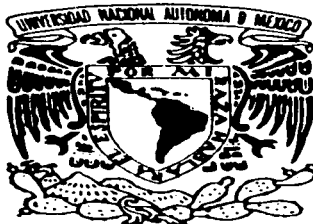


11281
9

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONÓMA DE MÉXICO



INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

Efecto del bloqueo de la aromatización y de los receptores a andrógenos sobre la diferenciación sexual cerebral y conductual en ratas.

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
Doctor en Ciencias Biomédicas**

P R E S E N T A

Emilio Domínguez Salazar

TUTOR: Dr. Raúl Gerardo Paredes Guerrero

Querétaro, Qro.

Febrero de 2003

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**TESIS
CON
FALLA DE
ORIGEN**

ÍNDICE

Resumen	1
Abstract	2
CAPITULO I. Conducta Sexual	3
Descripción de la conducta sexual	3
Machos	3
Hembras	5
Control neuronal de la conducta sexual masculina	5
Sistema de proyección vomeronasal	5
Órgano vomeronasal	6
Bulbo olfatorio accesorio	7
Amígdala	8
Núcleo de la cama de la estría terminal	8
Área preóptica medial	9
Tegmento dorsolateral o Campo central Tegmental	11
Control endocrino de la conducta sexual masculina	12
Control endócrino de la conducta sexual femenina	14
Regulación neuronal de la conducta sexual femenina	17
CAPITULO II. Diferenciación sexual	21
Hipótesis de la aromatización	23
Bases bioquímicas de la diferenciación sexual	27
Diferencias sexuales en la morfología y función neuronal	31
Dimorfismo sexual en conductas no reproductivas	33
CAPITULO III. Objetivos y metodología	36
Hipótesis	37
Objetivo General	37
Objetivos Particulares	37
Metodología general	39
Pruebas de conducta coital femenina	41
Pruebas de conducta coital masculina	41
Preferencia olfatoria	42
Preferencia sexual	42
Pruebas de cópula regulada ("pacing")	43
Condicionamiento de preferencia de lugar	45
Cirugías	46
Análisis estadístico	46
CAPITULO IV. Trabajo experimental	48
Experimento 1	45
Experimento 2	73
Experimento 3	195
Experimento 4	110
Experimento 5	120
CAPITULO V. Discusión general	126
CAPITULO VI. Conclusiones	138
Referencias	143

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESUMEN

Efecto del bloqueo de la aromatización y de los receptores de andrógenos sobre la diferenciación sexual cerebral y conductual en ratas.

Durante un periodo perinatal crítico, los andrógenos y sus metabolitos estrogénicos actúan sobre el desarrollo del sistema nervioso central alterando en forma permanente su estructura y función. Durante este periodo se establecen las vías neuronales que determinan la conducta sexual, la preferencia sexual y olfatoria, así como la respuesta a feromonas. En este trabajo se estudiaron los mecanismos implicados en la diferenciación sexual de dichos procesos modificando el ambiente hormonal durante el periodo sensible, utilizando flutamida (bloqueador de los receptores de andrógenos) o ATD (inhibidor de la aromatización, conversión de andrógenos a estrógenos). Nuestros resultados sugieren la participación de los estrógenos en la organización de una conducta típicamente femenina, la lordosis, tanto de hembras como de machos, así como en el establecimiento de la preferencia olfatoria en machos y de las propiedades aversivas de la cópula en hembras. Por su parte los andrógenos participan en la organización de la preferencia olfatoria y en el establecimiento de la mayor parte de las características de la cópula en machos. Finalmente, postulamos que la organización de la preferencia sexual, de la conducta coital masculina y la respuesta neuronal a feromonas femeninas depende de manera redundante tanto de los andrógenos como de los estrógenos durante el periodo crítico de diferenciación sexual.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ABSTRACT

Effect of aromatization and androgen receptors blockade on brain and behavioral sexual differentiation in rats.

During a critical perinatal period, androgens and their estrogenic metabolites act on the developing central nervous system by permanently altering its structure and function. During this period, the neuronal pathways for sexual behavior, partner, olfactory preferences, and response to pheromones, are established. The sexual differentiation of these processes was studied in this thesis. The hormonal environment during the sensitive period was modified by flutamide (an androgen receptor blocker) or ATD (an aromatase inhibitor, block conversion of androgen to estrogen). Our results suggest that estrogens are involved in the organization of a typical feminine behavior, lordosis, in females and males. Estrogens also participate in males' olfactory preference and in the induction of aversive properties of mating in females. The androgens are involved in the organization of olfactory preference and in some characteristics of mating in males. Finally, we postulate that androgens and estrogens establish the organization of partner preference, masculine coital behavior and the neuronal responses to feminine pheromones in a redundant way during the critical period of sexual differentiation.

TESIS CON
FALLA DE JUREN

CAPÍTULO I. CONDUCTA SEXUAL

Las conductas reproductivas son las más importantes dentro del gran conjunto de conductas sociales, ya que sin ellas no se podrían perpetuar las especies, e incluyen el cortejo, la cópula, las conductas maternas y paternas y algunas formas de conducta agresiva. En este trabajo el término conducta sexual se utiliza para referirse a la conducta coital (cópula) y ocasionalmente también a las conductas de cortejo o precopulatorias.

Este capítulo describe la conducta sexual y el papel que tienen las hormonas esteroides para su expresión. Se revisan las estructuras cerebrales que se han involucrado en el mantenimiento y expresión de dicha conducta y las estructuras involucradas en la detección de señales olfatorias sexualmente relevantes (feromonas).

Descripción de la Conducta Sexual.

Machos

El comportamiento sexual en los mamíferos macho depende de la expresión de al menos dos mecanismos: uno motivacional que lleva al individuo a la búsqueda y al inicio de la interacción con la pareja (Fig. 1A) y un mecanismo consumatorio o de ejecución que le permite llevar a cabo dicha interacción (Fig. 1.1: B, C y D) (para revisión de estos términos ver, Beach, 1956). La mayoría de los estudios en este campo se concentran en los aspectos relacionados con la ejecución de la conducta copulatoria, es decir en el estudio de los patrones motores fácilmente identificables. El patrón copulatorio de la rata macho está compuesto de secuencias de montas e intromisiones que culminan con la eyaculación (Meisel y Sachs, 1994). En la monta, el macho abraza con sus miembros anteriores los flancos de la hembra y presenta movimientos pélvicos de empuje. Esta conducta finaliza cuando el macho la desmonta lentamente (Fig. 1.1B). La intromisión es una monta con movimientos pélvicos más prolongados y profundos, luego de lo cual el macho desmonta a la hembra, rápida y bruscamente. En la mayoría de las investigaciones sobre conducta copulatoria se presupone que el patrón de intromisión va acompañado de penetración vaginal. La eyaculación es una intromisión que termina con un movimiento pélvico profundo e intenso, mantenido por algunos segundos (Fig. 1.1D). El acto de desmontar a la hembra es lento y se caracteriza por un movimiento lateral de las patas delanteras. La expulsión de líquido seminal y espermatozoides está asociada con

contracciones espasmódicas de los músculos esqueléticos, especialmente de la cadera, la región perineal así como de los cuartos delanteros y traseros, así como de la musculatura lisa de las vesículas seminales y cuagulativas y de la próstata. Durante la conducta copulatoria el macho puede presentar o no montas, y el número de intromisiones varía entre 7 y 15 antes de eyacular. Un macho sexualmente experto puede eyacular en menos de 10 minutos después de este acto de copular que se presenta con una hembra receptiva, completando así una serie eyaculatoria. La eyaculación es seguida por un período refractario, denominado intervalo posteyaculatorio, en el que el macho entra a una etapa de inactividad sexual y autoacicalamiento genital, donde comúnmente permanece echado lejos de la hembra. Este período dura de 4 a 6 minutos después de la primera eyaculación y se prolonga de 1-2 minutos más con cada eyaculación sucesiva de manera regular. Después del período refractario, el animal puede reiniciar la cópula. (Larsson, 1956; Meisel y Sachs, 1994). El patrón copulatorio no parece ser sensible a alteraciones sensoriales. La privación del olfato, la visión y la sensibilidad de la piel en la cara de la rata no alteran la conducta de la rata en forma importante (Beach, 1942a). Por ejemplo, la anosmia producida por lesiones del bulbo olfatorio, la ceguera producida al cortar los nervios ópticos, así como la sordera, no afectan la copulación en ratas que han tenido cuando menos la experiencia de una serie copulatoria (Larsson, 1975).

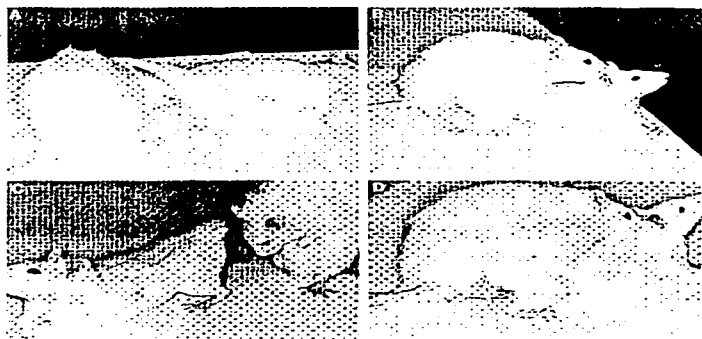


Figura 1.1. Conducta sexual en ratas. Conducta precopulatoria: Un macho investiga la región perineal de la hembra (A). Conducta copulatoria: si la hembra esta en estro, el macho la monta tomándola por los flancos traseros (B), esta es la misma posición que adopta cuando existe intromisión, la diferencia conductual con la monta estriba en que al realizarse la desmonta, ésta se realiza de manera brusca. Después de ser desmontada, la hembra permanece en lordosis por 1-2 segundos (C). Después de 7-15 intromisiones el macho eyacula (D). Tomada de Bakker (1996).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Hembras

La conducta sexual femenina se caracteriza por al menos cuatro conductas típicas, 3 son de proceptividad y una de receptividad. Las de proceptividad son movimientos muy rápidos de las orejas (ear wiggling), saltos (hopping) y carreras cortas (darting), estos movimientos se llevan a cabo para llamar la atención del macho, aumentar su motivación y así inducir la cópula. La conducta de receptividad se denomina lordosis (Fig. 1.1C) y es una posición que facilita la penetración del pene a la vagina. Se caracteriza porque al momento de ser montada, la hembra levanta los cuartos traseros para exponer la vagina.

Además de las conductas proceptivas y receptivas hay otro factor que influye en la interacción de las hembras con los machos: la atractividad, es decir, qué tanto es atractiva la hembra para el macho. Que el macho sea sexualmente atraído hacia la hembra depende tanto de la habilidad de esta para atraer a un macho (conductas proceptivas) como del olor emanado de su vagina. Durante la fase de estro, la rata emana un olor particular que la hace más atractiva (Meyerson y Lindstrom, 1973; Beach, 1976). La atractividad de una hembra no depende exclusivamente de sus niveles hormonales ya que a pesar de que varias hembras se encuentren en la fase estral, solamente algunas serán preferidas por los machos sin importar que todas tengan el mismo nivel de receptividad (Beach, 1976).

Control Neuronal de la Conducta Sexual Masculina

Sistema de proyección vomeronasal

Actualmente se conocen los sistemas neuronales determinantes para el procesamiento de señales quimiosensoriales sexualmente relevantes. Se ha descrito que el órgano vomeronasal (OVN) tiene un papel fundamental en la expresión de la conducta copulatoria. En los roedores la atracción de la hembra depende de secreciones vaginales, las cuales son detectadas por el OVN del macho (Powers y Winans, 1975).

Después de que los receptores del OVN detectan las señales feromonales relevantes para la conducta reproductiva la información es enviada a los somas que se encuentran en el bulbo olfatorio accesorio (BOA). En el BOA se realiza un relevo con neuronas que proyectan a los núcleos anteromedial y posterocortical de la amígdala media (AMG), y al núcleo de la cama de la estria terminal (NCET) (Scalia y Winans, 1975; de Olmos et al., 1978; Shipley y Adamek, 1984).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los núcleos anteromedial y posterocortical de la AMG envían proyecciones a otros núcleos, de las cuales las más importantes son las establecidas con el núcleo amigdaloides posterior y con el área preóptica medial (APM) (Rao et al., 1987). A este sistema se le conoce como el sistema o circuito de proyección vomeronasal o sistema olfatorio accesorio (Fig. 1.2) y es sexualmente dimórfico (Segovia y Guillamón, 1993; Guillamón y Segovia, 1997). A continuación se describe cada una de las estructuras que forman dicho circuito, ya que cada una participa de alguna manera en la regulación de la conducta sexual masculina. Se hace especial énfasis en el APM ya que es una de las estructuras más importantes en la expresión de dicha conducta.

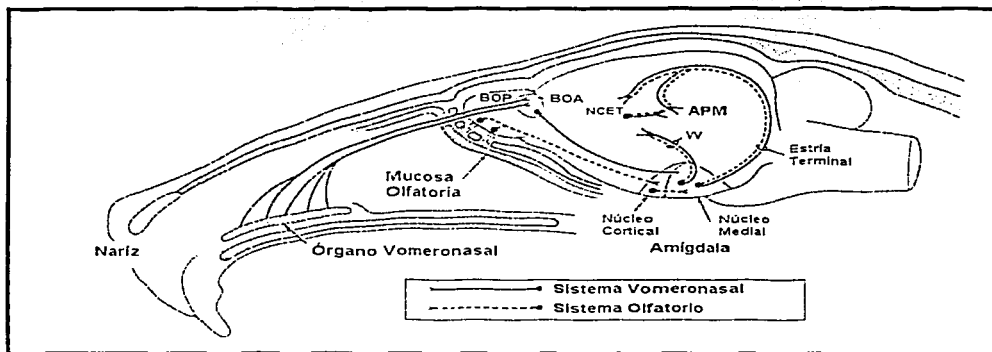


Fig. 1.2 Sistema de proyección vomeronasal. El sistema que participa en la detección de señales quimiosensoriales sexualmente relevantes inicia con el órgano vomeronasal, el cual transmite esta información al bulbo olfatorio accesorio (BOA), que establece conexiones directas con la amígdala (AMG). Esta establece conexiones tanto con el núcleo de la cama de la estria terminal (NCET), como con el área preóptica medial (APM) a través de la vía estriatal y sólo con el APM por la vía ventral (VV). En el esquema también se observa la vía que sigue la detección de olores propiamente dichos, que son detectados por la mucosa olfatoria que conecta directamente con el bulbo olfatorio principal (BOP). (Adaptado de Baum, 1992).

Órgano vomeronasal (OVN)

El OVN es un quimiorreceptor fusiforme que se encuentra localizado bilateralmente en la parte ventral del septum nasal. La interacción de las señales quimiosensoriales sexualmente relevante o feromonas con este quimiorreceptor en el epitelio neurosensorial vomeronasal modifica la secreción de gonadotropinas, las cuales influyen en la pubertad, el ciclo estral, la gestación y en la conducta sexual tanto masculina como femenina (Fleming y Rosenblatt, 1974; Saito y Moltz,

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1986a, 1986b). Las feromonas también están involucradas en la mediación de la atractividad sexual (Halpern, 1987; Romero et al., 1990) y parecen estar fuertemente relacionadas con la inhibición del cuidado paterno mostrado por ratas macho (Mennella y Moltz, 1988). Cuando a ratas macho sexualmente expertas se les remueve el órgano vomeronasal se observa un aumento en la latencia de intromisión y en la latencia de eyacuación, así como un mayor número de montas. Fuera de estas alteraciones todos los machos que han copulado son capaces de eyacular (Saito y Moltz, 1986a).

Bulbo olfatorio accesorio (BOA)

El bulbo olfatorio accesorio es una estructura que descansa en la porción dorsocaudal del bulbo olfatorio mayor. El nervio vomeronasal (nervio terminal, par craneal 0 (Fuller y Burger, 1990)) transmite información desde el OVN al glomérulo del BOA (Barber y Raisman, 1974; Scalia y Winans, 1975). El BOA tiene proyecciones directas a la AMG media, específicamente a los núcleos corticales medial y posterior al núcleo de la cama de la estria terminal y al núcleo de la cama del tracto olfatorio accesorio. Las neuronas del BOA expresan receptores de estrógenos y andrógenos (Shughrue et al., 1997), los cuales pueden ser modulados directamente por hormonas circulantes. El desarrollo del bulbo olfatorio accesorio está también influido por andrógenos (Roos et al., 1988) ya que aunque el BOA es significativamente más grande en la rata macho que en la hembra, si el macho es castrado tempranamente durante el desarrollo, tiene un BOA de tamaño similar al de la hembra (Segovia y Guillamon, 1996).

En los primeros trabajos en los cuales se lesionaron los bulbos olfatorios, tanto el principal como el accesorio, se observaron déficit conductuales, que fueron atribuidos únicamente a la anosmia, sin embargo es difícil distinguir los efectos provocados por la remoción del sistema olfatorio principal de aquellos provocados al lesionar el sistema olfatorio accesorio (ver, por ejemplo: Larsson, 1975; Meisel et al., 1982). Actualmente está bien documentado que los bulbos olfatorios, además de su papel olfatorio, tienen importantes funciones integrativas (Cain, 1974). En particular, el BOA está implicado en la agresión (Kolunje y Stern, 1995), la regulación de la temperatura (Kikusui et al., 2001), en el aprendizaje y memoria olfativa (Taylor y Keverne, 1991). Tiene, además, funciones endócrinas y, en la rata macho, parece estar relacionado con la inhibición de la conducta sexual femenina (Schaeffer et al., 1986). Además lesiones con lidocaína del BOA, reducen las frecuencias y aumentan las latencias de monta, intromisión y eyacuación, así como disminuyen la preferencia sexual por la hembra (Hurtazo y Paredes, resultados sin publicar).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

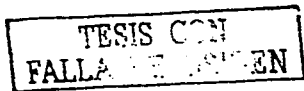
Amígdala (AMG)

La amígdala se localiza en la porción medial del lóbulo temporal, colinda con la parte final rostral de la formación del hipocampo y el límite anterior del asta temporal del ventrículo lateral (Price et al., 1987). La amígdala está involucrada en una gran variedad de conductas y funciones reguladoras. Estas incluyen la emoción, memoria, la modulación de los sistemas autónomos y neuroendócrinos y en conductas sociales como la reproducción y la agresión (Price et al., 1987).

El papel de la amígdala en el control de la copulación en roedores ha sido estudiado lesionando dos regiones: la amígdala corticomedial (circundando los núcleos corticales y mediales) y la amígdala basolateral, que incluye la región de los núcleos laterales y basales. La amígdala media es el blanco de la vía vomeronasal cuyas neuronas presentan receptores tanto para los andrógenos como para los estrógenos (Stumpf y Sar, 1982; Simerly et al., 1990). Las lesiones en la amígdala basolateral no tienen efectos importantes sobre la conducta copulatoria en ratas macho (Harris y Sachs, 1975) ni en hámster (Lehman y Winans, 1982). Por el contrario, las lesiones en la amígdala corticomedial sí tienen efectos en la conducta sexual tanto de ratas como de hámsters. Giantonio, Lund y Gerall (1970) fueron los primeros en demostrar que la lesión de la amígdala corticomedial puede alterar la copulación en las ratas macho. Los machos lesionados tienen latencias de eyaculación muy largas y pocas eyaculaciones. Los efectos sobre la conducta copulatoria de los machos lesionados en la amígdala corticomedial están en función de las condiciones hormonales de las ratas hembras, ya que si se usan en el experimento hembras tratadas únicamente con estradiol se observa un aumento de las latencias de eyaculación y en las frecuencias e intervalos de intromisión (Peirce y Nuttall, 1961). Cuando se usan hembras tratadas con estradiol más progesterona no se observan diferencias en la conducta sexual de las ratas lesionadas con respecto a las control. Los resultados de estos experimentos aún no están bien explicados, se había propuesto que la amígdala al recibir información de los nervios sensoriales de la región genital (Carrer, 1978), una sensibilidad genital inadecuada pudiera influir en la inhibición de la conducta, sin embargo, esto depende de la vía tálamo - corteza sensorial.

Núcleo de la cama de la estría terminal (NCET)

En 1923 Johnston describió el NCET como una estructura del cerebro anterior que es una masa prominente de materia gris rostral al núcleo olfatorio y caudal a ciertos componentes del complejo amigdaloides (Citado en Allison, 1953). Algunos autores han considerado que el núcleo de la cama de la estría terminal es una extensión de la amígdala (Allison, 1953).



EL NCET está involucrado en aspectos fisiológicos y conductuales de la reproducción. Lesiones del NCET y de la misma estría terminal generan déficit copulatorios en las ratas aumentando el número de intromisiones precedentes a la eyaculación, el intervalo entre intromisiones y consecuentemente la latencia de eyaculación (Giantonio et al., 1970). Los efectos de las lesiones en el NCET son muy similares a los generados mediante lesiones en la amígdala corticomedia, lo cual sugiere que el NCET sirve principalmente para el relevo de información desde la amígdala a otras áreas como son el núcleo medial preóptico (Benjamin et al., 1982).

El NCET y la amígdala corticomedia están principalmente involucrados en el mantenimiento de la conducta copulatoria y en la ejecución de la eyaculación. Aparentemente también integran el sistema neuronal que controla parcialmente la iniciación de la conducta de copula y el reinicio de la conducta copulatoria después de la eyaculación (Emery y Sachs, 1976).

Área preóptica medial (APM)

El APM se localiza entre la porción caudal del quiasma óptico y la comisura anterior, tiene como borde rostral y caudal a la lámina terminal y la división media del NCET respectivamente. El APM forma conexiones con varias regiones cerebrales. Se han identificado conexiones recíprocas (tanto aferentes como eferentes) entre el APM y el septum lateral, el NCET, la amígdala medial, varios núcleos hipotalámicos (incluidos el lateral, paraventricular, ventromedial y arcuato), el giro central, el núcleo del rafé (dorsal y medio), el área ventral tegmental y el núcleo del tracto solitario (Conrad y Pfaff, 1976b, 1976a; Chiba y Murata, 1985; Simerly y Swanson, 1986, 1988). Otras eferentes importantes del APM llegan a todas las regiones de la zona periventricular del hipotálamo, núcleo accumbens, caudado putamen, pálido ventral y el núcleo tegmental dorsolateral (Simerly y Swanson, 1986, 1988).

Dado que el APM forma diversas conexiones neuronales con una gran cantidad de regiones del cerebro, se explica porque esta implicada en diversas funciones como son: la regulación endócrina de la liberación de gonadotropinas, la liberación de prolactina, la termorregulación, la sed hipovolémica así como el control de la conducta materna y sexual masculina (Conrad y Pfaff, 1976a; Chiba y Murata, 1985; Simerly y Swanson, 1986, 1988; Paredes y Baum, 1997). En el control de la conducta sexual masculina se encuentran involucradas vías aferentes al APM desde el órgano vomeronasal, las cuales transportan información quimiosensorial directa (Larriva-Sahd et al., 1993) y vía el BOA, la AMG medial y la porción encapsulada del NCET (Scalia y Winans, 1975).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A pesar de que lesiones de diferentes estructuras cerebrales pueden afectar de alguna forma la expresión del patrón copulatorio, las evidencias descritas demuestran que el área preóptica medial es la estructura más importante en el control de la conducta sexual masculina. Lesiones electrolíticas bilaterales del APM alteran la conducta sexual en la rata macho mientras que las lesiones unilaterales en la misma región carecen de efecto (Lisk, 1968). Cuando las lesiones son pequeñas, la alteración de la conducta sexual es temporal pero cuando la lesión es suficientemente grande, la conducta sexual desaparece por completo (Heimer y Larsson, 1964, 1966/1967) (Heimer, 1966/1967). Las alteraciones conductuales no dependen de un sólo tipo de lesión ya que los efectos se observan con lesiones producidas por la aplicación de ácido iboténico (Hansen et al., 1982), radiofrecuencia (Lupo et al., 1983) y cortes con cuchillo (Szechtman et al., 1978). Más aún, efectos similares producidos por la lesión del APM se han descrito en diferentes especies como son: pollos, ranas, ratones, hámsteres, cabras, gatos, perros y monos (Larsson, 1979; Hart y Leedy, 1985; Meisel y Sachs, 1994).

Por otro lado, las deficiencias en la conducta sexual producidas por lesiones bilaterales del APM no se asocian con alteraciones del eje hipófisis-gónadas o alteraciones de los mecanismos de crecición o eyaculación (Heimer y Larsson, 1966/1967; Lisk, 1968; Lupo et al., 1983; Stefanick y Davidson, 1987). Los tratamientos con testosterona y los procedimientos que inducen conducta sexual en ratas poco activas sexualmente (reemplazo de la hembra, manipulación del macho, choques eléctricos al macho) no restablecen la conducta sexual en ratas con lesiones en el APM (Heimer y Larsson, 1966/1967; Lisk, 1968; Caggiula et al., 1974; Stefanick y Davidson, 1987). Las deficiencias conductuales producidas por la lesión parecen ser permanentes, ya que no se ha detectado recuperación de la conducta en animales aún 8 meses después de la lesión (Ginton y Merari, 1977).

Se han planteado diferentes hipótesis para tratar de explicar los mecanismos por los que la lesión del APM afecta la conducta sexual. Las ratas macho entrenadas para responder instrumentalmente y obtener acceso a una hembra receptiva, dejan de copular pero siguen mostrando la respuesta instrumental después de lesionar el APM (Everitt y Stacey, 1987). Se han descrito resultados similares usando el paradigma de preferencia sexual o el de preferencia de lugar. Utilizando estos procedimientos se ha demostrado que los animales con lesiones en el APM prefieren la compañía de una hembra receptiva o estar donde ésta estuvo, sugiriendo que el APM está involucrada en las respuestas motoras y no en las motivacionales relacionadas con la conducta sexual (Hughes et al., 1990). Otros estudios que apoyan esta hipótesis, han demostrado que animales con lesiones en el APM muestran interés por la hembra y despliegan montas incompletas (Hansen,

TESIS CON
FALLA DE CUBIEN

1982). Más aún, monos *rhesus* lesionados en el APM no despliegan conducta copulatoria pero se masturban y aprietan la palanca para obtener la compañía de una hembra (Sлимп et al., 1978).

