macho adulta y si estas se activan durante la cópula. Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar sexualmente expertos, los cuales se dividieron en los siguientes grupos: a) machos control que no copularon, b) exposición, machos que fueron expuestos a una hembra sexualmente receptiva sin tener contacto físico, c) cópula regulada por una hembra, machos que copularon con hembras que regularon los contactos copulatorios y dos grupos de machos que copularon libremente y que d) eyacularon una vez y e) eyacularon tres veces. A los sujetos se les administró el marcador de proliferación celular 5-bromo-2-deoxyuridina (BrdU) durante la prueba conductual y fueron sacrificados 45 días después. Para detectar el número de células nuevas que incorporaron el marcador BrdU se realizó una inmunohistoquímica, y para determinar si estas células nuevas se diferencian a neuronas y células gliales una inmunofluorescencia. Para determinar si son neuronas se utilizó el anticuerpo NeuN (proteína nuclear específica de neuronas). Al mismo tiempo se observó si estas nuevas células se activaban durante la conducta; para el cual se utilizó el anticuerpo c-Fos (gen de activación temprana). Los datos demuestran que los machos que copulan regulando la interacción sexual y eyaculan tres veces tienen un mayor número de células nuevas en el BOA capa granular en comparación a los control. Algunas de estas células expresan el marcador de diferenciación neuronal aproximadamente el 64%. Así mismo se demostró que estas nuevas neuronas se activan durante el apareamiento. Estos resultados proponen que en la rata macho la estimulación sexual recibida regulando la cópula incrementa la neurogénesis en la capa granular del BOA, y que estas células se activan en respuesta a la estimulación sexual, por lo que la cópula induce cambios plásticos en el sistema nervioso central.

Palabras Claves: Neurogénesis, Conducta sexual, Bulbo olfatorio, Cambios plásticos, Supervivencia.

SUMMARY

In the male rat, the integrity of the olfactory system is important for the expression of sexual behavior. The olfactory bulb (OB) is a structure that in adulthood undergoes neurogenesis (generation of newborn neurons). In adulthood, the olfactory bulb undergoes neurogenesis, a dynamic biological process that depends on stimulation. Several research groups have demonstrated that physical activity, enriched environments with scents or pheromones, and modulation of neuronal activity increased neurogenesis in the OB. The aim of this study was to determine if sexual behavior increased the number of new neurons in the accessory olfactory bulb (AOB) and in the main olfactory bulb (MOB) of adult male rats and if these neurons can respond to sexual behavior. Sexually experienced male Wistar rats were separated into five groups: 1) Control, males without sexual interaction; 2) Exposed, males exposed to a receptive female; 3) Paced males that mate in conditions regulated by the female rat; 4) One ejaculation, males that control the sexual interaction with a receptive female and were allowed to ejaculate one time, and 5) Three ejaculations, males that control the sexual interaction with a receptive female and were allowed to ejaculate three times. Subjects were administered the DNA synthesis marker 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) during the behavioral testing, and all animals were perfused 45 days later. We used an immunohistochemistry technique to detect the number of cells that incorporated BrdU, and immunofluorescence to determine if these new cells had differentiated into neurons. Antibody against NeuN (neuron-specific nuclear protein) was used to detect neurons and simultaneously, antibody against c-Fos (an early activation gene) indicated if these new cells were activated during behavior. The quantitative analysis shows an increase in the number of BrdU-positive cells in the posterior granular cell layer of the AOB in the group that paced the mating and ejaculated three times. Approximately 60% of these cells express the neuronal differentiation marker. Furthermore, the data demonstrate that these new neurons are activated during mating. These results suggest that sexual behavior induces plastic changes in the AOB.

Key Words: Neurogenesis, Sexual behavior, Olfactory bulb, Plastic changes and Survival.

ÍNDICE

Resumen.....	I
Summary.....	li
Índice.....	iii
Índice de cuadros.....	vi
Índice de figuras.....	vii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
La neuroetología del reconocimiento de olores.....	3
La conducta sexual.....	10
Sistema olfatorio.....	15
Descripción del sistema olfatorio accesorio.....	18
Órgano vomeronasal.....	22
Sistema olfatorio principal.....	25
Neurogénesis.....	28
Proceso de neurogénesis en el BO.....	32
Neurogénesis y conducta sexual masculina.....	34
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	39
Hipótesis.....	39
Objetivo general.....	39
Objetivos particulares.....	39

IV. MATERIAL Y MÉTODOS.....	40
Técnica.....	40
Herramientas experimentales en el estudio de proliferación celular y neurogénesis.....	40
Sujetos.....	41
Diseño experimental.....	41
Prueba de conducta sexual masculina.....	43
Administración de BrdU.....	44
Histología e inmunohistoquímica.....	44
Técnica de inmunohistoquímica para BrdU.....	45
Técnica de inmunofluorescencia para BrdU/NeuN.....	45
Técnica de inmunofluorescencia para BrdU/GFAP.....	46
Técnica de inmunofluorescencia para BrdU/NeuN/c-Fos.....	46
Análisis de imágenes y cuantificación de células.....	47
Análisis de imágenes y cuantificación de células inmunoreactivas a BrdU.	47
Análisis de imágenes y cuantificación de células inmunoreactivas a BrdU/NeuN; BrdU / GFAP y BrdU / NeuN / c-Fos.....	48
Análisis estadístico.....	49
V. RESULTADOS.....	50
Análisis de datos conductuales.....	50
Prueba de conducta sexual masculina.....	50
Análisis estadístico de la densidad de células nuevas.....	52
Análisis estadístico de la densidad de células nuevas en el BOP...	52
Análisis estadístico de la densidad de células nuevas en el BOA en la región anterior y posterior.....	53

Caracterización fenotípica de las células.....	54
Caracterización fenotípica de las células marcadas con BrdU/NeuN en la capa granular del BOA.....	54
Caracterización fenotípica de las células marcadas con BrdU/GFAP en la capa granular del BOA.....	57
Caracterización fenotípica de las células marcadas con BrdU/NeuN/c-Fos en la capa granular del BOA.....	61
VI. CONCLUSIÓN Y DISCUSIÓN.....	64
Discusión.....	64
Conclusión.....	68
LITERATURA CITADA.....	69

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO		PÁGINA
1	Efecto de lesiones en el OVN en el macho roedor.	24
2	Pruebas de conducta sexual masculina durante el entrenamiento.	50
3	Datos de la prueba de conducta sexual realizada el día en que a los animales se les administró BrdU.	51
4	Porcentaje de células inmunoreactivas a BrdU/NeuN, en la región anterior y posterior de la capa granular del bulbo olfatorio accesorio, del grupo cópula regulada por el macho hasta eyacular tres veces.	57
5	Porcentaje de células inmunoreactivas a BrdU/GFAP, en la región anterior y posterior del bulbo olfatorio accesorio del grupo cópula regulada por el macho hasta eyacular tres veces.	60
6	Porcentaje de las neuronas nuevas que se activan durante la realización de la tarea conductual en la región anterior y posterior de la capa granular del bulbo olfatorio accesorio.	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Vista sagital del cerebro de un roedor, en el cual se muestran los dos sistemas olfatorios.	6
2	Conductas precopulatorias en roedores.	11
3	Conductas consumatorias o de ejecución en roedores.	13
4	Esquema de la organización celular del bulbo olfatorio.	18
5	Esquema en donde se muestra el bulbo olfatorio accesorio y las vías de los receptores (V1R, V2R) los cuales proyectan hasta la amígdala.	21
6	Esquema de corte sagital de la cabeza de un hámster que muestra el órgano vomeronasal.	25
7a	Esquema representativo los dos principales componentes del sistema olfatorio en los roedores.	26
7b	Las áreas sombreadas indican las regiones del cerebro que reciben proyecciones eferentes del sistema olfativo.	26
8	Zona Subventricular y ruta al bulbo olfatorio.	28
9	Neurogénesis en el sistema olfatorio de un animal adulto.	33
10	Proceso de neurogénesis en el bulbo olfatorio.	34
11	Esquema de la unión del marcado exógeno BrdU al ADN en la fase S (de síntesis) del ciclo celular.	41
12	Fotografías de los grupos experimentales.	43
13	Esquema del método utilizado para la administración del marcador de síntesis de DNA BrdU.	44
14	Esquema representativo de un corte sagital del bulbo olfatorio de una rata adulta, en donde se muestra el área de cuantificación de células BrdU positivas en el bulbo olfatorio principal y bulbo olfatorio accesorio en la región anterior y posterior de la capa glomerular, mitral y granular.	48
15	Esquema que representa un corte sagital del bulbo olfatorio de una rata adulta, en donde se muestra el área de cuantificación de células BrdU/NeuN, BrdU/GFAP, BrdU/GFAP/c-Fos en el bulbo olfatorio accesorio.	49

16	Número de células positivas a BrdU en el bulbo olfatorio principal. En la capa glomerular, capa mitral y capa granular.	52
17	Número de células positivas a BrdU en la región anterior y posterior del bulbo olfatorio accesorio. En la capa glomerular, capa mitral y capa granular.	53
18	Fotomicrografías (20X) en donde se muestra un doble marcaje. BrdU (verde) y NeuN (rojo) en la capa granular del bulbo olfatorio accesorio en el grupo control.	54
19	Fotomicrografía (20X) en donde se muestra un doble marcaje BrdU (verde) y NeuN (rojo) en la capa granular del bulbo olfatorio accesorio en el grupo cópula regulada por el macho hasta tener 3 eyaculaciones.	55
20	Número de células positivas a BrdU y BrdU/NeuN en la región anterior y posterior del bulbo olfatorio accesorio de la capa granular.	56
21	Fotomicrografía (20X) en donde se muestra un doble marcaje con BrdU (verde), GFAP (rojo), Hoechst (azul) en la capa granular del bulbo olfatorio accesorio en el grupo control.	58
22	Fotomicrografía (20X) en donde se muestra un triple marcaje con BrdU (verde), GFAP (rojo), Hoechst (azul) en la capa granular del bulbo olfatorio accesorio en el grupo cópula regulada por el macho hasta tener 3 eyaculaciones.	59
23	Número de células positivas a BrdU y BrdU/GFAP en la región anterior y posterior del bulbo olfatorio accesorio, de la capa granular.	60
24	Fotomicrografía (20X) en donde se muestra un triple marcaje con BrdU (verde), NeuN (rojo) y c-Fos (azul) en la capa granular del bulbo olfatorio accesorio en el grupo control.	61
25	Fotomicrografía (20X) en donde se muestra un triple marcaje con BrdU (verde), NeuN (rojo) y c-Fos (azul) en la capa granular del bulbo olfatorio accesorio en el grupo cópula regulada por el macho hasta eyacular 3 veces.	62
26	Número de células positivas a BrdU y BrdU/NeuN/c-Fos en la región anterior y posterior del bulbo olfatorio accesorio de la capa granular.	63

I. INTRODUCCIÓN.

La conducta sexual ha sido persistentemente estudiada por varias disciplinas, para entender sus causas y su valor adaptativo (Muscarella y cols, 2001).

En la rata macho, la conducta sexual es modulada por el sistema olfatorio. De esta forma la lesión del bulbo olfatorio (BO) en animales sin experiencia sexual elimina esta conducta por completo (Winans y Powers, 1977).

Los BO al igual que el giro dentado son estructuras que en el organismo adulto tienen un constante recambio de neuronas nuevas (neurogénesis) (Lledo y cols, 2006; Gould y Gross, 2002). Esta capacidad les confiere a estas estructuras alta plasticidad.

Las neuronas nuevas que son incorporadas en el BO son generadas en la zona subventricular (ZSV), y la vía migratoria rostral (VMR) de donde migran indiferenciadas a través de la VMR hacia el BO donde se diferencian y se integran a los circuitos neuronales (Petreanu y Alvarez-Buylla, 2002). Las neuronas nuevas migran hasta el BO en 15 a 22 días (Gheusi y Lledo, 2007), y entre 15 a 45 días se integran funcionalmente a los circuitos neuronales (Petreanu y Alvarez-Buylla, 2002).

La neurogénesis constituye un proceso biológico dinámico, ya que su tasa es variable y depende de la estimulación que el animal recibe (Peterson, 2002). Se ha demostrado que la actividad física y los estímulos ambientales promueven la neurogénesis (Tanapat y cols, 1999).

De esta manera se ha demostrado que los estímulos olfatorios pueden incrementar la neurogénesis del BO (revisado en Lau y cols, 2011; Alonso y cols, 2006). Por ejemplo, en el ratón macho la exposición prolongada a un ambiente olfatorio enriquecido con fragancias aromáticas incrementa el número de neuronas

nuevas en la capa granular del BO principal (BOP), donde éstas neuronas favorecen la discriminación de olores (Rocheftort y cols, 2002). Por otra parte, la sobrevivencia de las células nuevas depende de la estimulación olfatoria ya que si los ratones son trasladados a ambientes no enriquecidos con fragancias el número de células nuevas regresa a niveles basales (Rocheftort y cols, 2002, Rocheftort y Lledo, 2005).

En mamíferos, varios grupos de investigación han demostrado que los estímulos olfatorios sexualmente relevantes pueden influir en la neurogénesis del BO (revisión en Lau y cols, 2011). Por ejemplo en ratones hembra la exposición a olores de machos dominantes estimula la proliferación neuronal en la ZSV, el BO y el giro dentado (Mark y cols, 2007).

La relevancia fisiológica de las células nuevas ha sido evaluada por Huang y Bittman (2002) quienes demostraron en el hámster macho que las células nacidas durante la etapa adulta son activadas durante la conducta sexual. Nosotros demostramos que las ratas macho que copulan hasta eyacular una o tres veces en condiciones en las que ellos regulan la interacción sexual, incrementa el número de células nuevas en la capa granular del bulbo olfatorio accesorio (BOA), 15 días después de haber copulado. Sin embargo, cuando el macho no regula la cópula no se observa un incremento en el número de células nuevas en ninguna de las capas analizadas (Portillo, 2012).

Por otro lado, se ha reportado que del día 15 al 45 el número de células declina hasta en un 50% y su supervivencia depende del nivel de actividad que reciban (Petreanu y Alvarez-Buylla, 2002; Kelsch y cols, 2009; Lin y cols, 2010). En el presente proyecto el objetivo fue evaluar si la estimulación recibida durante la cópula regulada por el macho favorece la supervivencia de estas células. También, evaluamos si estas se diferencian al linaje neuronal o glial y si se integran a los circuitos neuronales que modulan la conducta sexual masculina.

II. REVISIÓN DE LITERATURA.

2.1. LA NEUROETOLOGÍA DEL RECONOCIMIENTO DE OLORES

La neuroetología identifica las correlaciones entre las presiones de selección ecológica y la cognición de los animales, específicamente los efectos de la selección natural y sexual (Sherry, 2006). Aunque esta ciencia se centra en el comportamiento que los animales presentan en la naturaleza, utiliza métodos experimentales para observar las relaciones que existen con las redes neuronales (Kruger 2004, Nieuwenhuys 1998, Striedter de 2005, Tinbergen, 1963).

La neuroetología examina la función y el significado adaptativo de la conducta animal, especialmente la conducta social, usando modelos matemáticos para desarrollar la teoría y la investigación empírica de campo y en el laboratorio para poner a prueba las predicciones derivadas de la teoría (David, 2006). Actualmente las investigaciones de la neuroetología examina las relaciones entre el cerebro en el contexto de los sistemas de apareamiento, la organización social y la comunicación (Revisado en David, 2006).

La conducta sexual ha sido persistentemente estudiada por disciplinas como la biología, la sociología, la psicología y la antropología, con el objetivo de encontrar sus causas y explicar su valor adaptativo (Muscarella y cols, 2001). Entender el papel que cumple un proceso como la elección de pareja para copular requiere, además de describirlo y explicarlo conductualmente, precisar los mecanismos biológicos necesarios para el desarrollo de las funciones conductuales (Manrique y Gutiérrez, 2006). Uno de estos mecanismos se relaciona con el papel que tienen algunas áreas del cerebro que regulan este comportamiento en ratas machos; como son, el bulbo olfatorio (BO), el núcleo de la cama de la estría terminal (BNST) y la amígdala (AMG) (revisado en Konoshenko y cols, 2012). Newman (1999) sugiere que estas áreas forman un circuito interconectado recíprocamente, y forman parte de los comportamientos sociales en mamíferos.

El sistema olfatorio es una de las estructuras que detectan e integran la información que proviene del ambiente, transmitiendo esta información a zonas específicas del cerebro como el BO, el BNST, el núcleo cortical anterior de la amígdala (ACO) la corteza entorrinal (CE), la corteza piriforme (PC) entre otras (Shipley y cols, 1995).

A medida que los organismos se hicieron más complejos fueron desarrollando un sistema nervioso complejo, así, la interacción de la información odorífera con las terminaciones nerviosas constituyeron la primera función de este sistema (revisado en Hudson y cols, 2003). Cuando surgieron los invertebrados como los anélidos (lombrices, sanguijuelas) y moluscos (calamar, ostiones, pulpos) tanto el sistema nervioso y la conducta se hicieron más complejas estableciendo una comunicación química (Hudson R y cols, 2003); la cual les permite a los animales comunicarse entre ellos estableciendo una serie de conductas como la búsqueda de alimentos, la protección y la reproducción.

Por ejemplo los tentáculos o antenas son estructuras que tienen células sensoriales olfatorias que están involucradas en la alimentación y la defensa, en los artrópodos como los insectos, el olfato está involucrado en la conducta social (Agosta, 1992). Otro ejemplo son las polillas, las cuales detecta la información olfatoria en la antena y esta señal es llevada hacia las proyecciones centrales de los axones de los receptores neuronales olfatorios del lóbulo antenal (Strausfeld, 1976) de esta forma los machos pueden detectar las feromonas sexuales, respondiendo con movimientos en zigzag con dirección hacia el viento (Kennedy, 1983).

En la mayoría de los mamíferos (roedores, lagomorfos, carnívoros, etc.) el sistema olfatorio está bien desarrollado, aunque en primates y humanos poseen un sistema menos complejo ya que dependen de otros sentidos como la visión y la audición (Keverne, 1983). En los animales que presentan un sistema olfatorio desarrollado, éste en particular es importante para localizar y seleccionar el

alimento, para la comunicación, y es esencial para la conducta reproductiva (Hudson y cols, 2003).

Algunos vertebrados terrestres poseen dos sistemas para la detección de olores, el primero es el sistema olfatorio principal y el segundo el accesorio conformado por el órgano vomeronasal (OVN) (Halpern y Martínez-Marcos, 2003).

El sistema olfatorio principal tiene receptores codificados por más de 1000 genes (Buck y Axel, 1991), la mayoría de los receptores están acoplados a proteínas G, que son capaces de responder a una variedad casi infinita de olores volátiles derivados de ambientes naturales y sociales; en caso de el sistema olfativo accesorio, los receptores se encuentran en el órgano vomeronasal (OVN), los receptores se dividen en dos grandes familias V1R y V2R que son codificados aproximadamente por 300 genes (Dulac y Axle, 1995; Ryba y Tirindelli, 1997). Se ha propuesto que estos son capaces de responder tanto olores volátiles como no volátiles (revisado en Keverne, 2004). El OVN envía la información directamente a las estructuras del sistema límbico del cerebro que son importantes para el desarrollo y la expresión de conductas primarias como la agresión (Papes y cols, 2010) (Fig. 1) así como comportamientos que requieren activación de las vías neuroendocrinas implicadas con la reproducción (revisado en Keverne, 2004).

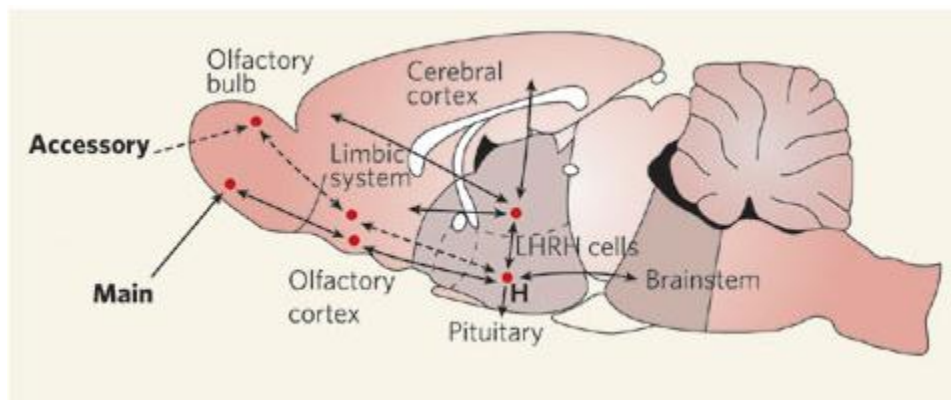


Fig.1 Vista sagital del cerebro de un roedor, en el cual se muestran los dos sistemas olfatorios: el sistema olfatorio principal (Main; líneas continuas) y el sistema olfatorio accesorio (Accessory; líneas discontinuas) dirigiéndose hacia el hipotálamo (H) y hacia regiones relacionadas. El bulbo olfatorio tiene conexiones con el hipotálamo para la percepción y la emoción; con el sistema límbico y el tronco cerebral para el comportamiento reproductivo y con la hipófisis coordinando las funciones endocrinas (Modificada de Shepherd, 2006).

A pesar de que ya se conocía que las señales olfativas estaban relacionadas con el comportamiento sexual, no fue hasta 1975 (Powers y Winans, 1975) que se estudió la función del OVN. Los primeros estudios sobre el OVN mostraron que es importante para la expresión de la conducta sexual en hámster. Por ejemplo en el macho, la exposición a una hembra sexualmente receptiva (estro) le induce patrones de cópula. Si a los machos se les lesiona la mucosa olfativa no se observan efectos importantes sobre la cópula; sin embargo, lesiones de ambos sistemas eliminan completamente el cortejo y la actividad sexual (Winans y Powers, 1977).

En general se cree que el reconocimiento de la pareja implica la vía olfatoria principal, lo cual se ha demostrado en hurones, cerdos, monos y roedores (revisado en Hudson y cols, 2003). Existe un segundo componente que es el OVN para el reconocimiento del compañero, específicamente para la búsqueda del individuo, y este reconocimiento individual es importante para formar una relación estrecha, así como evitar la endogamia y el bloqueo de la preñez (revisado en Hudson y cols, 2003). También se ha postulado que este sistema, a través de sus

conexiones estrechas con el hipotálamo, es la principal vía para producir cambios neuroendocrinos que participan en la aceleración de la pubertad, la inducción del estro (receptividad sexual), y el bloqueo de la preñez, así como los aumentos de testosterona en los machos por la exposición a la orina de hembras en estro (Cohen-Tanoudji y cols, 1989). De esta forma el sistema olfatorio es una estructura que se ha especializado en la detección de componentes químicos que regulan una gran variedad de funciones. Uno de los componentes químicos que más utilizan las especies son las feromonas.

Las feromonas son señales químicas que son usadas para la comunicación entre conspecíficos (ver revisión Kaupp, 2010); modulan la conducta social de los animales, tales como el comportamiento reproductivo, la dominancia social, la agresión y la unión de una madre con su cría (ver revisión Shepherd, 2006). Una feromona de atracción sexual es la afrodisina, que es una proteína de 17 kDa que se encuentra en los fluidos vaginales de la hembra en el hámster, la cual induce la monta en los machos (Briand y cols, 2004).

Stern (1969) demostró que las ratas machos prefieren los olores de hembras en estro que el de hembras en anestro. Estos estudios muestran la importancia de la distinción de olores sexuales en el ambiente natural. Por ejemplo en especies monógamas el poder distinguir a la hembra receptiva después de la cópula puede servir para establecer lazos entre parejas. Por otro lado Carr y colaboradores (1965) reportaron que el contacto sexual es necesario para la elección de pareja; al aparecer esto indicaría que el significado de los olores forma una asociación entre individuos en particular.

Una conducta importante para la sobrevivencia en los conejos es la que despliegan las crías al buscar el pezón de la madre. Los conejos tienen una extrema forma de cuidado materno, realizando visitas a las crías de tan solo 4 a 5 minutos por día, este es el único tiempo que las crías pueden alimentarse. Durante este periodo las crías tienen que ser muy hábiles para poderse alimentar, las crías

son guiadas por la feromona del pezón que se encuentra tanto en la madre como en la leche (Hudson y Distel, 1986). Este es otro claro ejemplo en donde la participación del olfato es importante para el procesamiento de la información del ambiente.

Con respecto al hipocampo se ha reportado que es una estructura que está involucrada en la consolidación y recuperación de la memoria; esta estructura tanto envía como recibe información del sistema olfatorio, del sistema estriatal, del sistema límbico (corteza entorrinal) y de las estructuras corticales. Esta extensa conectividad a lo largo del hipocampo consolida la información olfatoria de un evento como es la respuesta emocional (Arisi y cols, 2011).

El hipocampo es una estructura plástica que depende de la estimulación que recibe el organismo, en el adulto incorpora neuronas nuevas. Se ha demostrado que este proceso de neurogénesis incrementa con la actividad reproductiva. Por ejemplo Ormerod (2003) en ratones de la pradera muestra que aumenta la proliferación celular en el giro dentado del hipocampo en sujetos con actividad reproductiva en comparación con los no activos sexualmente; este estudio demuestra que la neurogénesis en el hipocampo está influenciada por el estado reproductivo.