Aunque los datos arriba descritos demuestran que la ausencia de la conducta sexual en animales con lesiones en el APM se debe a alteraciones relacionadas con la ejecución de la conducta, existen también datos que sugieren que al lesionar el APM se producen alteraciones en los mecanismos motivacionales. Por ejemplo, se ha demostrado que los animales con lesiones en el APM muestran menor preferencia por una hembra receptiva que los animales control. Esta disminución en la preferencia se acentúa aún más al aumentar el tiempo de prueba después de la lesión, sugiriendo que la conducta desaparece por una reducción en la motivación sexual (Edwards y Einhorn, 1986). La cópula asociada a la estimulación y la inducción de la conducta sexual en animales no copuladores producida por el kindling (un modelo de plasticidad neuronal en el que estimulaciones subumbrales en algunas regiones cerebrales inducen convulsiones tónico-clónicas semejantes a la epilepsia) facilitan los aspectos motivacionales de la conducta sexual (Madlafousek et al., 1970; Paredes et al., 1990).

La tercera hipótesis sugiere que el APM está involucrada tanto con los mecanismos de la ejecución como con los de la motivación de la conducta sexual masculina. Por ejemplo, algunas ratas con lesiones en el APM despliegan algunas montas e intromisiones pero no eyaculan (Ginton y Merari, 1977). Cuando se realizan cortes dorsales y sagitales de las fibras que llevan información del o hacia el APM, se producen alteraciones conductuales diferenciales relacionadas tanto con la ejecución como con el inicio de la conducta respectivamente (Szechtman et al., 1978). La estimulación eléctrica del APM (Merari y Ginton, 1975) y la infusión de bicuculina en esta región (Fernandez-Guasti et al., 1985) reduce el número de intromisiones, la latencia de eyaculación y el intervalo posteyaculatorio, y aumenta el número de eyaculaciones en el tiempo de prueba.

Tegmento dorsolateral o Campo central tegmental (TDL)

Esta estructura está estrechamente involucrada en la expresión de la conducta sexual; al ser lesionada bilateralmente se provoca una inhibición completa de la conducta sexual masculina en las ratas machos (Giordano et al., 1998) que no es debida a alteraciones motoras (Brackett y Edwards, 1984). El hecho de que las lesiones en el TDL simulen las lesiones en el APM hizo pensar que ambas estructuras formaran parte de un mismo circuito, Brackett y Edwards (1984) lesionaron contralateralmente las dos estructuras corroborando dicha hipótesis, ya que los machos lesionados de esta manera no presentaron conducta sexual masculina.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los mecanismos por los cuales la lesión del TDL abate la conducta sexual podrían incluir la inhibición generalizada de conductas precopulatorias, sociales y de exploración (Giordano et al., 1998), sin que las conductas motivacionales estuvieran involucradas. Esto está fundamentado en el hecho de que en los machos expuestos a feromonas femeninas no se activa el TDL, mientras que cuando el macho copula se observa un aumento en la actividad de esta área (Bressler y Baum, 1996). Por lo que se ha postulado que el TDL participa en los mecanismos ejecutorios de la conducta sexual.

Control Endócrino de la Conducta Sexual Masculina

Desde hace tiempo se ha relacionado la aparición de la conducta copulatoria con el desarrollo completo de las glándulas sexuales, por lo que desde un principio se pensó que esas glándulas secretaban algún factor que estimulaba la aparición de dicha conducta a través de efectos periféricos (e.g., crecimiento del pene y la sensibilización de los genitales externos). El primer experimento formal en endocrinología fue el realizado por Berhold en 1848. Él observó que la castración provocaba que el gallo no desarrollara sus características típicamente masculinas y que la reimplantación o trasplante de los testículos en la cavidad abdominal inducía la diferenciación hacia el fenotipo masculino. Cuando los esteroides naturales pudieron sintetizarse, se pudo comprobar que las inyecciones subcutáneas de testosterona restauraban la conducta sexual de una rata macho castrada. Normalmente la testosterona es secretada por las células de Leydig en los testículos, y actualmente este esteroide ha sido implicado en el desarrollo y despliegue de la conducta sexual masculina en todas las especies pertenecientes a los mamíferos, incluyendo los primates humanos y no humanos. Varios estudios han sugerido que la testosterona activa la conducta sexual como resultado de sus acciones intracelulares en diferentes sitios del cerebro anterior, de la médula espinal y del pene. El primer trabajo que demostró que las hormonas esteroides actuaban en el cerebro fue el de Harris y Michel en 1958, ellos implantaron cristales de estrógenos en el hipotálamo de una gata y observaron que su conducta sexual femenina aumentaba. La demostración de que las hormonas actuaban directamente en el cerebro para inducir conducta sexual se extendió a los machos y a otras especies. Davidson (1966) y Johnston y Davidson (1972), por ejemplo, demostraron que el propionato de testosterona implantado en el área preóptica medial / hipotálamo anterior era capaz de restaurar la conducta sexual de ratas macho castradas. Esos y otros resultados permitieron afirmar que la testosterona además de tener efectos sobre los órganos sexuales accesorios, tienen también

efectos centrales. Sin embargo, esos estudios también mostraron que la testosterona administrada centralmente no prevenía la atrofia del pene, lo que ocasionaba que el patrón sexual no se manifestara correctamente. Por lo tanto, la acción periférica y la central de la testosterona son necesarias para la correcta expresión de la conducta sexual. Sin embargo, en la década de los setentas se descubrió un potente metabolito de la testosterona, la 5α -dihidrotestosterona (DHT). Este metabolito es capaz de inhibir la atrofia periférica que la testosterona por si misma es incapaz de prevenir (Wilson y Gloyne, 1970), pero la DHT no inducía conducta sexual masculina (Davis y Barfield, 1979).

Por otro lado, Ryan y cols. (1972) y varios más (ver sección hipótesis de la aromatización en el capítulo siguiente) demostraron que la testosterona se biotransformaba a estradiol en el tejido cerebral de la rata macho lo que sugirió que la testosterona pudiera tener su efecto central a través de su conversión a estradiol. Esta hipótesis de la aromatización fue probada con éxito para explicar los efectos "paradójicos" del estradiol sobre la diferenciación cerebral y conductual masculina (ver capítulo 2). Sin embargo, otra hipótesis de la aromatización fue probada para explicar la razón por la cual los bloqueadores a andrógenos no eliminaban completamente la conducta sexual masculina (Beach y Westbrook, 1968). Se demostró que la testosterona actuaba al biotransformarse a DHT en la periferia y en estradiol en el sistema nervioso central ya que la administración conjunta de DHT y estradiol (Baum y Vreeburg, 1973; Larsson et al., 1973; Christensen y Clemens, 1974) era capaz de restaurar la conducta sexual en machos castrados, y que inyecciones sistémicas o centrales de estradiol eran capaces de restaurar la conducta sexual en las ratas castradas pocos días antes del tratamiento (Sodersten, 1973). Es decir, al comparar el efecto de la administración de DHT y de la testosterona a ratas castradas se observó que el tratamiento con 125 μ g de DHT durante 8 días no estimuló la conducta sexual de los sujetos, en tanto que una dosis similar de testosterona estimuló la actividad eyaculatoria en 5 de 6 ratas (McDonald et al., 1970). Observaciones similares fueron descritas por Feder (1971) y Whalen y Luttge (1971) y confirmadas posteriormente por varios grupos (revisado en Larsson, 1979). Además se demostró que la administración diaria de 1 mg/kg de varios andrógenos naturales 5α - o 5β -reducidos o de 11 β -hidroxi-androstenediona, que como los anteriores es incapaz de aromatizarse, eran inefectivas para restituir la conducta sexual de ratas macho castradas (Beyer et al., 1973). Por el contrario, los andrógenos aromatizables como la androstendiona (Beyer et al., 1973; Morali et al., 1974), o aquellos capaces de interaccionar con los receptores de estrógenos en el hipotálamo como el 5α , 3β -androstadiol (Baum y Vreeburg, 1976; Morali et al., 1994), restituyen la conducta sexual en la rata castrada. Finalmente, otra evidencia que

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

apoya el hecho de que la testosterona se necesita aromatizar a estradiol para ejercer su efecto sobre la conducta sexual masculina lo proporcionan los trabajos en los que se utilizó inhibidores de la aromatasas: al ser administrados interfieren con el despliegue de la conducta (Beyer et al., 1976; Morali et al., 1977). Este hallazgo a sido confirmado en mamíferos, aves y reptiles (para revisión ver (Meisel y Sachs, 1994). Sin embargo, en algunas especies como el hámster, el cobayo, el mono rhesus y algunas variedades de ratón la administración de DHT estimula la conducta sexual masculina, aunque con menor potencia que la testosterona, (para revisión ver: (Larsson, 1979; Meisel y Sachs, 1994), incluso la administración de un andrógeno sintético no reducible, la metilnortestosterona, induce conducta sexual masculina en la rata (Morali et al., 1993), por lo que se ha sugerido que la estimulación fisiológica de esta conducta se puede ejercer a través de un mecanismo principalmente mediado por los receptores de andrógenos, pero sin excluir la participación de un mecanismo estrogénico complementario cuya importancia relativa puede variar en magnitud de una especie a otra (Morali, 1998).

Para resumir, además de las acciones mediadas por receptores de andrógenos, la testosterona también media la conducta sexual en el macho después de su conversión local a estradiol (aromatización) por medio de la enzima aromatasas. Ésta se encuentran ampliamente distribuida en el cerebro masculino de la rata (Roselli et al., 1985). Los receptores de estrógenos se distribuyen en numerosas regiones del cerebro anterior, incluida el área preóptica medial (Li et al., 1993; Tobet et al., 1993; Shughrue et al., 1997; Greco et al., 1998; Greco et al., 2001). El papel del estradiol en la activación de la conducta sexual masculina ha sido establecido por varios estudios que han mostrado que la infusión intracerebral en el APM de drogas que bloquean la actividad de aromatasas (y por lo tanto inhiben la síntesis de estradiol) también inhiben la habilidad de la testosterona sistémica para restaurar la conducta de cópula en los machos castrados. Estos efectos se revierten con la administración concurrente de estradiol.

Control Endocrino de la Conducta Sexual Femenina

La expresión de la conducta sexual femenina en roedores depende en gran medida de las hormonas sexuales, principalmente los estrógenos y la progesterona (Dempsey et al., 1936; Boling y Blandau, 1939; Beach, 1942b; Zucker y Goy, 1967; Edwards et al., 1968; Powers, 1970; Quadagno et al., 1972; Yanase y Gorski, 1976; Sodersten y Hansen, 1977; Zemlan y Adler, 1977; Beyer, 1980;

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Clemens y Weaver, 1985), pero, a diferencia del macho, la secreción hormonal en la hembra presenta grandes variaciones, lo que se manifiesta en un ciclo estral y en la manifestación, también cíclica, de las conductas proceptivas y receptivas. Las hembras de las especies de mamíferos que son ovuladores espontáneos presentan períodos de actividad sexual (estro) alternados con períodos en los que no la presentan (diestro). Estas variaciones en el comportamiento son cíclicas y ocurren como consecuencia de cambios en la función ovárica (Morali y Beyer, 1979; Adler y Allen, 1983). La rata hembra presenta un ciclo estral de cuatro días aproximadamente. Durante los primeros dos días del ciclo (diestro) se produce un aumento gradual en la secreción de estradiol que alcanza su máximo nivel en la tarde del proestro y la P también aumenta gradualmente en diestro II y su concentración disminuye cuando el estradiol alcanza su concentración máxima (Fig. 1.3). El estradiol, al alcanzar su pico máximo induce la ovulación, en la mañana del proestro. Unas horas después del pico de estradiol ocurre otro pico en la secreción de P, que alcanza su nivel máximo en la noche del proestro (Edwards et al., 1968; Clemens y Weaver, 1985). La receptividad sexual, que dura entre 13 y 15 horas, coincide con el aumento en la secreción de P.

Se ha propuesto que la acción inicial del estradiol es sensibilizar al sustrato neuronal responsable de la activación de la conducta de estro, mientras que la P provoca su expresión (Edwards et al., 1968; Yanase y Gorski, 1976; Beyer, 1980; Clemens y Weaver, 1985) y existen resultados que apoyan esta propuesta. Así, cuando una hembra es ovariectomizada (ovx) poco antes del pico preovulatorio de P, la hembra no despliega conducta sexual a pesar de que se permitió que el estradiol alcanzara su pico máximo (Edwards et al., 1968; Powers, 1970). Mientras que si al momento de la ovariectomía se le administra P la hembra presenta conducta de lordosis (Powers, 1970; Moreines y Powers, 1977). Si la ovx se realiza después del pico de P, la conducta sexual también se presenta (Moreines y Powers, 1977; Clemens y Weaver, 1985). A pesar de que estos experimentos apoyan la propuesta de que el estradiol sensibiliza el sustrato neuronal para que la P produzca la conducta de estro, existe evidencia de que esta conducta se manifiesta con la administración repetida de diferentes estrógenos. Beyer y cols. (Beyer et al., 1971; Morali y Beyer, 1979) han mostrado que el estradiol es el estrógeno más potente, seguido por la estrona y el estriol, para inducir lordosis en la rata ovx. También la latencia para la expresión de la lordosis después de la monta disminuye y la duración de ésta se prolonga con dosis crecientes de estradiol (Zemlan y Adler, 1977). Además se ha demostrado que el estradiol también modula la intensidad y la frecuencia de conductas proceptivas (Hardy y DeBold, 1971; Hardy y De Bold, 1972).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

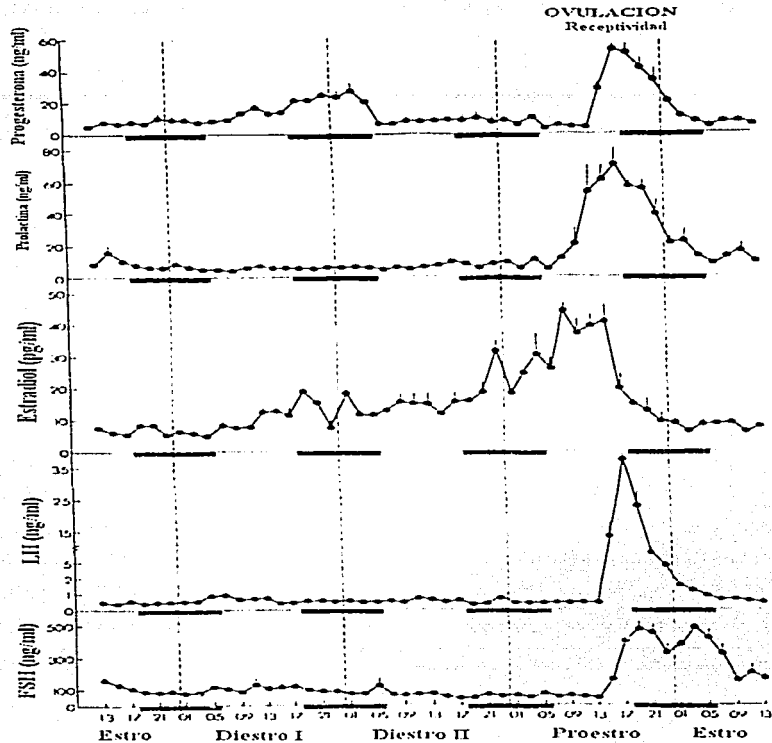


Figura 1.3. Patrón de concentración hormonal en plasma a intervalos de 2-hr durante el ciclo estral de la ratona. En la gráfica se indica el período en el cual ocurre la receptividad sexual y la ovulación. Las barras negras representan el intervalo de oscuridad en un ciclo (12-12). (Tomado de (Smith et al., 1975)).

Si bien es cierto que la conducta de estro puede estimularse únicamente con estradiol en ratas y cuyos ovariectomizados (Pfaff, 1970; Beyer et al., 1971; Morali y Beyer, 1979; Pfaff, 1980), la P aumenta de manera importante los niveles de receptividad en comparación a los obtenidos con la sola administración de estrógeno (Dempsey et al., 1936; Boling y Blandau, 1939; Beach, 1942b;

Zucker y Goy, 1967; Edwards et al., 1968; Hardy y DeBold, 1971). Sin embargo, para que la P induzca la conducta de lordosis, es necesario que las hembras hayan sido expuestas al estrógeno por lo menos entre 12 y 18 horas antes (Dempsey et al., 1936; Boling y Blandau, 1939) y la latencia para que se inicie la conducta de estro después de la administración s.c. de P es entre 2 a 6 horas (Glaser et al., 1983).

Por otro lado, además de los estrógenos, los andrógenos también tienen efecto sobre el comportamiento estral. Los andrógenos en la hembra son secretados por los ovarios y las glándulas adrenales y estimulan la lordosis en ratas ovariectomizadas. Los andrógenos más efectivos para lograr este efecto son los que tienen el grupo ceto en el carbono 3 y una doble ligadura entre los carbonos 4 y 5. Esta estructura se presenta, por ejemplo, en la testosterona y la androstendiona. Los andrógenos débiles tales como la 19-hidroxitestosterona y la 19-hidroxiandrostendiona a dosis adecuadas, propician que se dé el comportamiento sexual femenino. Es importante mencionar que el comportamiento estral inducido por andrógenos es similar a aquel producido por estrógenos. Sin embargo, para obtener un nivel similar de receptividad se requiere una dosis mayor de andrógenos que de estrógenos (Moralí y Beyer, 1979). Se ha propuesto que los andrógenos provocan el comportamiento sexual femenino a través de su transformación a estrógenos. Esta hipótesis ha sido respaldada debido a que los andrógenos aromatizables, es decir, los que se pueden convertir a estrógenos son mucho más potentes al inducir la receptividad en la rata hembra que los que no lo son (Moralí y Beyer, 1979). Además los antiestrógenos como MER-25 (tamoxitrifetol) inhiben la respuesta estral producida por la administración diaria de propionato de testosterona (PT) en ratas ovariectomizadas (Moralí y Beyer, 1979).

Regulación Neuronal de la Conducta de Sexual Femenina

La información sensorial relevante para inducir la lordosis entra al sistema nervioso de la rata hembra a través de los receptores cutáneos de los flancos, los cuartos traseros y el perineo, estimulados durante la cópula. La información recibida por los receptores de la piel y de las neuronas que responden a la presión entra a la médula espinal, donde se encuentran las motoneuronas responsables de controlar los músculos que intervienen en la lordosis, y es enviada al bulbo raquídeo (formación reticular medular) (Pfüff et al., 1994). Esta vía de la médula espinal al tallo cerebral es necesaria pero no suficiente para que la lordosis se produzca.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

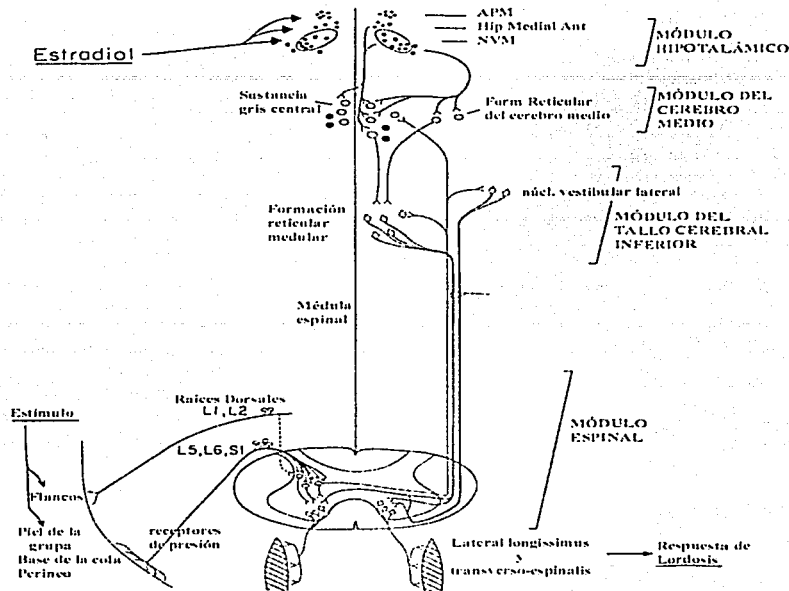


Figura 1.4. Circuito neuronal básico que se requiere para producir la conducta de lordosis. Para detalles ver texto. (Modificado de Pfaff et al., 2000)

Se debe considerar que las hormonas también actúan sobre los mecanismos nerviosos centrales que integran la información endócrina, social y ambiental que intervienen en la cópula. Se han descubierto varios sitios cerebrales que regulan la expresión de la lordosis. Las lesiones del núcleo ventromedial del hipotálamo (NVM) o la destrucción de sus eferencias o aferencias reduce la frecuencia de lordosis (Yamanouchi, 1980; Clark et al., 1981; Emery y Moss, 1984), lo que demuestra que la integridad del NVM es crítica para que se exprese de manera adecuada la respuesta de lordosis. Con el objeto de mapear el circuito neuronal involucrado en la lordosis se han trazado retrograda y anterógradamente las fibras que llegan o salen del NVM. Se ha descrito que las fibras que salen del NVM a través de una vía postero-lateral extensa son necesarias para la lordosis, mientras que otras fibras son menos importantes (Pfaff et al., 2000). Los axones esenciales

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

descienden a la sustancia gris central del cerebro medio y lesiones de esta región reducen la frecuencia de lordosis (Sakuma y Pfaff, 1979). La destrucción del haz ventral noradrenérgico ascendente del cerebro medio (VNAB) abole completamente la conducta de lordosis (Hansen et al., 1980, 1981). Las neuronas de la región gris central del cerebro medio proyectan sus axones a la formación reticular medular en el tallo cerebral. Esta región del cerebro medio controla las motoneuronas que inervan a los músculos axiales, especialmente los músculos de la espalda baja (longissimus lateral y espinal transverso), los cuales son críticos para la lordosis (Pfaff et al., 1994). La conexión de esta región del tallo cerebral con las fibras descendentes que provienen de la región gris central del cerebro medio permite que la lordosis se dé sólo cuando las hormonas sexuales ejercen su efecto sobre las neuronas del cerebro medio en el VMN. En la figura 1.4 se observa un diagrama detallado de estos circuitos neuronales.

Las células que concentran estradiol y progesterona han sido mostradas en numerosas regiones del cerebro de vertebrados. Las áreas con la mayor densidad de células que concentran estradiol y progesterona, en la rata, están localizadas en el cerebro anterior, incluyendo el área preóptica medial, el hipotálamo anterior y el hipotálamo ventro medial y ventro lateral, así como la amígdala y el área gris central del cerebro medio (Pfaff y Conrad, 1978). Varios son los estudios de lesión y de estimulación eléctrica que han revelado que estas regiones están involucradas en la regulación de la conducta sexual femenina. En la tabla 1.1 se muestran un resumen de dichos efectos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

REGIÓN LESIONADA	EFEECTO	REFERENCIAS
Peripenduncular del mesencéfalo	Reduce respuesta de lordosis al dañar eferencias del NVM al SGC. Es un enlace entre sistemas sensoriales y motores	(Pfeifle et al., 1980) (Pfeifle y Edwards, 1983)
Diencefalo y telencefalo	Eliminan comportamiento sexual	(Komisaruk, 1978)
HIPOTALAMO		
Central	Muestran ciclos estrales pero desaparece la conducta	(Komisaruk, 1978) (Komisaruk et al., 1981)
Anterior, no preópticas	Eliminan reflejo de lordosis	(Komisaruk, 1978)
Ventral	Ciclo estral intacto, disminuye comportamiento sexual	(Komisaruk, 1978)
Lateral	Sin efecto	(Clemens y Christensen, 1975)
APM	Facilita la receptividad sexual: las hembras ovx necesitan menor cantidad de estrógenos para inducir lordosis. Inducen estro continuo en las hembras intactas	(Powers y Valenstein, 1972) (Pfeifle y Edwards 1983) (Law y Meagher, 1958) (Malsbury et al., 1980) (Singer, 1968)
Septum lateral	Aumenta la conducta de lordosis, aumentando la sensibilidad a estrógenos y progesterona.	(Nance et al., 1974) (Nance et al., 1975) (Nance et al., 1977)
Región premamilar	Facilita: las hembras ovx necesitan menor cantidad de hormonas para mostrar lordosis. Inducen estro continuo en las hembras intactas.	(Powers y Valenstein, 1972) (Pfeifle y Edwards 1983)
Núcleo de la habénula	Reduce las conductas de lordosis y proceptivas en ratas ovx y tratadas con estrógenos.	(Modianos et al., 1975) (Rodgers y Law, 1967)
Arcuato	Disminuye la conducta de lordosis.	(Nadler, 1972)
HVM	Disminuye o elimina la conducta de lordosis en ratas con ciclo normal u ovariectomizadas y tratadas con estrógenos con o sin P. Disminuye la preferencia por el macho. Aumenta la conducta agresiva.	(Nadler, 1972) (Kennedy, 1963) (Kennedy, 1964) (Dorner et al., 1975) (Dorner et al., 1969) (Carrer et al., 1973) (Malsbury et al., 1977) (Clark et al., 1981)
Tálamo sensorial	Reduce respuesta de lordosis	(Edwards y Pfeifle, 1983) (Pfeifle y Edwards, 1983)
NMH, AMG, ET		
Fórnix, BO, Complejo mamilar	Facilita, propician cópula en diestro Facilita la respuesta de lordosis con estradiol y con o sin P y en ratas con ciclo normal. Cociente de lordosis (CL) elevado Presenta conducta lordótica temprana con hormonas, pero no en facilita en ratas en diestro.	(Komisaruk, 1978) (Komisaruk, 1974) (Moss, 1971) (Edwards y Warner, 1972) (Lumia et al., 1981) (Al Satli y Aron, 1977) (McGinnis et al., 1978)
SGC	Pérdida inmediata de la respuesta de lordosis Pérdida del reflejo de lordosis	(Hennessey et al., 1990) (Modianos y Pfaff, 1976)
ESTIMULACIÓN ELÉCTRICA		
APM	Disminuye la conducta de lordosis. Aumentan las conductas de rechazo.	(Pfaff y Sakuma, 1979) (Malsbury et al., 1980)
HVM	Facilita el reflejo de lordosis de ratas hembra ovx pretratadas con estradiol.	(Pfaff y Sakuma, 1979)
Septum	Previene la aparición de la conducta de lordosis.	(Zasorin et al., 1977)
SGC	Facilita la expresión de la conducta de lordosis de manera inmediata.	(Sakuma y Pfaff, 1979)

Tabla 1.1. Efecto sobre la conducta sexual femenina de lesión y estimulación eléctrica cerebral. NVM: Núcleo ventro medial; SGC: Sustancia gris central; BO: Bulbo olfatorio; NMH: Núcleo medial de la habénula, AMG, ET: estria terminal.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

CAPITULO II. DIFERENCIACIÓN SEXUAL

Las diferencias sexuales en la morfología genital, en la estructura y función del sistema nervioso central y, en consecuencia, en la conducta, son el resultado de un proceso llamado diferenciación sexual, el cual ocurre durante el desarrollo. La diferenciación sexual es un proceso secuencial que comienza con el establecimiento del sexo genético al momento de la concepción, lo cual lleva al desarrollo del sexo gonadal y, bajo la influencia de las hormonas gonadales, al sexo fenotípico o corporal y determinan de manera importante la estructura y función del cerebro. Esta diferenciación sexual cerebral se lleva a cabo en las etapas perinatales y se ha considerado como un factor decisivo en la expresión de la conducta sexual (Tobet y Fox, 1992). Desde hace tiempo se reconoce que la manipulación hormonal prenatal o en los primeros días de nacimiento modifica la diferenciación sexual cerebral y en consecuencia el patrón de conducta sexual.