Varios estudios han demostrado que las neuronas granulares del giro dentado tienen mayor tasa de sobrevivencia cuando la rata realiza actividades relacionadas con el aprendizaje (Gould y cols, 1999) en comparación con las ratas tratadas con un agente citostático (para reducir el número de neuronas jóvenes), las cuales realizan deficientemente las tareas de aprendizaje (Shors y cols, 2001).

Además, recientemente Ormerod (revisado en Ormerod, 2003) ha reportado que los ratones de campo con un mayor número de neuronas jóvenes en el giro dentado del hipocampo retienen mejor la información espacial. Lo cual les ayuda a tener una mejor ubicación espacial y así poder regresar a una

madriguera en la cual se encuentre una hembra con la que había copulado anteriormente.

Otros estudios con ratones de la pradera (*Microtus pennsylvanicus*) han demostrado que en condiciones naturales el territorio de los machos es más grande que el de las hembras (Gaulin y FitzGerald 1986). Los machos tienen una mejor aptitud espacial que las hembras (Gaulin y FitzGerald, 1986), lo cual les confiere una ventaja adaptativa; puesto que al tener un mayor área de recorrido puede visitar varias madrigueras y frecuentar a las hembras preferidas, en comparación con los machos que tienen menos capacidad espacial (Spritzer y cols. 2005). Por otro lado las hembras que son visitadas con más frecuencia tienen mayor posibilidad de quedar gestantes (Spritzer y cols, 2005).

Los ratones de campo (*Microtus pinetorum* Pine) y los ratones de la pradera (*Microtus ochrogaster*), a diferencia de la mayoría de los roedores, son monógamos. Los machos de estas especies suelen asociarse con una hembra durante la reproducción y posteriormente proveen cuidado paterno (Fitzgerald y Madison, 1983). Se ha reportado que no existen diferencias en cuanto a la capacidad espacial en estos dos tipos de roedores (Gaulin y cols, 1990). Todos estos ejemplos demuestran que el olfato junto con el hipocampo son estructuras importantes en la selección de pareja.

El sentido del olfato es la fuente de información sobre el medio externo de muchas especies, como lo hemos mencionado anteriormente es importante para la búsqueda de alimento, pareja y hábitat, las cuales están relacionadas con su supervivencia. El BO es una de las principales estructuras donde la neurogénesis persiste en el cerebro adulto de los mamíferos (Ming, 2005).

En el bulbo olfatorio principal (BOP) la neurogénesis es importante en el aprendizaje, memoria olfativa a largo plazo y en la discriminación de olores sociales en el ratón (Lazarini y cols, 2009; Sakamoto y cols, 2011). En el ratón

hembra la exposición a camas impregnadas con orina de machos incrementa la sobrevivencia de las células nuevas (Oboti y cols, 2009). Se ha demostrado que en ratones hembras, al exponerlas a olores de orina de un macho puede acelerar el periodo estral, dando lugar a la pubertad temprana, así mismo, el solo hecho de que las hembras se expongan a olores de orina de un macho distinto del que la gestó, es capaz de inducir la interrupción de la implantación del embrión, efecto que se conoce como efecto Bruce (Bruce, 1966). Esto sugiere que el sistema olfatorio es importante para la detección de olores sexualmente relevantes y es capaz de iniciar conductas dependientes de olores, como la conducta reproductiva (Shiple, 2004).

2.2. LA CONDUCTA SEXUAL

La conducta sexual es fundamental para la supervivencia de la especie, sin embargo para el individuo esta conducta no tiene otro propósito más que su propia ejecución (Agmo, 1999).

Algunos animales responden a una variedad de estímulos internos y externos que desencadena el propio deseo sexual. La capacidad para que el animal responda a estos estímulos requiere no solo de mecanismos innatos, sino también que el animal reconozca a los estímulos predictores para la cópula (James y cols, 2001).

En la conducta sexual de los mamíferos se pueden identificar dos componentes: el primero precopulatorio o motivacional, lleva al sujeto a la búsqueda y al inicio de la interacción con la pareja sexual y el segundo consumatorio o de ejecución (Beach, 1967). Las conductas precopulatorias duran desde unos cuantos segundos, minutos o incluso horas dependiendo de la especie y de la experiencia sexual previa. En la rata estas conductas consisten básicamente en el olfateo de la región perineal, la exploración genital y el aseo del compañero (Fig. 2) (Hliňák, 1986). Las hembras emiten señales de atracción como

pequeños saltos, movimientos en zig-zag y movimientos repetidos de orejas (Erskine, 1989).

Durante este periodo los roedores de ambos sexos pueden emitir vocalizaciones ultrasónicas de 50 kHz (Beyer y Barfield, 1978; Pomerantz y Clemens, 1981). Dichos sonidos tienden a aumentar la excitación de la pareja y la propia excitación del animal emisor (Knutson, 2002), en algunos casos el macho marca con orina su territorio (Meisel y Sachs, 1994). Así mismo, se ha demostrado que si la estimulación producida por el compañero durante la fase precopulatoria no es la adecuada es muy probable que la cópula no se lleve a cabo (Paredes y Agmo, 1989). De esta forma los trabajos de Hliňák y colaboradores (1986) demostraron que la transición de la fase precopulatoria a la copulatoria es un aspecto importante no sólo de la potencia sexual temporal del macho sino también de su potencia sexual permanente, esta transición parece ser clave en la interacción sexual.

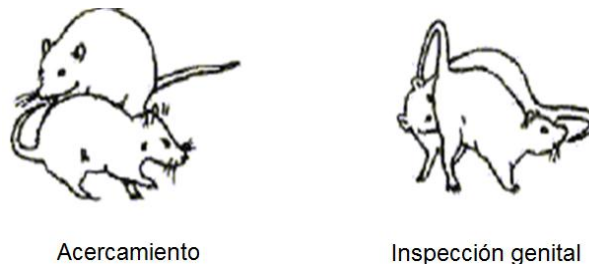


Fig. 2. Conductas precopulatorias las cuales pueden durar desde unos cuantos segundos, minutos o incluso horas dependiendo de la especie y de la experiencia sexual previa. En la rata estas conductas consisten básicamente en el olfateo de la región perineal, la exploración genital y el aseo del compañero.

Las conductas consumatorias o de ejecución consisten de una serie de patrones estereotipados que pueden identificarse fácilmente en: A) monta; en este patrón el macho se posa sobre la parte posterior de la hembra y realiza una serie de movimientos pélvicos, no se presenta inserción peneana y su patrón de desmonta no es estereotipado (Fig., 3). En ocasiones esta conducta puede ir

seguida por el acicalamiento genital (Hull y cols, 2002). La monta está asociada con un aumento en la presión intracavernosa. En la monta la presión intracavernosa es de 35 mmHg (mmHg, unidad de presión arterial) (Giuliano y cols, 1994). B) intromisión, ocurre durante una monta, el pene se inserta en la vagina de la hembra, además de exhibir inicialmente los movimientos propios de la monta, la desmonta difiere por tratarse de un movimiento pélvico intenso, con una duración de 200 a 300 milisegundos (Beyer y cols, 1981) seguido por una brusca retirada (Fig. 3), después de la cual el macho puede lamarse el pene (Hull y cols, 2002). Se ha reportado que el pico de la presión del musculo intracavernoso durante la intromisión es de 700 mmHg y su duración al igual que en la monta es de 3 segundos (Bernabé y cols, 1999) y C) eyaculación; se presenta después de aproximadamente 8-10 intromisiones, se caracteriza por ser intromisiones que terminan en movimientos repetidos de los miembros anteriores (Fig. 3). La penetración es de una duración más larga (750-2000 milisegundos) y la desmonta es muy lenta (Beyer y cols, 1981). La eyaculación es una fuerte expulsión de líquido seminal y espermatozoides desde el cuerpo del macho. La expulsión del esperma generalmente se acompaña por contracciones espasmódicas de la musculatura esquelética, principalmente de los miembros anteriores y posteriores, así como de los músculos estriados de la región perineal, que incluyen al isquiocavernoso, al bulbo esponjoso y al esfínter anal (Holmes y cols, 1991). Después de la eyaculación el patrón de desmonta no es estereotipado y por lo general es seguido de acicalamiento genital (Hull y cols, 2002).

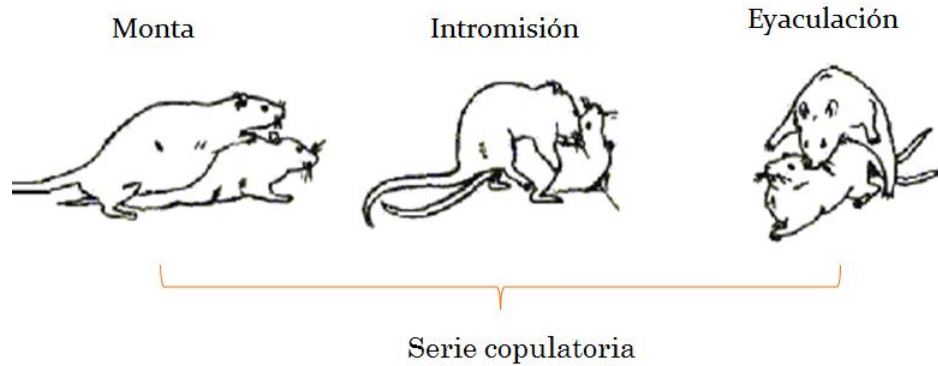


Fig. 3. Conductas consumatorias o de ejecución, la cual consiste en una serie de patrones estereotipados que pueden identificarse fácilmente en: monta, intromisión y eyaculación.

Al conjunto de patrones sexuales que presenta un macho desde que entra en contacto con la hembra en estro (sexualmente receptivas) hasta que eyacula se le denomina serie copulatoria. Después de terminar una serie copulatoria se presenta un intervalo de 4 a 5 minutos en el que el macho no responde a una nueva estimulación sexual, a este periodo se le ha denominado intervalo posteyaculatorio (IPE) (Larsson, 1956). Este comprende dos fases: una larga denominada “periodo refractario absoluto”. En ratas, este dura entre 5-8 minutos después de una primera eyaculación y aumenta con cada eyaculación sucesiva. Este periodo abarca el primer 75% de la duración del IPE, se caracteriza porque el macho no tiene actividad sexual (Sachs y Bialy, 2000) y emite vocalizaciones ultrasónicas a 22kHz (Barfield y Geyer, 1975).

La segunda fase es más corta y corresponde al “periodo refractario relativo”, no es acompañado por vocalizaciones. Durante este tiempo el macho monta a la hembra si esta lo estimula adecuadamente (Beach y Holz-Tucker, 1949; Zucker y Wade, 1968). Después del IPE, las ratas macho reanudan la conducta sexual. Los ratones reanudar su actividad sexual después de 1-24 horas, dependiendo de la cepa, mientras que en los hámsteres tienen un IPE mucho más corto, de unos pocos segundos a 1,5 minutos (Revisado en Burns-Cusato y cols, 2004; Hull y Domínguez, 2007; Meisel y Sachs, 1994). Conforme las series

eyaculatorias van avanzado, la duración de los intervalos posteyaculatorios aumentan y el número de intromisiones disminuye (Rodríguez-Manzo y Fernández Guasti, 1994).

Para que la cópula se lleve a cabo es necesario, que las hembras se encuentren sexualmente receptivas. La receptividad se manifiesta de distintas formas según la especie, pero en todos los casos implica la adopción de una postura que facilita la inserción y permanencia del pene dentro de la vagina y como consecuencia, la eyaculación dentro de ella (Moralí y Beyer, 1979). En la rata se presenta la respuesta de lordosis, la cual consiste en una dorsiflexión de forma que la cabeza y el periné se encuentren elevados y la cola desviada hacia un lado (Blaustein y Erskine, 2002).

Se ha reportado que la experiencia sexual facilita la cópula. Larsson (1956) y posteriormente Dewsbury (1969) demostraron que la experiencia sexual en la rata macho permite que la conducta sexual se despliegue con mayor facilidad y en menor tiempo. Se reportó que la latencia de monta, intromisión y eyaculación disminuyeron con respecto a ratas machos que no tuvieron experiencia previa. Resultados similares se han reportado en ratones (McGill, 1962b), gatos (Michael, 1961), y conejillos de indias (Valenstein y Goy, 1957). Además McGill (1962a) describió que el número de montas dirigidas hacia la cabeza de la hembra disminuyó con la previa experiencia sexual.

La expresión de la conducta sexual masculina es modulada por factores neuronales, hormonales y sistemas de neurotransmisores. Las hormonas y los neurotransmisores actúan principalmente a nivel del sistema nervioso central para controlar la conducta sexual y el sustrato neuronal permite o inhibe la liberación de estos. Por lo anterior en el siguiente capítulo describiré brevemente las estructuras neuronales más importantes en el control de la conducta sexual masculina.

2.3. SISTEMA OLFATORIO

Las diversas especies de mamíferos emplean preferentemente algunos de sus sentidos para poder detectar y elegir a su pareja sexual. Los roedores utilizan con este fin principalmente al sentido del olfato.

El sistema olfatorio es más que un simple receptor de olores, es un activador y sensibilizador de otros sistemas neuronales, sobre todo de aquellos que constituyen el substrato de patrones de conducta emocional (Noback y Demarest, 1975). El sistema olfatorio es importante para la interacción de los roedores con su medio externo. Las señales quimiosensoriales son traducidas en la mucosa olfatoria y en el órgano vomeronasal (OVN) y se transmiten al BO. La importancia de las señales quimiosensoriales varían entre las especies.

Para la expresión de la conducta sexual se requieren de estímulos olfatorios quimiosensoriales sexualmente relevantes, como las feromonas (Keller y cols, 2006), por lo que el sistema olfatorio juega un papel primordial, siendo crucial para la provisión de alimentos, apareamiento, cuidado materno, detención de predadores y muchos otros aspectos del comportamiento social (Valverde, 2003).

Los BO son muy prominentes en los roedores, y son el paso de la información al sistema nervioso central que reciben las aferencias de los receptores olfatorios (localizados en el OVN o en la mucosa olfatoria principal) y procesan la información para poder discriminar los olores. Los BO a su vez envían proyecciones eferentes al resto de las vías neuronales que componen los sistemas olfatorios. Por lo tanto la función de los BO es indispensable para el procesamiento de las señales olfatorias, ya que es el primer relevo por el que pasa la información sensorial olfatoria (García-Cabral, 2008).

En la vía olfatoria se encuentran tres elementos principales: la entrada de las fibras olfatorias, que hacen contacto con las dendritas de las células mitrales y empenachadas del BO, en formaciones especiales denominadas glomérulos

olfatorios; los axones de las células mitrales y empenachadas forman el tracto olfatorio lateral, que se extienden por la parte superficial del núcleo olfatorio lateral, que es la región más anterior de la corteza olfatoria propiamente dicha y, por último, los axones de las células piramidales del núcleo olfatorio lateral que entran a formar parte de la comisura anterior. El BO contiene, además, otras variedades neuronales entre las que cabe destacar los granos, células carentes de axón pero con prolongaciones provistas de numerosas espinas conteniendo vesículas sinápticas, las células periglomerulares con dendritas que se ramifican en el interior de los glomérulos y axones de extensión variable y las variedades de células de axón corto (Fig. 4) (Valverde, 2003).

Así en el BO podemos diferenciar tres capas importantes:

Capa glomerular: en donde existe sinapsis entre los axones de las neuronas receptoras, las dendritas de las células de proyección o mitrales y con las dendritas y axones de las células periglomerulares. Todas estas conexiones están confinadas en una estructura esférica denominada glomérulo, el cual mide entre 50-100 μm de diámetro (Bayle y cols, 1999). La formación de estos glomérulos depende de la llegada de aferencias desde el epitelio (St John y cols, 2003) de las células de proyección (Bulfone y cols, 1998) o de la actividad sensorial (Lin y cols, 2004). Esta organización no solo ocurre en mamíferos sino que en otras especies como es la polilla (*Manduca sexta*) en donde los glomérulos se desarrollan en ausencia de las neuronas de proyección del lóbulo antenal (Oland y Tolbert, 1998).

Capa mitral: esta capa está formada por los cuerpos celulares de las principales células de proyección, células mitrales. Las dendritas principales llegan hasta los glomérulos, donde hacen sinapsis con los axones de las neuronas sensoriales (NSO), estas células mitrales solo tienen una dendrita apical participando así en un solo glomérulo. Los axones de las mitrales proyectan por la parte ventrolateral del telencéfalo formando el tracto olfatorio lateral (Revisado en López-Mascaraque y De Castro, 2002).

Capa granular: esta capa está conformada por interneuronas granulares, las cuales carecen de axón, tiene una dendrita apical la cual hace sinapsis dendrodendríticas con dendritas secundarias de las células mitrales y algunas empenachadas (Revisado en López-Mascaraque y De Castro, 2002). En esta capa se destacan neuronas con forma de estrella y de gran tamaño llamadas células Blanes (Blanes, 1898). A las cuales se les ha atribuido la función de recordar olores (Pressler y Strowbridge, 2006).

Existen dos sistemas neuronales involucrados en el procesamiento olfatorio los cuales están separados anatómicamente: el sistema olfatorio principal (SOP) y el sistema olfatorio accesorio (SOA). Los olores no volátiles como algunas feromonas, que requieren del acercamiento físico por parte del roedor para ser detectados, son procesados principalmente por el SOA. Los olores volátiles, que pueden ser detectados a distancia, y que son muy importantes para la detección de la presencia de un depredador o una pareja sexual son procesados por el SOP (García- Cabral, 2008). Actualmente se ha postulado que en el ratón y en el hurón el BOP interactúa con el BOA en el reconocimiento de pareja (Baum, 2012).

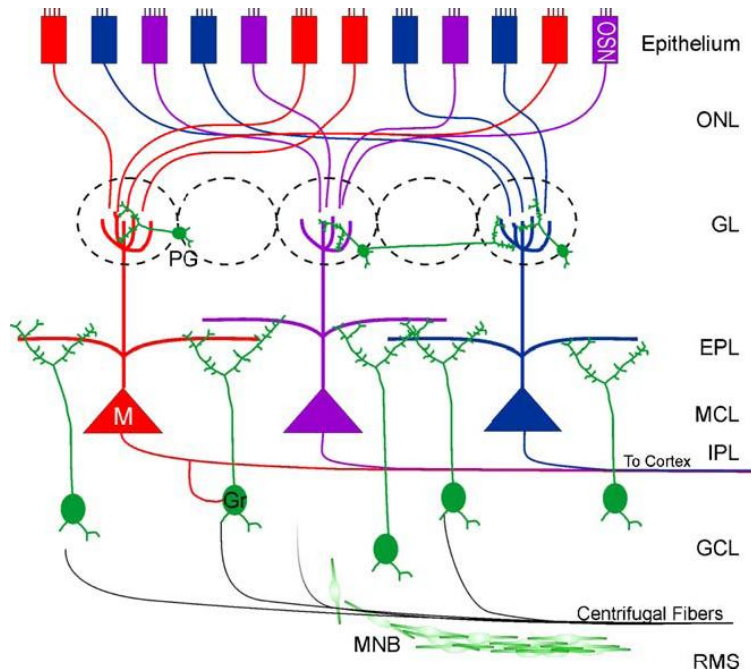


Fig. 4 Esquema de la organización celular del BO. Las subpoblaciones de los axones de las neuronas sensoriales olfatorias se muestran en color rojo, azul y morado. Las neuronas de proyección, células mitrales y empenachadas extienden una única dendrita apical que arboriza en un glomérulo y varias dendritas laterales en el exterior de la capa plexiforme. En los glomérulos, los axones de las OSN hacen sinapsis con las células mitrales así como con las dendritas periglomerulares. La otra población principal de interneuronas son las células granulares, tienen su soma situado en la capa granular y una dendrita espinosa apical que arboriza en la capa plexiforme externa donde se establece sinapsis dendrodendrítica con las células mitrales o empenachadas. BO, bulbo olfatorio; OSN, neuronas sensoriales olfatorias; ONL, capa del nervio olfatorio; GL, capa glomerular; EPL, capa externa plexiforme; MCL, capa de células mitrales; IPL, capa plexiforme interna; GCL, capa de células granulares; RMS vía migratoria rostral; PG, células periglomerulares; M, célula mitral; Gr, células granulares.

2.3.1. Descripción del sistema olfatorio accesorio.

En mamíferos el SOA o sistema de proyección vomeronasal es el principal circuito que detecta las feromonas, las cuales puede desencadenar respuestas fisiológicas y conductuales (Keller y cols, 2006).

El SOA está compuesto por una serie de estructuras: el OVN, el BOA, la amígdala medial (AMG), el núcleo de la cama de la estría terminal (NLET) y área preóptica medial (APM) continúo con el hipotálamo. Éste sistema detecta los olores gracias a sus receptores localizados en el OVN, el cual se ubica

bilateralmente en la parte superior del paladar y es llamado así porque se encuentra recargado en el hueso vómer (Keller y cols, 2006).

El OVN es una formación par, situada en el tabique nasal muy cerca del hueso vómer, en donde se localiza el conducto vomeronasal y está conectado a la nariz y/o cavidad bucal a través de un conducto estrecho (Doving y Trotier, 1998). El epitelio sensorial que contiene a las neuronas sensoriales del vomeronasal (NSVs) se encuentra en el lado medial del órgano, que responden a estímulos después de un contacto físico directo con una fuente de olor. Este mecanismo puede variar entre las especies. En los roedores, como los hámsteres y los ratones, el OVN se encuentra encerrado en una cápsula cartilaginosa (Meredith y O'Connell, 1979).

El SOA se encuentra involucrado en diferentes funciones reproductivas que incluyen la inducción y el mantenimiento de la conducta sexual masculina (Hull y cols, 2002; Portillo y Paredes, 1998), los mecanismos de las feromonas que afectan a la gestación (Bellringer y cols, 1980), el ciclo estral (Ingersoll, 1981) y la conducta materna (Fleming y cols, 1979).

Los estímulos detectados por el OVN son pequeñas moléculas volátiles, y actúan como estímulos para las NSVs in vitro (Leinders-Zufall y cols, 2000). En los roedores, los olores sexualmente relevantes son detectados en los receptores del OVN, el cual a su vez transmite la información hacia el BOA. En estudios utilizando la técnica de resonancia magnética funcional se ha demostrado que en ratones anestesiados la estimulación con orina induce cambios en la actividad neuronal en la región anterior del BOA (Xu y cols, 2005).

Los nervios vomeronasales son los responsables de transportar la información del OVN al BOA. Estos nervios recorren la cavidad nasal, cruzan la lámina cribosa y llegan a la mitad del BOA donde entran formando un ángulo de 90° (Revisado en Alonso y cols, 2006).

Los nervios que se encuentran en el septum entran al cerebro a través de la placa cribiforme, estos continúan a los glomérulos del BOA, localizado en la parte dorsocaudal del BOP. Aquí estas hacen conexión con las dendritas de las células mitrales. Así la primera sinapsis está localizada en los glomérulos. Una característica de las células mitrales del BOA es que elaboran dendritas en forma de penacho, las cuales inervan con múltiples axones de las neuronas sensoriales olfatorias. Las células mitrales del BOA envían proyecciones directamente a la capa del núcleo corticomedia ipsilateral de la amígdala; del complejo amigdalóide las fibras corren por la estría terminal del hipotálamo ventromedial, al área preóptica media, al núcleo premamilar, y al NLET (Fig. 7b) (Halpern y Martínez-Marcos, 2003; Von Campenhausen y Mori, 2000; Doving y Trotier, 1998). A partir de estas regiones, la información del OVN puede acceder directamente a varios núcleos hipotalámicos regulando conductas innatas socio sexuales (Canteras y cols, 1995; Choi y cols, 2005).

El BOA de los machos es de mayor volumen y tiene más células mitrales que el BOA de las hembras (Revisado en Parra y cols, 2009). Las diferentes señales químicas en machos y hembras activan diferentes subpoblaciones de neuronas en la amígdala medial (Choi y cols, 2005). En ratones machos se mostró que las neuronas que responden a las señales químicas de los olores de hembras en la amígdala medial envían información a las áreas del hipotálamo implicados en la cópula. Por el contrario, las neuronas que responden a las señales químicas de olores de machos y que proyectan al hipotálamo se ha reportado que están involucradas en la mediación de la conducta de defensa y agresión. Es importante destacar que las neuronas que responden a olores de machos envían proyecciones a las áreas del hipotálamo controlando la conducta reproductiva (Choi y cols, 2005).

Darle una forma al BOA es complicado pero, como punto de partida, se podría decir que tiene forma cóncava dividida por la mitad, con una superficie externa cóncava y con un eje mayor orientado en sentido antero-posterior.

Anteriormente solo se habían realizado estudios de las proyecciones del BOA globalmente (Scalia y Winans, 1975). Tras la descripción de la heterogeneidad de este sistema se han realizado estudios sobre las proyecciones de la región anterior y posterior; por ejemplo en zarigüeyas, tanto la porción anterior y posterior proyectan hacia a capas superficiales de la amígdala, aunque esta última también proyecta a la amígdala medial (Halpern y Martínez-Marco, 1999).

Las neuronas sensoriales de ratas y ratones poseen cuerpos celulares situados en las capas apical y basal del epitelio sensorial vomeronasal (Jia and Halpern, 1996). Se ha descrito que las neuronas sensoriales que están en la capa apical y basal proyectan a la región anterior y posterior respectivamente del BOA (Fig. 5) (Jia y Halpern, 1996).