Diferenciación Sexual

La fertilización es el primer paso en el proceso de diferenciación sexual. Un óvulo puede ser fertilizado por un espermatozoide que lleve un cromosoma X o uno Y. En los mamíferos, cada individuo posee un conjunto de autosomas apareados y dos cromosomas sexuales. Las hembras son de sexo homogamético (XX), mientras que los machos son de sexo heterogamético (XY). El gen SRY, situado en el brazo corto de cromosoma Y, codifica el factor determinante del testículo (TDF, por sus siglas en inglés, Berta y cols, (Pritchard et al., 1987; Berta et al., 1990; Gubbay et al., 1990; Jager et al., 1990; Koopman et al., 1990) el cual determina que durante el desarrollo embrionario las gónadas se diferencien como testículos. Si el TDF es expresado por las gónadas indiferenciadas, entonces la proteína TDF se produce y se desarrollarán los testículos. Estos, a su vez, secretarán la hormona antimülleriana y la testosterona que diferenciarán los conductos internos y el seno urogenital hacia el fenotipo masculino. Su ausencia llevará a que las gónadas se desarrollen en ovarios.

En 1959 surgió el ahora trabajo clásico de Phoenix, Goy, Gerall and Young (1959), quienes demostraron que el tratamiento con testosterona de una conejilla de indias gestante provocaba que sus crías hembra se masculinizaran tanto física como conductualmente. Los resultados de este experimento indicaban que las vías neuronales que regulan la conducta sexual se establecen durante

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

el desarrollo prenatal y los autores sugirieron que la testosterona tenía que actuar en el cerebro para inducir la diferenciación sexual de los machos para que en la edad adulta manifestaran una conducta sexual masculina. Los trabajos que apoyaron esta hipótesis consistieron, principalmente en observaciones de animales castrados prenatalmente. Esos machos, en edad adulta, no exhiben conducta sexual masculina y muestran un aumento en la conducta sexual femenina (Grady y Phoenix, 1963; Harris, 1964, citados en Dörner, 1980; Feder y Whalen, 1965) (Tobet y Fox, 1992). Por el otro lado, varios trabajos confirmaron que la inyección de testosterona a la madre gestante inducía masculinización y defeminización en las hembras (i. e. Stockman et al., 1985) además de esterilidad, ausencia de cuerpos lúteos y presencia de estro persistente, características hace tiempo descritas como síndrome androgénico (Shay et al., 1939; Bradbury, 1941; Wilson, 1943) (citados en (Dörner, 1980). Es de hacerse notar que tanto en la rata como en los ratones y en los hámsteres, los efectos del tratamiento con testosterona o con propionato de testosterona eran más dramáticos cuando se administraba durante los primeros días de nacimiento (Swanson y van Werff ten Bosch, 1965; Swanson y Werff ten Bosch, 1965; Alleva et al., 1969). Sin embargo Flerkó, Petrusz y Timar (1967) y Kobayashi (1967) al inyectar dosis más elevadas durante el último tercio de la gestación, también obtuvieron hembras masculinizadas. Estos últimos resultados junto con el hecho de que las propiedades masculinizantes de la testosterona endógena eran inhibidas al inyectar prenatalmente un antiandrógeno, acetato de ciproterona (que en realidad es un progestágeno sintético) (Neumann y Elger, 1966b, 1966a; Neumann et al., 1966), establecieron que el período crítico para la acción masculinizante de la testosterona abarcaba desde el último tercio de gestación hasta los primeros días de nacimiento.

Otros investigadores (Gorski, 1963; Whalen y Nadler, 1965) (Kikuyama, 1963; Takasugi, 1963, citados en Dörner, 1980), observaron que dosis elevadas de estrógenos eran capaces de imitar los efectos fisiológicos de la testosterona, ya que al ser administrados perinatalmente, inducían en las hembras las características del síndrome androgénico (i. e., esterilidad anovulatoria y estro persistente), así como un aumento en la actividad sexual masculina. Estos resultados fueron considerados en un principio como reflejo de la gran cantidad de hormona inyectada, pero otra serie de experimentos (Levine y Mullins, 1964; Dörner et al., 1971) demostraron que las hembras tratadas al primer día de nacimiento con estradiol presentaban una disminución de la conducta sexual femenina y un aumento en la masculina, estro continuo, esterilidad y aumento de peso corporal; mismas características que eran inducidas por la administración perinatal de testosterona. Esto llevó a la sugerencia de que la testosterona podía producir sus efectos a través de su conversión (aromatización) a estradiol, la "hipótesis de la aromatización".

Hipótesis de la Aromatización

Como se mencionaba, los resultados previamente descritos fueron explicados como paradójicos "los efectos del estradiol que simulan los efectos de los andrógenos sobre la diferenciación sexual" (citado en Dörner, 1980). Sin embargo, otros resultados empezaron a mostrar el efecto más local del estradiol. El síndrome androgénico fue descrito en hembras a las que se les había implantado benzoato de estradiol (BE) en el hipotálamo mediobasal a los cuatro días de nacidas (Docke y Dörner, 1975), lo que sugirió que éste era el sitio cerebral donde el estradiol ejercía esos efectos. Al implantar testosterona o estradiol en otras regiones (corteza cerebral, por ejemplo) el fenómeno no se reproducía (Christensen y Gorski, 1978), es decir, el hipotálamo ventromedial fue la única área en la cual los implantes de testosterona o estradiol inducían una secreción acíclica de gonadotropinas y el área preóptica dorsal era el único sitio donde los implantes provocaban un aumento de la conducta sexual masculina en las hembras (Christensen y Gorski, 1978).

Esos hallazgos indicaban que los andrógenos estaban siendo aromatizados a estrógenos en esas áreas cerebrales para inducir los procesos de diferenciación sexual cerebral. Esa posibilidad se vio fortalecida cuando varios investigadores reportaron la presencia de aromatasas en el cerebro (Knapstein et al., 1968; Naftolin et al., 1971; Weisz y Gibbs, 1974; Lieberburg y McEwen, 1975). Además los andrógenos no aromatizables como la 5α -dihidrotestosterona no reproducían los efectos de la testosterona o el estradiol (Luttge y Whalen, 1970). Por tanto la hipótesis de la aromatización propone que la testosterona secretada por los testículos de los fetos machos y de los machos recién nacidos masculiniza y desfeminiza el cerebro en desarrollo a través de su metabolismo intracelular a estradiol por las aromatasas. Esta hipótesis se fortaleció aún más cuando se observó que los efectos del estradiol y la testosterona podían ser prevenidos, al menos parcialmente, con antiestrógenos (los cuales compiten con el estradiol por sus receptores). Asimismo los efectos de la testosterona sobre la diferenciación sexual del cerebro se bloqueaban parcial o completamente con inhibidores de las aromatasas, bloqueando la bioconversión de testosterona a estradiol (Lieberburg et al., 1977; McEwen et al., 1977; Booth, 1978).

Resumiendo, las evidencias de que la aromatización es esencial para la masculinización del cerebro son las siguientes:

- 1) Los andrógenos aromatizables (testosterona y Δ^4 -androstendiona, e.g.) administrados neonatalmente a ratas hembra mimetizan el efecto masculinizante del estrógeno en el sistema nervioso central (Luttge y Whalen, 1970; Edwards, 1971; McDonald y Doughty, 1974). Los

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

andrógenos no aromatizables como el propionato de dihidrotestosterona, no tienen la capacidad de prevenir los efectos de la castración neonatal en la rata macho sobre la conducta sexual (Luttge y Whalen, 1970; van der Schoot, 1980).

- 2) El tratamiento con antagonistas de estrógenos bloquea los efectos de la testosterona en hembras neonatas (McDonald y Doughty, 1972);
- 3) La 19-hidroxitestosterona, un intermediario en el proceso de aromatización, es un agente masculinizante más potente que la testosterona cuando se administra a hembras recién nacidas (McDonald y Doughty, 1974);
- 4) La administración neonatal de un inhibidor de aromatasas, 1,4,6-androstantrieno-3,17-diona (ATD) aumenta de manera importante la capacidad de los machos para mostrar conducta sexual femenina, no sólo después de la castración y bajo tratamiento con estradiol y progesterona cuando adultos (McEwen et al., 1977; Vreeburg et al., 1977; Davis et al., 1979), sino también en los machos gonadalmente intactos (Brand et al., 1991). Los machos tratados neonatalmente con ATD también muestran una secreción cíclica de gonadotropinas, lo cual se ha evidenciado por la presencia de ovulación en implantes de ovario bajo el riñón (Vreeburg et al., 1977).
- 5) Resultados similares al tratamiento con ATD se han observado con la administración neonatal del antiestrógeno MER-25 (Booth, 1977; Sodersten, 1978): en el macho adulto se observa un aumento en la conducta de lordosis después de la administración de estradiol y progesterona. Además, a pesar de que se le trate con testosterona, la conducta de eyaculación esta disminuida.
- 6) Los machos neonatalmente castrados y tratados con propionato de DHT (que no se aromatiza) muestran una disminución en la preferencia por la hembra en comparación a los que tuvieron recambio hormonal con propionato de testosterona (PT) (Brand y Slob, 1991a). Machos gonadalmente intactos pero tratados pre y/o neonatalmente con el inhibidor de aromatasas ATD, también muestran una disminución en su preferencia por la hembra en comparación a los machos control (Brand et al., 1991).

Una de las preguntas derivadas de la hipótesis de la aromatización fue la de por qué el cerebro de las hembras no se masculinizaba si la concentración de estradiol circulante era mayor en las hembras que en los machos. Se asumió que el cerebro femenino estaba "protegido" y esta protección fue atribuida a que los estrógenos endógenos circulantes se inactivaban al unirse a la glicoproteína plasmática entonces llamada " α -fetoproteína unidora de estrógenos" (Nunez et al.,

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1971; Raynaud, 1973). Por el contrario, la testosterona no era unida por la α -fetoproteína y tendría así libre acceso a los receptores en el cerebro neonatal, donde se aromatizaría parcialmente a estradiol. Ahora se reconoce que la α -fetoproteína tiene mayor afinidad por el estradiol que por la testosterona (Keel y Abney, 1984). Presumiblemente, la α -fetoproteína reduce la fracción libre, biológicamente activa, de estradiol a concentraciones tan bajas que su entrada al cerebro, además de ser poca, tendría una velocidad de entrada mínima (Rhoda et al., 1984; Montano et al., 1995). En los embriones de ratas macho y hembra, los niveles séricos de estradiol disminuyen entre el día 21 de gestación y las 24 hrs posparto. En las ratas macho, los niveles hipotalámicos de estradiol aumentan dramáticamente entre las 0 y 24 hrs posparto y este estradiol hipotalámico está ausente en las hembras (Rhoda et al., 1984). El aumento de estradiol en el hipotálamo parece deberse más a la conversión intracelular de la testosterona a estradiol que a los niveles testiculares de estradiol, que como se mencionó, son bajos (Rhoda et al., 1984). En las hembras los niveles de estradiol aumentan dramáticamente a partir del día 5 posparto alcanzando su concentración máxima alrededor de los 15 días después del nacimiento (Meijs-Roelofs et al., 1973; Dohler y Wuttke, 1975). En teoría, la α -fetoproteína debería impedir que este aumento de estradiol alcanzara al cerebro de la hembra para impedir que se masculinizara. Existen evidencias indirectas que muestran que las α -fetoproteínas protegen al cerebro femenino durante esta etapa, la administración neonatal de RU2858 (un estrógeno sintético que no se une a la α -fetoproteína) fue cerca de 100 veces más potente que el BE para desfeminizar a las ratas hembra (Doughty et al., 1975). Sin embargo, también se ha descrito que en crías hembra de 2 días de edad tratadas con estradiol vía implantes subcutáneos, éste se detecta en núcleos neuronales (Montano et al., 1995). Esto significa que las α -fetoproteínas no pueden proteger completamente al cerebro del estradiol. Actualmente, por lo tanto, no es claro por qué el cerebro de la rata hembra no se masculiniza y se desfeminiza por las concentraciones circulantes de estradiol libre (Montano et al., 1995).

Por otro lado, las ratas hembra tratadas crónicamente con altas dosis de estradiol o testosterona muestran patrones conductuales de monta, intromisión y eyaculación (Beach, 1942c; Baum et al., 1974; Emery y Sachs, 1975; Oboh et al., 1995). Estos hallazgos revelan que normalmente existe una considerable masculinización cerebral en la rata hembra, y se ha propuesto que esta masculinización ocurre debido a que las ratas hembras están expuestas a testosterona, ya sea de origen placentario (Gibori et al., 1981; Vreeburg et al., 1983; Baum et al., 1991) o proveniente de los testículos fetales de los machos adyacentes (Gladue y Clemens, 1978; Gladue et al., 1978; Gladue y Clemens, 1980b, 1980a). Esta masculinización cerebral de la rata hembra

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

también podría ser debida al estradiol libre en suero. Döhler y cols. (1993) reportaron que el tratamiento con tamoxifen, un antagonista estrogénico, inhibía significativamente el mecanismo de retroalimentación positiva para estrógeno/progesterona que estimulaba la liberación de LH y reducía la capacidad para mostrar conducta de lordosis. Sin embargo, el tamoxifen no estimulaba la presencia de conductas típicamente masculinas. Estos hallazgos sugieren que no solo la diferenciación sexual masculina del cerebro, sino también la femenina, puede estar bajo la influencia del estradiol (Dohler et al., 1993). Sin embargo, por sí mismo el tamoxifen parece tener un efecto estrogénico en el cerebro. Mathews y cols. (1988) reportaron que el tratamiento con tamoxifen era incapaz de bloquear la masculinización de las regiones que controlan el canto en los pinzones hembra y macho pero sí masculinizaba a los pinzones hembra e hipermasculinizaba a los pinzones macho (Mathews et al., 1988). Una evidencia más de que el estradiol no es necesario para la diferenciación de la liberación cíclica de gonadotropina y de la conducta sexual femenina fue proporcionada cuando ratas macho castradas neonatalmente (van der Shoot y Zeilmaker, 1972) o tratadas neonatalmente con ATD (Vreburg et al., 1977) mostraron ovulación del tejido ovárico previamente implantado, además de una elevada respuesta de lordosis cuando fueron probadas bajo tratamiento con estradiol y progesterona (Beach et al., 1969; Vreburg et al., 1977; Davies et al., 1979).

La diferenciación sexual, por lo tanto, es un proceso secuencial que comienza con el establecimiento del sexo cromosomal (determinación sexual), seguido por el desarrollo del sexo gonadal y culminando con el fenotipo sexual. Este es el paradigma de Jost (Sinclair, 1998) y sugiere cuál es la secuencia normal de eventos. Sin embargo, este paradigma no considera el hecho de que no necesariamente el fenotipo sexual coincida con el sexo gonadal. Dörmer (1980) propuso que después del sexo gonadal, la presencia o ausencia de andrógenos determinaba, por un lado, el sexo somático, y por otro el sexo neuronal, y que estos, junto con los efectos psicosociales determinaban la identidad sexual (Fig. 2.1). Esto puede ser aplicable a humanos, pero no es posible determinar a ciencia cierta la identidad sexual de otros animales. Sin embargo, sí es posible determinar, con pruebas conductuales, la preferencia sexual de los animales. En este sentido, es difícil evaluar los efectos psicosociales sobre las ratas, por lo que en la mayoría de los estudios en animales estos efectos no son tomados en cuenta. A pesar de lo anterior, el "paradigma de Dörmer" puede extenderse a otros mamíferos interpretando identidad sexual como preferencia sexual.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

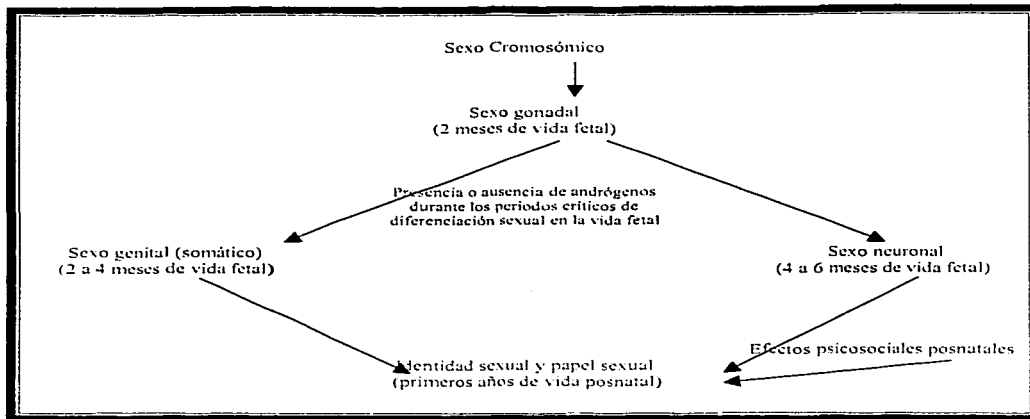


Figura 2.1. "Paradigma de Dörner" sobre la diferenciación sexual en humanos. Los procesos ejemplificados aquí pueden ser válidos para roedores tomando en consideración 2 factores: 1) que la identidad sexual se valore con la conducta y preferencia sexual y 2) los efectos psicosociales generalmente no se han podido evaluar en animales, por lo que su papel en la diferenciación sexual no está completamente determinado. Modificado de Dörner (1980).

Bases bioquímicas de la diferenciación sexual

En esta sección se hará un breve resumen de las características de las hormonas esteroides, cómo se sintetizan y cuales son sus funciones. Se hará énfasis en los andrógenos, debido a que son los que determinan las diferencias genitales y neuronales entre machos y hembras. Se resaltarán la conversión de la testosterona a sus dos metabolitos principales: la 5α -dihidrotestosterona, que participa en la diferenciación de las gónadas hacia el fenotipo masculino, y el estradiol, cuya presencia induce la masculinización y no feminización del cerebro en la rata macho (para revisión ver Miller, 1988; Gore-Langton y Armstrong, 1994; Baulieu et al., 2001).

Las hormonas esteroides, que son sintetizadas principalmente en las glándulas suprarrenales, en las gónadas y en la placenta derivan del colesterol, el cual es proveído por la sangre en forma de lipoproteínas de baja y alta densidad. Una pequeña proporción de colesterol también puede ser producida directamente en células esteroidogénicas a partir de acetato. Las reacciones bioquímicas responsables de la síntesis de hormonas esteroides son controladas por varias familias de enzimas que incluyen hidroxilasas (desmolosas), oxido-reductasas

(deshidrogenasas), sulfurilasas y sulfo- o sulfiriltransferasas (Figura 2.2). La clonación molecular de las enzimas responsables de la síntesis de hormonas esteroideas ha revelado en algunos casos la existencia de múltiples isoformas que son expresadas diferencialmente en los tejidos esteroideogénicos (Miller, 1988; Labrie et al., 1994). Los mecanismos que regulan la expresión de hormonas esteroideogénicas han sido estudiados en gran detalle en la glándula adrenal y en las gónadas (para revisión ver Miller, 1988).

Las hormonas esteroideas pueden ser clasificadas con base en el número de carbonos que se presenta en su estructura. Así las que tienen 21 carbonos son pregnanos, las de 19, androstanos y las de 18, estranos. Generalmente su clasificación química corresponde a su clasificación biológica, por lo que los androstanos son andrógenos y los estranos, estrógenos, sin embargo, los pregnanos son progestinas y corticoesteroides. Dentro de los estrógenos, la estrona y el 17β -estradiol son fisiológicamente los más importantes en roedores y humanos: el 17β -estradiol es diez veces más potente que la estrona. Los estrógenos son las hormonas esteroideas que juegan un papel fundamental en los procesos reproductivos femeninos. Se biosintetizan principalmente en el ovario y ejercen sus efectos biológicos a través de la activación de los receptores de estrógenos (RE). Los RE son miembros de la superfamilia de receptores intracelulares (a la que también pertenecen los receptores de progestinas y andrógenos) y cuando se les une un estrógeno o un agonista (i.e. dietilestilbestrol) se convierten en factores de transcripción que regulan la transcripción de los genes en los cuales reconoce la secuencia genética denominada "elemento de respuesta al estrógeno" (ERE) o sitio AP-1 (Smith y O'Malley, 1999).

La pregnenolona juega un papel clave dentro de la biosíntesis de hormonas esteroideas, es el producto limitante para la velocidad de síntesis de las hormonas esteroideas (ver Fig. 2.2). Sin embargo, el producto más abundante del folículo es la progesterona. Las progestinas pueden estar reducidas en los carbonos 3, 5, 17 o 20, ya sea en configuración α o β y son las hormonas esteroideas que mantienen la gestación e inducen la aparición del comportamiento proceptivo (Gore-Langton y Armstrong, 1994).

Los andrógenos son las hormonas esteroideas que poseen actividad masculinizante. En los mamíferos son producidos principalmente por las células de Leydig de los testículos, por las células corticales de la suprarrenal y por las células de la teca de los ovarios. El andrógeno más importante producido por las células de Leydig es la testosterona y está bajo el control de la LH; prácticamente no se almacena y se libera conforme se produce.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

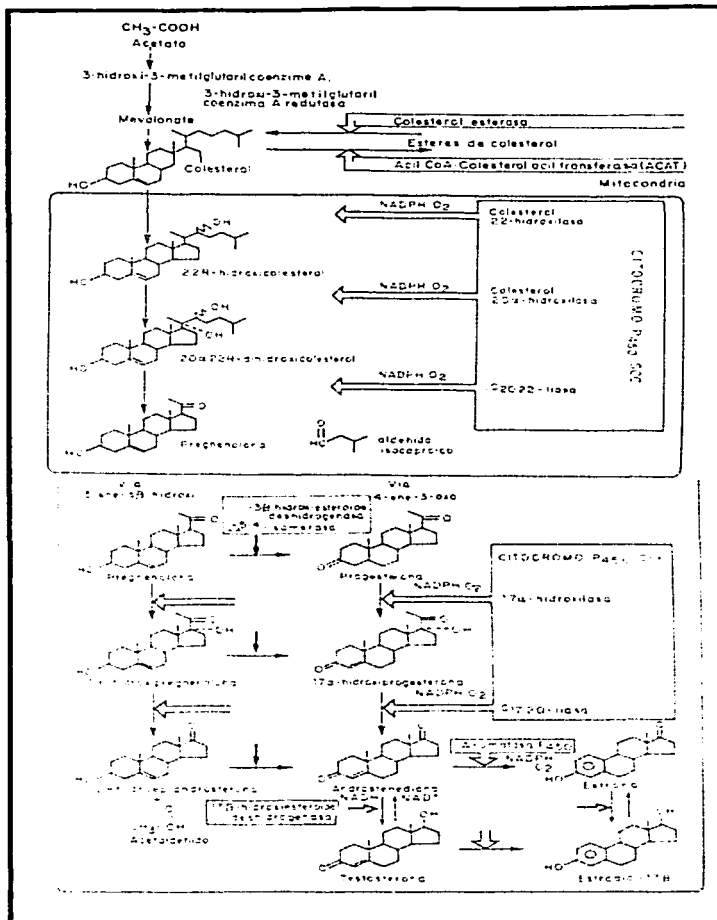


Figura 2.2. Síntesis de hormonas esteroideas (Pedernera, 1993).

La 5 α -DHT tiene mayor afinidad que la testosterona por los receptores de andrógenos y por lo tanto es el andrógeno más potente: se metaboliza a partir de la testosterona en muchos tejidos dependientes de andrógenos como la próstata, el epidídimo, las vesículas seminales y la piel, pero

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

no en otros como el testículo o el músculo. La DHT es la responsable de la formación de los caracteres secundarios durante la pubertad, y de la diferenciación de los genitales externos y parte de los internos durante el desarrollo fetal (Robaire y Bayly, 1989). El receptor de andrógenos, como los otros ya mencionados, es intracelular. La unión del esteroide a su receptor ocurre con una alta afinidad, es reversible e induce una activación conformacional del receptor seguido por su fosforilación. El receptor activado se une al ADN con alta afinidad en regiones específicas de la cromatina (el sitio aceptor nuclear con una secuencia consenso TGTTCT). Ya unido al DNA el complejo hormona-receptor actúa como un regulador transcripcional e inicia una cascada de eventos que finalmente llevan a la síntesis, inhibición o modificación de proteínas (Beato, 1989; Beato et al., 1995).