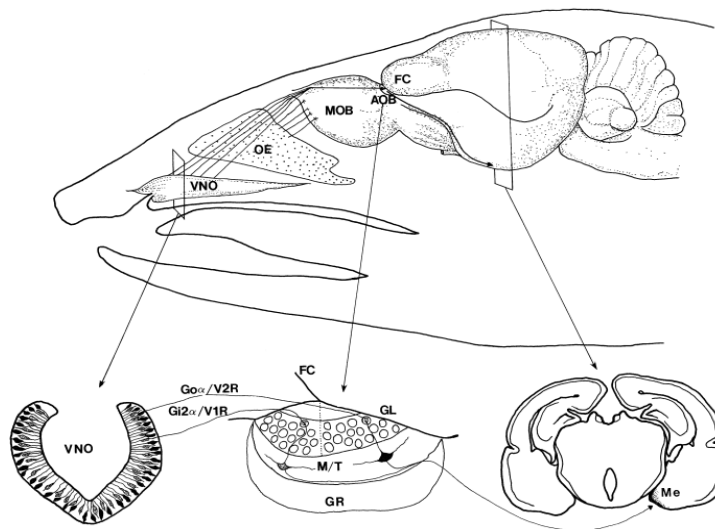


Fig.5 Esquema en donde se muestra el bulbo olfatorio accesorio y las vías de los receptores (V1R, V2R) los cuales proyectan hasta la amígdala. VNO, órgano vomeronasal; OE, epitelio olfatorio; MOB, bulbo olfatorio principal; AOB, bulbo olfatorio accesorio; FC, corteza frontal; GL, capa glomerular; M/T, capa mitral; GR, capa granular; Me, amígdala; $G_{o\alpha}$ - $G_{i2\alpha}$ /V1R-V2R, proteínas/receptores. (Modificado de Martínez-Marco y Halpern, 1999).

Se han descrito dos familias de receptores vomeronasales el V1R y V2R, los cuales están acoplados a proteínas G (G_i las V1R y G_o las V2R). (Halpern y Marcos Martínez, 2003). Las proyecciones de estas dos poblaciones de neuronas

vomeronasales se dirigen al BOA. Las neuronas V1R proyectan al BOA anterior y las V2R al BOA posterior (Stowers y cols, 2002). Las proyecciones de la parte posterior, acaban en capas profundas de la amígdala anterodorsal y de la amígdala medial anterior (Von Campenhausen y Mori, 2000).

Este acomodo del BOA sugiere, que estas subdivisiones funcionales están involucradas en el procesamiento de la información de feromonas relacionadas con la conducta especie-específica. Por ejemplo, en ratones machos, la presencia de una hembra en diestro activa la región anterior del BOA (Kumar y cols, 1999), mientras que la conducta agresiva así como la exposición de olores volátiles de una hembra en estro activan la región posterior del BOA. Mientras que en la hembra la exposición a la orina de un macho activa la región posterior del BOA (Brennan y cols, 1999; Kumar y cols, 1999; Yoshikage y cols, 2007).

Nunez-Parra y colaboradores (2011) reportaron que la neurogénesis puede ser diferencialmente modulada a través de la región anterior-posterior del BOA dependiendo del tipo de estímulo social. La conducta agresiva en machos, utilizando el paradigma residente-intruso, significativamente incrementa la neurogénesis en el BOA en la región anterior en el sujeto intruso. En contraste, las hembras que fueron expuestas a orinas de machos incrementaron la neurogénesis en el BOA región posterior (Nunez-Parra y cols, 2011).

2.3.2. Órgano vomeronasal

El OVN es una estructura quimiorreceptora fusiforme que se encuentra bilateralmente localizado en la parte más ventral del septum nasal. Es regulado desde el nacimiento por los esteroides gonadales y el mantenimiento de su morfología depende de secreción de hormonas durante la edad adulta (Segovia y Guillamon, 1982). La interacción de las feromonas con el epitelio neurosensorial vomeronasal modifica la secreción de hormonas esteroides, las cuales influyen en

la pubertad, el ciclo estral, la gestación, la conducta materna, la conducta sexual masculina y femenina (Fleming y cols, 1979).

Se ha demostrado que los valores del volumen total del OVN (volumen del neuroepitelio y el número de receptores olfatorios) son mayores en machos que en hembras. Diversos estudios realizados proponen que durante el desarrollo temprano, el OVN pasa por un proceso de diferenciación sexual que depende de hormonas sexuales, y la estructura de éste se mantiene durante la vida adulta por los niveles de esteroides sexuales (Segovia y Guillamón, 1982; 1999).

El sistema vomeronasal juega un papel importante en la conducta social incluyendo el apareamiento y la agresión (Bean, 1982b; Clancy y cols, 1984; Stwowers y cols, 2002).

La importancia del OVN en el control de la conducta sexual masculina se ha estudiado mediante técnicas de lesión. De esta forma, en estudios en los que se remueve el OVN a ratas macho sexualmente expertas se observa un incremento en la latencia de intromisión, así como una disminución en la tasa de intromisiones. Fuera de estas alteraciones, todos los machos que han copulado son capaces de eyacular (Saito y Moltz, 1986). En el macho hámster la remoción del OVN genera un déficit en la conducta sexual en animales sexualmente inexpertos (Ballard y Wood, 2007; Powers y Winans, 1975). Por otro lado en el ratón y en el ratón de campo, las lesiones del OVN disminuyen la conducta sexual y la agresión (Clancy y cols, 1984). Después de retirar el OVN en el Lemur gris (*Microcebus murinus*), un pequeño primate originario de Madagascar, se demostró una reducción en la intensidad de montas y en las investigaciones anogenitales (Aujard, 1997). La eliminación de la OVN bloquea la preferencia por los olores de orina de hembras sexualmente receptivas, pero no afecta la atracción sexual por el sexo opuesto (Pankevich y cols, 2004). Tabla 1.

Tabla 1. Efecto de lesiones en el OVN en el macho roedor.

Efectos de la lesión vomeronasal en machos de roedor			
Lesión	Especie	Respuesta eliminada o disminuida	Autores
OVN	Ratón	Aumento de testosterona producido por hembras o su orina	Wysocki y cols, 1983
OVN	Ratón	Vocalizaciones de 70 kHz a hembras o su orina	Nyby y cols, 1978 * Bean, 1982
OVN	Ratón	Comportamiento sexual	Bean y Wysocki, 1985 # Clancy y cols, 1984a Wysocki y Lepri, 1991*
OVN	Ratón	Preferencia por olores no volátiles de hembra. Sin efecto en comportamiento sexual (hembras o machos)	Pankevich y cols, 2004
OVN	Ratón	Marcaje territorial en presencia de señales de macho o de la hembra	Maruniak y cols, 1986
OVN	Ratón	Agresión a machos intrusos	Bean, 1982 Clancy y cols, 1984a Maruniak y cols, 1986
OVN	Cobayo	Investigación de orina de hembras preferente a la de machos	Beauchamp y cols, 1982* Beauchamp y cols, 1985*
OVN	Hámster	Discriminación de olores de individuos	Johnston y Peg, 2000
OVN	Hámster	Comportamiento sexual	Meredith, 1986*

Las lesiones se realizaron el primer día de vida.

*el efecto depende de la experiencia previa.

Adicionalmente, el sistema vomeronasal tiene conexiones directas con estructuras del sistema límbico como el tálamo, el hipotálamo y la amígdala; que son importantes para el desarrollo y expresión de conductas sociales, parentales, neonatales, territoriales y agresivas (Scalia y Winans, 1976).

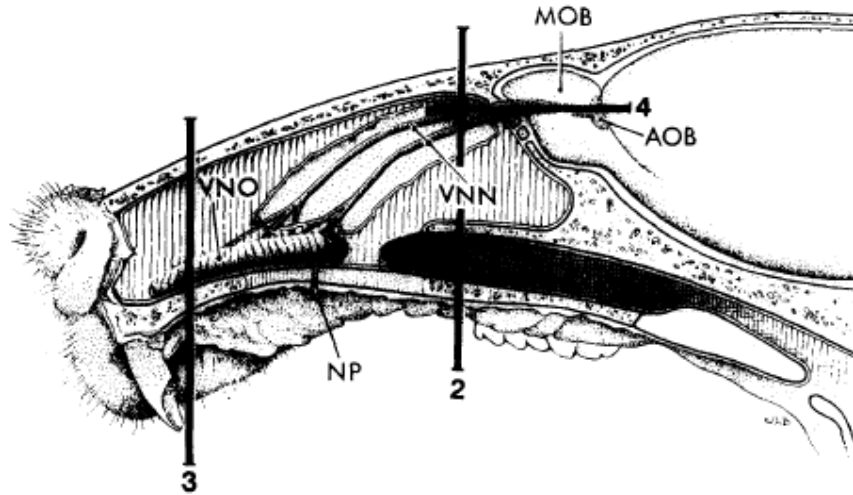


Fig. 6 Esquema de corte sagital de la cabeza de un hámster que muestra el órgano vomeronasal (VNO). El nervio vomeronasal (VNN) está constituido por los axones de las neuronas del epitelio del órgano vomeronasal, se dirige a la porción medial del bulbo olfatorio principal (MOB) y finalmente llega al bulbo accesorio (AOB) (Modificado de Winans y Powers, 1977).

2.3.3. Sistema olfatorio principal

El sistema olfatorio principal (SOP) detecta señales quimiosensoriales complejas. Las claves olfatorias volátiles son reconocidas por receptores localizados en neuronas del epitelio olfatorio principal localizado en la cavidad nasal. Estas neuronas reconocen las moléculas a través de los compuestos químicos y las traducen a señales eléctricas, las cuales son enviadas a través del nervio olfatorio hacia el BOP. Al recibir la información química en los receptores, hay proyecciones que son enviadas a los glomérulos del BOP (Kellers y cols, 2006), los cuales transmiten la información a las células mitrales y éstas a su vez a las granulares (Fig. 4) dándose una retroalimentación interna en el BO (García-Cabral, 2008).

La información sigue un circuito neural diferente al del SOA, ya que después del BOP la señal es enviada hacia regiones corticales como el núcleo olfatorio anterior, el tubérculo olfatorio, la corteza piriforme y la corteza entorinal, y es hasta después que la información llega a algunos núcleos de la amígdala y es

Se ha postulado que la experiencia sexual facilita la activación de los circuitos neuronales que la controlan. Por ejemplo, es muy claro que conforme el macho adquiere experiencia sexual la cantidad de estímulos necesarios para que el macho eyacule se acortan (Pfeiffer y Johnston, 1994). De la misma manera, en machos sexualmente inexpertos la lesión de las estructuras que conforman al sistema de proyección vomeronasal tiene efectos más dramáticos en la alteración de la conducta sexual que en los machos expertos (Ballard y Wood, 2007). Por otro lado la conducta sexual en hámster inexpertos es eliminada por completo cuando se realiza una bulbectomía (Hull y cols, 2006). En ratas machos la bulbectomía lateral aumenta la latencia de intromisión y eyaculación (Edwards y cols, 1990).

Bergvall y colaboradores en 1991 reportaron que la anosmia periférica reduce la conducta sexual en la rata macho. La inducción de la anosmia degenera las neuronas del BO. Por otro lado se ha reportado que la remoción de los BO en machos sexualmente expertos, no altera la expresión de la conducta sexual (revisado en Hull y cols, 2002). Se ha postulado que la experiencia sexual puede inducir cambios plásticos a nivel del sistema nervioso central que conllevan a una facilitación de esta conducta.

Entre los cambios plásticos que se han propuesto, destacan incrementos en las conexiones sinápticas, en las arborizaciones dendríticas y cambios a nivel de receptores a hormonas y neurotransmisores. Recientemente se ha explorado la posibilidad de cambios plásticos involucrados con la generación de células nuevas (neurogénesis). Nuestro grupo de investigación está interesado en evaluar esta posibilidad. En el siguiente capítulo describiré el proceso de neurogénesis y su posible participación como un mecanismo plástico en la modulación de la conducta sexual masculina.

2.4. NEUROGENESIS.

El cerebro es capaz de presentar cambios, ya sean estructurales y/o funcionales a nivel del sistema nervioso, y éstos ocurren durante la maduración, el aprendizaje, las modificaciones ambientales y patológicas (Lledo y cols, 2006), estos cambios están dados por la plasticidad neuronal (Gheusi y Lledo, 2007). Esta plasticidad se ha observado en varios niveles de la organización neuronal, tales como: dendrogénesis, espinogénesis, morfogénesis, neurogénesis, vesículas sinápticas, entre otros (Kolb, 1995).

La neurogénesis se define como la constante generación de neuronas. Ramón y Cajal rompió el paradigma que durante muchos años se postuló: que cada uno de nosotros se moría con el mismo número de células con el que nacía (Ramón y Cajal, 1913).

Actualmente se ha demostrado que el cerebro es capaz de generar neuronas nuevas (Revisado en Whitman y Greer, 2009).

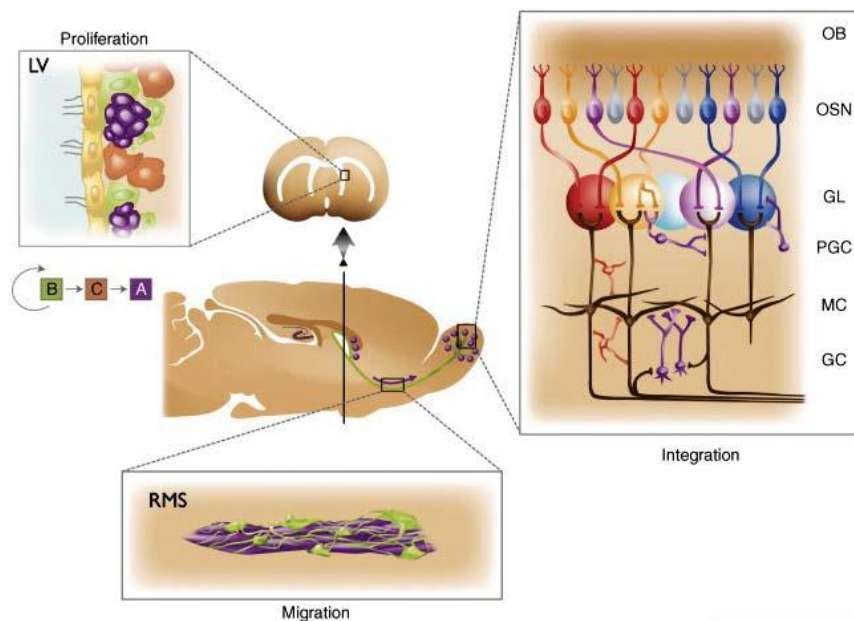


Fig. 8 Zona Subventricular (ZSV) y ruta al bulbo olfatorio (BO). Representación de un corte sagital del ratón donde se muestra una de las áreas neurogénicas en el cerebro adulto, el BO ubicado en el centro de la figura. La flecha indica la migración tangencial de los neuroblastos (puntos

morados) hacia el BO. Las nuevas neuronas reclutadas reemplazan continuamente a las interneuronas locales. El panel a la derecha muestra las conexiones nerviosas dentro del BO. La actividad de las neuronas de proyección en el OB tiene lugar a través de dos poblaciones de interneuronas: las periglomerulares (PGC) y las granulares (GC) (ambas en morado) y células de axón corto (en rojo). El panel de la izquierda muestra el nicho neurogénico. La proliferación tiene lugar en las paredes del ventrículo lateral (LV), en donde las células madre (en verde, células tipo B) se dividen para generar las células que se amplifican transitoriamente (en marrón, tipo C), que a su vez dan origen a los neuroblastos (en morado, células tipo A) que son los que migran en la corriente migratoria rostral (RMS en el panel inferior) hasta su destino final en el OB, donde se diferencian en interneuronas (Modificado de Arias 2007).

Este proceso se lleva a cabo en el sistema nervioso de los organismos durante el desarrollo (Ming y Song, 2005), la etapa juvenil y en el adulto (Gould, 2007). La capacidad de generación de neuronas nuevas en un organismo adulto, representa la posibilidad de que éste constante remplazo sea un mecanismo para el mantenimiento y adaptación del organismo, a los continuos cambios que le rodean como un elemento de reparación de daño neuronal, para mejorar la realización de alguna tarea o aprendizaje impuestos por el medio ambiente o el estado interno del organismo (Lledo y cols, 2006; Gould y Gross 2002).

Los primeros informes de la neurogénesis en el adulto del sistema nervioso central (SNC) fueron ignorados, debido a la imposibilidad de determinar con certeza la naturaleza neuronal de las células (Levi, 1898). Los trabajos de Altman (1962), seguido por los estudios de Kaplan y Hinds (1977), han propuesto evidencias convincentes, de que las neuronas nuevas se agregan en regiones del cerebro adulto: como son el BO y el giro dentado del hipocampo, también se han encontrado indicios de formación de neuronas nuevas en algunas otras regiones como la neocorteza, el estriado, la corteza piriforme, la amígdala, el hipotálamo, la sustancia nigra y el núcleo del vago (Gould, 2007).

Las primeras evidencias de neurogénesis en el cerebro adulto de mamíferos fueron demostradas por el grupo de Altman, con el uso de la técnica de autorradiografía por timidina-[H3], la cual consistía en la incorporación de la

timidina-[H3] a las células que se encontraran en la fase de síntesis de DNA en el proceso de mitosis (Altman, 1963).

Aunque estos primeros reportes eran claros y descriptivos, no fue sino hasta 1984 que surge la primera evidencia contundente que da credibilidad y aceptación dentro de la comunidad científica de que hay formación de neuronas nuevas funcionales (Lledo y cols, 2006; Gould y Gross, 2002). Gracias a los resultados de un estudio conjunto de neuroanatomía, autoradiografía y electrofisiología en canarios, se demostró que estas neuronas eran capaces de integrarse a circuitos preexistente en el cerebro adulto (Paton y Nottebohm, 1984).

Estas primeras descripciones en canarios demostraron que se generaban por día hasta el 1.5% de las neuronas, marcadas con [3H] timidina, en el centro vocal superior (CVS) de los machos (Goldman y Nottebohm, 1983). El CVS es parte de una serie de núcleos cerebrales interconectados que controlan el aprendizaje y la producción del canto (Brenowitz, 1997).

En estas regiones la integración de las neuronas nuevas permite la posibilidad de que el cerebro pueda presentar cambios, arreglos o renovaciones funcionales y estructurales en sus circuitos neuronales. De hecho, la renovación celular no es meramente restaurativa, sino que constituye una respuesta adaptativa a los retos (Lledo y cols, 2006; Gould, 2002).

En el sistema olfatorio, las neuronas receptoras del epitelio olfatorio son generadas continuamente durante toda la vida del individuo. Con un periodo de vida media de unas 4 a 8 semanas, son reemplazadas por neuronas nuevas que se originan de precursores epiteliales, denominadas células basales, localizadas en la parte profunda del neuroepitelio olfatorio. Los axones de las neuronas nuevas del epitelio olfatorio son capaces de crecer hasta alcanzar el BO y establecer nuevos contactos funcionales con las dendritas de las células mitrales y empenachadas en el glomérulo olfatorio (Halpern y cols, 1995). Esta permisividad

para el crecimiento axonal y establecimiento de nuevas conexiones está dada por la presencia de un tipo especial de macroglia, la glía envolvente, únicamente presente en los nervios olfatorios, en la capa de fibras olfatorias y glomérulos del bulbo olfatorio (Valverde, 2003).

La glía envolvente procede de la placoda olfatoria durante el desarrollo y su función principal es envolver grupos de axones olfatorios, de tal forma que previenen el contacto con otros tipos de glía central y la exposición a moléculas inhibitorias, por lo que se ha sugerido que esta variedad de neuroglia sería responsable de la plasticidad y regeneración en el BO adulto (Valverde, 2003).

En el adulto, la glía envolvente presenta un fenotipo claramente diferenciado. Existen ciertas propiedades en común con las células de Schwann, glía astrocitaria y glía radial, pero la glía envolvente no pertenece a ninguna de estas familias. La glía envolvente exhibe ciertas moléculas implicadas en la adhesión celular y el crecimiento axonal, tales como L1 (La molécula L1 de adhesión de célula neural se manifiesta predominantemente durante el desarrollo de las células de Schwann y las neuronas; está implicada en la adherencia celular, migración neuronal, crecimiento y evolución axonal y la mielinización), laminina (es una gran molécula glicoproteica sulfatada con un 15% de hidrato de carbono, influye en la forma y función celular, su función es la de anclar las células epiteliales a la lámina densa) y N-CAM (moléculas de adhesión celular neural), expresadas precisamente en los puntos de contacto con los axones olfatorios (Valverde, 2003).

Durante el desarrollo embrionario, la glía envolvente participa de forma activa en la división de fibras olfatorias y su contacto con las dendritas de las células principales del BO, por lo que su papel en la formación de los glomérulos parece ser fundamental (Valverde, 2003).

2.4.1. Proceso de neurogénesis en el BO

La ZSV se desarrolla a partir de progenitores de la eminencia ganglionar lateral (EGL) (Bayer y cols, 1994), esta estructura es una de las principales capas germinales durante la embriogénesis, dando lugar a la mayoría de las neuronas y células gliales en el cerebro anterior, incluyendo a los astrocitos (Doetsch y col, 1999), las células endimales multiciliadas (Johansson y cols, 1999) y las células subendimales (Morshead y cols, 1994).

Hasta hace poco, se creía que la zona de germinación en el adulto se limitaba a la pared del ventrículo lateral hacia el cuerpo estriado (pared lateral) en la que se observa la proliferación postnatal. Sin embargo, la vía migratoria rostral (VMR) y parte de la pared lateral del ventrículo hacia el septum, o el cuerpo calloso o palio, contienen células proliferantes que actúan como células madre *in vitro* (Doetsch y cols, 1999; Gritti y cols, 2002) e *in vivo* (Merkle y cols, 2007), por lo que en conjunto estas regiones pueden ser consideradas como zonas de proliferación.

Las neuronas nuevas que son incorporadas en el BO son generadas en la ZSV y VMR de donde migran indiferenciadas a través de la VMR hacia el BO donde se diferencian y se integran a los circuitos neuronales (Petreanu y Alvarez-Buylla, 2002). La ZSV es una capa vestigial que está organizada como una red de cadenas de precursores neuronales y gliales que se extienden por las paredes laterales de los ventrículos laterales en el adulto. La ZSV consta de cuatro tipos de células: las células endimarias que se encuentran en las paredes de los ventrículos laterales, las células precursoras con capacidad proliferativa, los astrocitos y las neuronas migratorias jóvenes (Alvarez-Buylla y García-Verdugo, 2002).

Las células que se generan continuamente en la ZSV, principalmente en la región anterior, migran en dirección rostral una distancia aproximadamente de 5 a 8 mm a través de la VMR hasta finalmente llegar al BO (Doetsch y Alvarez

Buylla, 1996) donde se diferencian alrededor del 95% en células granulares (Lledo y Saghatelyan, 2005). La minoría se diferencian en células periglomerulares (Bagley y cols, 2007; Brill y cols, 2008).

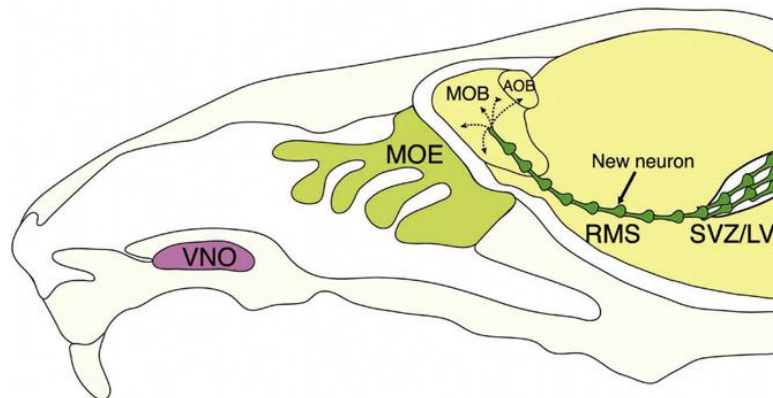


Fig. 9 Neurogénesis en el sistema olfatorio de un animal adulto. Las neuronas nacidas en la zona subventricular (SVZ) del ventrículo lateral (LV) migran por la vía migratoria rostral (RMS) hasta el bulbo olfatorio, y se integran en el bulbo olfatorio principal (MOB) y el bulbo olfatorio accesorio (AOB). Epitelio olfatorio principal (MOE); órgano vomeronasal (VNO) (Tomado de Kageyama y cols, 2011).

En el sistema olfatorio, la migración de las neuronas nuevas es extensa, primero migran tangencialmente a través de la pared del ventrículo lateral, ayudadas de células gliales, en especial de células endoteliales. Cuando salen de la ZSV, comienzan a desplazarse tangencialmente por la VMR y se mantienen unidas gracias a los astrocitos que forman la vía (Fig. 10). La migración a través de la VMR es un proceso único llamado migración en cadena en la cual los neuroblastos migran unidos en una estructura de tubo formada por células gliales (Gheusi y Lledo, 2007). Más de 30,000 neuroblastos salen diariamente de la ZSV por la VMR (Revisado en Alvarez- Buylla y cols, 2001).