Por otro lado, la testosterona se puede aromatizar a estradiol, el cual media los efectos de la testosterona en el cerebro vía el receptor de estrógenos. Las aromatasas con complejos enzimático de dos proteínas, una es una forma específica de citocromo (citocromo P-450 aromataza) responsable de la unión del sustrato de 19 carbonos y de la formación del anillo A fenólico característico de los estrógenos. La otra es una flavoproteína (NADPH-citocromo P-450 reductasa) la cual transfiere los equivalentes reducidos del NADPH al citocromo y de ahí al esteroide (para revisión ver Nelson et al., 1993). La actividad de las aromatasas ha sido detectada en la placenta, el ovario, el testículo y los adipocitos (Mensah-Nyagan et al., 1999) y desde hace tiempo se ha reportado la conversión de androstenediona a estrona (Naftolin et al., 1972; Naftolin et al., 1975) y de testosterona a estradiol (McEwen et al., 1977; Roselli y Resko, 1987) en el cerebro de rata. Estudios inmunocitoquímicos han demostrado que la expresión de las aromatasas en condiciones fisiológicamente sanas es en las neuronas, no en las células gliales (Negri Cesi et al., 1992) [Lephart, 1996 #8835]. En el área preóptica de aves se han descrito tanto neuronas inmunorreactivas a aromataza como actividad enzimática de la misma (Balthazart et al., 1990; Balthazart et al., 1992). Sin embargo en roedores adultos no se ha reportado una correlación consistente entre presencia y actividad de las aromatasas. Por ejemplo, se han reportado altos niveles de actividad de aromataza en el área preóptica medial y en el núcleo ventromedial de la rata, dos regiones que generalmente han no han mostrado inmunorreactividad hacia la aromataza (Shinoda et al., 1989; Balthazart et al., 1992). Sin embargo, se ha demostrado que durante la ontogénesis se encuentran neuronas positivas de aromataza en el área preóptica, en el hipotálamo ventromedial y en el núcleo arcuato a partir de los días 13, 16 y 19 de gestación, respectivamente. En esas regiones, el número de neuronas inmunorreactivas a aromataza aumentan durante la gestación, con un pico máximo antes del nacimiento, y una disminución e incluso desaparición, durante las dos primeras semanas de vida

postnatal (Tsuruo et al., 1994). Esos datos revelan la existencia de variaciones espacio-temporales en el nivel de transcripción del gen de aromatasa durante el desarrollo.

Diferencias sexuales en la morfología y función neuronal

Como se describe a lo largo de este capítulo y del anterior, existen diferencias entre los sexos en la conducta sexual, en la producción y secreción hormonal así como en conductas no relacionadas con la reproducción. Posiblemente estas diferencias están relacionadas con las diferencias morfológicas que se presentan entre los cerebros de machos y hembras. En ratas, la primera evidencia de la existencia de un dimorfismo anatómico en el cerebro llegó en 1971 cuando Raisman y Field descubrieron con microscopía electrónica que las dendritas del APO de las hembras recibían mayor proporción de aferentes en las espinas dendríticas que los machos. La castración neonatal provocaba que los machos tuvieran el fenotipo femenino de organización sináptica, mientras que la administración de PT en las hembras les inducía un fenotipo masculino (Raisman y Field, 1971, 1973b, 1973a). Prácticamente todas las estructuras cerebrales involucradas en la expresión de la conducta sexual son sexualmente dimórficas. Dentro del ámbito de esta tesis, es interesante hacer notar que muchas de las estructuras cerebrales sexualmente dimórficas están bajo la influencia de las hormonas perinatales, sobre todo del estradiol producto de la aromatización de la testosterona. Así, la inhibición perinatal de la formación de estrógenos provoca que los machos presenten características femeninas o intermedias entre las características masculinas y femeninas de los dimorfismos neurales que se describirán a continuación.

Área preóptica medial / hipotálamo anterior. Después de que Gorski y cols. (Gorski et al., 1978; Gorski et al., 1980) describieron la existencia de un núcleo del APM que era más grande en los machos que en las hembras y por lo tanto se le denominó núcleo dimórfico sexual del APM (NSD-APM), se han encontrado estructuras homólogas en otras especies como gerbos (el área sexualmente dimórfica y su pars compacta (Commins y Yahr, 1984), conejillos de indias (área preóptica sexualmente dimórfica (Hines et al., 1985), y hurones (núcleo masculino del APM (Tobet et al., 1986). También han sido descritos núcleos dimórficos en el hipotálamo de humanos (núcleos intersticiales 2 y 4 del hipotálamo, (Swaab y Fliers, 1985; Allen et al., 1989). El volumen del NSD-APM y del núcleo masculino del hurón no se ven modificados por el estado hormonal en el adulto (Gorski et al., 1978; Tobet et al., 1986), mientras que el área sexualmente dimórfica del gerbo aumenta significativamente con la presencia de testosterona (Commins y Yard, 1984). Sin embargo,

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

a pesar de que el volumen del núcleo masculino del hurón no se ve afectado por la presencia de testosterona, sus células son 20% más grandes cuando recibe testosterona (Tobet et al., 1986).

Las diferencias sexuales en la morfología del APM dependen de la acción de las hormonas esteroideas durante los periodos críticos de las etapas tempranas del desarrollo embrionario. La testosterona administrada neonatalmente a las ratas hembras aumenta el volumen del NSD-APM en los adultos, mientras que la castración neonatal de las ratas macho reduce el volumen del núcleo en el adulto (Gorski et al., 1978; Jacobson y Gorski, 1981; Handa et al., 1985). Sin embargo, estas manipulaciones neonatales no resultan en una completa reversión del tamaño del núcleo. Las ratas hembras androgenizadas neonatalmente tienen el NSD de un volumen significativamente mayor al de las hembras control, pero también es significativamente menor al de las ratas macho. Aparentemente la diferenciación sexual del NSD comienza prenatalmente. Esta posibilidad fue enfatizada por los hallazgos de Döhler y cols. (Dohler et al., 1982, 1984a; Dohler et al., 1984b) quienes administraron testosterona pre y neonatalmente a las hembras; observaron que el volumen del NSD llega a ser prácticamente indistinguible del de los machos. Además, se ha demostrado que la diferenciación sexual del NSD-APM depende del metabolito aromatizado de la testosterona, el estradiol (Döhler et al., 1982; 1984), ya que los machos tratados prenatalmente o pre- y neonatalmente con el inhibidor de la aromataza, ATD, presentan en la edad adulta un menor volumen del NSD que los machos control (Houtsmuller et al., 1994).

Núcleo supraquiasmático, arcuato y núcleo ventromedial del hipotálamo: A nivel ultraestructural, se han encontrado diferencias sexuales en el número de sinapsis presentes en el núcleo supraquiasmático; éstas son más numerosas en los machos (5-30%) que en las hembras (Guldner, 1982; Leblond et al., 1982). Además, el volumen de ese núcleo es mayor en ratas macho (Robinson et al., 1986). También se han observado diferencias ultraestructurales en el arcuato y en el hipotálamo ventromedial (HVM) de la rata. Las hembras presentan casi el doble de sinapsis sobre las espinas dendríticas pero la mitad sobre el pericarión con respecto a los machos. En la porción ventrolateral del HVM los machos tienen alrededor de 33% más sinapsis axodendríticas que las hembras. Estas diferencias sexuales en el arcuato (Matsumoto y Arai, 1981) y en el HVM (Matsumoto y Arai, 1986) han sido atribuidas a la acción neonatal de la testosterona y/o el estradiol.

Dimorfismo sexual en el sistema de proyección vomeronasal. En el capítulo primero se describió la importancia del SPV en la detección y procesamiento de las señales quimiosensoriales sexualmente relevantes (feromonas). El dimorfismo sexual se presenta a todo lo largo de este sistema. En general,

todas las partes que lo conforman son mayores en los machos que en las hembras (revisado en Segovia y Guillamon, 1993; Guillamon y Segovia, 1997). En el órgano vomeronasal los machos tienen mayor número de receptores así como un mayor volumen del neuroepitelio. Cuando los machos son castrados al nacimiento o las hembras son tratadas con PT, estas diferencias desaparecen. Sin embargo, la gonadectomía en adultos provoca que el peso del neuroepitelio disminuya tanto en machos como en hembras (Segovia y Guillamon, 1982).

El volumen del BOA es mayor y presenta más células mitrales en los machos que en las hembras (Roos et al., 1988), también el soma de las células mitrales es mayor y tiene una mayor cantidad de dendritas en los machos (Caminero et al., 1991). Se ha observado que estas diferencias también dependen de la presencia de andrógenos; cuando los machos son castrados neonatalmente o las hembras son androgenizadas, estas diferencias desaparecen (Segovia y Guillamon, 1993).

A pesar de que no se ha encontrado dimorfismo en todo el NCET, Existen diferencias sexuales volumétricas en pequeñas divisiones del NCET, el volumen de algunas regiones es mayor en machos, pero en otras el volumen es mayor en las hembras. Por ejemplo, el volumen de la división posteromedial del BNST es mayor en la rata macho (del Abril et al., 1987), mientras que la región medial anterior del BNST es mayor en las hembras (del Abril et al., 1987).

También se han reportado diferencias sexuales en la morfología del núcleo amigdaloides medial. En machos su volumen es 20% mayor y recibe 25% más sinapsis que en las hembras (Nishizuka y Arai, 1981a; Mizukami et al., 1983) y esto parece depender de acción temprana de los esteroides gonadales (Nishizuka y Arai, 1981b).

Dimorfismo sexual en conductas no reproductivas

En muchas especies, los machos se diferencian bastante de las hembras, no sólo en su fenotipo, femenino y masculino, y en su conducta sexual y su preferencia olfatoria, sino también en una serie de conductas no asociadas a la cópula. La expresión de estas conductas no solo se debe a los efectos organizacionales de las hormonas en las etapas tempranas del desarrollo sino también a sus influencias activacionales. Como ya se mencionó, la presencia ó ausencia de andrógenos o de sus productos aromatizados durante el desarrollo perinatal, determina la capacidad para desplegar patrones copulatorios masculinos o femeninos, respectivamente. En ese momento los andrógenos y su aromatización tienen efectos organizacionales en la estructura cerebral. Cuando adultos, la

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

presencia de andrógenos y su aromatización en el cerebro son factores activacionales sobre la conducta sexual masculina, mientras que el estradiol y la progesterona, son los factores activacionales de la conducta femenina. Para muchas conductas sexualmente dimórficas no asociadas a la reproducción, los andrógenos y su aromatización también actúan como los factores activacionales y en algunas conductas también son los factores organizacionales. A continuación se describen brevemente algunas conductas que presentan dimorfismo sexual.

Actividad locomotora: Ha sido estudiada en la rata en bandas sin fin y en pruebas de campo abierto; en ambas se han observado diferencias sexuales, las hembras han sido más activas que los machos. La gonadectomía hace desaparecer las diferencias en la banda sin fin y el reemplazo hormonal induce su reaparición (Beatty, 1992). La actividad motora en una banda sin fin se correlaciona positivamente con las dosis de estradiol tanto en hembras como en machos, por lo que se ha sugerido que el efecto activacional de la testosterona se da a través de su aromatización (Roy y Wade, 1975). También se ha reportado el efecto de la testosterona y el estradiol sobre la organización de esta conducta: las hembras tratadas con PT reducen su respuesta a las inyecciones de estradiol (Beatty, 1992), mientras que el tratamiento neonatal con estradiol no modifica la respuesta al estradiol cuando adulto (Gerall, 1967). Con respecto a la actividad motora en campo abierto no está claro el papel de las hormonas esteroides en los adultos; sin embargo, con respecto a los efectos organizacionales de las hormonas, las hembras tratadas con PT disminuyen su actividad (Pfaff y Zigmond, 1971; Blizard y Denef, 1973) y los machos castrados neonatalmente tienen mayor actividad que los machos control (Ross et al., 1988).

Preferencia de sabor: Las ratas hembra exhiben una mayor preferencia que los machos por soluciones dulces, ya sea nutritivas (glucosa) o no nutritivas (sacarina) (Valenstein et al., 1967) (Wade y Zucker, 1969). El sabor dulce también aumenta el consumo de alimentos en las hembras (Hamilton y Timmons, 1976). Las hormonas ováricas actúan sinérgicamente para determinar la preferencia por la sacarina en las hembras ya que la ovariectomía reduce drásticamente esta preferencia que es restituida con estrógenos y progesterona, estas hormonas por sí solas no producen mucho efecto (Wade y Zucker, 1969). Los efectos activacionales de las hormonas testiculares prácticamente no tienen ningún efecto, la castración no modifica de manera importante el consumo de sacarina, pero el tratamiento neonatal con PT (mas no con BE), reduce de manera importante la preferencia por sacarina en las hembras (Wade y Zucker, 1969; Zucker et al., 1972).

Las ratas hembras también presentan una mayor preferencia por los sabores salados que los machos (Krocek et al., 1972), pero estas diferencias no aparecen sino hasta después de la pubertad. La gonadectomía a los diez días de edad no afecta la preferencia por la sal en ningún sexo, pero la

manipulación hormonal neonatal tiene potentes efectos organizacionales. Las hembras tratadas con testosterona a los dos días de edad muestran una preferencia típicamente masculina (baja) por la sal pero la administración de testosterona a los 12 días de edad no tiene ningún efecto (Krecek, 1973). La castración neonatal en los machos tiene el efecto opuesto: aumenta la preferencia por la sal (Krecek, 1976). La hormonas ováricas parecen también tener un papel importante; la ovariectomía neonatal reduce de manera importante la preferencia por la sal (Krecek, 1978).

Agresión. Se han demostrado conductas sexodimórficas en el comportamiento agresivo de ratas, los machos presentan mayor conducta agresiva que las hembras. Cuando los machos son castrados disminuye la agresión por choques (Bernard y Paolino, 1975) así como la agresión hacia un intruso (Barfield et al., 1972) y la agresión por el acceso a una hembra (Taylor et al., 1984). Los mecanismos por los cuales la testosterona activa la agresión en la rata macho no han sido bien estudiados. Christie y Barfield (1979) han encontrado que la testosterona y el estradiol son igualmente potentes para restaurar la conducta agresiva en ratas machos castradas cuando se ponen en presencia de un intruso, también observaron que los andrógenos no aromatizables como la DHT son menos potentes que los aromatizables, pero más potentes que las inyecciones control. Sin embargo, Barr y cols. (1976) observaron que la castración neonatal reducía la agresión y que la testosterona aplicada cuando eran adultos no era capaz de restablecerla a sus niveles normales. Van de Poll y cols. (1981) no encontraron diferencias entre machos y hembras cuando eran gonadectomizados neonatalmente y se les administraba testosterona cuando adultos, pero sí cuando se les trataba con benzoato de estradiol: los machos mostraban mayor agresión.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CAPITULO III. OBJETIVOS Y METODOLOGÍA

Las diferencias sexuales en la acción y secreción hormonal, en la anatomía y función tanto corporal como cerebral así como en otras conductas, algunas descritas en los capítulos anteriores, muestran el papel fundamental que juegan los andrógenos y sus metabolitos aromatizados en su establecimiento (nivel organizacional) y en su expresión (nivel activacional). Sin embargo, existen varias preguntas que necesitan respuesta. Entre ellas la que sobresale es el papel que tienen los andrógenos y los estrógenos en la diferenciación sexual femenina, ya que incluso se ha argumentado que no participan de manera importante en el establecimiento de las características sexuales en las hembras. A lo largo de estos capítulos se ha mostrado que los andrógenos y estrógenos participan en los procesos de masculinización y desfeminización pero no se menciona cómo el cerebro ha hecho para feminizarse para después poder ser desfeminizado. Este juego de palabras que parece intrascendente demuestra el gran vacío que existe en la comprensión del proceso de la diferenciación sexual en la hembra, ya que varios de los estudios se basan en la premisa de que el cerebro es "innatamente femenino" lo que ocasiona que el término desfeminización tenga una explicación evidente. Sin embargo, creemos que también el cerebro es indiferenciado y se tiene que masculinizar o feminizar. El problema es que no se conoce cuáles son los eventos que inducen la feminización cerebral, aunque aparentemente la falta de estrógenos en el encéfalo es lo que lo feminiza. Por esta razón se explicaría por que la administración perinatal de inhibidores de la aromatasa o la administración de estrógenos induce que los machos presenten conducta de receptividad.

Para probar la hipótesis de que la falta de estradiol es el factor que feminiza el cerebro se decidió evaluar el efecto de la administración perinatal de un inhibidor de la aromatización o un bloqueador de los receptores de andrógenos sobre la expresión sexual tanto de hembras como de machos. Este es el primer estudio comparativo del efecto perinatal de ATD y flutamida teniendo como controles sujetos del mismo sexo y del sexo opuesto, tanto tratados como no tratados para reducir en la manera de lo posible una interpretación inadecuada o parcial de los efectos observados. Además se deseó correlacionar los efectos de los tratamientos perinatales en la conducta coital con su efecto sobre la preferencia sexual y olfatoria para tener una visión más integrativa de la conducta sexual que despliegan dichos animales. Una diferencia más de este estudio con respecto a otros es que se evaluó el efecto activacional de hormonas típicamente femeninas o masculinas en animales gonadectomizados para después compararlo con los resultados obtenidos en los animales no gonadectomizados y sin influencia hormonal de reemplazo. Esto permitió una visión relativamente

amplia del efecto perinatal del bloqueo de receptores de andrógenos (con flutamida) o de la inhibición de la aromatización (con ATD) sobre la conducta sexual de hembras y machos en diferentes condiciones hormonales.

Al comenzar este trabajo partimos de la idea ampliamente discutida en los capítulos anteriores de que el estradiol es el responsable de masculinizar y desfeminizar el cerebro en los machos, por lo tanto nuestra hipótesis fue la siguiente:

HIPÓTESIS:

Los machos con inhibición de la aromatización de la testosterona a estradiol no mostrarán conducta sexual masculina y tampoco preferencia sexual y olfatoria por las hembras. Mientras que las hembras con el mismo tratamiento, tampoco mostrarán conductas típicamente masculinas y su conducta femenina será mayor que la mostrada por las hembras control. Además, si el estradiol es el responsable de la masculinización y desfeminización de la conducta, el hecho de bloquear a los receptores de andrógenos prenatalmente no interferirá con el despliegue de la conducta y las preferencias sexual y olfatoria de los machos o de las hembras.

Por lo tanto los el objetivos general y particulares de este trabajo fueron los siguientes:

OBJETIVOS GENERAL

El objetivo general de esta tesis fue investigar el efecto de la inhibición perinatal de la formación de estrógeno o del bloqueo prenatal de la acción de andrógenos sobre la diferenciación sexual conductual y cerebral en ratas de ambos sexos.

OBJETIVOS PARTICULARES

- El experimento 1 fue descriptivo. Los objetivos particulares fueron analizar el efecto de la administración perinatal de ATD o flutamida sobre la conducta coital tanto masculina como

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

femenina como en las preferencias olfatoria y sexual. El experimento fue diseñado para determinar si los efectos observados en la conducta coital eran debidos a un procesamiento inadecuado de las señales olfatorias o a un cambio real de preferencia de compañero sexual. Es decir, si por ejemplo, las modificaciones observadas en los machos con inhibición perinatal de la aromatización, que presentan conducta coital femenina, la presentan por una desinhibición del reflejo de lordosis ó porque tienen una clara preferencia por los machos. Además, el experimento se diseñó para determinar si el efecto inducido por cada uno de los tratamientos era un efecto a nivel organizacional o a nivel activacional. Para esto se decidió realizar las pruebas conductuales en animales intactos o en animales gonadectomizados bajo reemplazo hormonal. Si los efectos eran activacionales observaríamos inconsistencias entre los animales intactos y los tratados hormonalmente. Si, en cambio, los efectos eran organizacionales se obtendrían los mismos resultados independientemente de la condición hormonal de los sujetos.

- Los experimentos 2 y 3 fueron diseñados con el objetivo de demostrar que la testosterona (experimento 2) y/o el estradiol (experimento 3) participan en la diferenciación sexual femenina, particularmente en la diferenciación de una conducta proceptiva (la capacidad de controlar la cópula) y en la diferenciación de las propiedades reforzantes de la cópula regulada. Para ello se efectuaron pruebas de conducta coital controladas por las hembras ("pacing") y se evaluó si el estado inducido por este tipo de cópula tiene propiedades reforzantes (afectivas positivas) por medio del paradigma de preferencia de lugar inducido por cópula. Esto nos permitiría determinar si la conducta sexual femenina que presentaban las hembras tratadas con los mencionados fármacos induce las mismas propiedades reforzantes que aquéllas inducidas en las hembras control.
- El objetivo del experimento 4 fue determinar si los machos tratados perinatalmente con ATD eran capaces de regular la interacción sexual con un macho estímulo y si esta actividad era capaz de inducirles un estado afectivo positivo (reforzante).
- Para el experimento 5 teníamos resultados provenientes de otro grupo de investigación que demostró que ratas macho tratadas postnatalmente con el inhibidor de la aromataasa, a pesar de presentar conducta coital femenina, responden al olor de hembras receptivas, de la misma

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

manera que los machos control. El primer objetivo de este experimento fue determinar si el bloqueo de la aromatización tanto prenatal como postnatal era capaz de feminizar la respuesta del sistema responsable de responder al olor estral (sistema de proyección vomeronasal u olfatorio accesorio). El segundo objetivo fue evaluar la posibilidad de que fuera la testosterona por sí misma la responsable de organizar (masculinizar) la respuesta del sistema de proyección vomeronasal tanto en hembras como en machos. Es decir que fuera la testosterona proveniente de los testículos fetales adyacentes a las hembras la responsable de que las ratas hembras respondieran al olor de hembras en estro, hecho que no se observa en hurones y hámsteres en los cuales la testosterona fetal proveniente de los machos no pasa a las hembras adyacentes.

Para alcanzar dichos objetivos se siguió la siguiente metodología general. Se debe destacar que en cada experimento se describe la metodología particular para cada uno de ellos.

METODOLOGÍA GENERAL

En todos los experimentos se usaron ratas de la cepa Sprague-Dawley obtenidas del bioterio del Instituto de Neurobiología y se les mantuvo con comida (5001 Rodent Diet, de LabDiet) y agua a libre demanda. Se mantuvieron en grupos de 3-5 animales del mismo sexo por caja en un cuarto con un ciclo invertido de luz de 12 por 12 horas (la luz se apagaba a las 8:00 hrs.).

Para obtener a los animales experimentales las hembras fueron observadas para determinar su estado estral, cuando ellas presentaban estro conductual recibieron dos eyaculaciones de dos machos, ese día fue considerado como el día 0 de gestación. A los 12 días de gestación se empezaron a administrar los tratamientos control y los tratamientos experimentales. Los tratamientos experimentales fueron dos, uno con ATD y otro con flutamida.

El ATD (1,4,6-androstatriene-3,17-diona, inhibidor de la aromatas) inicialmente fue donado por el Dr. Michael Baum y después se adquirió directamente a Steraloids, INC. A los 12 días de gestación a las hembras preñadas se les implantó subcutáneamente una cápsula de silastic (diámetro externo: 2.1 mm, diámetro interno: 1.5 mm, longitud: 5 cm) que contenía el ATD. Dentro de las primeras 4 horas después del nacimiento se les administró 1mg de ATD disuelto en aceite de maíz

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

en un volumen de 0.05 ó 0.1 mL, este tratamiento se repitió cada tercer día y la última administración fue a los 11 días de edad (Brand et al., 1991).

La flutamida (4'-nitro-3'-trifluorometilisobutirilamida, bloqueador de los receptores de andrógenos, comprado a Sigma) fue administrada a la hembra preñada a partir de los 12 días de gestación hasta al nacimiento por vía subcutánea (Brand y Slob, 1991c). La flutamida se disolvió en propilenglicol:etanol (9:1) y se administró dos veces diarias (9:00-10:00 y 20:00-21:00 hrs.) en una dosis de 10 mg/Kg. Al nacimiento, en algunos experimentos, las crías fueron inyectadas con 0.05 mL de aceite de maíz como tratamiento control.

En un inicio se hicieron tres grupos control. En el primero, las hembras preñadas fueron implantadas con una cápsula de silastic vacía, al nacimiento las crías fueron inyectadas con aceite de maíz cada tercer día desde el nacimiento hasta los 11 días de edad. En el segundo grupo control las hembras gestantes fueron inyectadas con propilenglicol:etanol (9:1) dos veces diarias desde los 12 días de preñez hasta el nacimiento y en algunas ocasiones las crías fueron inyectadas con aceite de maíz (0.05 mL) cada tercer día desde el nacimiento hasta los 11 días de edad. Las hembras gestantes del último grupo control fueron tratadas con propilenglicol:etanol (9:1) dos veces diarias desde el día doce de gestación hasta el nacimiento y una cápsula de silastic vacía les fue implantada subcutáneamente a los 12 días de gestación; las crías fueron inyectadas con aceite cada tercer día desde el nacimiento hasta los 11 días de gestación. Debido a que no se encontraron diferencias conductuales entre los distintos grupos control los animales se consideraron como pertenecientes a un único grupo control; en experimentos posteriores solo se trataron hembras gestantes como se describe en los dos primeros grupos control y los sujetos de ambos grupos fueron aleatoriamente escogidos para hacer un único control de los experimentos realizados.

Todos las crías fueron separadas de sus madres entre los 25 y 26 días de edad y fueron alojadas en grupos de 3 a 5 sujetos según el sexo. Entre los 3 y 5 meses de edad se consideraron en edad idónea para utilizarlos en los experimentos.

Los animales estímulo en las pruebas conductuales, fueron hembras ovariectomizadas y tratadas con benzoato de estradiol (Sigma, 25 µg por rata, al menos 44 hrs. antes de utilizarlas) y progesterona (Sigma, 1 mg por rata, al menos 4 hrs. antes de su uso) y machos intactos entrenados para copular.

A continuación se describe la forma en que se realizaron las pruebas conductuales.

TESIS CON
FALLA DE CONTEN

Conducta Coital Femenina

En una caja de observación (70 X 40 X 35 cm, Fig. 3.1) donde se encontraba un macho estímulo, fue introducido un sujeto experimental el cual fue montado por el macho estímulo hasta en 10 ocasiones. Se registró si presentaba o no lordosis y la intensidad de estas en una escala de 0 a 2 (0= sin lordosis, 1= lordosis caracterizada por una flexión cóncava moderada de la espalda, y 2= lordosis caracterizada por una flexión cóncava pronunciada de la espalda y extensión del cuello). A partir de estos datos se obtuvieron los siguientes parámetros: Cociente de lordosis (CL ó LQ, número de lordosis realizadas dividido entre número de montas recibidas, esto multiplicado por 100) e intensidad media de lordosis (IML ó IL, suma de puntos obtenidos en cada una de las montas dividido entre el número de montas).

Conducta Coital Masculina

Una hembra estímulo era introducida a la caja de observación descrita en el apartado anterior. Posteriormente se introducía al sujeto experimental y se registraba el tiempo de la primera presentación (latencia) de los patrones de monta (LM), intromisión (LI) y eyacuación (LE). En todos los casos se registró la actividad coital del sujeto experimental por 30 min lo que permitió obtener la frecuencia de monta (FM), intromisión (FI) y eyacuación (FE). Además se calculó el intervalo interintromisión (III) y el periodo refractario después de la eyacuación (PR). A continuación se define cada uno de los parámetros:

LM: Tiempo transcurrido desde la introducción del sujeto experimental a la caja de observación hasta la presentación del primer patrón de monta.

LI: Tiempo transcurrido desde la introducción del sujeto experimental a la caja de observación hasta la presentación del primer patrón de intromisión.

LE: Tiempo transcurrido desde la primera intromisión del sujeto experimental hasta la presentación de primer patrón de eyacuación.

FM: Número de patrones de monta en los 30 min de duración de la prueba.

FI: Número de patrones de intromisión en los 30 min de duración de la prueba.

FE: Número de patrones de eyacuación en los 30 min de duración de la prueba.

III: LE dividida entre el número de intromisiones previas a la primera eyacuación.

PR: Tiempo transcurrido entre la primera eyacuación y el siguiente patrón de intromisión.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Preferencia Olfatoria

El sujeto experimental fue introducido en una caja de prueba que contenía tres recipientes (10 X 10 X 4 cm) colocados equidistantemente y al azar (Fig. 3.1). Uno de los recipientes contenía aserrín proveniente de la cama de machos estímulo; otro, aserrín proveniente de la cama de hembras receptoras. En ambos recipientes el aserrín que formaba la cama estuvo expuesto al menos 6 hrs a las secreciones de los sujetos estímulo. El tercer recipiente contenía aserrín limpio. Durante 10 min se registró el tiempo en el que el sujeto tenía el hocico dentro de cada uno de los recipientes (Paredes et al., 1998a).

Para determinar si existía preferencia olfatoria, el recipiente donde se registró el tiempo más alto tenía que ser estadísticamente diferente al tiempo registrado en los otros dos recipientes.

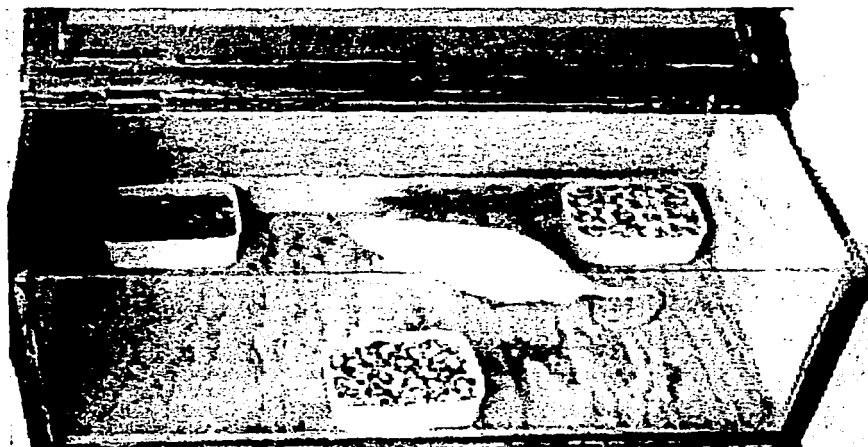


Figura 3.1. Caja para la evaluación de la preferencia olfatoria con tres recipientes que contienen aserrín limpio, aserrín proveniente de la caja-hogar de 5 machos sexualmente expertos y aserrín proveniente de la caja-hogar de 5 hembras receptoras.

Preferencia Sexual

En esta prueba se utilizó una caja de madera de tres compartimentos. El compartimiento central (21 X 27 X 32 cm) comunicaba con los dos compartimentos laterales (36 X 27 X 32 cm) por medio de puertas deslizantes (tipo guillotina, 10 X 10 cm). En uno de los compartimentos laterales se

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

encontraba una hembra receptiva y en el otro un macho estímulo, ambos con un chaleco de tela en el tórax. El chaleco estaba sujeto por medio de un cable a una de las paredes, lo que impedía al sujeto salir de su compartimento pero no limitaba su desempeño sexual (Fig. 3.2). Al inicio de la prueba, el sujeto experimental era introducido al compartimento central por un minuto, pasado este tiempo las puertas se abrían y se registraba durante 10 min el tiempo que permanecía en cada compartimento, tomando como factor de decisión que ambos miembros anteriores estuvieran dentro del compartimento (Paredes et al., 1998b). Para determinar si existía preferencia por el macho (o por la hembra) el tiempo pasado con él (ó ella) tenía que ser significativamente mayor al transcurrido en el compartimento central y el pasado con la hembra (o el macho, respectivamente).

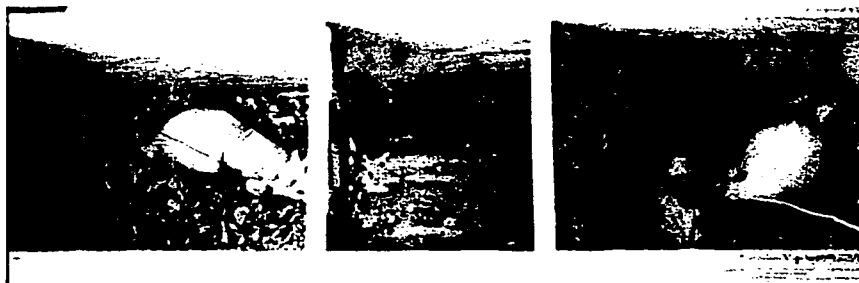


Figura 3.2. Caja con tres compartimentos para evaluar la preferencia sexual. En el compartimento izquierdo se encuentra un macho estímulo y en el derecho una hembra receptiva, ambos con chalecos para limitar su movimiento a su compartimento respectivo. Con la hembra estímulo se observa un sujeto experimental, en este caso un macho, el cual puede desplazarse libremente entre los 3 compartimentos.

Pruebas de cópula regulada (“pacing”)

Para las pruebas de cópula regulada un macho estímulo era introducido en una caja de observación que estaba dividida en dos partes por una pared. La pared tenía un orificio (5 X 3 cm si el sujeto experimental era una hembra ó 6 X 3 cm, si era un macho) por el que el macho estímulo no cabía (Fig. 3.3). El sujeto experimental, ya sea macho o hembra, menos grandes que el macho estímulo, era introducido a la caja de observación por el lado desocupado. Debido a su menor tamaño éste podía pasar a donde estaba confinado el macho estímulo y salir en cualquier momento; es decir, regulaba la frecuencia y el tiempo de interacción con el macho estímulo. Se registró la latencia de entrada (tiempo desde la entrada de la hembra a la caja de observación hasta el momento

en que la hembra entraba al compartimento del macho) y cada una de las montas, intromisiones y eyaculaciones que recibía así como la intensidad de cada lordosis. Además, se registró el tiempo en que ocurría cada salida, correlacionándola con el patrón conductual previo presentado por el macho y el tiempo en que volvía a regresar con él. Esta información se usó para determinar el porcentaje de salidas después de recibir una monta, una intromisión ó una eyaculación, y la latencia de regreso después de cada uno de estos patrones conductuales. Si el sujeto experimental era una hembra, la prueba terminaba cuando ella recibía 15 intromisiones o después de recibir menos de 15 intromisiones y una eyaculación (Paredes y Alonso, 1997). Si recibía una eyaculación se esperaban dos minutos para determinar si la hembra salía, si lo hacía se registraba la latencia de regreso; si al final de esos dos minutos la hembra no salía era retirada de la caja. Si el sujeto experimental era un macho se registraron los mismos parámetros, con la excepción de que los machos no recibieron patrones de intromisión y por lo tanto solo se obtuvieron el porcentaje de salida y la latencia de regreso después de recibir una monta. La prueba terminaba cuando el macho experimental recibía 15 montas o transcurrían 20 min.

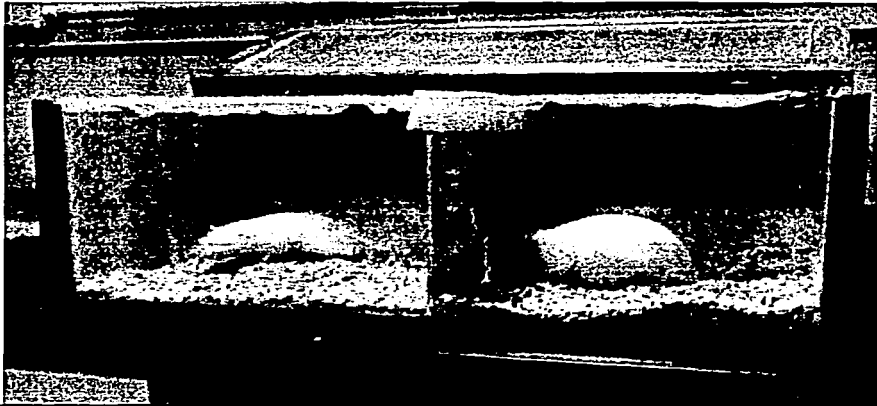


Figura 3.3. Caja de cópula regulada. El macho estímulo está confinado a un lado de la caja, mientras que el sujeto experimental, de menor tamaño, puede pasar a través de la abertura y así regular la interacción con el macho estímulo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Prueba de condicionamiento de preferencia de lugar

Esta prueba se utilizó para evaluar la capacidad del estado inducido por la cópula regulada para producir un estado afectivo positivo (reforzante). La caja para evaluar la preferencia de lugar tiene tres compartimentos. El compartimento central (21 X 27 X 32 cm), de color gris, comunica con dos compartimentos laterales (36 X 27 X 32 cm) por medio de puertas deslizantes (tipo guillotina, 10 X 10 cm). Uno de los compartimentos laterales es blanco y tiene aserrín en el piso, el otro compartimento es negro y las paredes se impregnaron de ácido acético al 2% (Fig. 3.4). Esto tiene la finalidad de darle características diferentes en cuanto a textura, color y olor para que puedan usar esas señales sensoriales para diferenciarlos y escogerlos (preferirlo o no preferirlo). En el primer día de sesión (preprueba), el sujeto experimental es introducido al compartimento central durante 1 min. Pasado este tiempo las puertas son removidas y la rata puede circular libremente entre los tres compartimentos. Se registra el tiempo que pasa en cada uno de ellos durante 10 min y al final de la prueba se conoce la preferencia inicial de la hembra ya sea por el compartimento blanco o el negro. En los 6 días posteriores se alternan sesiones de reforzamiento con sesiones sin reforzamiento, de tal manera que la rata recibe 3 sesiones reforzantes y 3 no reforzantes. En las sesiones de reforzamiento la rata es sometida al estímulo reforzante y al final de este se coloca al animal durante 30 min en el compartimento no preferido (Paredes y Alonso, 1997). En las sesiones sin reforzamiento se coloca a la rata durante 30 min en el compartimento preferido directamente de su caja-hogar o después de una situación control. En los experimentos descritos en el presente trabajo se utilizaron uno de tres estímulos reforzantes, inyección de morfina, cópula regulada ó cópula no regulada (donde la barrera es removida). Después de las tres sesiones no reforzadas y de las tres de asociación al estímulo reforzante, la preferencia de lugar fue evaluada nuevamente (prueba) de la misma manera que al determinar la preferencia inicial. Para determinar si el estímulo reforzante fue asociado al compartimento que la rata inicialmente no había preferido, es decir evaluar si el estímulo indujo un cambio de preferencia, se utilizaron dos parámetros: 1) el tiempo en el compartimento no preferido (reforzado) y 2) el índice de preferencia (tiempo en el compartimento reforzado dividido entre la suma del tiempo en ambos compartimentos laterales). Ambos parámetros debían de aumentar significativamente en la preferencia final (prueba) con respecto a la preferencia inicial (preprueba). Se considera importante que ambos aumenten significativamente ya que el hecho de considerar sólo uno de los parámetros podría llevar a la obtención de resultados espurios lo que llevaría a una interpretación equivocada del experimento.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

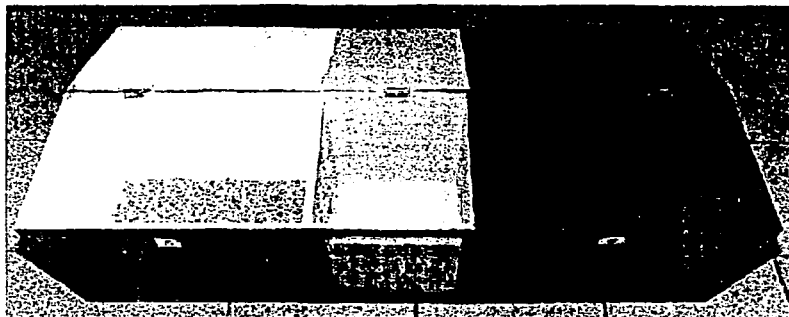


Figura 3.4. Caja de condicionamiento de preferencia de lugar. Los compartimentos laterales difieren en color, textura y olor para proporcionar señales sensoriales al sujeto experimental que pueda relacionar con estímulos reforzantes o afectivos positivos.

Cirugías

La mayoría de los animales fueron gonadectomizados. Para ello se les tomó el peso corporal y fueron anestesiados con una mezcla de ketamina (70 mg/Kg) y xilazina (6 mg/Kg). Cuando los animales estaban completamente anestesiados se les midió la distancia ano-genital y se inició la cirugía, ya sea para remover los ovarios o los testículos. En algunos casos las gónadas fueron pesadas y al final de las cirugías los sujetos fueron inyectados con 0.1 mL de depomycine (200 UI de penicilina G procaínica y 20 mg de sulfato de dihidroestreptomicina de Intervet) para prevenir infecciones.

Además de estas pruebas conductuales se realizaron tinciones inmunohistoquímicas contra la proteína Fos para detectar la intensidad de respuesta del sistema de proyección vomeronasal a señales quimiosensoriales sexualmente relevantes provenientes de hembras en estro. Debido a que esta técnica fue usada únicamente en el experimento 5, es ahí donde se describe.

Análisis estadístico

A pesar de que cada experimento descrito tiene un diseño experimental particular y por lo tanto el diseño estadístico es particular al experimento, lo que sigue son observaciones aplicables a prácticamente todos los experimentos. Se trató de usar estadística paramétrica sobre la no paramétrica debido a que la estadística paramétrica permite analizar con mayor minuciosidad un

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

conjunto complejo de datos, sobre todo cuando se tienen varios grupos con 2 o 3 interacciones (como fue el caso de las pruebas de preferencia olfatoria, por ejemplo, en las que se tenían los diferentes tratamiento, ambos sexos y los tres tipos de aserrín). Por otro lado, en varios experimentos nos interesó demostrar que no existían diferencias significativas, por lo que se utilizó una prueba considerada clásicamente "débil", la prueba de diferencias mínimas significativas (LSD) de Fisher, pero que para nuestro interés era la prueba estadística más fuerte, ya que nos aseguraba que realmente no existían diferencias. Finalmente, en todas las pruebas de condicionamiento de preferencia de lugar se utilizó un análisis de varianza de medidas repetidas (en el factor preprueba-prueba) con análisis de componentes principales para determinar si el tiempo en la caja reforzada y el índice de preferencia aumentaba significativamente en la prueba con respecto a la preprueba en cada uno de los grupos en cada experimento.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CAPITULO IV: TRABAJO EXPERIMENTAL

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

EXPERIMENTO 1:

**SEXUAL DIFFERENTIATION OF COITAL
BEHAVIOR, PARTNER PREFERENCE
AND ODOR PREFERENCE IN RATS.**

Emilio Domínguez-Salazar and Raúl G. Paredes

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

SEXUAL DIFFERENTIATION OF COITAL BEHAVIOR, PARTNER PREFERENCE AND ODOR PREFERENCE IN RATS.

INTRODUCTION

During a sensitive or critical perinatal period, androgens and their estrogenic metabolites act on the developing central nervous system by permanently altering its structure and function. They act not only in the control of gonadotropin secretion, but also in the process of masculinization and defeminization of sexual behavior (Baum, 1979; Goy, 1966; Phoenix, Goy, Gerall, and Young, 1959) including organization of partner (Bakker, Brand, van Ophemert, and Slob, 1993a; Brand, Kroonen, Mos, and Slob, 1991; Vega Matuszczyk and Larsson, 1995) and odor preference (Bakker, Van Ophemert, and Slob, 1996b).

In the rat, masculinization results in the display of mount, intromission and ejaculation in adulthood and defeminization result in a loss of a cyclic release of gonadotropins necessary for ovulation and the display of proceptive and receptive behaviors (McLusky and Naftolin, 1981). Thus, gonadally intact male rats prefer to be with estrous females over males (Bakker, van Ophemert, and Slob, 1993b; Brand and Slob, 1991b; Hetta and Meyerson, 1978) and show a clear preference for odors of receptive females over odors from stimulus males or anestrus females (LeMagnen, 1952; Carr et al., 1965; Stern, 1970; Bakker et al., 1996). On the other hand, intact estrous females prefer to be with a male over a female (Meyerson and Lindstrom, 1973) and show preference for odors from males over odors from estrous females (Bakker et al., 1996b).

These behaviors are sexually differentiated and reflect the action of estradiol, derived from neural aromatization of testosterone, in the male. If the formation of estradiol is inhibited perinatally by the administration of the aromatase inhibitor 1,4,6-androstatrieno- 3,17-dione (ATD), the males show masculine as well as feminine sexual behaviors [Bakker, 1993 #91; Brand, 1991 #426; Dominguez-Salazar, 2002 #226; Davis, 1979 #5167; Vreeburg, 1977 #5031] (Bakker et al., 1993; Brand et al., 1991; Davics et al., 1979; Dominguez-Salazar et al., 2002; Vreeburg, 1977).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Sexual partner preference is also incompletely sexually differentiated in neonatally estrogen-deprived males. If gonadally intact, ATD males do not show a clear preference for the female over the male (Bakker et al., 1993b; Bakker, van Ophemert, and Slob, 1995; Bakker, van Ophemert, Timmerman, de Jong, and Slob, 1995). The most striking differences between neonatally estrogen-deprived males and normal males were obtained when the subjects were castrated and treated with estradiol, ATD males showed a clearcut preference for the sexually active male (Bakker et al., 1993b). But when the perinatally ATD-treated males were gonadectomized and treated with testosterone propionate in adulthood, they showed a clear preference for the estrous females like the one showed by control males (Dominguez-Salazar et al., 2002).

The odor preference by sexually relevant cues of males is influenced by perinatal aromatization. The vomeronasal projection pathway, the system responsible for processing of reproductive relevant pheromonal cues, of neonatally ATD-treated males responded to odors from estrous females when treated with estradiol (E) (Bakker, Baum, and Slob, 1996a) or testosterone propionate (TP) (Dominguez-Salazar et al., 2002) and to odors from active males when they were treated with EB (Bakker et al., 1996a). However, when ATD males were tested in a three compartments box under estradiol treatment, they showed preference for the compartment with soiled bedding from estrous females over the compartment with soiled bedding from active males (Bakker et al., 1996b).

The role of androgen on feminine sexual differentiation appears not to be important. Flutamide-treated and ATD-treated females showed higher lordosis levels than control females with low doses of E13 and decreased male-like behavior (Clemens and Gladue, 1978; Clemens, Gladue, and Coniglio, 1978; Gladue and Clemens, 1978). These results suggested that the masculinization induced by the androgens from adjacent males in prenatal stage could be blocked by an antagonist for androgen receptors or by inhibition of aromatization. However, some results suggest that androgens do not participate in feminine sexual differentiation. For example, Brand and Slob (Brand and Slob, 1991c) showed that female rats prenatally treated with flutamide had an equal

TESIS CON
FALLA DE CUBRIR

preference for the male as that of controls when they were treated with EB plus P and switched their preference for an estrous female after a long-term T treatment.

In the present study we analyzed the effect of prenatal blocked of androgen receptors with flutamide and the effect of perinatal inhibition of aromatization on the masculine and feminine coital behavior, odor preference and partner preference in female and male adults rats under different hormonal conditions: intact subjects, gonadectomized and treated with TP and gonadectomized and treated with EB plus P.

GENERAL METHODS

Animals and Treatments

Male and female Sprague-Dawley rats obtained from the breeding colony at the Instituto de Neurobiología (INB, UNAM, Querétaro, México) were housed in single-sex groups of three to five animals. Food and water were available *ad libitum*. Rats were maintained in a room with a reversed light-dark cycle (12h light/12h dark; lights off at 10:00).

Female rats were time-mated. At day 12 of gestation, pregnant dams received under light ether anesthesia a subcutaneous (sc) implant of a silastic capsule (inner diameter 1.5 mm; outer diameter 2.1 mm; length: 5 cm) containing ATD. Male and female offspring from ATD-treated mothers continued to receive ATD by injection (1 mg/rat; ever other day with corn oil as the vehicle) until Day 12 after birth. Other group of pregnant dams was injected twice daily (10 AM and 8 PM) with Flutamide (10mg/kg, dissolved in propylene glycol with 10% ethanol) from Day 12 of gestation until pups were born. Two control treatments were done: 1) pregnant dams were implanted with an empty capsule at day 12 of gestation and the pups were injected with 0.05 mL of corn oil every other day. 2) pregnant dams were injected twice daily with propylene glycol:ethanol (9:1) since day 12 of gestation until birth. There were no differences in any of the behavioral test between the different control treatments therefore subjects were pooled in one control group. Pups were weaned at 25 days of age and housed two to three of the same treatment and sex to a cage.

Stimulus animals were sexually active males and estrous females. Male stimulus animals were gonadally intact and sexually experienced. Female stimulus were ovariectomized and were brought into behavioral estrus by injecting them sc with 25 μ g of estradiol benzoate (EB) 52 h before testing and by an injection of 1 mg/kg progesterone (P) 4h before mating and partner preference tests.

Behavioral Testing

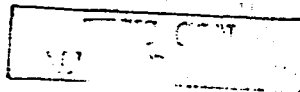
Female-coital behavior

Subjects were tested for lordosis behavior. The lordosis responses and lordosis intensity (on a scale of 0-2; 0= no lordosis, 1 = partial lordosis characterized by lateral tail deviation with moderate concave back flexion, 2 = full lordosis characterized by lateral tail deviation with pronounced back flexion and neck extension) of experimental animals to the mounting of a stimulus male were scored. Tests lasted until the experimental animal had received 7-10 mounts (with or without intromission) by the stimulus males. The lordosis quotient, LQ (total number of lordosis responses / total number of mounts \times 100) and the mean lordosis intensity, LI (sum of points per test / number of mounts) were calculated.

Mate-coital behavior

We evaluated the patterns of mount with pelvic thrust, intromission and ejaculation displayed by the subjects during 30-min tests with receptive females. The following parameters of sexual behavior were registered: Mount (ML) and intromission (IL) latency (time from introduction of the experimental subject until the first mount or intromission pattern, respectively); ejaculation latency (EL, time from first intromission pattern until first ejaculation pattern); mounts (MF), intromission (IF) and ejaculation (EF) frequency (number of patterns during the 30-min test); postejaculatory interval (PEI, time from the first ejaculation until the next intromission).

In females the term intromission and ejaculation refer to behavioral patterns displayed that resembles the behavior shown by males.



Odor preference

Subjects were tested for their preference to approach and investigate different odor stimuli. Subjects were put in a cage (40 x 60 x 40 cm) with three bowls (10 X 10 X 4 cm) containing fresh sawdust, soiled bedding from sexually experienced males, or soiled bedding from receptive females, the bowls were placed random and equidistantly in the cage. The time spent by the subjects investigating (with the nose in) each bowl was recorded during a 10 min test. Soiled bedding from males was collected from 5 sexually active males 6h after they were placed on fresh sawdust. Soiled bedding from estrous females was collected from 5 ovariectomized, EB primed females, 6h after they received an injection of P. All soiled bedding was used immediately in the experiment. Fresh sawdust was used as clean bedding control.

Partner Preference

Subjects were tested for partner preference in a three-compartment box made of wood. The middle compartment (21 x 27 x 32 cm) was connected with the lateral compartments (36 x 27 x 32cm) via a sliding door (10 x 10 cm). The lateral compartments contained in one side a sexually active male and in the other side an estrous female as stimulus animals. The stimulus animals were tethered to the rear of the compartment using a harness attached to a flexible rope. In this way the tethered stimulus animals were able to display coital behaviors while being restricted to their respective compartments. During testing, subjects were placed in the middle compartment, the sliding doors were removed after 1 min, and the time spent in each of the lateral compartments was recorded during a 10 min test.

Statistics

Data from anogenital distance, ovary and testis weight, feminine and masculine sexual behavior were evaluated by a three (group) x two (sex) ANOVA. A three (group) x three (bowl or compartment) ANOVA for each sex was used to evaluate odor and partner preference. When the ANOVA was significant it was followed by post-hoc comparisons using the LSD's Fisher test. For

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

percent of subjects that displaying lordosis, mount, intromission or ejaculation, χ^2 test was used, when the conditions for the use of this test were not satisfied, Fisher's exact test was used indeed.

Experiment 1: Intact subjects.

This experiment was performance to evaluate the effect of the prenatal treatment with Flutamide and the perinatal treatment with ATD on coital behavior and odor and partner preference in intact females and males. In females rats, two tests of each behavior were done, one during behavioral estrous and other during behavioral anestrous. In male rats also two test of each behavior were done with the objective to give the same experience to all subjects.

Methods

10 animals of each sex and treatment were used. Between 3 to 5 months of age, subjects were tested for spontaneous lordosis behavior with a stimulus male during 5 consecutive days. During the next days the receptivity of the females was evaluated with a stimulus male. Two test of masculine coital behavior, odor preference and partner preference (in this sequence) were done. In males, both tests were combined. In the case of the females, one test was done when females presented receptivity behavior (lordosis response previously evaluated with a stimulus male) and one when the females did not show lordosis. The behavioral paradigms were performed one each week. At approximately six months of age the animals were sacrificed with a high dose of pentobarbital and the ano-genital distance, body weight and ovary and testis weight were obtained.