Las células provenientes de la VMR se integran en las diferentes capas que constituyen al BO, tanto el principal como el accesorio (Fig. 10). Estas células se integran a los circuitos olfatorios previamente establecidos y se relacionan con

la inducción, facilitación, y la generación de circuitos olfatorios nuevos estimulados por alguna conducta como la elección de la comida o la selección de la pareja (Gheusi y Lledo, 2007). El presente trabajo nos enfocaremos a la neurogénesis en el BO por la relevancia que esta estructura tiene en la conducta sexual.

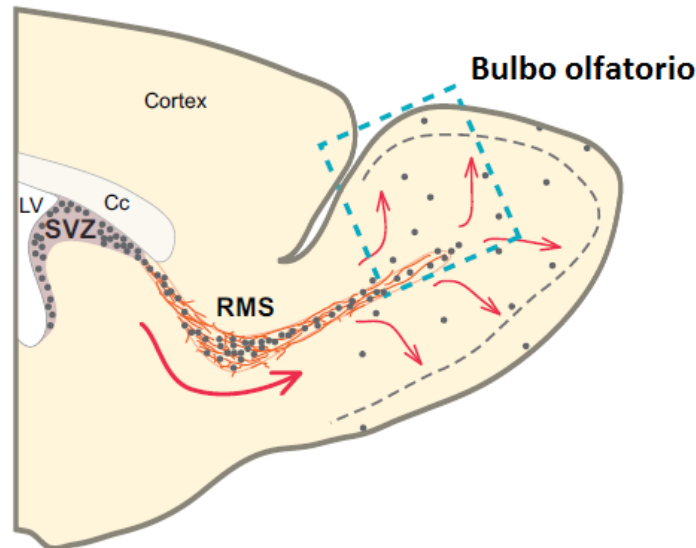


Fig. 10 Proceso de neurogénesis en el BO. Se ilustra la migración tangencial de las células nuevas por la vía migratoria rostral (RMS), desde su lugar de generación: Zona Subventricular (SVZ); Vía Migratoria Rostral (RMS). En el BO, migran radialmente y se integran en la red neuronal ya existente. LV: ventrículo lateral; Cc: cuerpo calloso.

2.4.2. Neurogénesis y conducta sexual masculina

Como ya se mencionó, las primeras observaciones de neurogénesis en el adulto se describieron en los canarios. Los machos de esta especie modifican su canto a lo largo del año. En la primavera (cuando inicia la época reproductiva), cantan frecuentemente y producen un canto diferente para llamar la atención de la pareja y así iniciar la reproducción. Al final de la etapa reproductiva los machos cantan con menor frecuencia (Nottebohm, Nottebohm y cols, 1987). Se ha reportado que en América del Norte en el mes de enero los canarios presentan cantos plásticos o variables, pero en los meses de octubre y noviembre tienen un canto estereotipado, el cual coincide con la época reproductiva (Nottebohm y Nottebohm, 1978; Nottebohm y cols, 1986).

En canarios, se realizaron las primeras descripciones neuroanatómicas en donde demostraban que había formación de células nuevas y que algunas de éstas células eran neuronas (Nottebohm y Arnold, 1976; Nottebohm, Nottebohm y cols, 1987; Nottebohm, 1989; Nottebohm y O'Loughlin, 1994).

Estas primeras descripciones en canarios demostraron que se generaban por día hasta el 1.5% de las neuronas, marcadas con [3H] timidina, en el centro vocal superior (CVS) de los machos (Goldman y Nottebohm, 1983).

Los niveles hormonales también varían según la estación del año, se ha reportado que los niveles de testosterona son más altos en abril y mayo, cuando los pájaros tienen cantos variados que en septiembre y octubre cuando no lo hacen (Nottebohm y cols, 1987). De igual manera, se ha descrito la presencia de receptores a andrógenos y estrógenos en el CVS, por lo que la sobrevivencia neuronal durante el desarrollo está regulada por estas hormonas (Arnold, 1992).

Otro factor que favorece la generación de neuronas nuevas en el CVS es la presencia de una hembra (Arnold, 1992). En el CVS de machos que cohabitaron en la misma jaula con una hembra, se reporta un incremento en el volumen y número de células positivas a doblecortina (marcador de microtúbulos requeridos para la migración en neuronas post mitóticas) en comparación a los machos enjaulados con otro sujeto de su mismo sexo (Balthazart y cols, 2008).

En mamíferos, varios grupos de investigación han demostrado que los estímulos olfatorios incluyendo los sexualmente relevantes pueden influir en la neurogénesis del BO (Taupin, 2005). Por ejemplo en ratones hembras la exposición a olores de machos dominantes estimula la proliferación neuronal en la ZSV y el giro dentado, este efecto no se observa si las hembras son expuestas a olores de ratones machos subordinados, machos gonadectomizados u olores sexualmente no relevantes como coco o almendra (Mark, 2007). Se ha reportado que la sobrevivencia de las células nuevas en hembras es favorecida después de

la exposición a olores sexualmente relevantes y existe un incremento del 38% de neuronas nuevas en el BO y un incremento del 47% en el giro dentado 4 semanas después de la exposición a olores de machos sexualmente dominantes (Mark y cols, 2007).

En hámster machos, Huang y Bittman (2002) evaluaron si las células nuevas que llegan al BO pueden incorporarse a circuitos neuronales preexistentes y activarse durante la ejecución de la conducta sexual. En sus experimentos administraron el marcador BrdU a machos 10 días, 3 y 7 semanas antes de copular con una hembra sexualmente receptiva. Los investigadores cuantificaron en el BO el número de células nuevas (BrdU positivas) y las que se activaron durante la cópula (mediante la detección de genes de respuesta temprana como c-Fos, células c-Fos positivas).

Los autores también demostraron que en hámster macho llegan células nuevas en el BOP y BOA y estas se activaban después de la exposición a olores sexualmente relevantes como son el de una hembra en estro anestesiada, secreciones vaginales de una hembra o inclusive el de un macho agresivo, siendo el estímulo de la hembra en estro el más efectivo. Estos resultados sugieren que las células nuevas del BO del adulto pueden integrarse y ser funcionales en un circuito social y sexual en el hámster machos.

En estudios más recientes se ha encontrado que la experiencia sexual aguda aumenta el número de neuronas nuevas en el giro dentado del hipocampo; sin embargo con la experiencia sexual crónica se estimula la proliferación celular, la neurogénesis adulta y el crecimiento de las espinas dendríticas (Leuner y cols, 2010). La exposición aguda a la olor de un depredador trimetiltiazolina (TMT) induce comportamiento defensivo en la rata macho, y esta respuesta se asocia con una disminución en la proliferación celular en el giro dentado del hipocampo. La experiencia sexual parece ser un factor de protección, ya que ejerce efectos de tipo ansiolítico. Se ha demostrado que la experiencia sexual reduce la duración de

posturas de defensa. Además, TMT induce un aumento significativo en la proliferación celular en el giro dentado, pero sólo en los machos con experiencia sexual. Esto demuestra que existe una influencia en la experiencia socio-sexual en la magnitud de la conducta y respuesta neuronal a estrés por olores de depredadores (Spritzer y cols 2009).

Antzoulatos y colaboradores (2008) evaluaron si la testosterona, la estimulación recibida o ambas, durante la conducta sexual promueven la proliferación celular y la sobrevivencia de células nuevas en la amígdala y el área preóptica medial. Realizaron dos experimentos, en el primero compararon el número de células positivas a BrdU en hámsteres machos castrados e intactos gonadalmente a las 24 horas y 7 días después de la administración de BrdU. Encontraron que en la amígdala posterior medial la testosterona exógena estimuló la proliferación celular a las 24 horas y no observaron ningún efecto en el área preóptica media. A las siete semanas la testosterona no tuvo ningún efecto ya que en ambas regiones se observaron escasas células. En el segundo experimento, machos con experiencia sexual fueron probados con hembras receptivas cada semana para determinar si la activación neuronal facilita la sobrevivencia de células nuevas 7 semanas después de la inyección de BrdU en las zonas antes mencionadas. No encontraron diferencias significativas en la sobrevivencia celular en ninguna de las 2 áreas.

Actualmente se ha reportado que la ejecución de la conducta sexual incrementa la neurogénesis. Nuestro grupo de investigación ha demostrado que cuando las ratas machos copulan regulando la interacción sexual se observa un incremento en el número de células nuevas que se incorporan a la capa granular del BOA 15 días después de realizada la conducta (Portillo, 2012). También se demostró que aproximadamente el 40% de estas células se diferencian en neuronas. Ni en el grupo de machos que fueron expuestos a hembras receptivas ni el grupo de los machos que no regulan la interacción sexual y eyaculan en promedio 2.6 veces no se observa un incremento en el número de células nuevas;

así la estimulación genital parece ser fundamental para favorecer la neurogénesis en la capa granular del BOA en la rata macho adulta (Portillo, 2012).

El objetivo de este proyecto fue determinar si la ejecución de la conducta sexual, modula la neurogénesis en el BO de la rata macho adulta 45 días después. Además pretendí diseccionar los efectos de diferentes tipos de estimulación sexual como la exposición a olores sexualmente relevantes, una y tres eyaculaciones y cópula en la cual el macho no controla la frecuencia de la interacción sexual.

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

3.1. HIPÓTESIS

Mediante el uso de un modelo experimental de ratas machos, con previa experiencia sexual, se propone que:

- ❖ El mantener el control de la ejecución de la conducta sexual masculina favorecerá la supervivencia de las neuronas nuevas en el BOP y BOA de la rata adulta.

3.2. OBJETIVO GENERAL.

- ❖ Evaluar si la conducta sexual favorece la supervivencia de neuronas nuevas en el BOP y BOA de la rata macho adulta y si estas neuronas nuevas se activan durante la ejecución de la conducta sexual.

3.3. OBJETIVOS PARTICULARES.

- ❖ Evaluar si el mantener el control de la interacción sexual incrementa el número de neuronas nuevas en el BO de la rata macho.
- ❖ Determinar si el mantener el control de la interacción sexual y si la estimulación sexual generada por una eyaculación difieren en el número de células nuevas en el BOP y BOA con respecto a la generada con tres eyaculaciones.
- ❖ Determinar si la cópula no regulada influye en el número de células nuevas en el BOP y BOA de la rata macho adulta.
- ❖ Determinar si la exposición a una hembra incrementa el número de células nuevas en el BOP y BOA de ratas macho adultas.

IV.MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. TÉCNICA

4.1.1. Herramientas experimentales en el estudio de proliferación celular y neurogénesis.

En 1990 la administración de 5-Bromo-2-deoxyridina (BrdU) se introdujo como una técnica para evaluar el estudio de la proliferación celular en el desarrollo del sistema nervioso (Gould y Gross, 2002). El BrdU es una halopirimidina análoga de la timidina (anillo de desoxirribosa unido a la base pirimidínica timina) que se incorpora a las células en división durante la fase S del ciclo celular y es utilizado para el marcaje del nacimiento celular, monitoreo y proliferación, ya que es un indicador de síntesis de ADN (Gratzner, 1982) (Fig. 11).

El BrdU puede revelarse por medio de la técnica de inmunohistoquímica utilizando anticuerpos dirigidos contra el BrdU que se ha adherido a una región específica del ADN donde ya se ha incorporado el análogo a la timidina. Éste ha sido el marcador principal de células mitóticas en estudios de neurogénesis en adulto, ya que es una técnica rápida y simple de usar (Revisado en Kempermann, 2006).

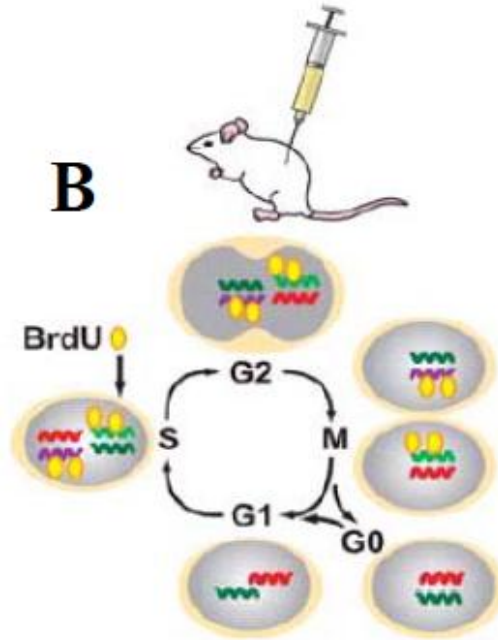


Fig. 11 Esquema de la unión del marcado exógeno BrdU al ADN en la fase S (de síntesis) del ciclo celular. (Modificada de Ming y Song, 2005).

4.2. SUJETOS.

Se utilizaron ratas *Wistar* machos entre 250-350 gr de peso. Los animales estímulo fueron hembras de la misma cepa las cuales fueron ovariectomizadas, para mantenerlas sexualmente receptivas se les administró benzoato estradiol 25 µg/rata 48 antes del tratamiento con 1mg de progesterona de 4-6 horas antes de las pruebas conductuales. El agua y el alimento fue *ad-libitum* y los animales se mantuvieron en ciclo de luz-oscuridad invertido. Los machos que conformaran los grupos que copularon (cópula regulada por la hembra, 1 eyaculación y 3 eyaculaciones) realizaron un entrenamiento el cual consistió de tres pruebas de conducta sexual hasta eyacular con hembras receptivas.

4.3. DISEÑO EXPERIMENTAL.

Se obtuvo un grupo de 40 machos los cuales se dividieron aleatoriamente en los grupos experimentales y control (Fig. 12). Para las pruebas conductuales en un inicio se obtuvieron 10 machos y se tomaron aleatoriamente 8 sujetos.

Grupo control.

Las ratas de este grupo no tuvieron contacto con ninguna hembra. Los machos fueron colocados en la caja de cópula durante 60 minutos la cual permaneció libre de olores; el aserrín que se utilizó para esta prueba fue estéril y limpio. El día del sacrificio (día 45), los machos realizaron la misma tarea conductual y se sacrificaron 30min después de la prueba.

Grupo I. Exposición a una hembra receptiva (EO).

Las ratas de este grupo permanecieron, durante 60 minutos, en la caja de cópula dividida en dos compartimentos por una lámina de acrílico. Esta separación tiene orificios de 1cm de diámetro, lo cual permitió que el macho estuviera expuesto a los olores, sonidos y estimulación visual de una hembra sexualmente receptiva, pero no que exista contacto físico entre ellos. El día del sacrificio (día 45) se realizó la misma conducta y se sacrificaron 30min después de la prueba.

Grupo II. Cópula regulada por la hembra (CRh).

Los machos se colocaron en la caja de cópula con una división que genera dos compartimentos. Esta división posee un orificio de 7 cm de altura y 4cm de ancho, el cual únicamente pudo ser atravesado por las hembras al tener un tamaño menor que el macho. Esto permitió a la hembra regular la interacción sexual. Las ratas permanecieron en la caja durante 60 minutos. El día del sacrificio (día 45) se realizó la misma conducta y se sacrificaron 30min después de la prueba.

Grupo III. Cópula regulada por el macho hasta eyacular una vez (CRm1).

A los machos se les permitió regular la interacción sexual. La prueba finalizó cuando el macho eyaculó una vez. El día del sacrificio (día 45) se realizó la misma conducta y se sacrificaron 30min después de la prueba.

Grupo IV. Cópula regulada por el macho hasta eyacular tres veces (CRm3).

Los machos copularon libremente con las hembras sexualmente receptivas. La prueba terminó cuando el macho eyaculó tres veces. El día del sacrificio (día 45) se realizó la misma conducta y se sacrificaron 30min después de la prueba.



Fig. 12 Fotografías de los grupos experimentales. A) grupo control; donde los machos no tuvieron contacto hembras por 60 min; B) grupo exposición, en la caja se observa la división con orificios en donde el macho solo puede ver, oler y escuchar a la hembra sexualmente receptiva; C) grupo de cópula regulada por la hembra, se observa una división con un orificio por donde la hembra puede moverse de un compartimento a otro; de esta forma el macho no controla la interacción sexual D) grupos de cópula regulada por el macho, la caja no tiene divisiones de esta forma la rata macho regula las interacciones sexuales.

4.3.1. Prueba de conducta sexual masculina.

Las pruebas conductuales se realizaron en cajas de acrílico con las siguientes dimensiones: 62 cm de ancho, 29 cm de altura y 42 cm de profundidad.

El piso de la caja permaneció cubierto con aserrín, el cual se cambió entre cada prueba conductual. La hembra sexualmente receptiva fue introducida a la caja 5 minutos antes de colocar al macho. En estas pruebas se registró el

número y latencia de montas, intromisiones y eyaculaciones, el intervalo inter-intromisión; así como el intervalo post- eyaculatorio.

4.3.2. Administración de BrdU.

El marcador de síntesis de DNA BrdU (Sigma, St. Louis, USA en 0.9% NaCl) se inyectó intraperitonealmente en una concentración de 100mg/kg, en tres tiempos, siguiendo el siguiente esquema: la primera se realizó una hora antes de la prueba conductual, el segunda fue inmediatamente después de que finalizó y una tercera dosis fue una hora después del término de la prueba conductual (fig. 13).

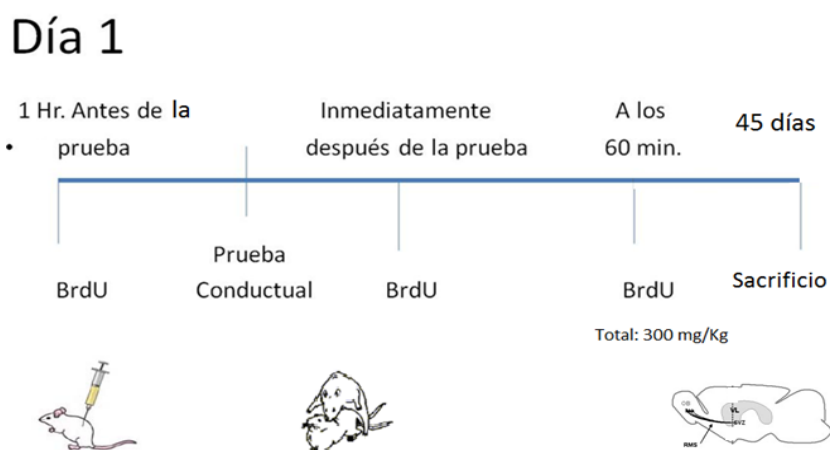


Fig. 13 Esquema del método utilizado para la administración del marcador de síntesis de DNA BrdU.

4.4. HISTOLOGÍA E INMUNOHISTOQUÍMICA.

Las ratas macho fueron sacrificadas 45 días después de la administración del BrdU y 30 minutos después de haber realizado la prueba conductual. Los animales fueron anestesiados con una sobredosis de pentobarbital, 2ml por rata (Cheminova, México DF). En seguida se perfundieron vía intracardiaca con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 0.1M y paraformaldehído (PF) al 4%. Los cerebros fueron removidos y se mantuvieron durante una hora en PF,

posteriormente se cambiaron a una solución de sacarosa al 30% donde permanecieron hasta ser cortados. Se realizaron cortes del BO, los cortes fueron sagitales de 30 μ m de grosor en el micrótopo de congelación.

4.4.1. Técnica de inmunohistoquímica para BrdU.

Para detectar el número de células que incorporaron el marcador BrdU se realizó una inmunohistoquímica por la técnica de flotación (Arzate y cols, 2012; Corona y cols, 2011). Los tejidos se lavaron en una solución amortiguadora de fosfatos (TBS) y se incubaron en 2N HCl durante 60 minutos, este proceso abre poros en la membrana nuclear, lo cual permite que el anticuerpo contra BrdU llegue hasta el ADN. El bloqueo de sitios inespecíficos se realizó incubando los tejidos durante 15 minutos con albúmina bovina y Tritón-X (Tx 0.3%). La incubación con el anticuerpo monoclonal anti-BrdU (1:2000) (BD Bioscience) fue por 16 horas a 4°C. Consecutivamente los tejidos se prepararon durante 1 hora con lavados de TBS, albúmina bovina (1%) y Tx (0.02%) para después incubarlos con el anticuerpo secundario biotinilado anti-ratón IgG (1:500) (Vector Laboratories, Burlingame, CA) durante 2 horas. Después se lavaron varias veces y se incubaron con el complejo AB (complejo de avidina biotina) en 0.32% de Tx (Vector Laboratories, Burlingame, CA), por 90 minutos y la inmunoreacción se reveló con diaminobenzidina (DAB, Sigma). Los cortes se montaron en laminillas gelatinizadas utilizando Permount para cubrirlas.

4.4.2 Técnica de inmunofluorescencia para BrdU/NeuN.

Para determinar si estas células nuevas se diferencian al linaje neuronal se realizó un doble marcaje con BrdU y NeuN (proteína nuclear específica de neuronas) siguiendo el protocolo descrito anteriormente. Los tejidos se incubaron durante 16 horas a 4°C los anticuerpos primarios: monoclonal anti-BrdU de rata (1:800, AbD SeroTeC) y anticuerpo monoclonal anti-NeuN de ratón (1:250 MILLIPORE). Posteriormente el tejido se incubó en anticuerpos secundarios: anti-rata IgG Alexa Fluor 488 (1:1250, Invitrogen) y anti-ratón IgG Alexa Fluor 568

(1:1250, Invitrogen). Los cortes se montaron en laminillas no gelatinizadas utilizando AQUAMONT (Polysciences, Inc) para cubrirlas.

4.4.3 Técnica de inmunofluorescencia para BrdU/GFAP.

Para determinar si estas células nuevas se diferencian al linaje glial se realizó un doble marcaje con BrdU y GFAP (proteína gliofibrilar ácida) siguiendo el protocolo descrito anteriormente. Los tejidos se incubaron durante 16 horas a 4°C en anticuerpo monoclonal anti-BrdU de rata (1:800, AbD SeroTeC) y anticuerpo monoclonal anti-GFAP de conejo (1:500 MILLIPORE). Posteriormente se incubaron en los anticuerpos secundarios: anti-rata IgG Alexa Fluor 488 (1:1250, Invitrogen) y anti-conejo IgG Alexa Fluor 568 (1:1250, Invitrogen). Los cortes se montaron en laminillas no gelatinizadas utilizando AQUAMONT (Polysciences, Inc) para cubrirlas.

4.4.4 Técnica de inmunofluorescencia para BrdU/NeuN/c-Fos.

Para determinar si estas células nuevas se diferencian al linaje neuronal y si se activan durante la cópula se realizó un triple marcaje con BrdU, NeuN (proteína nuclear específica de neuronas) y c-Fos (gen de activación temprana) siguiendo el protocolo descrito anteriormente. Los tejidos se incubaron durante 16 horas a 4°C en los anticuerpos primarios monoclonal anti-BrdU de rata (1:800, AbD SeroTeC), anticuerpo monoclonal anti-NeuN de ratón (1:250, MILLIPORE), anticuerpo monoclonal anti-c-Fos de conejo (1:250, Santa Cruz). Posteriormente los tejidos se incubaron en los anticuerpos secundarios: anti-rata IgG Alexa Fluor 488 (1:1250, Invitrogen), Cy3 ratón (1:1000, Jackson Immuno Research) y Cy5 conejo (1:500, ZYMED). Los cortes se montaron en laminillas no gelatinizadas utilizando AQUAMONT (Polysciences, Inc) para cubrirlas.

4.5. ANÁLISIS DE IMÁGENES Y CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS.

4.5.1. Análisis de imágenes y cuantificación de células inmunoreactivas a BrdU.

La cuantificación de las células positivas a BrdU se realizó en el BOP y BOA. Se trabajó únicamente con el hemisferio derecho ya que no existe evidencia de que existan diferencias con respecto a la neurogénesis del BO entre hemisferios (Díaz y cols, 2009). El análisis cuantitativo de las células se realizó utilizando el software Image Pro Plus 6.1, se obtuvieron imágenes de 10X de los cortes previamente seleccionados para el conteo (6 cortes por sujeto) del BOA y BOP.

Para la cuantificación de las células que incorporaran el marcador BrdU en el BOA, se delimitó un área de conteo utilizando 6 círculos de 200 μ m de diámetro cada uno, que fueron colocados sobre en la región anterior y posterior de las capas de estudio (capa glomerular, mitral y granular). El área delimitada para la cuantificación de las células fue constante para cada corte analizado. En total se cuantificaron 4 cortes de cada animal, de los 5 grupos (fig. 14).

En el caso del BOP, la cuantificación de las células que incorporaron el marcador BrdU se delimitó utilizando tres círculos de 400 μ m de diámetro cada uno, los cuales fueron colocados sobre las capas de interés (capa glomerular, mitral y granular). El área delimitada para la cuantificación de las células fue constante para cada corte analizado. En total se cuantificaron 3 cortes de cada animal, de los 5 grupos (fig. 14).