Results

During the feminine coital behavior tests evaluated during 5 consecutive days we obtained the percentage of days with receptivity in each subject (Fig. 1). ANOVA showed a significant differences between groups ($F_{(2,59)}=21, p<0.0001$) and sex ($F_{(1,59)}=19.53, p<0.0001$). The posthoc analysis showed an increase of days with receptivity in ATD males with respect to control males and an increase in ATD females with respect to control females.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ANOVA showed significant differences in lordosis quotient (group: ($F_{(2,59)}=17.1$, $p<0.0001$), sex ($F_{(1,59)}=50.4$, $p<0.0001$) and interaction: ($F_{(1,59)}=6.18$, $p=0.0038$) and lordosis intensity (group: ($F_{(2,59)}=5.9$, $p<0.0001$), sex ($F_{(1,59)}=45.3$, $p<0.0001$) and interaction: ($F_{(1,59)}=3.7$, $p=0.0313$)). The posthoc analysis showed an increase of lordosis behavior in females and males treated with ATD and a decreased in the females treated with flutamide (table 1).

GROUP	Percent of Days with Receptive Behavior	Intensity of Lordosis	Lordosis Quotient
CONTROL FEMALES	20 ± 3.8 *	1.62 ± 0.21 **	88.9 ± 9.94 **
FLUTAMIDE FEMALES	13.7 ± 4.2	0.58 ± 0.23 * ††	34 ± 12.6 * ††
ATD FEMALES	65.3 ± 10.4 ** ††	1.85 ± 0.21 **	52.7 ± 0.3 ** ††
CONTROL MALES	0 ± 0 †	0 ± 0 ††	0 ± 0 ††
FLUTAMIDE MALES	0 ± 0 †	0 ± 0 ††	0 ± 0 ††
ATD MALES	26.5 ± 9.7 **	0.86 ± 0.27 ** ††	86.64 ± 5.11 **

Table 1. Feminine coital behavior displaying by intact subjects during 5 consecutive days.

Mean ± S.E.M. ANOVA followed by Fisher's LSD test. †, Different from control females, $p<0.05$; ††, $p<0.01$. *, Different from control males, $p<0.05$; **, $p<0.01$.

The percent of subjects displaying mount ($\chi^2_{(8)}=36.51$, $p<0.01$), intromission ($\chi^2_{(8)}=54.16$, $p<0.01$) and ejaculation ($\chi^2_{(8)}=41.4$, $p<0.01$) is showed in figure 1. The percent of flutamide treated males with intromission and ejaculation decreased with respect to control and ATD treated males. Only few females showed mount and intromission patterns. Table 2 show data for mount latency (ANOVA, sex ($F_{(2,42)}=8.25$, $p=0.001$), mount frequency (ANOVA, sex ($F_{(2,67)}=11.25$, $p<0.0001$), intromission latency, intromission frequency (ANOVA, sex ($F_{(2,67)}=5.53$, $p=0.006$), ejaculation latency, ejaculation frequency (ANOVA, sex ($F_{(2,67)}=11.25$, $p<0.0001$) and postejaculatory interval. The posthoc analysis revealed that flutamide treated males and all females had less mounts and intromissions than control males. Control and flutamide treated non-receptive females show decreased mount latency with respect to control receptive females.

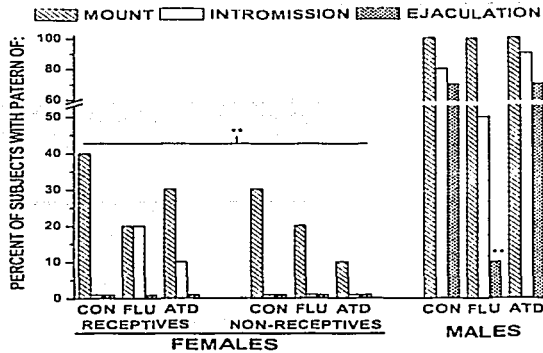


Figure 1. Percent of intact subjects that displaying mount, intromission and ejaculation patterns. Fisher exact test, **, Different from control and ATD treated males, $p < 0.01$.

GROUP	ML	MF	IL	IF	EL	EF	PEI
MALES							
CONTROL	167 ± 34 ††	40 ± 18	280 ± 50	12 ± 5	861 ± 196	0.7 ± 0.3	223 ± 49
FLUTAMIDE	284 ± 74 ††	11 ± 2 **	220 ± 82	0.4 ± 0.1 **	469 ± 0	0.05 ± 0.05 **	998 ± 0
ATD	155 ± 51 ††	20 ± 3	458 ± 116	6 ± 1 *	643 ± 94	0.7 ± 0.2	297 ± 24
RECEPTIVE FEMALES							
CONTROL	748 ± 308 **	2.4 ± 1.6 **	ND	0 ± 0 **	ND	0 ± 0 **	ND
FLUTAMIDE	404 ± 133	5.8 ± 2.6 **	569 ± 0	0.4 ± 0.4 **	ND	0 ± 0 **	ND
ATD	607 ± 307 *	3.3 ± 1.7 **	357 ± 0	0.1 ± 0.1 **	ND	0 ± 0 **	ND
NON RECEPTIVE FEMALES							
CONTROL	298 ± 72 †	5 ± 3 **	ND	0 ± 0 **	ND	0 ± 0 **	ND
FLUTAMIDE	246 ± 182 †	0.5 ± 0.4 **	ND	0 ± 0 **	ND	0 ± 0 **	ND
ATD	474 ± 0	0.8 ± 0.8 **	ND	0 ± 0 **	ND	0 ± 0 **	ND

Table 2. Masculine coital behavior displaying by intact subjects. Mean ± S.E.M. ANOVA followed by Fisher's LSD test. *, Different to control males, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$. †, Different to control receptive females, $p < 0.05$; ††, $p < 0.01$.

ANOVA for partner preference (compartment $F(2,228)=92.9$, $p < 0.0001$; sex X compartment $F(4,228)=65.9$, $p < 0.001$; group X compartment $F(4,228)=2.7$, $p = 0.034$) showed that all males and non-receptive flutamide-treated females had preference for estrous females, and the control and ATD treated females with behavioral estrous had preference by male partner (table 3).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

GROUP	NEUTRAL COMPARTMENT	MALE COMPARTMENT	FEMALE COMPARTMENT
RECEPTIVE FEMALES			
CONTROL	220 ± 21	251 ± 18 ††	129 ± 11
FLUTAMIDE	187 ± 23	217 ± 24	196 ± 20
ATD	164 ± 13	243 ± 14 *	194 ± 17
NON-RECEPTIVE FEMALES			
CONTROL	145 ± 21	236 ± 23	219 ± 23
FLUTAMIDE	135 ± 25	206 ± 21	260 ± 29 †
ATD	125 ± 8	246 ± 14	229 ± 17
MALES			
CONTROL	103 ± 7	132 ± 13	365 ± 13 ††
FLUTAMIDE	88 ± 7	159 ± 11	354 ± 17 †
ATD	108 ± 13	132 ± 9	360 ± 18 ††

Table 3. Partner preference of intact subjects. Mean ± S.E.M. ANOVA followed by Fisher's LSD test. †, Different from neutral and male compartments in the same group, $p < 0.05$; ††, $p < 0.01$. *, Different from neutral and female compartments in the same group, $p < 0.05$. ††, Different from compartment of the female in the same group, $p < 0.01$.

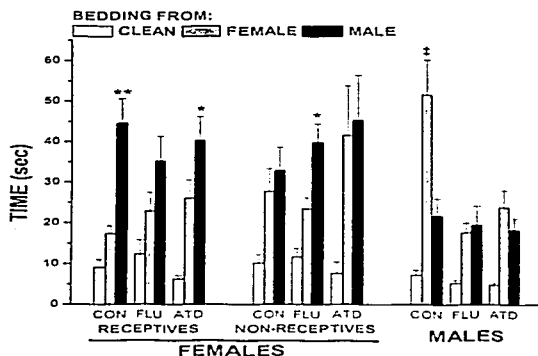


Figure 2. Odor preference of intact subjects. Mean ± S.E.M. ANOVA followed by Fisher's LSD test. *, Different from clean and female bedding in the same group, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$. †, Different from clean and male bedding in the same group, $p < 0.01$.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

In the odor preference test ANOVA revealed significant differences (Fig. 2, sex $F(2,201)=6.4$, $p=0.002$; bedding $F(2,201)=70.7$, $p<0.0001$; sex X group $F(4,201)=3.7$, $p=0.006$; sex X bedding $F(4,201)=7.9$, $p<0.0001$; sex X group X bedding $F(8,201)=2.6$, $p=0.009$), the posthoc analysis showed that receptive control and ATD-treated females and non-receptive flutamide-treated females had preference by the bedding from sexually experience males. Only control males showed a preference for the odor from estrous females.

In the table 4 are the data of body and gonads weight. There were difference in body weight in females ($F(2,27)=12.53$, $p<0.001$), ATD and flutamide treated females had less body weight than control females. ANOVA revealed difference in the weight of ovaries (between groups: $F(2,55)=18.29$, $p<0.001$), and its index ($F(5,55)=7.22$; $p<0.001$). The posthoc analysis show a decrease of ovary weight and index for ATD and flutamide treated females with respect to ovaries of control females. The autopsy of flutamide and ATD treated males showed that the seminal vesicles were slightly differentiated and the prostate was practically absent. Moreover the testis weight (between groups: $F(2,51)=10.8$, $p=0.0001$), particularly the right testis, had a less weight in

	CONTROL FEMALES	FLUTAMIDE FEMALES	ATD FEMALES	CONTROL MALES	FLUTAMIDE MALES	ATD MALES
Body Weight (g)	333 ± 5	304 ± 7 **	292 ± 7 **	523 ± 10	500 ± 9	515 ± 5
Left Gonad ¹	50 ± 5	30 ± 3 **	28 ± 2 **	2.04 ± 0.07	1.8 ± 0.11	1.96 ± 0.03
Right Gonad ¹	49 ± 4	31 ± 3 **	24 ± 2 **	2.04 ± 0.07	1.46 ± 0.19 *	1.98 ± 0.02
Both Gonads ¹	99 ± 9	61 ± 6 **	52 ± 4 **	4.08 ± 0.14	3.41 ± 0.2 **	3.94 ± 0.05
A-G Distance (cm)	1.84 ± 0.03	1.73 ± 0.06	1.72 ± 0.06	5.27 ± 0.06	3.6 ± 0.23 *	5.3 ± 0.15
Left Gonad Index ²	14.8 ± 1.3	9.7 ± 0.8 **	9.6 ± 0.7 **	0.39 ± 0.01	0.36 ± 0.02	0.38 ± 0.004
Right Gonad Index ²	14.6 ± 1.2	10.1 ± 0.8 **	8.3 ± 0.6 **	0.39 ± 0.01	0.29 ± 0.04 **	0.38 ± 0.004
Both Gonads Index ²	29 ± 2	20 ± 2 **	18 ± 2 **	0.78 ± 0.03	0.68 ± 0.04 **	0.77 ± 0.01
A-G Distance Index ³	0.53 ± 0.01	0.53 ± 0.02	0.54 ± 0.03	1 ± 0.02	0.74 ± 0.05 *	0.92 ± 0.1

Tabla 4. Ano-genital (A-D) distance and body and gonads weight in intact females and males control and perinatally treated with flutamide or ATD. Mean ± S.E.M. ANOVA followed by Fisher LSD test.

*, Different with its respective sex control, $p<0.05$; ** $p<0.01$.

¹ In females, ovary weight in mg; in males, testis weight in g.

² (gonad weight/body weight) × 100. In females, mg/g; in males, g/g

³ (A-G distance/body weight) × 100.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

flutamide-treated males than control. Similar results were observed with the index of testis weight ($F(2,51)=7.8$, $p=0.0011$) and weight of both testis ($F(2,25)=1.08$, $p=0.0056$). In two flutamide-treated males one testis had an infection process and in one, a tumor was present, in these cases the testis weight were not obtained. Almost all flutamide males had at least one testis in the abdominal cavity, all presented vaginal opening with a blind vagina. The ano-genital distance ($F(2,27)=36.84$, $p<0.0001$) and its index ($F(2,27)=3.38$, $p<0.05$) were decreased in these flutamide-treated males.

Experiment 2: Subjects treated with PT

The experiment 1 showed that the prenatal treatment with ATD modified the feminine coital behavior and the development of the gonads in both sexes and the odor preference in males. The prenatal treatment with flutamide modified the feminine coital behavior and partner preference in females, the masculine coital behavior in males and the development of gonads and the odor preference in both sexes. This experiment evaluated the activational effect of testosterone in the treated animals for determinate if the odor preference and the masculine coital behavior are reestablished in ATD- or Flutamide-treated males.

Methods

11 subjects of each sex and treatment were gonadectomized at between 3 and 5 months of age. Two weeks later were injected with EB + P and the feminine coital behavior were tested. Two weeks later a PT (5mg/kg daily) treatment was administrated for 25 days. The masculine coital behavior was tested at 21 day of treatment, odor preference at 23 day of treatment and partner preference was evaluated at 25 day of PT treatment. The animals were sacrificed with an overdose of pentobarbital and the body weight and ano-genital distance were obtained.

Results

Female coital behavior: There were differences between groups in the percent of subjects displaying lordosis behavior ($\chi^2= 21.1$, $p=0.0008$), in the lordosis quotients (group: $F(2,54)=9.1$, $p=0.0003$; sex: $F(1,54)=44.8$, $p<0.0001$; interaction: $p= F(2,54)=9$, $p=0.0003$) and in the lordosis

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

intensity (group: $F(2,54)= 5.4$, $p=0.0063$; sex: $F(1,54)=13.1$; $p<0.0001$; interaction: $F(2,54)$, $p<0.0001$). ATD-treated males showed similar levels of receptivity than females, levels increased with respect to control and flutamide-treated males (Table 5).

Masculine coital behavior: χ^2 tests showed difference in the percent of subjects with mount ($\chi^2= 21.07$, $p= 0.0008$), intromission ($\chi^2= 25.66$, $p= 0.0001$) and ejaculation ($\chi^2= 52.4$, $p< 0.0001$). The percent of females with masculine patterns show a significant decrease with respect to control males, also the number of flutamide-treated males with intromission and ejaculation was decreased. ANOVA showed differences in mount latency (group: $F(2,39)= 3.73$, $p= 0.0323$; interaction: $F(2,54)= 0.0115$, $p= 0.0115$), intromission latency (group: $F(2,27)= 12.35$, $p= 0.0001$; interaction: $F(8,9)$, $p= 0.001$), mount frequency (group: $F(2,54)= 3.73$, $p= 0.0323$; interaction: $F(2,54)= 4.62$, $p= 0.0153$), intromission frequency (group: $F(2,54)= 20.6$, $p<0.0001$; sex: $F(1,54)= 129.6$, $p< 0.0001$; interaction: $F(2,54)= 24.9$, $p< 0.0001$) and ejaculation frequency (group: $F(2,54)= 30.3$, $p< 0.0001$; sex: $F(2,54)= 102.1$, $p< 0.0001$; interaction: $F(2,54)= 30.3$, $p< 0.0001$). All females showed significant less masculine coital behavior than control males in these parameters. Flutamide-treated males had significant higher mount and intromission latencies, fewer number of intromissions and no ejaculation with respect to control males. ATD-treated males presented fewer ejaculations than control males (table 5).

Partner preference: ANOVA revealed differences between compartments ($F(2,162)= 71$, $p< 0.0001$) and in the interaction sex X compartment ($F(2,162)= 14.6$, $p< 0.0001$). The posthoc analysis showed that females had no preference and males preferred to interact with the females (Table 6).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

	CONTROL FEMALES	FLUTAMIDE FEMALES	ATD FEMALES	CONTROL MALES	FLUTAMIDE MALES	ATD MALES
FEMININE COITAL BEHAVIOR						
% of Ss with Lordosis	100 **	100 **	90 **	10 ††	30 ††	90 **
Lordosis Quotient	65 ± 9 **	72 ± 7 **	69 ± 9 **	8 ± 9 ††	5 ± 2 ††	64 ± 10 **
Lordosis Intensity	1.18 ± 0.2 **	1.3 ± 0.15 **	1.17 ± 0.19 **	0.15 ± 0.14 ††	0.06 ± 0.03 ††	1.1 ± 0.2 **
MASCULINE COITAL BEHAVIOR						
% of Ss with Mount	50 *	60 *	40 **	100 †	100 †	100 †
Mount Latency	486 ± 117 *	435 ± 68	450 ± 176	100 ± 12 †	728 ± 187 **	114 ± 26 †
Mount Frequency	9.5 ± 3.6 **	8.9 ± 2.7 **	8.6 ± 2.9 **	29.2 ± 5.8 ††	26.4 ± 5.7 ††	30.6 ± 3.9 ††
% of Ss with Intromission	20 **	30 **	40 **	100 ††	40 **	100 ††
Intromission Latency	634 ± 373 *	755 ± 122 **	687 ± 206 *	34 ± 23 †	1395 ± 181 ††**	256 ± 58
Intromission Frequency	0.6 ± 0.36 **	1.3 ± 0.68 **	1.1 ± 0.43 **	9.5 ± 0.43 ††	2.1 ± 1.15 **	10.6 ± 0.65 ††
% of Ss with Ejaculation	0 **	0 **	0 **	100 ††	0 **	80 ††
Ejaculation Latency	ND	ND	ND	841 ± 135	ND	919 ± 158
Ejaculation Frequency	0 ± 0 **	0 ± 0 **	0 ± 0 **	1.7 ± 0.3 ††	0 ± 0 **	1 ± 0.3 †† **
Postejaculatory Interval	ND	ND	ND	307 ± 36	ND	355 ± 13

Table 5. Parameters of feminine and masculine coital behavior in females and males perinatally treated with flutamide or ATD. Tests of feminine coital behavior were performance under EIB plus P, whereas masculine coital behavior tests, under TP treatment. Latencies and postejaculatory interval are expressed in seconds. The percentage of subjects was evaluated by χ^2 test. Mean \pm S.E.M. ANOVA followed by LSD Fisher test. * Different with respect to control males, $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. † Different with respect to control females, $p < 0.05$; †† $p < 0.01$.

	NEUTRAL	FEMALE	MALE
FEMALES			
CONTROL	133 ± 13	254 ± 20	213 ± 18
FLUTAMIDE	136 ± 14	235 ± 20	229 ± 16
ATD	133 ± 16	224 ± 23	243 ± 23
MALES			
CONTROL	137 ± 17	313 ± 26 **	150 ± 23
FLUTAMIDE	152 ± 17	272 ± 27 *	176 ± 19
ATD	110 ± 6	312 ± 22 **	178 ± 20

Table 6. Partner preference of females and males perinatally treated with flutamide or ATD tested under TP treatment. Mean \pm S.E.M. ANOVA followed by LSD Fisher test. * different with respect to neutral compartment and with compartment with the female in the same group, $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

TESIS CON
FALLA DE CEN

Odor preference: ANOVA revealed differences between bedding ($F(2,162)=17, p< 0.0001$) and in the interaction sex X group X bedding ($F(4,162)= 4.8, p= 0.0011$). Posthoc analysis showed that control females preferred to be with a male and control males and flutamide-treated females, with the receptive female (Table 7).

	CLEAN	FEMALE	MALE
FEMALES			
CONTROL	32.8 ± 8.3	21.3 ± 6.1	25.3 ± 5
FLUTAMIDE	17.2 ± 2.6	33.6 ± 6.3 *	20.7 ± 4.3
ATD	12.6 ± 1.9	25.8 ± 3.3	21.9 ± 3.6
MALES			
CONTROL	15 ± 2.8	31.8 ± 5.5 **	15 ± 1.9
FLUTAMIDE	13.2 ± 1.8	20.5 ± 3.5	17.3 ± 3
ATD	12.9 ± 2.5	25.9 ± 3.3	23.6 ± 4.2

Table 7. Odor preference between clean sawdust, male soiled bedding and estrous female bedding in females and males perinatally treated with flutamide or ATD under chronic treatment with TP. Mean ± S.E.M. ANOVA followed by LSD Fisher test. ** Different to clean and male soiled bedding, $p< 0.01$.

Ano-genital distance index: Control, flutamide, ATD females and flutamide-treated males ($0.64 \text{ cm} \pm 0.01, 0.59 \pm 0.02, 0.66 \pm 0.02$ and 0.75 ± 0.03 , respectively) have decreased the ano-genital distance index with respect to control and ATD-treated males (1.11 ± 0.03 and 1.13 ± 0.03 , respectively) (ANOVA: group: $F(2,54)= 59, p< 0.0001$; sex: $F(1,54)= 387, p< 0.0001$; interaction: $F(2,54)= 29, p< 0.0001$).

Experiment 3: Subjects treated with EB plus P

The differences between ATD- and flutamide-treated females in lordosis behavior founded in experiment 1 were eliminated with the treatment with estradiol and progesterone in experiment 2. Masculine coital behavior and odor preference of flutamide-treated males was not reestablished with the treatment with TP. ATD and flutamide treated subjects of both sexes no show odor preference whereas control animals showed it. The experiment 3 was performance to determinate if the activational effect of estradiol and progesterone restores the odor preference in ATD and flutamide treated females and the partner preference in flutamide-treated females and if is able of

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

modifies the behavior and preference in treated males. When the test under BE plus P finished, we administrated TP for evaluate if the control and ATD males showed masculine coital behavior and to evaluate the effect of this treatment under the feminine coital behavior in treated subjects.

Methods

10 subjects of each sex and treatment were used. Between 3 and 5 months of age the subjects were gonadectomized and the ano-genital distance and body weight were obtained. Two weeks later subjects were evaluated for lordosis behavior in three different test every other day under EB plus P regimen, data of the three tests was combined. Under EB plus P regimen later we evaluated odor preference, partner preference and masculine coital behavior in that sequence and one test each week. Two weeks later of the last behavioral test with BE plus P began a treatment with high dose of PT (5 mg/rat, daily) and 15-16 days later other test of feminine coital behavior was done and a test of masculine coital behavior were done at 18-19 days of treatment with PT.

Results

Feminine coital behavior: No differences were observed in the percentage of subjects with lordosis in at least one of three tests. ANOVA for LQ revealed differences between groups ($F_{(2,59)}= 55$, $p < 0.001$), between sexes ($F_{(1,59)}= 218$, $p < 0.001$) and in the interaction group X sex ($F_{(2,59)}=55$, $p < 0.001$). ANOVA for lordosis intensity revealed similar differences (group: $F_{(2,59)}= 33$, $p < 0.001$; sex: $F_{(1,59)}= 247$, $p < 0.0001$; interaction: $F_{(2,59)}= 42$, $p < 0.0001$). Posthoc analysis showed that control and flutamide-treated males had less lordosis behavior than females and ATD-treated males but ATD-treated males showed decreased lordosis intensity with respect to control females, and flutamide-treated males showed a LQ and lordosis intensity decreased with respect to control males (table S).

Masculine coital behavior. No significant differences were observed in the percent of subjects that showed mount ($\chi^2_5= 8.3$, $p= 0.138$) and intromission ($\chi^2_5= 6.3$, $p= 0.274$) patterns. The ANOVA for the latencies of mount ($F_{(5,30)}= 0.9$, $p= 0.486$) and intromission($F_{(3,7)}= 0.65$, $p= 0.625$), and the

ANOVA for intromission frequency ($F(5,59)=0.68$, $p=0.644$) revealed no differences. However, the ANOVA for number of mount showed significant differences (group: $F(2,59)=1.5$, $p=0.229$; sex: $F(1,59)=6.9$, $p=0.012$). Post hoc analysis, Fisher's LSD test, revealed a significant decrease in the frequency mount in control and flutamide males with respect to ATD females (table 8).

	CONTROL FEMALES	FLUTAMIDE FEMALES	ATD FEMALES	CONTROL MALES	FLUTAMIDE MALES	ATD MALES
FEMININE COITAL BEHAVIOR						
% of Ss with Lordosis	100	100	100	70	80	100
Lordosis Quotient	96.5 ± 1.2 **	95.6 ± 2.2 **	95.6 ± 1.9 **	25.6 ± 8.6 ††	9.4 ± 2.7 †† **	95.3 ± 2 **
Lordosis Intensity	1.67 ± 0.05 **	1.7 ± 0.05 **	1.62 ± 0.06 **	0.36 ± 0.13 ††	0.1 ± 0.03 †† *	1.42 ± 0.12 † **
MASCULINE COITAL BEHAVIOR						
% of Ss with Mount	60	50	80	20 b	40	40
Mount Latency	941.3 ± 102.3	856.3 ± 200.9	641.2 ± 131.9	1022 ± 392	680.8 ± 122.8	636.8 ± 131.8
Mount Frequency	5.5 ± 1.8	4.5 ± 2.4	9.6 ± 2.9	1 ± 0.7 a	2.5 ± 1.1 b	4.2 ± 2.1
% of Ss with Intromission	30	20	20	0	0	10
Intromission Latency	1537.7 ± 119.9	1246.5 ± 128.5	1093.5 ± 561.5	NO DATA	NO DATA	976 ± 0
Intromission Frequency	0.55 ± 0.31	0.73 ± 0.63	0.4 ± 0.27	0 ± 0	0 ± 0	0.78 ± 0.78
% of Ss with Ejaculation	0	0	0	0	0	0

Table 8. Feminine and masculine sexual behavior in subjects treated with EB plus P. Mean ± S.E.M. ANOVA followed by LSD Fisher test in Feminine coital behavior: †, different from control females, $p < 0.05$; ††, $p < 0.01$. *, Different from control males, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$. a, Different from ATD females, $p < 0.01$. χ^2 followed by Fisher's exact test for percent of Ss with mount pattern: b, different from ATD females, $p < 0.05$.

Partner preference. ANOVA revealed differences between compartment ($F(2,54)=39$, $p < 0.0001$) and in the interaction sex X compartment ($F(2,54)=22$, $p < 0.0001$). The posthoc analysis showed that control females show preference by the stimulus males and flutamide- and ATD treated females no show preference. All males presented preference by the estrous female.

Odor preference. ANOVA revealed differences in sex ($F(1,204)=11.3$, $p=0.0009$), bedding ($F(2,204)=71$, $p < 0.0001$), sex X bedding ($F(2,204)=3.8$, $p=0.0236$) and sex X group X bedding ($F(4,204)=3$, $p=0.0205$). Posthoc analysis showed that all females and control and Flutamide-

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

treated males had preference for the odor from soiled bedding of sexually experienced males. ATD-treated males did not show preference for any soiled bedding.