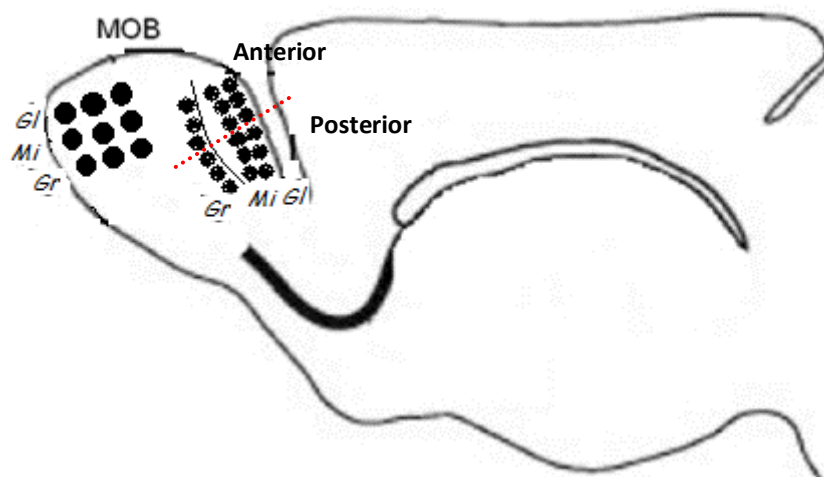


Fig. 14 Esquema representativo de un corte sagital del BO de una rata adulta, en donde se muestra el área de cuantificación de células BrdU positivas en el BOP (círculos de 400 μm de diámetro), BOA (círculos de 200 μm de diámetro) en la región anterior y posterior de la capa glomerular (CGL), mitral (CMI) y granular (CGr), MOB (bulbo olfatorio principal), AOB (bulbo olfatorio accesorio) (Modificado de Corona, 2011).

4.5.2. Análisis de imágenes y cuantificación de células inmunoreactivas a BrdU/NeuN; BrdU / GFAP y BrdU / NeuN / c-Fos.

La cuantificación de las células positivas BrdU / NeuN, BrdU / GFAP y BrdU / NeuN / c-Fos se realizó en el BOA en la capa granular, ya que fue en donde se observó el incremento de células positivas a BrdU. Se obtuvieron imágenes de 20X con el microscopio confocal Zeiss LSM510. El análisis cuantitativo de las células se realizó: utilizando el software AimImageExaminer (Compañía Zeiss LSM).

Para la cuantificación de las células que incorporaran los marcadores en el BOA, se delimitó un área de conteo utilizando dos cuadrados de 450 μm x450 μm , que fueron colocados sobre la capa granular del BOA. El área delimitada para la cuantificación de las células fue constante para cada corte analizado. En total se cuantificaron 2 cortes de cada animal, del grupo control y CRm3 (fig. 15).

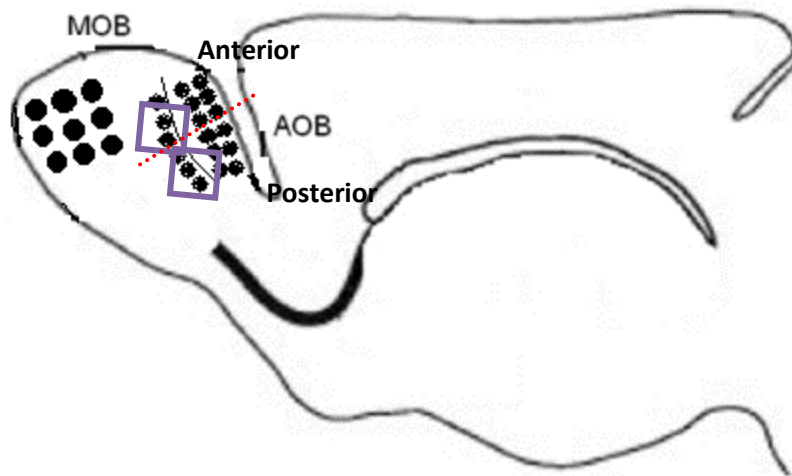


Fig. 15 Esquema que representa un corte sagital del BO de una ratona adulta, en donde se muestra el área de cuantificación de células BrdU/NeuN, BrdU/GFAP, BrdU/GFAP/c-Fos en el BOA (450 μ m x 450 μ m) en la capa granular (CGr) del BOA. MOB (bulbo olfatorio principal); AOB (bulbo olfatorio accesorio) (Modificado de Corona, 2011).

4.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los datos obtenidos de las pruebas de conducta sexual como son el número y la latencia de monta, intromisión y eyaculación fueron analizados utilizando la prueba Kruskal Wallis, debido a que los datos no pasaron la prueba de homogeneidad de varianza, en caso de diferencias significativas se utilizó la prueba Post-Hoc de Tukey.

Los datos del número de células inmunoreactivas a BrdU del BOP, el BOA región anterior y posterior y el número de células inmunoreactivas a BrdU/NeuN, se analizaron utilizando la prueba análisis de varianza (ANOVA) de una vía. Los datos del número de células inmunoreactivas a BrdU/GFAP y BrdU/NeuN/c-Fos no tuvieron una distribución normal y por lo tanto se analizaron mediante la prueba no paramétrica Kruskal Wallis.

V. RESULTADOS

5.1. ANÁLISIS DE DATOS CONDUCTUALES.

5.1.1. Prueba de conducta sexual masculina.

En las pruebas de conducta sexual masculina realizadas durante el entrenamiento, en el grupo CRh la latencia de intromisión fue más larga que el grupo CRm3 (K-W: $\chi(2)^2 = 7.81$, $p=0.02$, $n_1= 10$). No encontramos diferencias significativas en el número de montas (K-W: $\chi(2)^2 = 0.072$, $p=0.96$, $n_1= 10$), número de intromisiones (K-W: $\chi(2)^2 = 0.77$, $p=0.67$, $n_1= 10$), latencia de monta (K-W: $\chi(2)^2 = 5.78$, $p=0.056$, $n_1= 10$), latencia de eyaculación (K-W: $\chi(2)^2 = 3.32$, $p=0.19$, $n_1= 10$), intervalo post-eyaculatorio (K-W: $\chi(2)^2 = 0.53$, $p=0.76$, $n_1= 10$) e intervalo inter-intromisión (K-W: $\chi(2)^2 = 5.73$, $p=0.057$, $n_1= 10$). Tabla 2.

Tabla 2. Pruebas de conducta sexual masculina durante el entrenamiento. CRh, cópula regulada por la hembra; CRm1, cópula regulada por el macho hasta eyacular una vez; CRm3, cópula regulada por el macho hasta eyacular tres veces. Los datos se expresan como la media \pm error estándar. Los datos fueron analizados mediante la prueba Kruskal Wallis, en caso de diferencias significativas se utilizó la prueba post-hoc Tukey.

	CRh	CRm1	CRm3
Número de monta	12.30 \pm 3.14	9.90 \pm 1.42	13.30 \pm 3.38
Número de intromisiones	15.30 \pm 1.81	16.50 \pm 1.37	14.90 \pm 2.42
Latencia de monta	154.50 \pm 35.74	76.70 \pm 15.12	51.10 \pm 10.89
Latencia de intromisión	196.30 \pm 37.27	109.90 \pm 18.06	66.00 \pm 17.03
Latencia de eyaculación	932.20 \pm 189.64	512.70 \pm 53.67	769.80 \pm 178.05
Intervalo post-eyaculatorio.			
Intervalo	361.80 \pm 17.74	408.50 \pm 37.80	380.70 \pm 25.58
Intervalo Inter-Intromisión			
Intervalo	59.14 \pm 7.50 *	33.72 \pm 3.12	46.21 \pm 11.09

* Diferente de CRm3 en el mismo parámetro analizado. $p<0.05$

Los datos de las pruebas de conducta sexual el día en que a los animales se les administró el BrdU muestran que en el grupo CRh el intervalo inter-intromisión fue más largo que el grupo CRm1 (K-W: $\chi(2)2 = 9.96$, $p=0.007$). No se encontraron diferencias significativas en el número de montas (K-W: $\chi(2)2 = 1.87$, $p=0.39$), número de intromisiones (K-W: $\chi(2)2 = 5.71$, $p=0.058$), latencia de monta (K-W: $\chi(2)2 = 1.34$, $p=0.51$), latencia de intromisión (K-W: $\chi(2)2 = 0.85$, $p=0.65$), latencia de eyaculación (K-W: $\chi(2)2 = 0.53$, $p=0.76$) e intervalo post-eyaculatorio (K-W: $\chi(2)2 = 1.42$, $p=0.49$). Tabla 3.

Tabla 3. Datos de la prueba de conducta sexual realizada el día en que a los animales se les administró BrdU. CRh, cópula regulada por la hembra; CRm1, cópula regulada por el macho hasta eyacular una vez; CRm3, cópula regulada por el macho hasta eyacular tres veces. Los datos fueron analizados mediante la prueba Kruskal Wallis.

	CRh	CRm1	CRm3
Número de monta	10.75 ± 5.62	12.14 ± 4.20	11.12 ± 1.94
Número de intromisiones	10.12 ± 1.78	14.28 ± 2.43	14.87 ± 1.57
Latencia de monta	177.25 ± 65.29	174.14 ± 32.36	120.00 ± 32.00
Latencia de intromisión	247.25 ± 65.81	216.71 ± 41.46	209.87 ± 79.67
Latencia de eyaculación	769.00 ± 164.37	634.00 ± 150.04	754.75 ± 108.77
Intervalo post-eyaculatorio.	457.25 ± 45.30	413.42 ± 21.50	383.75 ± 16.61
Intervalo Inter-Intromisión	75.22 ± 7.46*	41.53 ± 3.98	49.83 ± 4.01
Número de eyaculaciones	2.62 ± 0.42	1 ± 0.00	3 ± 0.00

*Diferente de CRm1 en el mismo parámetro analizado. $p<0.05$

5.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA DENSIDAD DE CÉLULAS NUEVAS

5.2.1. Análisis estadístico de la densidad de células nuevas en el BOP

El análisis estadístico demuestra que no hay diferencias significativas entre los grupos en la capa glomerular ($F= 0.427$, $p=0.788$), mitral ($F=0.282$, $p=0.887$) y granular ($F=1.429$, $p=0.247$) (fig. 16).

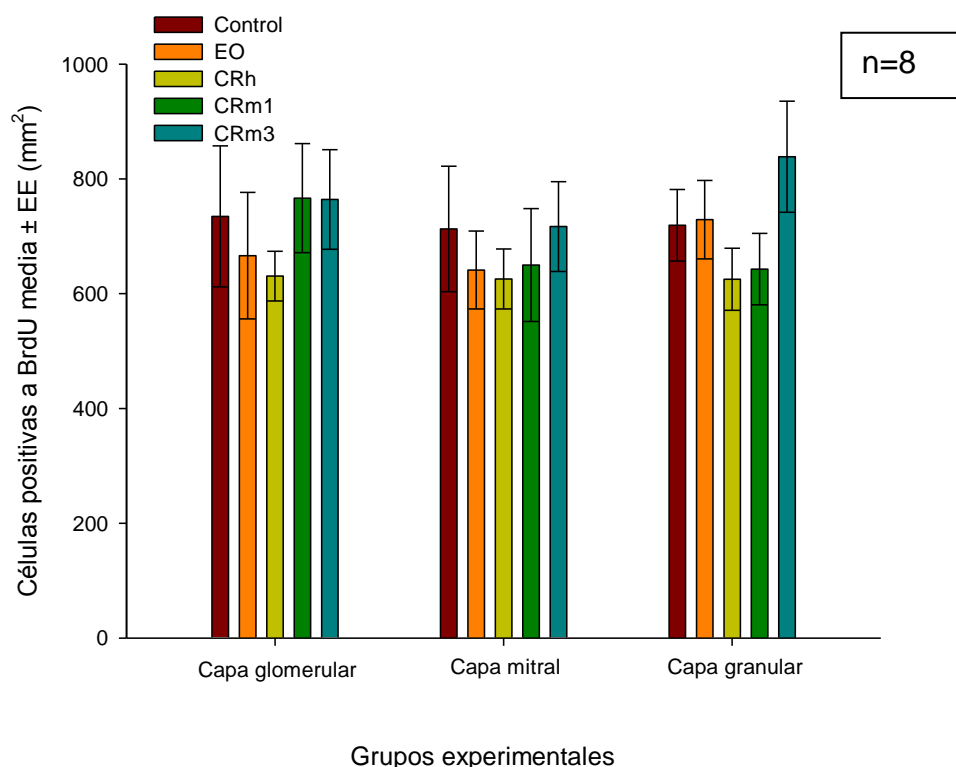


Fig. 16. Número de células positivas a BrdU en el BOP. En la capa glomerular, capa mitral y capa granular. Los grupos experimentales: Control (rojo); EO, exposición a una hembra en estro (naranja); CRh, cópula regulada por la hembra (verde pasto); CRm1, cópula regulada por el macho hasta eyacular una vez (verde); CRm3, cópula regulada por el macho hasta eyacular tres veces (azul). Los datos fueron analizados mediante una prueba de análisis de varianza de una vía (ANOVA). Los datos se expresan como media \pm error estándar (EE) en mm^2 .

5.2.2. Análisis estadístico de la densidad de células nuevas en el BOA en la región anterior y posterior.

El análisis estadístico demuestra que hay diferencias significativas en el número de células positivas a BrdU en la región posterior de la capa granular ($F=9.504$, $p=0.001$). La prueba Post-hoc Student Newman Keuls revela que existen diferencias significativas entre el grupo CRm3 con respecto al grupo control, EO, CRh y CRm1, $p<0.001$ (Fig.17). En la capa granular de la región anterior no encontramos diferencias significativas entre los grupos ($F=1.302$, $p=0.290$). De igual forma, no encontramos diferencias significativas en el número de células positivas a BrdU en el BOA en la región anterior y posterior en la capa glomerular ($F= 0.39$, $p=0.809$; $F=0.943$, $p=0.452$ respectivamente) y capa mitral ($F=0.147$, $p=0.963$; $F=0.293$, $p=0.881$ respectivamente) (fig. 17).

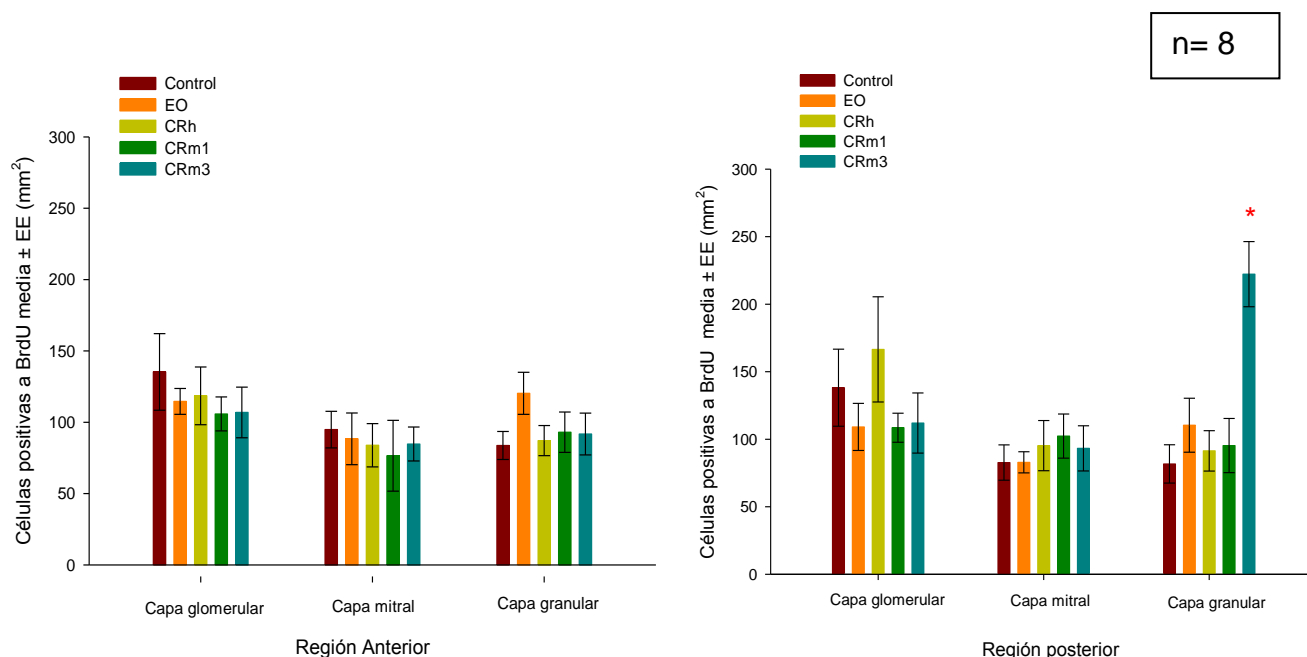


Fig. 17. Número de células positivas a BrdU en la región anterior y posterior del BOA. En la capa glomerular, capa mitral y capa granular. Los grupos experimentales: Control (rojo); EO, exposición a una hembra en estro (naranja); CRh, cópula regulada por la hembra (verde pasto); CRm1, cópula regulada por el macho hasta eyacular una vez (verde); CRm3, cópula regulada por el macho hasta eyacular 3 veces (azul). Los datos fueron analizados mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA). Los datos se expresan como media \pm error estándar (EE).

*Diferente a todos los grupos en la misma región neuronal. $p<0.001$

5.3. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LAS CÉLULAS.

5.3.1. Caracterización fenotípica de las células marcadas con BrdU/NeuN en la capa granular del BOA.

Mediante la técnica de inmunofluorescencia se detectaron el número de células nuevas que se diferencia al linaje neuronal (BrdU/NeuN). En la figura 18 y 19 se muestran fotomicrografías representativas.

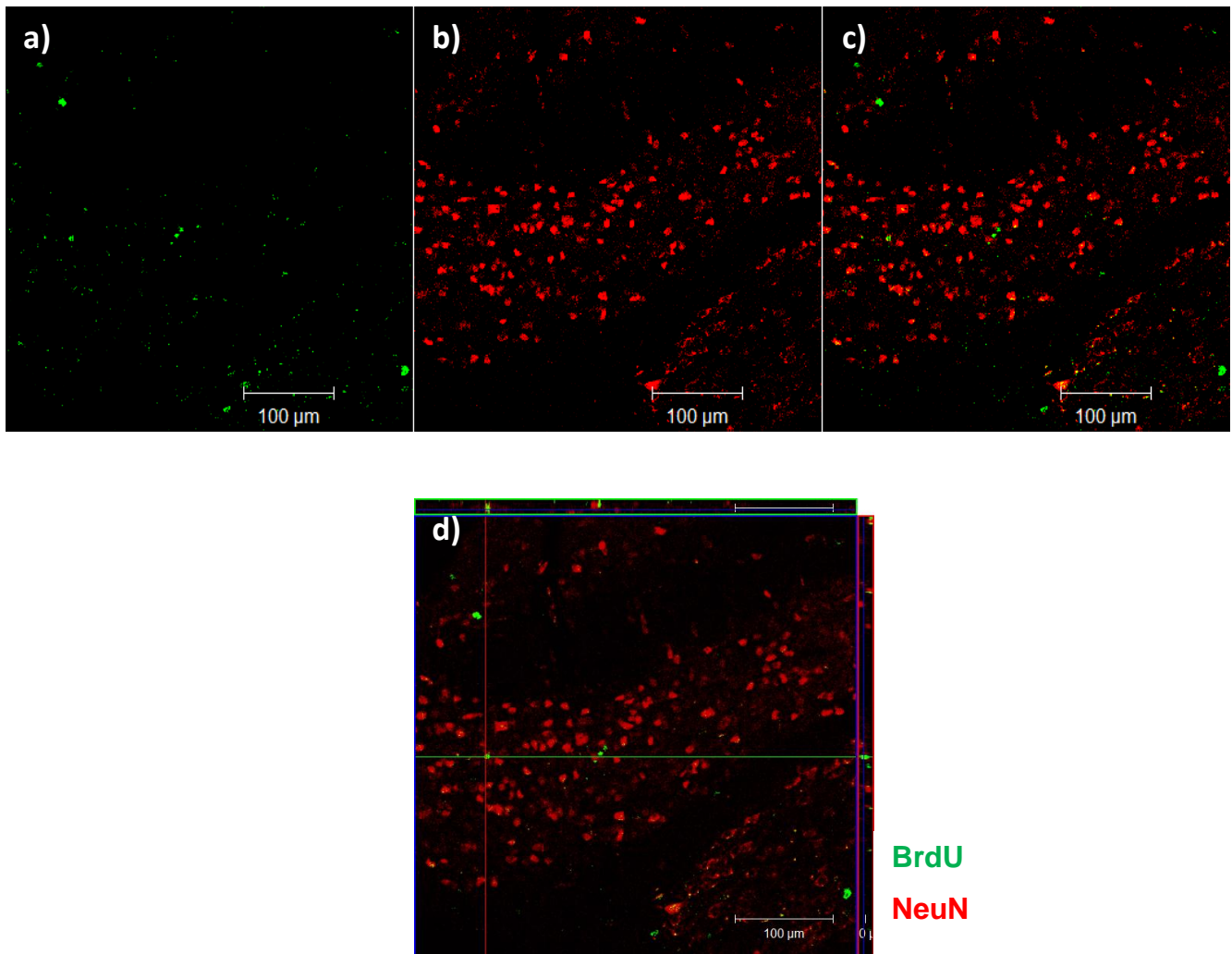


Fig. 18 Fotomicrografías (20X) en donde se muestra un doble marcaje. BrdU (verde) y NeuN (rojo) en la capa granular del BOA en el grupo control. Proyección (a, b y c); Corte ortogonal (d).

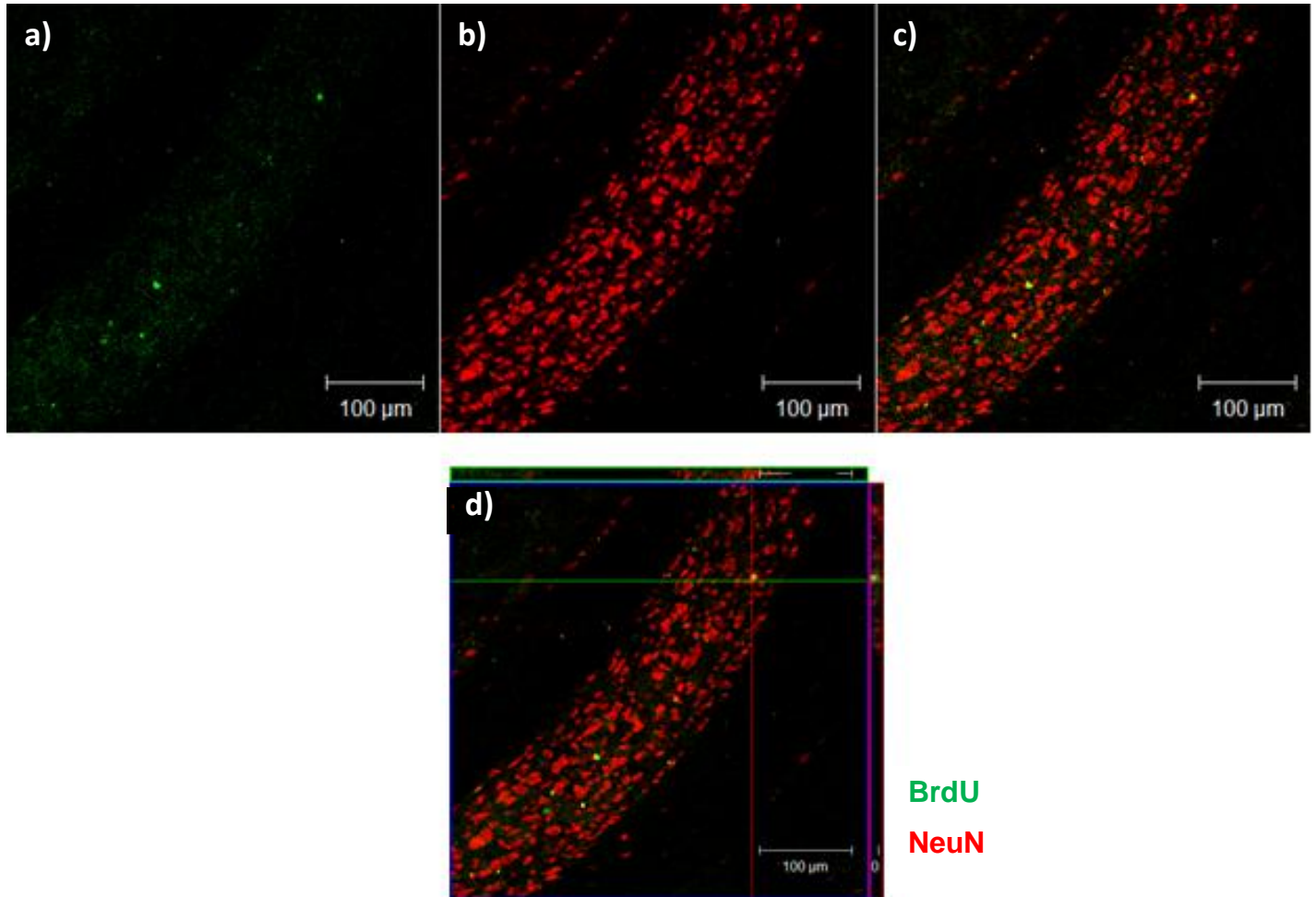


Fig. 19 Fotomicrografía (20X) en donde se muestra un doble marcaje BrdU (verde) y NeuN (rojo) en la capa granular del BOA en el grupo CRm3, cópula regulada por el macho hasta tener 3 eyaculaciones. Proyección (a, b y c); Corte ortogonal (d).

Los datos del número de células fluorescentes positivas a BrdU en la capa granular del BOA región anterior y posterior fueron analizados mediante una ANOVA de una vía. El análisis estadístico muestra diferencias significativas entre los grupos ($F=3.44$, $p=0.03$). La prueba Post-hoc Student Newman Keuls revela que en la región posterior, que el grupo de CRm3 incrementa el número de células nuevas con respecto al grupo Control en la misma región. En la región anterior no encontramos diferencias significativas entre el grupo control y CRm3.

El número de células inmunoreactivas a BrdU/NeuN en la capa granular anterior y posterior del BOA fue analizado mediante una ANOVA de una vía. Los datos muestran diferencias significativas entre los grupos ($F= 4.45, p=0.01$).

La prueba Post-hoc Student Newman Keuls muestra un incremento significativo en el número de células BrdU/NeuN positivas en el grupo CRm3 con respecto al control en la región posterior. También, encontramos diferencias significativas entre CRm3 región posterior contra el grupo control y CRm3 región anterior (Fig. 20).

En cuanto al porcentaje del número de células inmunoreactivas que se diferencian al linaje neuronal no se encuentra ninguna diferencia entre los grupos ($F= 1.468, p=0.245$) (Tabla 4).

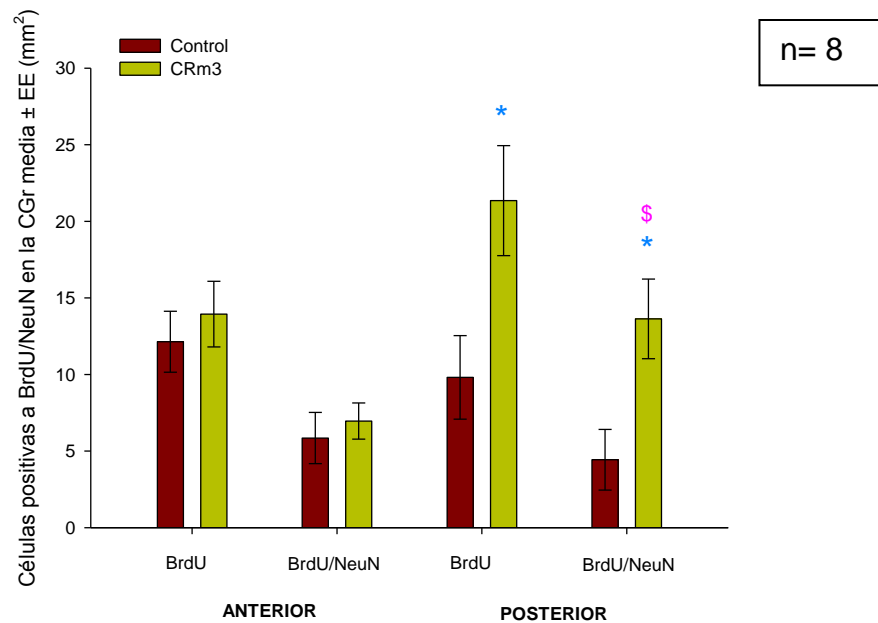


Fig. 20. Número de células positivas a BrdU y BrdU/NeuN en la región anterior y posterior del BOA de la capa granular. Los grupos experimentales: Control (rojo); CRm3, cópula regulada por el macho hasta 3 eyaculaciones (verde). Los datos fueron analizados mediante la prueba ANOVA de una vía. Los datos se expresan como media \pm error estándar (EE).

* Diferente de control en la región posterior.

\$ Diferente de control y CRm3 en la región anterior.

Tabla 4. Porcentaje de células inmunoreactivas a BrdU/NeuN, en la región anterior y posterior de la capa granular del BOA. CRm3, cópula regulada por el macho hasta eyacular tres veces. Los datos fueron analizados mediante la prueba ANOVA de una vía y se expresan como media \pm error estándar (EE).

Porcentaje de células que se diferencian al linaje neuronal		
	Control	CRm3
Región anterior	40.11 \pm 9.99	47.57 \pm 9.59
Región posterior	36.26 \pm 12.71	63.62 \pm 6.74

5.3.2. Caracterización fenotípica de las células marcadas con BrdU/GFAP en la capa granular del BOA.

Se evaluó si las células nuevas de la región anterior y posterior de la capa granular del BOA expresan marcadores de diferenciación al linaje glial. Los cortes fueron procesados por inmunofluorescencia para identificar las células nuevas (BrdU) que son positivas a GFAP (células gliales). Hoechst fue utilizado para marcar los núcleos celulares. Las imágenes de fluorescencia BrdU/ GFAP (20X), fueron tomadas de forma secuencial y con un promedio de 8 fotos (Fig. 21, 22).

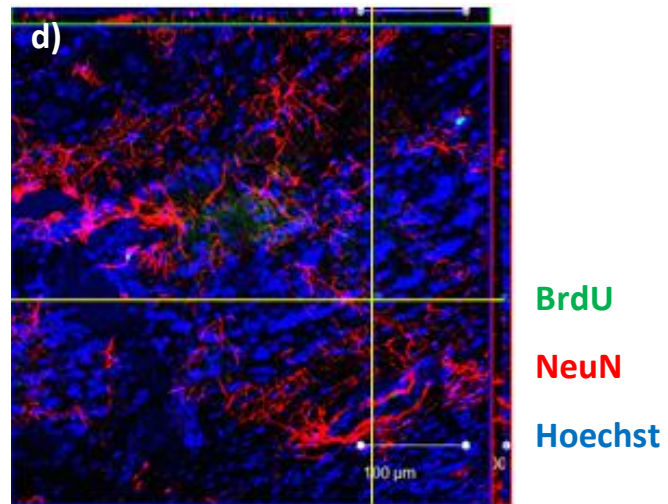
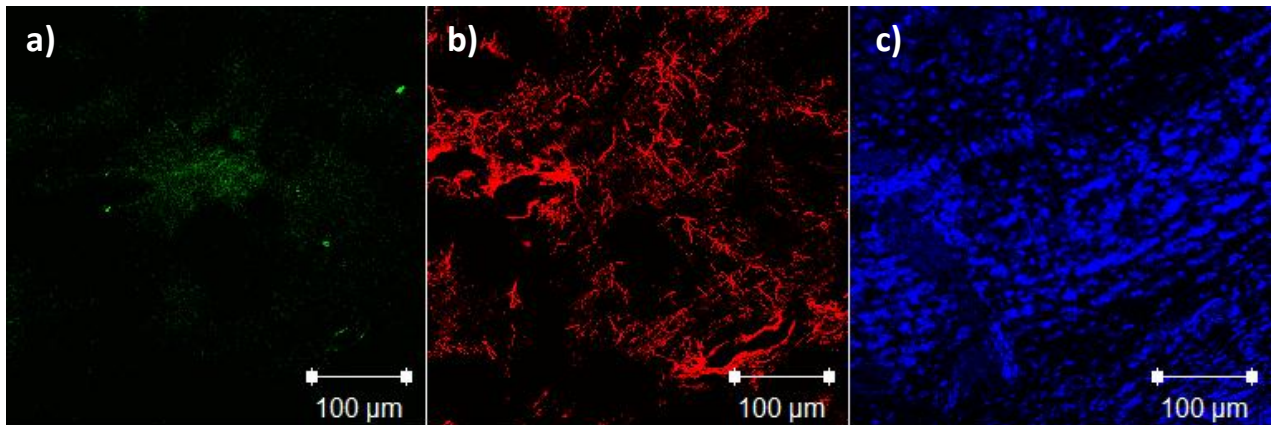


Fig. 21 Fotomicrografía (20X) en donde se muestra un doble marcaje con BrdU (verde), GFAP (rojo), Hoechst (azul) en la capa granular del BOA en el grupo control Proyección (a, b y c); Corte ortogonal (d).

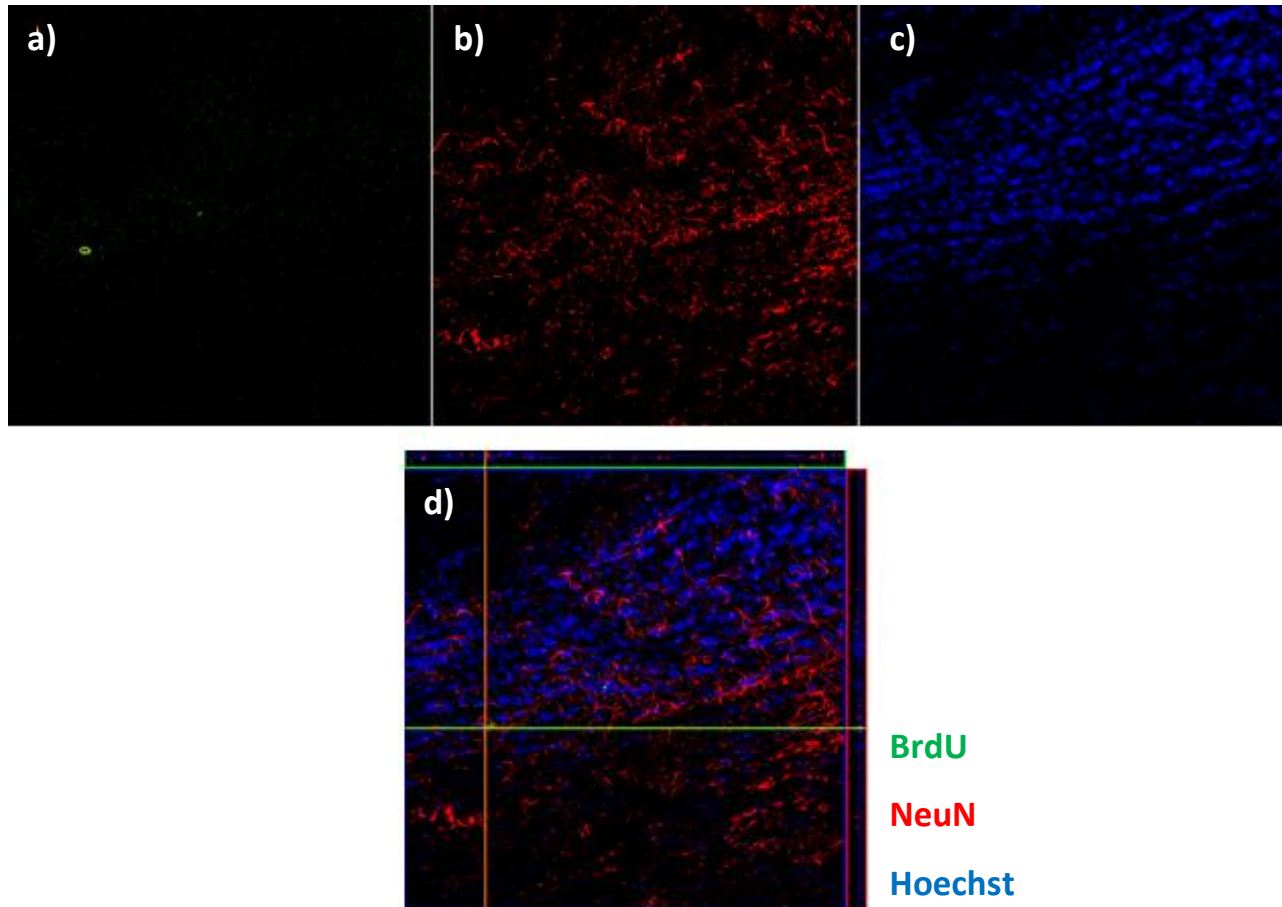


Fig. 22 Fotomicrografía (20X) en donde se muestra un triple marcaje con BrdU (verde), GFAP (rojo), Hoechst (azul) en la capa granular del BOA en el grupo CRm3, cópula regulada por el macho hasta tener 3 eyaculaciones. Proyección (a, b y c); Corte ortogonal (d).

El número de células inmunoreactivas a BrdU/GFAP fue analizado mediante la prueba Kruskal Wallis, los datos muestran que no hay diferencia en el número de células positivas a BrdU/GFAP en ninguna de las capas de estudio (anterior y posterior) (K-W: $\chi_{(4)}^2 = 0.818$, $p = 0.845$).

Así mismo se analizaron las células inmunoreactivas a BrdU. (Fig. 23) con la misma prueba estadística y tampoco se encontraron diferencias significativas en la región anterior y posterior (K-W: $\chi_{(4)}^2 = 7.717$, $p = 0.052$).

En cuanto al porcentaje del número de células inmunoreactivas que se diferencian al linaje glial no se encontraron diferencias entre los grupos (K-W: $\chi^2_{(4)} = 0.625$, $p = 0.891$) (Tabla 5).

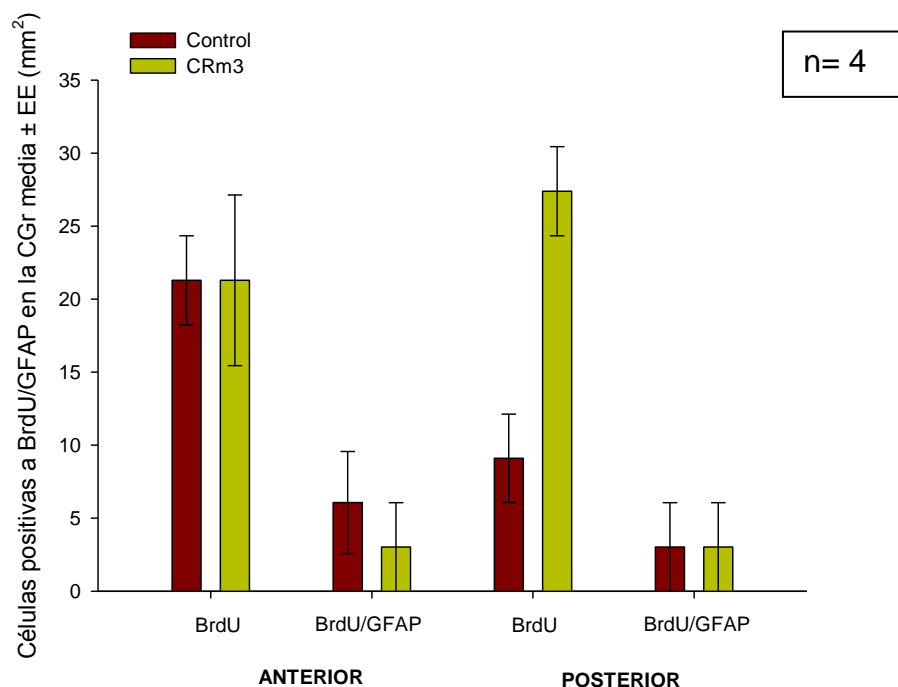


Fig. 23. Número de células positivas a BrdU y BrdU/GFAP en la región anterior y posterior del BOA, de la capa granular. Los grupos experimentales: Control (rojo); CRm3, cópula regulada por el macho hasta eyacular tres veces (verde). Los datos fueron analizados mediante una prueba Kruskal Wallis. Y se expresan como media \pm error estándar (EE).

Tabla 5. Porcentaje de células inmunoreactivas a BrdU/GFAP, en la región anterior y posterior del BOA. CRm3, cópula regulada por el macho hasta eyacular tres veces. Los datos fueron analizados mediante la prueba Kruskal Wallis. Los datos se expresan como media \pm error estándar (EE).

Porcentaje de células que se diferencian al linaje glial.		
	Control	CRm3
Región anterior	24.94 \pm 14.40	12.47 \pm 12.47
Región posterior	25.00 \pm 25.00	12.47 \pm 12.47

5.3.3. Caracterización fenotípica de las células marcadas con BrdU/NeuN/c-Fos en la capa granular del BOA.

Se analizó la parte anterior y posterior del BOA. El tejido fue procesado utilizando una inmunofluorescencia para identificar las células positivas a BrdU, NeuN (neuronas maduras) y c-Fos (gen de expresión temprana). Para las imágenes de fluorescencia BrdU/NeuN/c-Fos (25X), fueron tomadas de forma secuencial y con un promedio de 8 fotos (Fig. 24, 25).

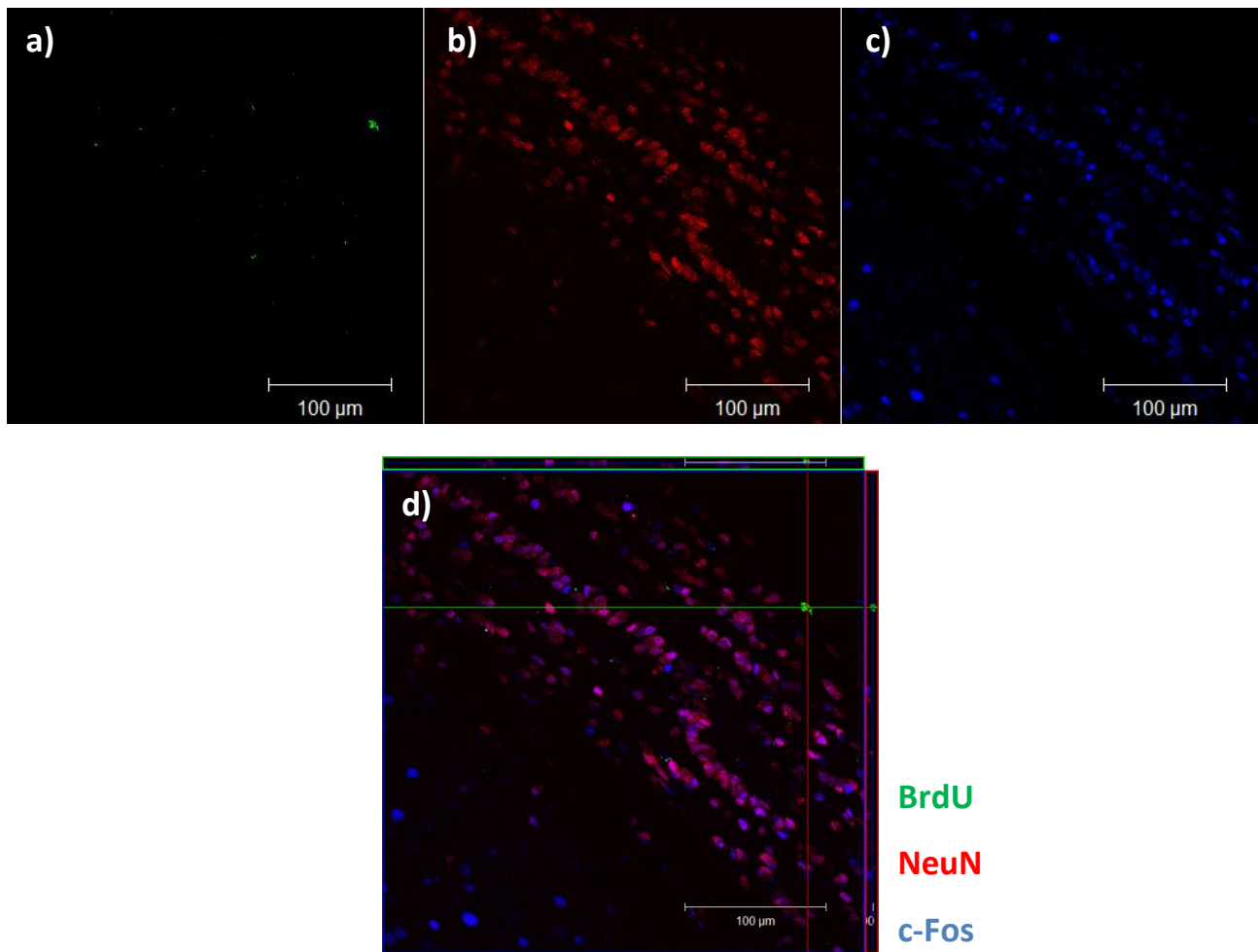


Fig. 24 Fotomicrografía (20X) en donde se muestra un triple marcaje con BrdU (verde), NeuN (rojo) y c-Fos (azul) en la capa granular del BOA en el grupo control. Proyección (a, b y c); Corte ortogonal (d).

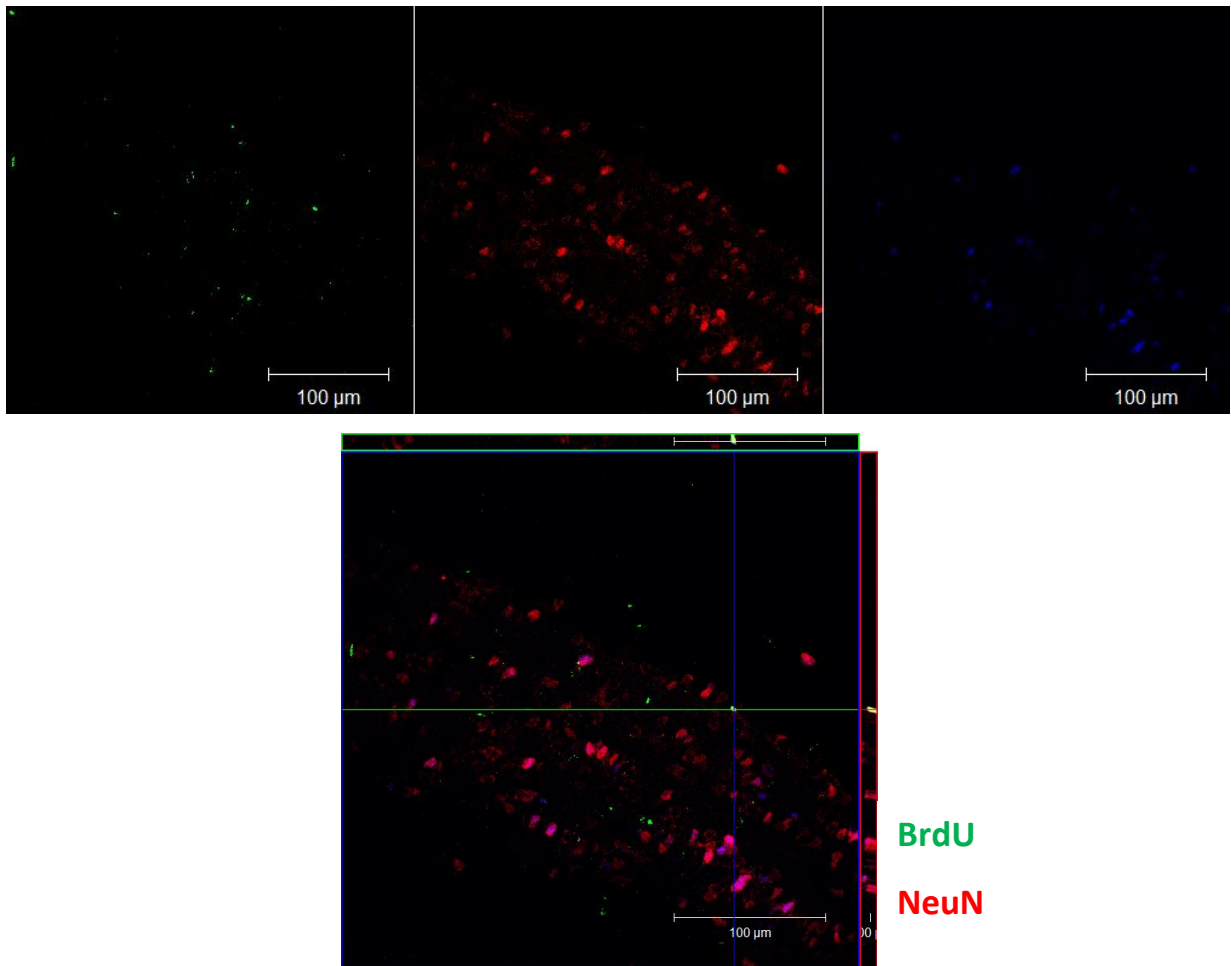


Fig. 25 Fotomicrografía (20X) en donde se muestra un triple marcaje con BrdU (verde), NeuN (rojo) y c-Fos (azul) en la capa granular del BOA en el grupo CRm3, cópula regulada por el macho hasta eyacular 3 veces. Proyección (a, b y c); Corte ortogonal (d).

El número de células inmunoreactivas a BrdU/NeuN/c-Fos fue analizado mediante la prueba Kruskal Wallis, los datos muestran que no hay diferencia en el número de células positivas a BrdU/NeuN/c-Fos en la capa granular región anterior y posterior del BOA de machos control y CRm3 (K-W: $\chi_{(4)}^2 = 5.048$, $p = 0.168$) (Fig. 26).

Así mismo se analizaron las células inmunoreactivas a BrdU con la misma prueba estadística, los datos muestran que no hay diferencias significativas en la capa anterior y posterior (Fig. 23).

En cuanto al porcentaje del número de neuronas nuevas que se están activando durante la realización de la prueba conductual no se encontraron diferencia entre los grupos (K-W: $\chi_{(4)}^2 = 2.712$, $p = 0.438$) (Tabla 6).