	NEUTRAL	FEMALE	MALE
FEMALES			
CONTROL	152 ± 12	191 ± 16.8	257 ± 18.9 ††
FLUTAMIDE	178.7 ± 15.1	198.2 ± 21.8	223.1 ± 10.4
ATD	168.2 ± 17.6	197.5 ± 15.7	234.3 ± 19.1
MALES			
CONTROL	137.4 ± 15.3	263.4 ± 20.4 *	199.2 ± 17.2
FLUTAMIDE	138.6 ± 13	281.8 ± 12.4 **	179.5 ± 10.2
ATD	156.8 ± 18.7	252 ± 31.6 *	191.2 ± 23.4

Table 9. Partner preference under BE plus P treatment. Mean ± S.E.M. ANOVA followed by LSD Fisher test. ††, Different from neutral and female compartments, $p < 0.01$. * Different from neutral and male compartments. $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

	CLEAN	FEMALE	MALE
FEMALES			
CONTROL	16.4 ± 1.9	28.2 ± 3.4	55.3 ± 3.5 **
FLUTAMIDE	11.8 ± 1.7	31.1 ± 2.8	50 ± 4.2 **
ATD	17.8 ± 2.8	22.1 ± 3	52.2 ± 6.4 **
MALES			
CONTROL	11.2 ± 2.1	17.9 ± 3.7	34.3 ± 6.3 *
FLUTAMIDE	13.5 ± 3.3	13.8 ± 2.9	41.8 ± 5.9 **
ATD	16.1 ± 3.6	36.3 ± 13.4	35.7 ± 5.4

Table 10. Odor preference under BE plus P treatment. Mean ± S.E.M. ANOVA followed by LSD Fisher test. *, Different from clean and female bedding, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

Feminine and masculine coital behavior with 5 mg/rat of TP. The percent of females and males treated with ATD that displaying lordosis was higher than other groups ($\chi^2 = 30.8$, $p < 0.0001$).

ANOVA revealed differences for IQ (between groups ($F(2.54) = 14.15$, $p < 0.0001$) and lordosis

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

intensity(sex, $F(5,4)= 4.03$, $p= 0.0504$; groups ($F(2,54)= 10.4$, $p= 0.0002$) 0.0001; interaction: $F(2,59)= 42$, $p< 0.0001$). Posthoc analysis showed that ATD-treated females and males had more lordosis behavior than the control and flutamide groups (table 11).

No significant differences were observed in the percent of subjects that showed mount and intromission, but significant differences were found in the percent of subject ejaculation ($\chi^2_5= 35$, $p< 0.0001$), the percent of control and ATD treated males with ejaculation was higher than females and Flutamide treated males. ANOVA revealed no differences in ejaculation latency (only done in males), in mount frequency and in the postejaculatory interval. ANOVA showed significant differences in intromission latency (sex: $F(1,57)= 11$, $p= 0.002$), intromission frequency (sex $F(1,59)= 31.1$, $p< 0.0001$; group $F(2,59)= 7.5$, $p= 0.0014$; sex \times group $F(2,59)= 9.7$, $p= 0.0003$) and ejaculation frequency (sex ($F(1,59)= 61.1$, $p < 0.0001$; group (2,59)= 6, $p= 0.0047$; interaction $F(2,59)= 7.6$, $p= 0.0014$). Post hoc analysis, revealed that control and ATD-treated males showed more intromission and ejaculation pattern than females and flutamide-treated males (table 11)

	CONTROL FEMALES	FLUTAMIDE FEMALES	ATD FEMALES	CONTROL MALES	FLUTAMIDE MALES	ATD MALES
FEMININE COITAL BEHAVIOR						
% of Ss with Lordosis	20	40	100 **	10	0	70 *
Lordosis Quotient	7.2 ± 6	19.62 ± 9.7	41.3 ± 7.8 ***	1 ± 1	0 ± 0	45 ± 22.1 ***
Lordosis Intensity	0.07 ± 0.06	0.31 ± 0.16	0.67 ± 0.14***	0.01 ± 0.01	0 ± 0	0.45 ± 0.22 ***
MASCULINE COITAL BEHAVIOR						
% of Ss with Mount	90	100	100	100	90	100
Mount Latency	180 ± 33	183 ± 51	168 ± 32	122 ± 27	134 ± 36	133 ± 35
Mount Frequency	20.3 ± 3.1	19.7 ± 2.8	18.8 ± 2.9	13.1 ± 2.4	26.6 ± 2.9	17.2 ± 4.3
% of Ss with Intromission	70	90	80	100	70	100
Intromission Latency	744 ± 185 ††	638 ± 159 ††	388 ± 83 ‡	163 ± 43 ††	395 ± 122	162 ± 41 ††
Intromission Frequency	3.4 ± 1 ††	4 ± 1.1 ††	3.2 ± 0.8 ††	13.8 ± 1.9 ††	3.2 ± 1 ††	15.25 ± 4.7 ††
% of Ss with Ejaculation	0 ††	10 ††	0 ††	90	40 †	80
Ejaculation Latency	ND	545 ± 0	ND	455 ± 102	782 ± 253	350 ± 127
Ejaculation Frequency	0 ± 0 ††	0.1 ± 0.1 ††	0 ± 0 ††	2.2 ± 0.36 ††	0.56 ± 0.24††	2 ± 0.7 ††
Postejaculatory Interval	ND	ND	ND	310 ± 29	317 ± 15	263 ± 52

Table 11. Feminine and masculine coital behavior in subjects treated with 5 mg of TP. Mean ± S.E.M. ANOVA followed by LSD Fisher test. For percent (%). Fisher's exact test. *, Different from control females and control males, $p< 0.05$; **, $p< 0.01$. ‡, Different from control females, $p< 0.05$; ††, $p< 0.01$. †, Different from control males, $p< 0.05$; ††, $p< 0.01$. ND: No data.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Discussion

Coital behavior

Since the experiments of Young and his co-workers (Phoenix et al., 1959; Young, Goy, and Phoenix, 1964) it was established that the prenatal exposure of female guinea pigs to pharmacological amounts of testosterone (T) permanently enhanced their capacity to display masculine sexual behavior as adults. That is, if females that receive T treatment early in life are gonadectomized as adults and treated with T; they will mount and copulate with an estrous female. This process is called coital masculinization (Baum, 1987). The coital masculinization is a clear example of sexually dimorphic behavior; females show lordosis and males mounts, intromissions and ejaculations. However, female rats frequently show mounting behavior (Beach, 1942; Beach, 1976; Sodersten, Larsson, Ahlenius, and Engel, 1976), which has often been referred to as "male sexual behavior". The observation of highly receptive females that mounted sexually inactive males have led to the suggestion that mounting reflect a high motivation to copulate with males (Beach, 1976; Young, 1941). Our results show that this is the case when females are highly receptive, under EB plus P treatment control and flutamide-treated males did not show mounting behavior, whereas all females and ATD-treated males do. Then, mounting behavior has to be considered like a feminine behavior at least when is evaluated under a EB plus P regimen. Our results suggest that the presence of intromission patterns, reflex masculine behavior better than mounts in females.

Any ATD-treated male showed a decrease in masculine coital behavior, our results support previous observation suggesting that estradiol do not participate in the process of masculinization and are agree with similar experiments (Clemens and Gladue, 1978; Davis, Chaptal, and McEwen, 1979; McEwen, Lieberburg, Maclusky, and Plapinger, 1977; Vreeburg, van der Vaart, and van der Schoot, 1977; Whalen and Olsen, 1981). However, there are some studies that have shown the opposite effect, neonatal ATD treatment modifies masculine sexual behavior (Bakker et al., 1993b; Brand et al., 1991; Brand and Slob, 1991a; Gladue and Clemens, 1980). Recently mice with a non-functional aromatasa gene were obtained (ArKO) and the analysis of sexual behavior showed that

aromatase is not important for masculine coital behavior (Bakker, Honda, Harada, and Balthazart, 2002). Moreover, ATD-treated females did not show less masculine coital behavior than control females. In this way, flutamide neither induces lower levels of masculine coital behavior in females. In males, flutamide reduced the presence of intromission and practically eliminated the ejaculation pattern. We suggest that estrogens and androgens contribute to organize the neural pathway for the display of masculine coital behavior in a redundant way: if estrogens are absent, the androgen will make the masculine pathways, and in absence of androgens, estrogens do it, and in this interplay the androgen will be more important. There is not any article in mammals that show the effect of an aromatase inhibitor and a androgen receptors blocker at same time, however in birds the administration of both drugs eliminates the aggression in males (Soma, Sullivan, and Wingfield, 1999).

The results obtained on lordosis behavior were consistent. Females and males treated perinatally with ATD showed high levels of lordosis when intact or under TP treatment. These results suggest that estradiol participate in the organization of lordosis behavior, whereas more lower are the levels of estradiol during perinatal development, higher lordosis behavior will be shown in adulthood. The inverse also will be true; the flutamide-treated subjects show lower levels of lordosis with respect to sex control, if the androgen receptors are not activated, then androgens are continuously secreted. An increase of androgens, induce higher aromatization and more estrogens and, therefore, decreased lordosis behavior. We propose that estradiol is a modulator in the organization of lordosis behavior during development. There are one article that showed that ATD do not modifies the lordosis response in females (Brand and Slob, 1991c) but in these experiments the evaluation of lordosis response was done in gonadectomized females under EB plus P regimen. We also did not observe differences with the same hormonal replacement. However, with lower doses of EB, ATD-treated females showed more lordosis reflex than control females (Witcher and Clemens, 1987).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Partner preference

Like control males, ATD- and flutamide-treated males show preference for an estrous female in all hormonal condition. These results indicate the estrogen and androgen do not participate, independently, in the organization of partner preference. These results are in clear opposition with some previously obtained. Bakker and collaborators (Bakker et al., 1993a) and Brand and Slob (1991a) showed that neonatally ATD-treated males displayed some preference for a stimulus male, but their results were inconsistent. The result obtained with ArKO mice revealed that males showed preference for their female partner (Bakker et al., 2002), and confirm that estradiol does not participate in the organization of partner preference. ATD-treated females showed a decrease partner preference for males with respect to control females, whereas flutamide-treated females did not show preference. These result, however, have to be confirmed with other method, our cage for the evaluation of partner preference in females was unable to eliminate the effect of paced mating. Females can to pace the interaction with the male in this cage and then the time in the neutral compartment was increased. This is clearly observed in the partner preference of control females under EB plus P regimen, significant differences were founded between male and female compartment but not between male and neutral compartments.

Odor preference

Stern (1970) showed that odor preference in males depends on their previous sexual experience. He demonstrated that male rats needs the experience of mounting behavior, at least, to develop preference for the odor of an estrous female. Our result confirmed and expanded the importance of previous experience. Control and flutamide-treated males only with "feminine" sexual experience (under EB plus P regimen) showed preference for the odor of the stimulus males.

Females and males prenatally treated with flutamide showed a decreased olfactory preference in comparison to control groups. However, odor preference was reestablished to control levels under the hormonal regimens. Then, the effect is a result of lower circulating hormones in these animals and is not an effect on the organization of neuronal pathway associated with odor.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Results are consistent with the response from accessory olfactory system to sexually relevant chemosensory cues, flutamide-treated animals showed less Fos-immunoreactivity in the response to odor from estrous females (Dominguez-Salazar et al., 2002).

ATD-treated females showed normal odor preference, whereas ATD males did not show odor preference under any test condition. This result indicates that estradiol organizes the neural pathways of males that process the odor information from partner subjects. This conclusion is supported from results obtained in ArKO mice. These mice did not show odor preference for non-volatile odors from estrous females whereas showed preference for volatile odor (Bakker et al., 2002), under the definition of Bakker's paper, our odor test evaluated the response to non-volatile odor. The accessory olfactory system is functional in ATD-treated animals (Bakker et al., 1996a; Dominguez-Salazar et al., 2002), then we suggest that the memory associate to olfaction (Keverne, 1995) is altered in the animals with perinatal inhibition of aromatization, in other words, estradiol is important to organized the neural pathway responsible for the memory of social odors in male rats.

References

- Bakker, J., Baum, M. J., and Slob, A. K. (1996a). Neonatal inhibition of brain estrogen synthesis alters adult neural Fos responses to mating and pheromonal stimulation in the male rat. *Neuroscience* 74(1), 251-60.
- Bakker, J., Brand, T., van Ophemert, J., and Slob, A. K. (1993a). Hormonal regulation of adult partner preference behavior in neonatally ATD-treated male rats. *Behav Neurosci* 107(3), 480-7.
- Bakker, J., Honda, S., Harada, N., and Balthazart, J. (2002). Sexual partner preference requires a functional aromatase (cyp19) gene in male mice. *Horm Behav* 42(2), 158.
- Bakker, J., van Ophemert, J., and Slob, A. K. (1993b). Organization of partner preference and sexual behavior and its nocturnal rhythmicity in male rats. *Behav Neurosci* 107(6), 1049-58.
- Bakker, J., van Ophemert, J., and Slob, A. K. (1995). Postweaning housing conditions and partner preference and sexual behavior of neonatally ATD-treated male rats. *Psychoneuroendocrinology* 20(3), 299-310.
- Bakker, J., Van Ophemert, J., and Slob, A. K. (1996b). Sexual differentiation of odor and partner preference in the rat. *Physiol Behav* 60(2), 489-94.
- Bakker, J., van Ophemert, J., Timmerman, M. A., de Jong, F. H., and Slob, A. K. (1995). Endogenous reproductive hormones and nocturnal rhythms in partner preference and sexual behavior of ATD-treated male rats. *Neuroendocrinology* 62(4), 396-405.
- Baum, M. J. (1979). Differentiation of coital behavior in mammals: a comparative analysis. *Neurosci Biobehav Rev* 3(4), 265-84.
- Baum, M. J. (1987). Hormonal control of sex differences in the brain and behavior in mammals. In D. Crews (Ed.), *Psychobiology of reproductive behavior*, pp. 230-257. Prentice-Hall, Inc., New Jersey.
- Beach, F. A. (1942). Importance of progesterone for induction of sexual receptivity in spayed female rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 51, 369-371.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Beach, F. A. (1976). Sexual attractiveness, proceptivity, and receptivity in female mammals. *Horm Behav* 7(1), 105-38.
- Brand, T., Kroonen, J., Mos, J., and Slob, A. K. (1991). Adult partner preference and sexual behavior of male rats affected by perinatal endocrine manipulations. *Horm Behav* 25(3), 323-41.
- Brand, T., and Slob, A. K. (1991a). Neonatal organization of adult partner preference behavior in male rats. *Physiol Behav* 49(1), 107-11.
- Brand, T., and Slob, A. K. (1991b). On the organization of partner preference behavior in female Wistar rats. *Physiol Behav* 49(3), 549-55.
- Brand, T., and Slob, A. K. (1991c). Perinatal flutamide and mounting and lordosis behavior in adult female Wistar and Sprague-Dawley rats. *Behav Brain Res* 44(1), 43-51.
- Clemens, L. G., and Gladue, B. A. (1978). Feminine sexual behavior in rats enhanced by prenatal inhibition of androgen aromatization. *Horm Behav* 11(2), 190-201.
- Clemens, L. G., Gladue, B. A., and Coniglio, L. P. (1978). Prenatal endogenous androgenic influences on masculine sexual behavior and genital morphology in male and female rats. *Horm Behav* 10(1), 40-53.
- Davis, P. G., Chaptal, C. V., and McEwen, B. S. (1979). Independence of the differentiation of masculine and feminine sexual behavior in rats. *Horm Behav* 12(1), 12-9.
- Dominguez-Salazar, E., Portillo, W., Baum, M. J., Bakker, J., and Paredes, R. G. (2002). Effect of prenatal androgen receptor antagonist or aromatase inhibitor on sexual behavior, partner preference and neuronal Fos responses to estrous female odors in the rat accessory olfactory system. *Physiol Behav* 75(3), 337-46.
- Gladue, B. A., and Clemens, L. G. (1978). Androgenic influences on feminine sexual behavior in male and female rats: defeminization blocked by prenatal antiandrogen treatment. *Endocrinology* 103(5), 1702-9.
- Gladue, B. A., and Clemens, L. G. (1980). Masculinization diminished by disruption of prenatal estrogen biosynthesis in male rats. *Physiol Behav* 25(4), 589-93.
- Goy, R. W. (1966). Role of androgens in the establishment and regulation of behavioral sex differences in mammals. *J Anim Sci* 25 Suppl, 21-35.
- Hetta, J., and Meyerson, B. J. (1978). Sex-specific orientation in the male rat. A methodological study. *Acta Physiol Scand Suppl* 453, 5-27.
- Keever, E. B. (1995). Olfactory learning. *Curr Opin Neurobiol* 5(4), 482-8.
- McEwen, B. S., Lieberburg, L., Macluskay, N., and Plapinger, L. (1977). Do estrogen receptors play a role in the sexual differentiation of the rat brain? *J Steroid Biochem* 8(5), 593-8.
- Meyerson, B. J., and Lindstrom, L. H. (1973). Sexual motivation in the female rat. A methodological study applied to the investigation of the effect of estradiol benzoate. *Acta Physiol Scand Suppl* 389, 1-80.
- Phoenix, C. H., Goy, R. W., Gerall, A. A., and Young, W. C. (1959). Organizing action of prenatally administered testosterone propionate on the tissues mediating mating behavior in the female guinea pig. *Endocrinology* 65, 369-382.
- Sodersten, P., Larsson, K., Ahlenius, S., and Engel, J. (1976). Stimulation of mounting behavior but not lordosis behavior in ovariectomized female rats by p-chlorophenylalanine. *Pharmacol Biochem Behav* 5(3), 329-33.
- Soma, K. K., Sullivan, K., and Wingfield, J. (1999). Combined aromatase inhibitor and antiandrogen treatment decreases territorial aggression in a wild songbird during the nonbreeding season. *Gen Comp Endocrinol* 115(3), 442-53.
- Vega Matuszczyk, J. V., and Larsson, K. (1995). Sexual preference and feminine and masculine sexual behavior of male rats prenatally exposed to antiandrogen or antiestrogen. *Horm Behav* 29(2), 191-206.
- Vreeburg, J. T., van der Vaart, P. D., and van der Schoot, P. (1977). Prevention of central defeminization but not masculinization in male rats by inhibition neonatally of oestrogen biosynthesis. *J Endocrinol* 74(3), 375-82.
- Whalen, R. E., and Olsen, K. L. (1981). Role of aromatization in sexual differentiation: effects of prenatal ATD treatment and neonatal castration. *Horm Behav* 15(2), 107-22.
- Witcher, J. A., and Clemens, L. G. (1987). A prenatal source for defeminization of female rats is the maternal ovary. *Horm Behav* 21(1), 36-43.
- Young, W. C., Goy, R. W., and Phoenix, C. H. (1964). Hormones and sexual behavior. Broad relationships exist between the gonadal hormones and behavior. *Science* 143, 212-221.

TEJIS CON
FALLA DE ORIGEN

EXPERIMENTO 2.

**THE PRENATAL BLOCKADE OF ANDROGEN
RECEPTORS REDUCE THE NUMBER OF
INTROMISSIONS NEEDED TO INDUCE
CONDITIONED PLACE PREFERENCE AFTER
PACED MATING IN FEMALE RATS**

**Emilio Domínguez-Salazar, Francisco J. Camacho
and Raúl G. Paredes**

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DOMINGUEZ-SALAZAR, E., F.J CAMACHO, R.G. PAREDES. **The prenatal blockade of androgen receptors reduce the number of intromissions needed to induce conditioned place preference after paced mating in female rats.**

Estrous females pace their coital contacts to control the rate of cervical/vaginal stimulation. Females that receive at least 10 paced intromissions develop a reward state, evaluated by conditioned place preference (CPP), whereas females that do not pace their coital contacts do not develop CPP. We asked if androgenic influences in perinatal life are responsible for inducing aversive properties of mating by prenatally blocking androgen receptors and evaluating if paced and non-paced mating induce CPP. Flutamide-treated females changed their place preference only with paced mating but needed fewer intromissions than control females. The results suggest the existence of a threshold of cervical/vaginal stimulation that correlates with the induction of a reward state and which can be reduce by prenatally blocking androgen receptors

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Sexual behavior in female rats has a receptive and a proceptive component. Receptivity is characterized by the lordosis posture: the female rat arches her back, raises her head and rear, and deflects her tail, allowing the male rat to intromit (Beach, 1976). Proceptivity is a complex pattern of soliciting behaviors (hopping, darting, ear-wiggling, soliciting mounting) (Beach, 1976; Madlafousek & Illinak, 1977) which trigger copulatory mounts from the male. Under semi-natural conditions (McClintock & Adler, 1978) or in the wild (Calhoun, 1962) estrous females rats exhibit a recognizable solicitation pattern consisting of approach toward, orientation to, and withdraw from the male (McClintock & Adler, 1978). This proceptive or soliciting behavior is named paced mating behavior (reviewed in Erskine, 1989). We have shown that paced mating behavior in females induces a reward state, evaluated by CPP, whereas non-paced mating does not induce CPP (Martinez & Paredes, 2001; Paredes & Alonso, 1997). In males, sexual behavior also induces a reward state (Hughes, Everitt, & Herbert, 1990; Mehrara & Baum, 1990; Miller & Baum, 1987) and ejaculation appears to be an important factor for the induction of CPP (Agmo & Berensfeld, 1990). On the other hand, in females 10-15 paced intromissions, without receiving an ejaculation, are enough to reach an affective-positive state and induce a reward state (Paredes & Vazquez, 1999).

Male rats with prenatal androgen blockade, when adults, showed a decrease in their masculine coital behavior (Clemens, Gladue, & Coniglio, 1978; Dominguez-Salazar, Portillo, Baum, Bakker, & Paredes, 2002) and an increased in lordosis behavior (Gladue & Clemens, 1978). Clemens and co-workers (Clemens et al., 1978) showed that androgenic substances secreted by fetal testis of male rats influence the morphology (increase the ano-genital distance) and later behavior of nearby fetal females (increase male-like behavior). The changes in morphology and behavior observed in female rats located near a male during uterine development were blocked with an androgen receptor antagonist (Clemens et al., 1978). However, treatment with the same androgen-receptor blocker (flutamide) had no effect on feminine coital behavior (Brand & Slob, 1991).

Females of others species, like ferrets and hamster, do not show male-like coital behavior as that seen in rats. Female hamsters are not exposed prenatally to male-like levels of

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

testosterone (Vomachka & Lisk, 1986), and in adulthood they have a limited capacity to display male-typical coital behavior (Fiber & Swann, 1996; Noble, 1977). The transplacental administration of testosterone to female ferrets over embryonic day 16 to 34 (Baum, 1976) or over day 30 to 41 of a 41-day gestation period (Tobet & Baum, 1987) failed to augment their ability to exhibit masculine coital behavior, when tested in adulthood following ovariectomy and concurrent administration of testosterone. On the other hand, female ferrets do not pace their coital interaction (Baum, 1990). This information suggests to us that probably androgens, that induce male-like coital behavior and cross the transplacental barrier in female rats easier than female ferrets and hamster, could induce aversive properties in mating. If this is the case, pacing behavior could function to reduce these negative consequences. To test the hypothesis that mating in female rats has aversive characteristics induced by androgenic influences in perinatal life, we evaluated the capacity of female rats with prenatal blockade of androgen receptor to develop CPP by paced and non-paced mating.

General Methods

Subjects

Sprague-Dawley rats obtained from the breeding colony at the Instituto de Neurobiología, (INB, UNAM, Querétaro, México) were maintained in a room with a reversed light-dark cycle (12h light/12h dark; lights off at 10:00) with food and water available *ad libitum*.

Female rats were time-mated. Starting at day 12 of gestation, pregnant dams were injected twice daily (10 AM and 8 PM) with flutamide (10mg/kg, dissolved in propylene glycol with 10% of ethanol) until pups were born. Pregnant dams of the control group were injected twice daily with vehicle (VEH) starting day 12 of gestation until birth. Pups were weaned at 25 days of age and housed three to four of the same treatment and sex to a cage. When adults, females were gonadectomized under sterile conditions using ketamine (70 mg/kg) and xylazine (6 mg/kg) at approximately 3 months of age.

Place Preference Paradigm

Three weeks after surgery females were tested in a three-compartment box. The central compartment (22 X 24 X 32 cm), painted gray, communicate with lateral compartments (23 X 37 X 32 cm) through a sliding door (10 x 10 cm). The lateral compartments offered distinct stimuli in color, texture and odor. One compartment is white with sawdust on the floor and the other is black with the walls moistened with a 2 % solution of glacial acetic acid. The animals were observed through the front wall of the central compartment made of fine wire mesh. After determining the initial preference, females were treated with estradiol benzoate (25 µg) and progesterone (0.5 mg) 52 and 4 h, respectively, before exposing them to the reinforcing event (morphine in experiment 1, mating in experiments 2 and 3).

A procedure similar to that used by Paredes and Alonso (1997) was followed. Placing the subject in the middle compartment and recording the time spent in each of the lateral chambers during a 10-min session determined the initial preference (pretest). During conditioning sessions, the animals were placed in the preferred compartment during 30 min. On alternate days the females were exposed to the reinforcing event and placed in the non-preferred (rewarded) compartment for 30 min. After six conditioned sessions, three reinforced and three non-reinforced, the preference for each chamber was tested again (test) in exactly the same way as before conditioning (pretest).

Paced and Non-paced Mating

The mating cages (40 X 60 X 40 cm) were equally divided by a removable wood partition with a small hole (4 X 7 cm) through which the female could enter or exit the other half of the cage in which the male was confined. In experiment 2, females paced their coital interaction; in experiment 3 the partition was removed and the females were not able to pace their sexual contacts.

During mating test the following parameters of sexual behavior were recorder: latencies and number of mounts, intromissions and ejaculations. The interintromission interval (III, ejaculation latency divided by the number of intromission) was calculated. Lordosis intensity

was rated on a scale of 0-2 as follows: 0, no lordosis; 1: partial lordosis characterized by lateral tail deviation with moderate concave back flexion and neck extension; 2, full lordosis characterized by lateral tail deviation with pronounced back and neck flexion. In this way, the mean lordosis intensity (MLI, the sum of points divided by the number of mount plus intromission received) and the lordosis quotient (LQ, the total number of lordosis responses divided by the number of mounts and intromissions multiplied by 100) were calculated. For pacing behavior percent of exits and return latencies (time between an exit and the next enter) after mount, intromission and ejaculation were calculated.