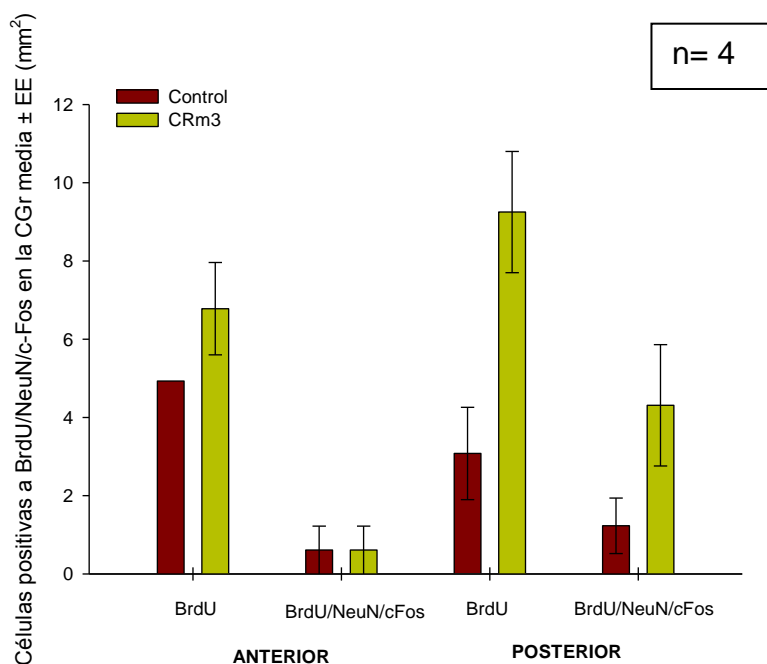


Fig. 26. Número de células positivas a BrdU y BrdU/NeuN/c-Fos en la región anterior y posterior del BOA de la capa granular. Los grupos experimentales: Control (rojo); CRm3, cópula regulada por el macho hasta eyacular 3 veces (verde). Los datos fueron analizados mediante una prueba Kruskal Wallis y se expresan como media \pm error estándar (EE).

Tabla 6. Porcentaje de las neuronas nuevas que se activan durante la realización de la tarea conductual en la región anterior y posterior de la capa granular del BOA. CRm3, cópula regulada por el macho hasta eyacular tres veces. Los datos fueron analizados mediante la prueba Kruskal Wallis. Los datos se expresan como media \pm error estándar (EE).

Porcentaje de las neuronas nuevas que se están activando durante la cópula.		
	Control	CRm3
Región anterior	25.00 \pm 25.00	8.31 \pm 8.31
Región posterior	50.00 \pm 28.86	49.97 \pm 20.41

VI. CONCLUSIÓN Y DISCUSIÓN

6.1. DISCUSIÓN

Los datos obtenidos en el presente trabajo demuestran que en el BOA el grupo de machos que eyaculan tres veces regulando la interacción sexual incrementó el número de células nuevas (positivas a BrdU) en la capa granular posterior del BOA con respecto a los animales control, al grupo de machos que fueron expuestos a una hembra sexualmente receptiva, al grupo de machos que copularon en condiciones regulada por la hembra y al grupo de machos que regularon la cópula y eyacularon una vez. Por lo que, al parecer la estimulación genital durante la cópula regulada por el macho parece ser fundamental para potenciar la supervivencia de las células nuevas en la capa granular posterior del BOA en la rata macho adulta. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos en la capa granular anterior del BOA. El hecho de que observemos un incremento en el número de células nuevas en la región posterior de la capa granular, en aquellos machos que copularon regulando la interacción y eyacularon 3 veces tiene una relevancia fisiológica ya que esta región es la que se activa al exponer a un macho a olores de hembras en estro y cuando las hembras son expuestas a olores de machos (Brennan y cols, 1999; Yoshikage y cols, 2007, Nunez-Parra 2011). Esto posiblemente nos dice que la región posterior del BOA está involucrada en la detección de olores sexualmente relevantes. En contraste la región anterior de la capa granular se activa en el macho cuando este es expuesto a olores de hembras en diestro (no sexualmente receptivas (Kumar y cols, 1999).

Se ha demostrado que la cópula regulada por el macho ya sea hasta eyacular una o tres veces, 15 días después, incrementa el número de células nuevas que llegan a la capa granular del BOA (Portillo y cols, 2011). Sin embargo, este incremento fue significativamente mayor en los machos que eyacularon 3 veces con respecto a los que eyacularon 1 vez, esto es que una mayor estimulación sexual tiene un efecto más robusto en el proceso de neurogénesis.

La estimulación que se liberan cuando el macho eyacula una vez, no son suficientes para incrementar la supervivencia de las células nuevas.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que el tipo de estimulación genital es fundamental en el proceso de neurogénesis inducido por la conducta sexual, ya que los machos que copularon en condiciones reguladas por la hembra y eyacularon en promedio 2.6 veces no se observó un incremento en la supervivencia de las nuevas células. De esta forma, mediante la prueba de preferencia de lugar condicionada, se ha demostrado que cuando los machos regulan la cópula esta conducta les induce estados afectivos positivos o placenteros (Camacho y cols, 2009; Paredes y Alonso, 1997; Paredes y Vázquez, 1999). Este estado afectivo positivo esta mediado por los péptidos opioides. La administración de naloxona, un antagonista de opioides, en la rata macho bloquea el efecto de recompensa inducido por la cópula regulada (Agmo y Gómez, 1993; García-Horsman y Paredes, 2004; Paredes y Martínez, 2001). Por lo que se ha postulado que los opioides son liberados durante la ejecución de la conducta sexual reduciendo así las consecuencias aversivas en la estimulación (Agmo y Gómez, 1993; Paredes, 2009, 2010). Interesantemente, los opioides incrementan la proliferación y supervivencia de las células nuevas en la ZSV (Sargeant y cols, 2008). Además, la activación de los receptores a opioides inducen diferenciación neuronal (Narita y cols, 2006). Por lo cual propongo que la liberación endógena de opioides durante la cópula regulada, puede ser uno de los factores involucrados en el incremento de la supervivencia de las células nuevas que se integran al BOA.

Por otro lado, se han demostrado que la exposición a olores sexualmente relevantes induce un aumento en el número de nuevas células en el BO (Mak y cols, 2007; Larsen y cols, 2008; Oboti y cols, 2009). Sin embrago en estos estudios los animales fueron expuestos continuamente a olores durante al menos 2 días; mientras que en presente trabajo los machos que fueron expuestos a hembras sexualmente receptivas por una 1 hora. Se ha demostrado que en la rata

macho y hembra que la exposición a olores volátiles del macho o de hembras sexualmente receptivas por 1 hora no incrementa la proliferación en la zona sub ventricular y vía migratoria rostral (datos no publicados). Tampoco tiene un efecto en la llegada de células nuevas ni en la supervivencia de estas (Arzate y cols, 2013, Corona y cols, 2010; Portillo y cols, 2012). Esto es que este estímulo no fue suficiente para incrementar el número de células nuevas que sobreviven en el BOA. Se ha propuesto que la exposición a olores por tiempo cortos no aumenta la supervivencia de las células nuevas, ya que se requiere de una asociación, discriminación y formación de memoria olfativa (Alonso y cols, 2006; Mouret y cols, 2008; Lazarini y Lledo, 2011).

En este trabajo se evaluó el linaje de diferenciación de las células nuevas (neuronas maduras, glía) y se observó un aumento en el número de células nuevas que se diferenciaron al linaje neuronal en el grupo de machos que reguló la cópula hasta eyacular 3 veces en la región posterior de la capa granular del BOA con respecto a los machos control. Esto es que en la rata macho la cópula regulada favorece la diferenciación al linaje neuronal. Observaciones similares se han descrito en el hipocampo después de que los machos copulan durante 14 días incrementa el número de neuronas nuevas en el giro dentado (Leuner y cols, 2010).

Interesantemente, estudios en ratas hembras apoyan esta teoría. Las ratas hembras que copulan regulando la interacción sexual, 15 días después de la cópula se observa un incremento en el porcentaje de neuronas nuevas que llegan la capa granular del BOA en comparación con el grupo control (Arzate y cols, 2013). De igual forma en hembras la cópula incrementa el porcentaje de células nuevas que se diferencian a neuronas, 45 días después del estímulo sexual (Corona y Paredes, 2008). Esto es que los cambios fisiológicos inducidos por la cópula incrementan la diferenciación de las células nuevas al linaje neuronal. Los mecanismos fisiológicos se desconocen, por lo que en el futuro será interesante evaluarlos.

En el presente trabajo reportamos que las células nuevas de la capa granular anterior y posterior se activan (expresión del gen de respuesta temprana c-Fos) después de que el macho copuló.

Se ha demostrado que las células de esta región se activan en respuesta a estímulos sexualmente relevantes. Honda y colaboradores (2008) han reportado que la orina de rata hembra induce la expresión de células inmunoreactivas a c-Fos en la región posterior del BOA de la rata macho. En machos se ha observado un aumento de células granulares que expresan el gen de respuesta temprana ARC en el BOP cuando son expuestos a olores de ratas hembras en estro (sexualmente receptivas) (Matsuoka y cols, 2002). Así mismo, la estimulación genital incrementa el número de células que expresan c-Fos en la capa granular del BOA (Kondo y cols, 2003).

Este trabajo, apoya los estudios de Huang y Bittman en el 2002, quienes demostraron que las células nuevas que se integran al BO expresan c-Fos en respuesta a la cópula. Esto es que las células nuevas son funcionales y se han integrado a los circuitos neuronales.

En el presente estudio no encontramos cambios en el número de células positivas a BrdU en la capa mitral y glomerular del BOA y BOP. Estudios demuestran que tanto los machos y las hembras que controlan la interacción sexual no se observa un incremento en la incorporación de células nuevas a estas capas 15 días después de haber realizado la cópula (Corona y cols, 2011; Portillo y cols, 2012). Estos resultados se pueden deber a que se ha reportado que el 95% de las células nuevas que llegan al BO se integran a la capa granular y solo una proporción pequeña a la capa glomerular alcanzando su nivel máximo un mes después de la administración de BrdU (Petreanu y Alvarez-Buylla, 2002; Winner y cols, 2002).

6.2. CONCLUSIÓN.

Los resultados de este trabajo proponen que la cópula regulada por el macho hasta eyacular tres veces, es un estímulo capaz de incrementar el número de células nuevas que sobreviven en la capa granular del BOA, específicamente en la región posterior.

En la rata macho la cópula regulada no incrementa la supervivencia de células nuevas en la capa mitral y glomerular del BOA. En el macho la cópula no incrementa el número de células nuevas en el BOP.

Se demostró que un alto porcentaje de células nuevas se diferencian al linaje neuronal y estas neuronas nuevas expresan genes de respuesta temprana durante la cópula (c-Fos), por lo que son funcionales y se integran a los circuitos neuronales preexistentes.

LITERATURA CITADA

- Agmo A and Gomez M. 1993. Sexual reinforcement is blocked by infusion of naloxone in to the medial preoptic area. *Behav. Neurosci.* (107): 812–818.
- Agmo A. 1999. Sexual motivation an inquirí into events determining the occurrence of sexual behavior. *Behavioral Brain Research.* (105):129-150.
- Agosta WC. 1992. *Chemical Communication: The Language of Pheromones.* Scientific American Library, New York.
- Alonso M, Viollet C, Gabellec MM, Meas-Yedid V, Olivo-Marin JC y Lledo PM. 2006. Olfactory Discrimination Learning Increases the Survival of Adult-Born Neurons in the Olfactory Bulb. *The Journal of Neuroscience.* 26(41):10508-10513.
- Alonso M, Lepousez G, Wagner S, Bardy C, Gabellec M-M, Torquet N and Lledo P. 2012. Activation of adult-born neurons facilitates learning and memory. *Nature Neuroscience* (15): 897-906
- Altman J. 1962. Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science.* (135):1127–28.
- Altman J. 1963. Autoradiographic investigation of cell proliferation in the brains of rats and cats. *Anat. Rec.* (145): 573–591.
- Alvarez-Buylla A. and Kirn JR. 1997. Birth, migration, incorporation, and death of vocal control neurons in adult songbirds. *J Neurobiol* 33(5): 585-601.
- Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM, Tramontin AD. 2001. A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci.* (2):287–293.
- Alvarez-Buylla A, García-Verdugo JM. 2002. Neurogénesis in adult subventricular zone. *The Journal of Neuroscience.* (22): 629-634.
- Antzoulatos E. Magorien LE. Wood RI. 2008. Cell proliferation and survival in the mating circuit of adult male hamster: effects of testosterone and sexual behavior. (54):735-740.
- Arisi GM, Foresti ML, Mukherjee S and Shapiro LA. 2011. The role of olfactory stimulus in adult mammalian neurogenesis. *Behavioural Brain Research.* (2):356-62
- Arnold AP. 1992. Developmental plasticity in neuronal circuits controlling birdsong sexual differentiation and the neural basis of learning. *J. Neurobiology.* 23(10):1506-1520.
- Arzate DM, Portillo W, Corona R and Paredes RG. 2012. Repeated paced mating promotes the arrival of more newborn neurons in the main and accessory olfactory bulbs of adult female rats. *Neuroscience* (232): 151-160.

- Bagley J, LaRocca G, Jimenez DA, Urban NN. 2007. Adult neurogenesis and specific replacement of interneuron subtypes in the mouse main olfactory bulb. *BMC Neurosci.* (8): 92.
- Bailey M, Puche AC and Shipley MT. 1999. Development of the olfactory bulb: evidence for glia-neuron interactions in glomerular formation. *J. Comp. Neurol.* (415):423-448.
- Bakker J. 2003. Sexual differentiation of the neuroendocrine mechanism regulating male recognition in mammals. *J. Neuroendocrine.* 15(6):615-21.
- Ballard CL. and Wood RI. 2007. Partner preference in male hamsters: Steroids, sexual experience and chemosensory cues. *Physiology and Behavior.* (91):1–8.
- Barfield RJ, Geyer LA. 1975. The ultrasonic postejaculatory vocalization and the postejaculatory refractory period of the male rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* (88):723-734
- Baum MJ and Kelliher KR. 2009. Complementary roles of the main and accessory olfactory systems in mammalian mate recognition. *Annu Rev Physiol;* (71):141–60.
- Baum MJ. 2012. Contribution of pheromones processed by the main olfactory system to mate recognition in female mammals. *Front Neuroanat.* (6):20.
- Baxi KN, Dorries KM and Eisthen HL. 2006. Is the vomeronasal system really specialized for detecting pheromones? *Trends Neurosci.* (29):1–7.
- Bayer SA, Zhang X, Russo RJ, Altman J. 1994. Three-dimensional reconstructions of the developing forebrain in rat embryos. *Neuroimage.* (1):296–307.
- Beach FA, and Holz-Tucker AM. 1949. Effects of different concentrations of androgen upon sexual behavior in castrated male rats. *J. Com. Physiol. Psychol.* (42):433-453.
- Beach FA. 1967. Cerebral and hormonal control of reflexive mechanisms involved in copulatory behavior. *Physiol. Rev.* (47):289-316.
- Bean NJ. 1982. Modulation of agonistic behavior by the dual olfactory system in male mice. *Physiol Behav.* (29): 433-437.
- Bean NJ. 1982. Olfactory and vomeronasal mediation of ultrasonic vocalizations in male mice. *Physiol. Behav.* (28): 31–37.
- Bean NJ and Wysocki CJ. 1985. Behavioral effects of removal of the vomeronasal organ in neonatal mice. *Chem. Senses* (10):421-422.
- Beauchamp GK, Martin IG, Wysocki CJ and Wellington JL. 1982. Chemoinvestigatory and sexual behavior of male guinea pigs following vomeronasal organ removal. *Physiol Behav.* (29):329-336.

- Beauchamp GK, Wysocki CJ and Wellington JL. 1985. Extinction of response to urine odor as a consequence of vomeronasal organ removal in male guinea pigs. *Behav. Neurosci.* (99):950-955.
- Bellringer JF, Pratt HPM, Keverne EB. 1980. Involvement of the vomeronasal organ and prolactin in pheromonal induction of delayed implantation in mice. *J. Reprod. Fertil.* (59):223-228.
- Beyer C., Contreras JL., Moralí G., and Larsson K. 1981. Effects of castration and sex steroid treatment on the motor copulatory pattern of the rat. *Physiology and Behavior* (27):727–730.
- Blanes T. 1898. Sobre algunos puntos dudosos de la estructura del bulbo olfatorio. *Rev. Trim. Micr.* (3):99-127.
- Blaustein JD, Erskine MS, 2002. Feminine sexual behavior: Cellular integration of hormonal and afferent information in the rodent brain. In: *Hormones, brain and behavior*. Pfaff, DW, Arnold AP, Etgen, AM., Fahrbach SE., Rubin RT. (Eds.). Academic press, San Diego, California. Pp: 139-214.
- Bonfanti L, Peretto P, Merighi A, Fasolo A. 1997. Newly-generated cells from the rostral migratory stream in the accessory olfactory bulb of adult rat. *Neuroscience.* 81(2):489-502.
- Brennan PA, Schellinck HM and Keverne EB. 1999. Patterns of expression of the immediate-early gene *egr-1* in the accessory olfactory bulb of female mice exposed to pheromonal constituents of male urine. *Neuroscience* (90): 1463–1470.
- Brennan PA. 2004. The nose knows who's who: chemosensory individuality and mate recognition in mice. *Horm. Behav.* (46): 231–240.
- Brenowitz EA. 1997. Comparative approaches to the avian song system. *J Neurobiol* 33(5): 517-31.
- Briand L, Trotier D and Pernollet JC. 2004. Aphrodisin, an aphrodisiac lipocalin secreted in hamster vaginal secretions. *Peptides.* (25):1545-52.
- Brill MS, Snayyan M, Wohlfrom H, Ninkovi, J, Jawerka M, Mastick GS, Ashery-Padan R, Saghatelian A, Berninger B, Gotz M. 2008. A *dlx2*- and *pax6*-dependent transcriptional code for periglomerular neuron specification in the adult olfactory bulb. *J. Neurosci.* (28): 6439–6452.
- Bruce HM. 1966. Smell as an exteroceptive factor. *J. Anim. Sci.* (25): 83–87.
- Buck L, Axel R. 1991. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell.* (65):175– 87.

- Bulfones A, Wang F, Hevnjer R, Anderson S, Cutforth, Chen S, Meneses J, Pedersen R, Axel R and Rubenstein JLR. 1998. An olfactory map develops in the absence of normal projection neurons or GABAergic interneurons. *Neuron*. (21):1273-1282.
- Burns-Cusato M., Scordalakes EM., and Rissman ER. 2004. Of mice and missing data: What we know (and need to learn) about male sexual behavior. *Physiology and Behavior* (83):217–232.
- Camacho FJ. Horsman P. Paredes RG. 2009. Hormonal and testing conditions for the induction of conditions place preference by paced mating. *Hormones and Behavior*. 56(4):410-415.
- Canteras NS, Simerly RB and Swanson LW. 1995. Organization of projections from the medial nucleus of the amygdala: a PHAL study in the rat. *J Comp Neurol* (360):213–245.
- Carr WJ, Loeb LS and Dissinger ML. 1965. Responses of rats to sex odors. *J. comp. physiol. Psychol.* (59):370-377.
- Choi G., Dong H., Murphy A., Valenzuela D., Yancopoulos G., Swanson L., Anderson D. 2005. Lhx6 delineates a pathway mediating innate reproductive behaviors from the amygdala to the hypothalamus. *Neuron*. (46):647–660.
- Clancy AN, Coquelin A, Macrides F, Gorski RA and Nobel EP. 1984a. Sexual behavior and aggression in male mice: involvement of the vomeronasal system. *Journal of Neuroscience* (4):2222-2229.
- Clancy LJ, Critchley JA, Leitch AG. 1984b. Circulating noradrenaline in the potentiation by hypoxia of the hyperventilation in exercise. *J. Physiology* 246(2):77-86
- Cohen-Tanoudji J, Lavenet C, Locatelli A, Tillet Y, Signoret JP. 1989. Noninvolvement of the accessory olfactory system in the LH response of anoestrous ewes to male odour. *J Reprod Fertil.* (86):135–44.
- Corona R, Larriva-Sahd J, Paredes RG. 2011. Paced-mating increases the number of adult new born cells in the internal cellular (granular) layer of the accessory olfactory bulb. *PLoS One*. 6(5):e19380.
- Corona R. y Paredes RG. 2008. Neurogénesis en el bulbo olfatorio inducida por conducta sexual en la rata hembra. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. Juriquilla, Querétaro. P: 65-67
- David F. Sherry. 2006. *NEUROECOLOGÍA*. *Annu. Rev. Psychol.* (57):167–97
- Dewsbury DA. 1969. Copulatory behaviour of rats (*Rattus norvegicus*) as a function of prior copulatory experience. *Anim. Behav.* (17): 217-223.

- Díaz D, Valero J, Airado C, Baltanás FC, Weruaga E, Alonso JR. 2009. Sexual dimorphic affect both proliferation and serotonergic innervation in the adult rostral migratory stream. *Experimental Neurology*. (216):357-364.
- Doetsch F, Alvarez-Buylla A. 1996. Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. (93):14895-14900.
- Doetsch F, Caillé I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. 1999. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*. (97):703–16.
- Doving KB, Trotier D. 1998. Structure and function of the vomeronasal organ. *J. Exp. Biol*. (21):2913–25.
- Dulac C y Axel R. 1995. A novel family of genes encoding putative pheromone receptors in mammals. *Cell*. (83):95 – 206.
- Dulac C, Wagner S. 2006. Genetic analysis of brain circuits underlying pheromone signaling. *Annu Rev Genet* (40):449–67.
- Edwards DA, Griffis KT, and Tardival C. 1990. Olfactory bulb removal: Effects on sexual behavior and partner-preference in male rats. *Physiology and Behavior* (48): 447–450.
- Emsley JG, Menezes RL, Rodrigo F, Madeiro DC, Martinez ANB and Macklis JD. Identification of radial glia-like cells in the adult mouse olfactory bulb. *Experimental Neurology* (236): 283–297
- Erskine MS. 1989. Solicitation behavior in the estrous female rat: A Review. *Hormone and Behavior*. (23): 473-502.
- Everitt BJ. 1990. Sexual motivation: A neural and behavioral analysis of the mechanisms underlying appetitive and copulatory responses of male rats. *Neurosci. Biobehav. Rev.* (14): 217-232.
- FitzGerald RW, Madison DM. 1983. Social organization of a free-ranging population of pine voles, *Microtus pinetorum*. *Behav. Ecol. Soc.* (13):183–87.
- Fleming A, Vaccarino F, Tambosso L, Chee Ph. 1979. Vomeronasal and olfactory system modulation of maternal behavior in rat. *Science*. (203):372-374.
- García Horsman P and Paredes RG. 2004. Dopamine antagonists do not block conditioned place preference induced by paced mating behavior in female rats. *Behav Neurosci.* (2):356-64.

- Gaulin SJC, FitzGerald RW, Wartell MS. 1990. Sex differences in spatial ability and activity in two vole species (*Microtus ochrogaster* and *M. pennsylvanicus*). *J. Comp. Psychol.* (104):88–93.
- Gaulin SJC, FitzGerald RW. 1986. Sex differences in spatial ability: an evolutionary hypothesis and test. *Am. Natur.* (127):74–88
- Geyer LA, and Barfield RJ. 1978. Influence of gonadal hormones and sexual behavior on ultrasonic vocalization in rats: I. Treatment of females. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* (92): 438–446.
- Gheusi G, Lledo PM. 2007. Control of early events in olfactory processing by adult neurogenesis. *Chemical Senses.* (32):397-409.
- Goldman SA. and Nottebohm F. 1983. Neuronal production, migration and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proc.*
- Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A and Shors TJ. 1999. Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation, *Nat. Neurosci.* (2): 260–265.
- Gould E y Gross CG. 2002. Neurogenesis in adult mammals: some progress and problems. *The Journal of Neuroscience.* (22):619-623.
- Gould E. 2007. How widespread is adult neurogenesis in mammals? Perspectives. *Nature Reviews. Neurosciencie.* (8):481-488.
- Gratzner HG. 1982. Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: a new reagent for detection of DNA replication. *Science* (218):474–75
- Gritti A., Bonfanti L., Doetsch F., Caille I., Alvarez-Buylla A., Lim DA., Galli R., Verdugo JM., Herrera DG., Vescovi AL. 2002. Multipotent neural stem cells reside into the rostral extension and olfactory bulb of adult rodents. *J Neurosci.* (22):437–45.
- Halpern M, Martínez-Marcos A. 2003. Structure and function of the vomeronasal system: An update. *Prog. Neurobiol.* (70):245–318.
- Halpern M, Shapiro LS, Jia C. 1995. Differential localization of G proteins in the opossum vomeronasal system. *Brain Res.* (677): 157–161.
- Hlíňák Z. 1986. Precopulatory behavior of laboratory rat: an ethological approach. *Activi. Nerv. Sup.* (28): 108-116.
- Holmes GM, Chapple WD, Leipheimer RE, Sachs BD. 1991. Electromyographic analysis of male rat perineal muscles during copulation and reflexive erections. *Physiol Behav* (49):1235-1246.

- Honda N, Sakamoto H, Inamura K and Kashiwayanagi M. 2008. Changes in Fos expression in the accessory olfactory bulb of sexually experienced male rats after exposure to female urinary pheromones. *Eur J Neurosci.* 27(8):1980-8.
- Huang L. and Bittmann EL. 2002. Olfactory bulb cells generated in adult male golden hamster are specifically activated by exposure to estrous female. *Hormones and Behavior.* (41):343-350
- Hudson R, Arteaga ML, Collado P, Distel H, Martínez-Gómez M y Lucio RA. 2003. El olfato en contexto: Estudios ecológicos y etológicos en humanos y conejos. *Fisiología, Ecología y Comportamiento: Una Propuesta Multidisciplinaria.* UAT-UNAM, México.
- Hudson R and Distel H. 1986. *Olfactory Guidance of Nipple-Search Behaviour in Newborn Rabbits.* Springer, New York.
- Hull EM, Meisel RL. Sachs BD. 2002. Male sexual behavior, in :Pfaff Dw. Arnold AP. Etgen AM, Fahveach SE, Rubi RT. (ed) *Hormones Brain an behavior academic prees,* -San –Diego, California, pp. 1-32.
- Hull EM, Wood RI, and McKenna K. 2006. The neurobiology of male sexual behavior. In: Neill JD (ed.) *Knobil and Neill' Physiology of Reproduction,* 3rd edn. (2): 33.
- Hull EM., and Dominguez JM. 2007. Sexual behavior in male rodents. *Hormones and Behavior.* (52):45–55.
- Hull EM., and Rodríguez-Manzo. 2009. Male Sexual Behavior. In: Donald W. Pfaff, Arthur P. Arnold, Anne M. Susan E. Fahrbach and Robert T. Rubin, editors. *Hormones, Brain and Behavior,* 2° edition, Vol. 1. San Diego: Academic Press; 2009. Pp.5-65
- Inamura K, Kashiwayanagi M and Kurihara K. 1999. Regionalization of Fos immunostaining in rat accessory olfactory bulb when the vomeronasal organ was exposed to urine. *Eur J Neurosci.* 11(7):2254-60.
- Ingersoll DW. 1981. Role of the vomeronasal organ in murini priming and signaling hemocommunication system. *Dissert. Abst.* (41B):3215-3225.
- Jia CP and Halpern M. 1996. Subclasses of vomeronasal receptor neurons: differential expression of G proteins (Gia2 and Goa) and segregated projections to the accessory olfactory bulb. *Brain Res.* (719): 117–128.
- Johansson CB, Svensson M, Wallstedt L, Janson AM, Frisen J. 1999. Neural stem cells in the adult human brain. *Exp. Cell Res.* (253):733–36

- Johnston RE and Peng M. 2000. The vomeronasal organ is involved in discrimination of individual odors by male but not by females in golden hamsters. *Physiol Behav.* (70):537-549.
- Kaba H, Rosser A and Keverne B. 1989. Neural basis of olfactory memory in the context of pregnancy block. *Neuroscience* (32): 657–662.
- Kageyama R, Imayoshi I, Sakamoto M. 2012. The role of neurogenesis in olfaction-dependent behaviors. *Behav Brain Res.* (2):459-63.
- Kaplan MS., Hinds JW. 1977. Neurogenesis in the adult rat: Electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science.* (197):1092–94.
- Kaupp UB. 2010. Olfactory signaling in vertebrates and insects: differences and commonalities. *Nature Reviews Neuroscience.* (11):188-200.
- Keller M, Douhard Q, Baum M.J, Bakker J. 2006. Destruction of the main olfactory epithelium reduces female sexual behavior and olfactory investigation in female mice. *Chemical Senses.* (31):315-323.
- Kelsch W, Lin CW, Mosley CP, Lois C. 2009. A critical period for activity-dependent synaptic development during olfactory bulb adult neurogenesis. *Journal Neuroscience.* 29(38):11852-11858
- Kemperman G. 2006. Adult Neurogenesis. *Stem Cells and Neuronal Development in the Adult Brain.* USA. Oxford.
- Kennedy JS. 1983. Zigzagging and casting as a programmed response to wind-borne odor: A review. *Physiol. Entomol.* (3):1-98.
- Keverne EB. 1983. Chemical communication in primates reproduction. En: Vandenberg JG (Ed) *Pheromones and Reproduction in Mammals.* Academic Press, NY, pp 79-92.
- Keverne EB. 2004. Importance of olfactory and vomeronasal systems for male sexual function. *Physiology and Behavior.* (83):177-187.
- Keverne EB. 2005. Odor here, odor there: chemosensation and reproductive function. *Nature Neuroscience.* (8): 1637-1638
- Knutson B, Burgdorf J, Panksepp J. 2002. Ultrasonic vocalizations as indices of affective states in rats. *Psychol. Bull.* (128):961-977.
- Kolb B. 1995. *Brain plasticity and behavior.* USA. Lawrence Erlbaum Associates Publishers.

- Kondo Y, Sudo T, Tomihara K and Sakuma Y. 2003. Activation of accessory olfactory bulb neurons during copulatory behavior after deprivation of vomeronasal inputs in male rats. *BrainRes.* (962): 232–236.
- Konoshenko MY, Timoshenko TV and Plyusnina IZ. 2012. C-Fos activation and intermale aggression in rats selected for behavior toward humans. *Behavioural Brain Research.* (EN PRENSA)
- Kruger L. 2004. An early illustrated comparative neuroanatomy of the brain: Samuel Collins' *A Systeme of Anatomy* (1685) and the emergence of comparative neurology in 17th century England. *J. Hist. Neurosci.* (13):195–217
- Kumar A, Dudley CA and Moss RL. 1999. Functional dichotomy within the vomeronasal system: distinct zones of neuronal activity in the accessory olfactory bulb correlate with sex-specific behaviors. *J. Neurosci.* 19, RC32.
- Larsen CM, Kokay IC, and Grattan DR. (2008). Male pheromones initiate prolactin-induced neurogenesis and advance maternal behavior in female mice. *Horm.Behav.* (53): 509–517.
- Larsson K. 1956. *Conditioning and Sexual Behavior in the Male Albino Rat.* Almqvist, Stockholm.
- Larsson K. 1956. The pattern of sexual behavior in the male rat. In: *Conditioning and sexual behavior in the male albino rat.* Elmgrem J. (Ed). Almqvist & Wiksell. Stockhol. Pp: 1-269.
- Lau BW, Yau SY y So KF. 2011. Reproduction: a new venue for studying function of adult neurogenesis? *Cell Transplantation.* (20):21–35.
- Lazarini F, Mouthon MA, Gheusi G, deChaumont F, Olivo-Marin, JC, Lamarque S, Abrous DN, Boussin FD and Lledo PM. 2009. Cellular and behavioral effects of cranial irradiation of the subventricular zone in adult mice. *PLoS ONE* (4): e7017.
- Lazarini F and Lledo PM. 2011. Is adult neurogenesis essential for olfaction? *Trends Neurosci.* (34): 20–30.
- Leinders-Zufall T., Lane AP., Puche AC., Ma W., Novotny MV., Shipley MT., Zufall F. 2000. Ultrasensitive pheromone detection by mammalian vomeronasal neurons. *Nature.* (405):792–96.
- Leonard ST, Ferkin MH, Johnson MM. 2001. The response of meadow voles to an overmark in which the two donors differ in gonadal hormone status. *Anim. Behav.* (62):1172–77

- Leuner B, Glasper ER and Gould E. 2010. Sexual experience promotes adult neurogenesis in the hippocampus despite an initial elevation in stress hormones. *PLoS One*. 5(7):e11597.
- Levin G. 1898. Sulla cariocinesi delle cellule nervose. *Riv Patol Nerv Ment.* (3):97–113.
- Leypold BG., Yu CR., Leinders-Zufall T., Kim MM., Zufall F., and Axel R. 2002. Altered sexual and social behaviors in *trp2* mutant mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (99): 6376–6381.
- Lin CW, Sim S, Ainsworth A, Okada M, Kelsch W, Lois C. 2010. Genetically increased cell-intrinsic excitability enhances neuronal integration into adult brain circuits. *Neuron*. 65(1):32-39l.
- Lin DM, Wang F, Lowe G, Gold GH, Axel R, Ngai J and Brute. 2004. Formation of precise connections in the olfactory bulbs occurs in the absence of odorant evoked neuronal activity. *Neuron* (26):69-80
- Lledo PM, Merkle FT, Alvarez-Buylla A. 2008. Origin and function of olfactory bulb interneuron diversity. *Trends Neurosci.* (31): 392–400.
- Lledo PM, Alonso M, Grubb M. 2006. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nature reviews. Neuroscience.* 7.
- Lledo, PM, Saghatelian, A. 2005. Integrating new neurons into the adult olfactory bulb: joining the network, life-death decisions, and the effects of sensory experience. *Trends Neurosci.* (28): 248–254.
- Lois C, Alvarez-Buylla A. 1994. Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* (264): 1145–1148.
- López-Mascaraque L and De Castro F. 2002. The olfactory bulb as an independent developmental domain. *Cell Death Differ.* (9): 1279-1286.
- Magavi SS, Mitchell BD, Szentirmai O, Carter BS, Macklis JD. 2005. Adult-born and pre-existing olfactory granule neurons undergo distinct experience dependent modifications of their olfactory responses in vivo. *J. Neurosci.* (25): 10729–10739.
- Mak GK, Enwere KE, Gregg C, Pakarainen T, Poutanen M, Huhtaniemi I and Weiss S. 2007. Male pheromone–stimulated neurogenesis in the adult female brain: possible role in mating behavior. *Nat. Neurosci.* (10): 1003–1011.
- Mandiyani VS., Coats JK., and Shah NM. 2005. Deficits in sexual and aggressive behaviors in *Cnga2* mutant mice. *Nature Neuroscience.* (8):1660–1662.
- Manrique PT and Gutiérrez G. 2006. Effects of Early Social Experiences On Mating Preferences Of *Coturnix Japonica*. *Act. Colom. Psicol.* vol.9 no.2.

- Matsuoka M, Yoshida-Matsuoka J, Sugiura H, Yamagata K, Ichikawa M and Norita M. 2002. Mating behavior induces differential Arc expression in the main and accessory olfactory bulbs of adult rats. *Neurosci. Lett.* (335): 111–114.
- Martel KL, Baum MJ. 2007. Sexually dimorphic activation of the accessory, but not the main, olfactory bulb in mice by urinary volatiles. *Eur J Neurosci*, (26): pp. 463-475
- Martínez-Marco y Halpern M. 1999. Differential projections from the anterior and posterior divisions of the accessory olfactory bulb to the medial amígdala in the opossum, *Monodelphis domestica*. *Eur. J. neurosci.* (11):3789-3799.
- Martinez I and Paredes RG. 2001. Onlyself-paced mating is rewarding in rats of both sexes. *Horm. Behav.* (40): 510–517.
- Maruniak JA, Wysocki CJ and Taylor JA. 1986. Mediation of male mouse urine marking and aggression by the vomeronasal organ. *Physiol Behav.* (37):655-657.
- McGill TE. 1962a. Reduction in “head-mounts” in the sexual behavior of the mouse as a function of experience. *Psychol. Rep.* (10): 284.
- McGill TE. 1962b. Sexual behavior in three inbred strains of mice. *Behaviour* (19): 341-350.
- Meisel RL, and Sachs BD. 1994. The physiology of male sexual behavior. In: Knobil E and Neill J (eds.) *Physiology of Reproduction*, 2nd edition. pp. 3–105. New York: Raven Press.
- Meredith M, O’Connell RJ. 1979. Efferent control of stimulus access to the hamster vomeronasal organ. *J. Physiol.* (286):301–16.
- Meredith M. 1986. Vomeronasal organ removal before sexual experience impairs male hamster mating behavior. *Physiol. Behav.* (36): 737-743.
- Michael RP. 1961. Observations upon the sexual behaviour of the domestic cat (*Felis catus* L.) under laboratory conditions. *Behaviour* (18): 1-24.
- Ming GL, and Song H. 2005. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* (28): 223–250.
- Moralí G, Beyer C. 1979. Neuroendocrine control of mammals estrous behavior. In: *Endocrine control of sexual behavior*. C. Beyer (Ed). New York, Raven Press. Pp: 33-71.
- Morshead CM, Reynolds BA, Craig CG, McBurney MW, Staines WA. 1994. Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron* (13):1071–82

- Mouret A, Gheusi G, Gabellec MM, De Chaumont F, Olivo-Marin JC and Lledo PM. 2008. Learning and survival of newly generated neurons: when time matters. *J. Neurosci.* (28): 11511–11516.
- Muscarella F, Fink B, Grammer K, and Kirk-Smith M. 2001. Homosexual Orientation in Males: Evolutionary and Ethological Aspects. *Neuroendocrinology letters* (22):393-400.
- Narita M, Kuzumaki N, Miyatake M, Sato F, Wachi H, Seyama Y, and Suzuki T. 2006. Role of delta-opioid receptor function in neurogenesis and neuroprotection. *J. Neurochem.* (97): 1494–1505.
- Newman SW. 1999. The medial extended amygdala in male reproductive behavior: A node in the mammalian social behavior network. *Annals of the New York Academy of Sciences* (877): 242–257.
- Nieuwenhuys R. 1998. Comparative neuroanatomy: place, principles and programme. In *The Central Nervous System of Vertebrates*, ed. R Nieuwenhuys, HJ ten Donkelaar, C Nicholson, pp. 273–326. Berlin: Springer-Verlag
- Nottebohm F, Arnold AP. 1976. Sexual dimorphism in vocal control areas of the songbird brain. *Science* 194(4261): 211-3.
- Nottebohm F, Nottebohm ME, Crane L. 1986. Developmental and seasonal changes in canary song and their relation to changes in the anatomy of song-control nuclei. *Behav Neural Biol* (46):445-47.
- Nottebohm F, Nottebohm ME. 1978. Relationship between song repertoire and age in the canary, *Serinus canarius*. *Z Tierpsychol* (46):298-305.
- Nottebohm F, Nottebohm ME. 1987. Seasonal changes in gonadal hormone levels of adult male canaries and their relation to song. *Behav Neural Biol.* 47(2): 197-211.
- Nottebohm F, O'Loughlin B. 1994. The life span of new neurons in a song control nucleus of the adult canary brain depends on time of year when these cells are born. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(17): 7849-53.
- Nottebohm F. 1989. From bird song to neurogenesis. *Sci Am* 260 (2): 74-9.
- Nunez-Parra A, Pugh V and Araneda RC. 2011. Regulation of adult neurogenesis by behavior and age in the accessory olfactory bulb. *Mol Cell Neurosci.*47(4):274-85.
- Nyby J, Whitney G, Schmitz S and Dizinni G. 1978. Postpubertal experience establishes signal value of mammalian sex odor. *Behav. Biol.* (22):545-552.

- Oboti L, Savalli G, Giachino C, De Marchis S, Panzica GC, Fasol A and Peretto P. 2009. Integration and sensory experience-dependent survival of newly-generated neurons in the accessory olfactory bulb of female mice. *Eur.J.Neurosci.* (29): 679–692.
- Oland LA and Tolbert LP. 1998. Glomerulus development in the absence of a set of mitral-like neurons in the insect olfactory lobe. *J. Neurobiol.* (36):41-52.
- Pankevich DE., Baum MJ, and Cherry JA. 2004. Olfactory sex discrimination persists, whereas the preference for urinary odorants from estrous females disappears in male mice after vomeronasal organ removal. *Journal of Neuroscience.* (24):9451–9457.
- Papes F, Logan DW, Stowers L. 2010. The vomeronasal organ mediates interspecies defensive behaviors through detection of protein pheromone homologs. *Cell.* (141):692–703.
- Paredes RG. 2009. Evaluating the neurobiology of sexual reward. *ILARJ.* (50): 15–27.
- Paredes RG. 2010. Hormones and sexual reward. *Vitam. Horm.* (82): 241–262.
- Paredes RG, and Agmo A. 1989. Stereospecific actions of baclofen on sociosexual behavior, locomotor activity and motor execution. *Psychopharmacology.* (97):358–364.
- Paredes RG, and Alonso A. 1997. Sexual behavior regulated (paced) by the female induces conditioned place preference. *Behav. Neurosci.* (111): 123-128
- Paredes RG and Martinez I. 2001. Naloxone blocks place preference conditioning after paced mating in female rats. *Behav. Neurosci.* (115). 1363–1367.
- Paredes RG, and Vázquez B. 1999. What do female rats like about sex? Paced mating. *Behav. Brain Res.* (105): 117-127.
- Parra GL, García HA, Ortiz VS, Pérez SD, Nájera RJ, Basurto AN, Espinoza CV, Rivas BR. 2009. Las diferencias anatómicas cerebrales que implican diferencias funcionales. *Rev Fac Med UNAM Vol. 52 No. 5*
- Peterson DA. 2002. Stem cells in brain plasticity and repair. *Curr Opin Pharmacol.* 2(1):34-42
- Petreanu L, Alvarez-Buylla A. 2002. Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: Role of olfaction. *The Journal of Neuroscience.* 22(14):6106-6113.
- Pfaus JG, Marcangione C, Smith WJ, Manitt C and Abillamaa H. 1996) Differential induction of Fos in the female rat brain following different amounts of vaginocervical stimulation: Modulation by steroid hormones. *Brain Res.* (741): 314-330.

- Pfeiffer CA y Johnston RE. 1994. Hormonal and behavioral responses of male hamsters to females and female odors: Roles of olfaction, the vomeronasal system, and sexual experience. *Physiology and Behavior* 55:129–138.
- Pomerantz SM., and Clemens LG. 1981. Ultrasonic vocalizations in male deer mice (*Peromyscus maniculatus bairdi*), their role in male sexual behavior. *Physiology and Behavior* (27):869–872.
- Portillo W, Paredes RG. 1998. Control neuronal de la conducta sexual masculina. En: *Biología de la Reproducción*. J. Velázquez (Ed). Universidad Metropolitana, Unidad Iztapalapa. Pp: 335-364.
- Portillo W, Unda N, Camacho FJ, Sánchez M, Corona R, Arzate DM, Díaz NF, Paredes RG. 2012. Sexual activity increases the number of newborn cells in the accessory olfactory bulb of male rats. *Front Neuroanat.* (6):25
- Powers JB and Winans SS. 1975. Vomeronasal organ: critical role in mediating sexual behavior in the male hamster. *Science.* (187):961–3.
- Ramon y Cajal S. 1913. *Degeneration and Regeneration of the Nervous System*. London: Oxford University Press; 1928. Trans. R. M. Day, from the Spanish.
- Rocheffort C, Gheusi G, Vincent JD y Lledo PM. 2002. Enriched odor exposure increases the number of newborn neurons in the adult olfactory bulb and improves odor memory. *The journal of Neuroscience.* (22):2679-2689
- Rocheffort C. y Lledo PM. 2005. Short-term survival newborn neurons in the adult olfactory bulb after exposure to a complex odor environment. *European Journal of Neuroscience.* (22):2863-2870
- Rodríguez-Manzo G. and Fernández-Guasti A. 1994. Reversal of sexual exhaustion by serotonergic and noradrenergic agents. *Behavioural Brain Research* (62):127–134.
- Ryba NJ and Tirindelli R. 1997. A new multigene family of putative pheromone receptors. *Neuron.* (19):371– 9.
- Sachs BD, Bialy M. 2000. Female presence during the postejaculatory interval facilitates penile erection and 22kHz vocalization in male rats. *Behav. Neurosci.* (114):1203-1208.
- Saito T. y Moltz H.1986. Copulatory behavior of sexually naive and sexually experienced male rats following removal of the vomeronasal organ. *Physiology and Behavior.* (37):507-510.

- Sakamoto M, Imayoshi I, Ohtsuka T, Yamaguchi M, Mori K and Kageyama R. 2011. Continuous neurogenesis in the adult forebrain is required for innate olfactory responses. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* (20): 8479–8484.
- Sargeant TJ, Miller JH, and Day DJ. 2008. Opioidergic regulation of astroglial / neuronal proliferation: where are we now? *J. Neurochem.* (107): 883–897.
- Scalia F, Winans SS.1976. New perspectives on the morphology of the olfactory system; Olfactory and vomeronasal pathways in mammals. In: Doty RL, ed. *Mammalian olfaction, reproductive processes and behavior*. New York: Academic Press. 7-28.
- Scalia F. Winans SS. 1975. The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals. *J. Comp. Neurol.* (161):31-55.
- Segovia A, Guillamón A. 1982. Effects of sex steroids on the development of the vomeronasal organ in the rat. *Brain Res.* (281):209-212.
- Segovia S, Guillamón A, Del Cerro MC. 1999. The development of brain sex differences: a multisignaling process. *Behav Brain Res.* (105): 69-80.
- Segovia S, Guillamón A. 1993. Sexual dimorphism in the vomeronasal pathway and sex differences in reproductive behaviors. *Brain Res Rev.* (18): 51-74.
- Shepherd GM. 2006. Behavior: Smells, brains and hormones. *Nature.* (439):149-151.
- Sherry DF. 2006. Neuroecology. *Annu. Rev. Psychol.* (57):167-97.
- Shingo, T. 2003. Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin. *Science* (299): 117–120.
- Shiosaka S, Sakanaka M, Inagaki S, Senba E, Hara Y, Takatsuki K, Takagi H, Kawai Y, Thohyama M. 1983. Putative neurotransmitters in the amygdaloid complex with special reference to peptidergi pathways. En: *Chemical Neuroanatomy*. PC. Emson (Ed). Raven Press, New York. Pp: 359-389.
- Shiple MT, McLean JH y Ennis M. 1995. Olfactory system. En: Paxinos G (Ed). *The Rat Nervous System*. Academic Press, NY. Pp 899-921.
- Shiple MT. 2004. Olfactory System. In: *The rat nervous system*. 3° Edition (Paxinos, G. Ed) 1328. Sydney, Australia. Prince of Wales Medical Research Institute. The University of New South Wales.
- Shors TJ, Miesgaes G, Beylin A, Zhao M, Rydel T and Gould E. 2001. Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories, *Nature.* (410): 372–376.
- Spritzer MD, Weinberg A, Viau V, Galea LA. 2009. Prior sexual experience increases hippocampal cell proliferation and decreases risk assessment behavior in response to acute predator odor stress in the male rat. *Behav Brain Res.* 200(1):106-12.

- Spritzer MD, Meikle DB, Solomon NG. 2005. Female choice based on male spatial ability and aggressiveness among meadow voles. *Anim. Behav.* (69):1121–30
- St John JA, Clarris HJ, McKeown S, Royal S and Key B. 2003. Sorting and convergence of primary olfactory axons are independent of the olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.* (464):131-140.
- Stern JJ. 1969. Responses of male rats to sex odors. *Physiology and Behavior.* (5):519-524.
- Stowers L, Holy TE, Meister M, Dulac C, and Koentges G. 2002. Loss of sex discrimination and male–male aggression in mice deficient for TRP2. *Science.* (295):1493–1500.
- Strausfeld NJ. 1976. *Atlas of an Insect Brain.* Heidelberg:Springer.
- Striedter GF. 2005. *Principles of Brain Evolution.* Sunderland, MA: Sinauer Assoc. Natl. Acad. Sci. USA. (80):2390-2394.
- Sugai T, Yoshimura H, Kato N, Onoda N. 2006. Component-dependent urine responses in the rat accessory olfactory bulb. *Neuroreport* (17):1663–1667.
- Tanapat P, Hasting NB, Reeves AJ and Gould E. 1999. Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. *Journal Neuroscience.* 19(14):5792-5801
- Taupin P. 2005. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system: functionality and potential clinical test. *Medical Science Monitor.* 11(7): 247-252.
- Taupin P. 2007. BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: paradigms, pitfalls, limitations, and validation. *Brain Research Reviews.* (53):198-214.
- Tinbergen N. 1963. On aims and methods of ethology. *Zeitschr. Tierpsychol.* 20:410–33
- Valenstein ES, and Goy RW. 1957. Further studies of the organization and display of sexual behavior in male guinea pigs. *J. Comp. Physiol. Psychol.* (50): 115- 119.
- Valverde F. 2003. El bulbo olfativo: un modelo para estudios experimentales. *Neurobiología.* 18(4):177-186.
- Von Campenhausen H., Mori K. 2000. Convergence of segregated pheromonal pathways from the accessory olfactory bulb to the cortex in the mouse. *Eur. J. Neurosci.* (12):33–46.
- Whitman MC and Greer CA. 2009. Adult neurogenesis and the olfactory system. *Progress in Neurobiology* (89): 162–175.
- Winans SS, Powers JB. 1977. Olfactory and vomeronasal differentiation of male hamsters: histological and behavioral analyses. *Brain. Res.* (126):325-344.

- Winner B, Cooper-Kuhn CM, Aigner R, Winkler J and Kuhn HG. 2002. Long-term survival and cell death of newly generated neurons in the adult rat olfactory bulb. *Eur.J.Neurosci.* (16): 1681–1689.
- Wysocki CJ. 1979. Neurobehavioral evidence for the involvement of the vomeronasal system in mammalian reproduction. *Neurosci Biobehav Rev.* Winter; 3(4):301-41.
- Wysocki CJ, Wellington JL and Beauchamp GK. 1980. Access of urinary nonvolatile to the mammalian vomeronasal organ. *Science* (207):781-783.
- Wysocki CJ, Katz Y and Bernhard R. 1983. Male vomeronasal organ mediates female-induced testosterone surges in mice. *Boil. Reprod.* (28):917-922.
- Wysocki CJ and Lepri JJ. 1991. consequences of removing the vomeronasal organ. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* (39):661-669.
- Xu F., Schaefer M., Kida I., Schaefer J., Liu N., Rothman D., Hyder F., Restrepo D., Shepherd G. 2005. Simultaneous activation of the mouse main and accessory olfactory bulbs by odors or pheromones. *J. Comp. Neurol.* (489):491–500.
- Yamaguchi M and Mori K. 2005. Critical period for sensory experience-dependent survival of newly generated granule cells in the adult mouse olfactory bulb. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (102): 9697–9702.
- Yoshikage M, Toshiaki I, Seiichi K, Nobuo K, and Nishimura M. 2007. Sex steroids modulate the signals from volatile female odors in the accessory olfactory bulb of male mice. *Neurosci. Lett.* (413): 11–15.
- Zucker I and Wade G. 1968 Sexual preferences of male rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* (66):816–819.