Table 1 summarizes the groups and treatments during conditioning for each experiment.

Statistical Analysis

The number and latency of mount, intromission and ejaculation; the LQ and MLI; the return latencies and percent of exits after mount, intromission or ejaculation were evaluated by an ANOVA for independent groups followed by LSD's Fisher post hoc test when the ANOVA revealed a significant effect. For these parameters we calculated the average of the three conditioning sessions.

We used two criteria to consider that a treatment induced a change in place preference. First, time in the reinforced compartment should increase between pretest and test. Second, the preference score (time in reinforced compartment / [time in reinforced compartment + time in non-reinforced compartment]) should increase between pretest and test. It was considered important to use both criteria because each them alone could indicate a false preference change. The preference score and the time spent in the reinforced compartment were evaluated by a 2 (test) X (2, 3 or 4 groups, depending on the experiment) ANOVA with repeated measures on the test factor (pretest-test).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Experiment 1. Conditioning with morphine

Methods

In order to determine if flutamide-treated females were able to change their place preference and if the prenatal treatment modifies their general reward system, 20 vehicle-treated females and 10 flutamide-treated females were used. Females were injected with saline in the non-reinforced sessions. During reinforced sessions, of the 20 females prenatally exposed to vehicle 10 were injected with saline (VEH-SAL) before being placed in the reinforced compartment during 30 min. The other 10 females exposed prenatally to vehicle (VEH-MOR) and the 10 females prenatally exposed to flutamide (FLU-MOR) were injected with morphine (1 mg/kg) before being placed in the reinforced compartment.

Results: All females changed their place preference with morphine

The ANOVA for the preference score revealed a significant effect of Session, $F_{(1,27)} = 28.65$, $p < 0.001$; Group, $F_{(2,27)} = 7.32$, $p = 0.003$ and Group X Session, $F_{(2,27)} = 3.57$, $p = 0.043$. Test for simple main effects showed a significant increase in the preference score in control (VEH) and flutamide groups [VEH-SAL, $F_{(1,27)} = 2.07$, $p = 0.16$; VEH-MOR, $F_{(1,27)} = 25.8$, $p < 0.001$; FLUT-MOR, $F_{(1,27)} = 7.4$, $p = 0.01$]. The analysis of the time spent in the reinforced compartment revealed a significant effect of the Session, $F_{(1,27)} = 21.7$, $p < 0.001$; Group, $F_{(2,27)} = 6.17$, $p = 0.006$ and Group X Session, $F_{(2,27)} = 3.47$, $p = 0.046$. Test for simple main effects showed a significant increase in the time spent in the reinforced compartment in control and flutamide groups [VEH-SAL, $F_{(1,27)} = 1.47$, $p = 0.24$; VEH-MOR, $F_{(1,27)} = 22.1$, $p < 0.001$; FLUT-MOR, $F_{(1,27)} = 4.4$, $p = 0.045$]. Figure 1 illustrates the clear change of preference induced by morphine. No change of preference was observed in the VEH-SAL group.

TESIS NO SALE
BIBLIOTECA

TESIS CON
FALLA DE 1988

Experiment 2: Conditioning with paced mating.

Methods

In order to evaluate if flutamide-treated females needed fewer number of intromissions than control females to induce a reward state, 30 vehicle- and 10 flutamide-treated females were used. Ten control females were introduced in the reinforced compartment, directly from their home cage without mating (VEH-0-Intro). Other 10 control females were gently introduced in the reinforced compartment after receiving between 10-15 intromissions with or without ejaculation (VEH >10-Intro). The remaining 10 control females were introduced in the reinforced compartment after receiving no more than 9 intromissions with ejaculation (VEH <9-Intro). Flutamide-treated females received no more than 9 intromissions (FLU <9-Intro) and an ejaculation before being placed in the reinforced compartment.

Results: Flutamide-treated females needed less intromission than control females to induce a reward state.

Table 2 summarizes the sexual behavior displayed by stimulus males, the ANOVA revealed significant differences in the number of intromissions (between groups, $F_{(2,27)} = 15.9$, $p < 0.001$), which was our criteria to differentiate the groups. With respect to pacing behavior the ANOVA revealed differences in return latencies (groups, $F_{(2,74)} = 12.8$, $p < 0.001$) and percent of exits (group, $F_{(2,31)} = 30.5$, $p < 0.001$; behavioral pattern, $F_{(2,81)} = 3.1$, $p = 0.048$) after mount, intromissions and ejaculation. Posthoc analysis showed that the percent of exits after ejaculation was increased with respect to percent of exits after mount and intromission in all groups. The return latency after ejaculation was increased with respect to return latency after mount in VEH >10-Intro group and also was increased with respect to return latencies after mount and intromission in FLU <9-Intro group. Differences in return latencies were not observed in VEH <9-Intro group (table 3).

The ANOVA of the preference score revealed a significant effect of Session, $F_{(1,36)} = 68.8$, $p < 0.001$ and Group X Session, $F_{(2,36)} = 3.8$, $p = 0.019$. Test for simple main effects showed

a significant increase in the preference score in all groups [VEH-0-Intro, $F_{(1,36)} = 8.47$, $p = 0.006$; VEH < 9-Intro, $F_{(1,36)} = 5.01$, $p < 0.031$; VEH > 10-Intro, $F_{(1,36)} = 42.1$, $p < 0.001$; FLU < 9-Intro, $F_{(1,36)} = 24.6$, $p < 0.001$]. The analysis of the time spent in the reinforced compartment revealed a significant effect of Session, $F_{(1,36)} = 15.7$, $p < 0.001$ and Group, $F_{(2,36)} = 5.6$, $p = 0.003$. Test for simple main effects showed a significant increase in the time spent in the reinforced compartment in control females with 10 or more intromissions and the flutamide group [VEH-0-Intro, $F_{(1,36)} = 0.5$, $p = 0.5$; VEH < 9-Intro, $F_{(1,36)} = 0.32$, $p = 0.32$; VEH > 10-Intro, $F_{(1,36)} = 15.5$, $p < 0.001$; FLU < 9-Intro, $F_{(1,36)} = 5.3$, $p = 0.027$]. Figure 2 illustrates the clear change of preference induced by pacing only in the control females with 10 or more intromissions and in the flutamide-treated females with less than 9 intromissions. No change of preference was observed in non-copulating females and in control females with less than 9 intromissions.

Experiment 3: Conditioning with non-paced mating

Methods

In experiment 2 we demonstrated that prenatal blockade of androgen receptors reduce the number of intromission that females need to develop a reward state. In order to determinate if the prenatal blockade of androgen receptors inhibits the need to pace the coital contacts to induce a positive affective state, we evaluated if non-paced mating could induce a change in place preference. Ten vehicle- (VEH) and 10 prenatally flutamide-treated (FLU) females were used. Females were introduced in the non-preferred compartment after receiving 10 to 15 intromissions with or without ejaculation during non-paced mating test.

Results: Non-paced mating did not induce CPP.

No differences were founded in masculine sexual behavior displayed by the stimulus males for VEH and FLU groups (table 2). The ANOVA of the preference score and the time in the reinforced compartment revealed a significant effect of session ($F_{(1,18)} = 13.53$, $p = 0.003$ and $F_{(1,18)} = 5.98$, $p = 0.029$, respectively). However post hoc analysis revealed no significant differences between pretest and test in both groups (Fig. 3).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Discussion

The results of experiment 1 showed that morphine can induce a reward state in females prenatally treated with flutamide, suggesting that the opioid system is functional in these females and hence conditioned place preference induced by pacing behavior could be evaluated. Previous studies from our group have shown that the injection of the opioid antagonist naloxone prior to mating blocks CPP induced by paced mating suggesting that the reward state induced when the females control the rate of sexual stimulation is mediated by opioids (Paredes & Martinez, 2001). The results of experiment 2 showed that flutamide-treated females were able to develop a change of preference after pacing. Moreover, a facilitation of conditioning place preference was observed; flutamide-treated females needed less number of intromissions than control females to induce a reward state. Previous observations showed that female rats need at least 10 paced intromissions to reach an affective positive state that induce CPP (Paredes & Alonso, 1997). Experiment 2 confirmed these observations; control females that received less than 9 intromissions (mean = 6) and an ejaculation did not change their preference, whereas the control females that change their preference received at least 10 intromissions (mean = 11) with or without ejaculation. The flutamide-treated females that received less than 9 intromissions (mean = 7) and an ejaculation showed a clear change of preference suggesting that the aversive consequences of mating were reduced by the prenatal blockade of androgen receptors.

Pacing behavior is a mechanism that females use to reduce the aversive properties of mating by controlling the rate at which they receive cervical/vaginal stimulation (Erskine, 1989; Erskine & Baum, 1982; Erskine, Kornberg, & Cherry, 1989; McClintock & Adler, 1978) that is critical for the initiation of pregnancy (Adler, 1969). Individual differences in paced mating behavior have the potential to cause variation in fertility among female rats. Clemens and collaborators (1978) demonstrated that females receive androgens from adjacent males in prenatal life, this androgenic stimulation facilitates the expression of masculine characteristic, when adults, and can be blocked by flutamide. The ano-genital distance of prenatally flutamide-treated males from the same litters than the experimental females used in this study was reduced.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

In addition to the feminization of the external genitalia, these males from the same litters as our subjects, showed no intromissions or ejaculation pattern (data not shown). These results confirm previous observations (Clemens et al., 1978; Imperato-McGinley, Sanchez, Spencer, Yee, & Vaughan, 1992) and show that flutamide treatment reached our subjects in uterus. The degree to which females are exposed to androgens during development is a potential mechanism for individual differences in mating behavior, particularly in paced mating.

The display of pacing behavior is dependent upon different intensities of cervical-vaginal stimulation. If the perineal/vaginal area is anesthetized, females present a failure to pace (Bermant & Westbrook, 1966) and pelvic nerve transection increases the time females spend with a sexually active male (Emery & Whitney, 1985). In addition, cervical-vaginal stimulation alters subsequent behavior, the return latencies increased after each intromission (Erskine, 1989; Peirce & Nuttall, 1961). These results suggest that the motivation to mate decreases with the degree of cervical-vaginal stimulation; with higher stimulation, the time to return with the male is increased. It is interesting to note that control females with less than 9 intromissions did not increase the return latencies after ejaculation. Bertmant and Westbrook (1966) suggested that continued vaginal distension or cervical stimulation provided by the deposition of vaginal plug after an ejaculation served to intensify the preceding stimulus. However, in our case no differences were observed between return latencies in this group, suggesting that a threshold of stimulation needs to be reach to observe a significant increase in the return latencies.

Females treated with a small dose (5 μ g) of testosterone propionate on day three postpartum showed delayed anovulatory syndrome, but were genitally unaltered and maintain fertility during their young adult lives, however, during paced conditions, their III was increased (Gans & Erskine, 1998). The effect of TP treatment was to amplify the large effect that paced mating itself had on III, that is, increased the return latencies after intromission. The authors explained this effect like a consequence of a decrease motivation to mate induced by testosterone. In agreement with this hypothesis when we blocked the effect of testosterone with flutamide an increase in motivation to mate had to be observed.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

The results of Gans and Erskine (1998) described above showed that the increase of return latency after intromission (with respect to control females) in female rats neonatally treated with TP is the consequence of a decrease of motivation. Our result showed that control females with less than 9 intromissions did not increase their return latencies probably because they had not reached the threshold of cervical/vaginal stimulation and their motivation to mate was still high. Control females with more than 10 intromissions and flutamide-treated females with less than 9 showed an increase in their return latencies after ejaculation with respect to their return latencies after mount and intromission. It could be suggested that they had reached the stimulation threshold and their motivation to mate decreased. These results correlate with the results obtained in CPP. The females that reach the stimulation threshold were the subjects that develop CPP, the increase in return latencies might be related with the induction of a reward state.

We previously demonstrated that only paced mating induces a change of place preference (Paredes & Alonso, 1997), suggesting that during paced mating female rats can dissociate the appetitive from the aversive components. In experiment 3, with non-paced mating, females received high levels of cervical/vaginal stimulation but were not able to decrease completely the aversive properties of mating because a reward state was not induced. This experiment showed that the prenatal blockade of androgen receptors did not eliminate the aversive properties of mating in a non-paced mating test, flutamide-treated females received a mean of 9 intromissions and an ejaculation and did not change their place preference.

To summarize, these experiments demonstrate that prenatal flutamide treatment reduce the number of intromissions needed to develop CPP only after paced mating, suggesting that the treatment reduced, but did not eliminate, the aversive properties of mating. We evaluated the effects induced by the presence of androgens from adjacent males by blocking androgen receptors directly, however, it is still necessary to evaluate the role of aromatization of these androgens in intrauterine life to determinate its contribution to the aversive properties of mating.

Acknowledgments

This project was supported by DGAPA IN228199 and CONACyT 28039N. We thank Pilar Galarza, Martín García and Lourdes Lara for technical assistance.

References

- Adler, N. T. (1969). Effects of the male's copulatory behavior on successful pregnancy of the female rat. J Comp Physiol Psychol, 69(4), 613-22.
- Agmo, A., & Berenfeld, R. (1990). Reinforcing properties of ejaculation in the male rat: role of opioids and dopamine. Behav Neurosci, 104(1), 177-82.
- Baum, M. J. (1976). Effects of testosterone propionate administered perinatally on sexual behavior of female ferrets. J Comp Physiol Psychol, 90(4), 399-410.
- Baum, M. J. (1990). The ferret as a model for studying the sexual differentiation of behavioral and reproductive function. J Exp Zool Suppl, 4, 213-4.
- Beach, F. A. (1976). Sexual attractivity, proceptivity, and receptivity in female mammals. Horm Behav, 7(1), 105-38.
- Bermant, G., & Westbrook, W. H. (1966). Peripheral factors in the regulation of sexual contact by female rats. J Comp Physiol Psychol, 61(2), 244-50.
- Brand, T., & Slob, A. K. (1991). Perinatal flutamide and mounting and lordosis behavior in adult female Wistar and Sprague-Dawley rats. Behav Brain Res, 44(1), 43-51.
- Calhoun, J. B. (1962). The Ecology and Sociology of the Norway Rat. Washington, D.C.: (U.S. Public Health Service Publication No. 1008) U.S. Government Printing Office.
- Clemens, L. G., Gladue, B. A., & Coniglio, L. P. (1978). Prenatal endogenous androgenic influences on masculine sexual behavior and genital morphology in male and female rats. Horm Behav, 10(1), 40-53.
- Dominguez-Salazar, E., Portillo, W., Baum, M. J., Bakker, J., & Paredes, R. G. (2002). Effect of prenatal androgen receptor antagonist or aromatase inhibitor on sexual behavior, partner preference and neuronal Fos responses to estrous female odors in the rat accessory olfactory system. Physiol Behav, 75(3), 337-46.

TESIS CON
FALLA DE CUBIEN

Emery, D. E., & Whitney, J. F. (1985). Effects of vagino-cervical stimulation upon sociosexual behaviors in female rats. Behav Neural Biol. 43(2), 199-205.

Erskine, M. S. (1989). Solicitation behavior in the estrous female rat: a review. Horm Behav. 23(4), 473-502.

Erskine, M. S., & Baum, M. J. (1982). Plasma concentrations of testosterone and dihydrotestosterone during perinatal development in male and female ferrets. Endocrinology. 111(3), 767-72.

Erskine, M. S., Kornberg, E., & Cherry, J. A. (1989). Paced copulation in rats: effects of intromission frequency and duration on luteal activation and estrus length. Physiol Behav. 45(1), 33-9.

Fiber, J. M., & Swann, J. M. (1996). Testosterone differentially influences sex-specific pheromone-stimulated Fos expression in limbic regions of Syrian hamsters. Horm Behav. 30(4), 455-73.

Gans, S. E., & Erskine, M. S. (1998). Neonatal testosterone treatment does not disrupt paced-mating induced female place preference. Paper presented at the SBN Meeting, Atlanta, GA.

Gladue, B. A., & Clemens, L. G. (1978). Androgenic influences on feminine sexual behavior in male and female rats: defeminization blocked by prenatal antiandrogen treatment. Endocrinology. 103(5), 1702-9.

Hughes, A. M., Everitt, B. J., & Herbert, J. (1990). Comparative effects of preoptic area infusions of opioid peptides, lesions and castration on sexual behaviour in male rats: studies of instrumental behaviour, conditioned place preference and partner preference. Psychopharmacology (Berl). 102(2), 243-56.

Imperato-McGinley, J., Sanchez, R. S., Spencer, J. R., Yee, B., & Vaughan, E. D. (1992). Comparison of the effects of the 5 alpha-reductase inhibitor finasteride and the antiandrogen flutamide on prostate and genital differentiation: dose-response studies. Endocrinology. 131(3), 1149-56.

TESIS CON
FALLA DE CUBIEN

Madlafousek, J., & Hlinak, Z. (1977). Sexual behavior of the female laboratory rat: Inventory, patterning, and measurement. Behaviour, 63, 129-174.

Martinez, I., & Paredes, R. G. (2001). Only self-paced mating is rewarding in rats of both sexes. Horm Behav, 40(4), 510-7.

McClintock, M. K., & Adler, N. T. (1978). The role of the female during copulation in wild and domestic Norway rats (*Rattus norvegicus*). Behaviour, 67, 67-96.

Mehrara, B. J., & Baum, M. J. (1990). Naloxone disrupts the expression but not the acquisition by male rats of a conditioned place preference response for an oestrous female. Psychopharmacology (Berl), 101(1), 118-25.

Miller, R. L., & Baum, M. J. (1987). Naloxone inhibits mating and conditioned place preference for an estrous female in male rats soon after castration. Pharmacol Biochem Behav, 26(4), 781-9.

Noble, R. G. (1977). Mounting in female hamsters: effects of different hormone regimens. Physiol Behav, 19, 519-526.

Paredes, R. G., & Alonso, A. (1997). Sexual behavior regulated (paced) by the female induces conditioned place preference. Behav Neurosci, 111(1), 123-8.

Paredes, R. G., & Martinez, I. (2001). Naloxone blocks place preference conditioning after paced mating in female rats. Behav Neurosci, 115(6), 1363-7.

Paredes, R. G., & Vazquez, B. (1999). What do female rats like about sex? Paced mating. Behav Brain Res, 105(1), 117-27.

Peirce, J. T., & Nuttall, R. L. (1961). Self-paced sexual behavior in the female rat. J Comp Physiol Psychol, 54, 310-313.

Tobet, S. A., & Baum, M. J. (1987). Role for prenatal estrogen in the development of masculine sexual behavior in the male ferret. Horm Behav, 21(4), 419-29.

Vomachka, A. J., & Lisk, R. D. (1986). Androgen and estradiol levels in plasma and amniotic fluid of late gestational male and female hamsters: uterine position effects. Horm Behav, 20(2), 181-93.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Table 1. Prenatal treatments and reinforced events of each group in the 3 experiments reported.

EXPERIMENT	GROUP NAME	N	PRENATAL TREATMENT OF GROUP	Treatment before been placed in the PREFERRED COMPARTMENT	Treatment before been placed in the REINFORCED COMPARTMENT
1) Morphine	1) VEI-SAL	10	Vehicle	Saline	Saline
	2) VEI-MOR	10	Vehicle	Saline	Morphine
	3) FLU-MOR	10	Flutamide	Saline	Morphine
2) Paced Mating	1) VEI-0-Intro	10	Vehicle	-	Without mating (0 Intromission)
	2) VEI > 10-Intro	10	Vehicle	-	More than 10 Paced Intromissions
	3) VEI < 9-Intro	10	Vehicle	-	Less than 9 Paced Intromissions
	4) FLU < 9-Intro	10	Flutamide	-	Less than 9 Paced Intromissions
3) Non-Paced Mating	1) VEI	10	Vehicle	-	More than 10 Non-Paced Intromissions
	2) FLU	10	Flutamide	-	More than 10 Non-Paced Intromissions

Table 2. Feminine coital behavior of experimental females and masculine coital behavior of stimulus males.

EXPERIMENT 1: PACED MATING

GROUP	ML	IL	EL	NM	NI	NE	III	LQ	LI
VEH >10-Intro	51 ± 16	78 ± 19	439 ± 76	10 ± 2	11 ± 1	0.7 ± 0.1	49 ± 7	96 ± 1	1.7 ± 0.05
VEH <9-Intro	20 ± 4	48 ± 8	256 ± 33*	8 ± 2	6 ± 1**	1 ± 0**	44 ± 4	95 ± 2	1.6 ± 0.07
FLU <9-Intro	35 ± 6	62 ± 12	308 ± 28	5 ± 1	7 ± 1**	1 ± 0**	45 ± 6	96 ± 2	1.7 ± 0.05

EXPERIMENT 2: NON-PACED MATING

VEH	47 ± 18	73 ± 21	372 ± 68	12 ± 2	11 ± 1	0.8 ± 0.1	43 ± 6	99 ± 1	1.8 ± 0.07
FLU	46 ± 22	69 ± 29	429 ± 84	9 ± 1	9 ± 1	1 ± 0	48 ± 9	98 ± 1	1.7 ± 0.04

ML: mount latency; IL: intromission latency; EL: ejaculation latency; III: interintromission interval; number of mounts (NM), intromissions (NI) and ejaculations (NE); lordosis quotient (LQ) and lordosis intensity (LI). The data represent the average of the three tests of coital behavior.

Mean ± S.E.M. ANOVA followed by LSD Fisher test. *, Different from vehicle with more than 10 intromissions (V > 10Intro), p < 0.05; ** p < 0.01.

RESEARCH CENTER
 FACULTY OF
 MEDICINE
 NO. 100
 SISIS CON

Table 3. Return latency after mount (MRL), after intromission (IRL) and after ejaculation (ERL) and percent of exits after mount (%EM), intromission (%EI) or ejaculation (%EE) displayed by the females during paced mating (experiment 1). The data represent the average of the three tests.

PACING BEHAVIOR						
GROUP	MRL	IRL	ERL	%EM	%EI	%EE
VEH >10 Intro	17 ± 3 *	32 ± 6	68 ± 24	15 ± 5	22 ± 6	65 ± 11 ††
VEH < 9 Intro	20 ± 3	22 ± 5	37 ± 6	20 ± 7	30 ± 8	80 ± 9 ††
FLU < 9 Intro	16 ± 3 *	29 ± 6 *	74 ± 18	34 ± 9	43 ± 8	77 ± 11 †

Mean ± S.E.M. ANOVA followed by LSD Fisher test. *, Different from ERL in the same group. p < 0.01. †, Different from %EM and %EI in the same group, p < 0.05; ††, p < 0.01.

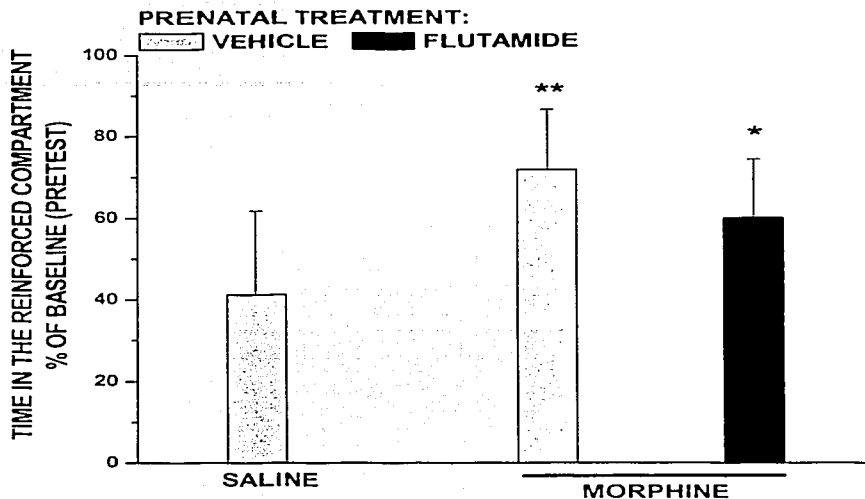


Figure 1. Effect of administration of morphine on CPP. A clear change of preference was observed in all groups that received morphine. The time spent in the reinforced compartment increased from pretest condition (baseline) in vehicle- and flutamide-treated females injected with morphine. Mean \pm S.E.M. The time spent in the reinforced compartment was evaluated by a 2 (test) X 3 (group) ANOVA with repeated measures on the test factor (pretest-test). *, Different from pretest condition (baseline), $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

TESIS CON
 FALLA DE CIEGOS

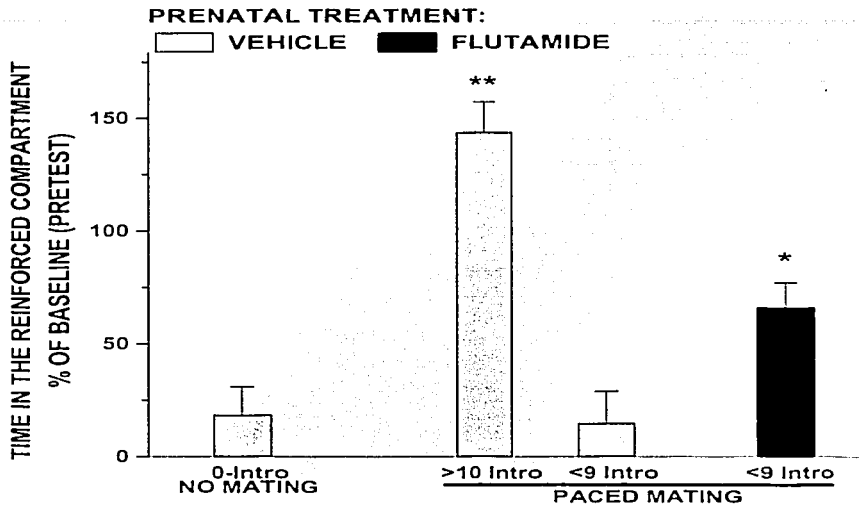


Figure 2. Effect of paced mating on CPP. A clear change of preference was observed in the control group that received at least 10 paced intromissions (VEH >10-Intro) and in the group prenatally treated with flutamide that received less than 9 intromissions (VEH < 9-Intro). Mean \pm S.E.M. The time spent in the reinforced compartment was evaluated by a 2 (test) X 4 (group) ANOVA with repeated measures on the test factor (pretest-test). *, Different from pretest condition (baseline) in the same group, $p < 0.01$; **, $p < 0.01$.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

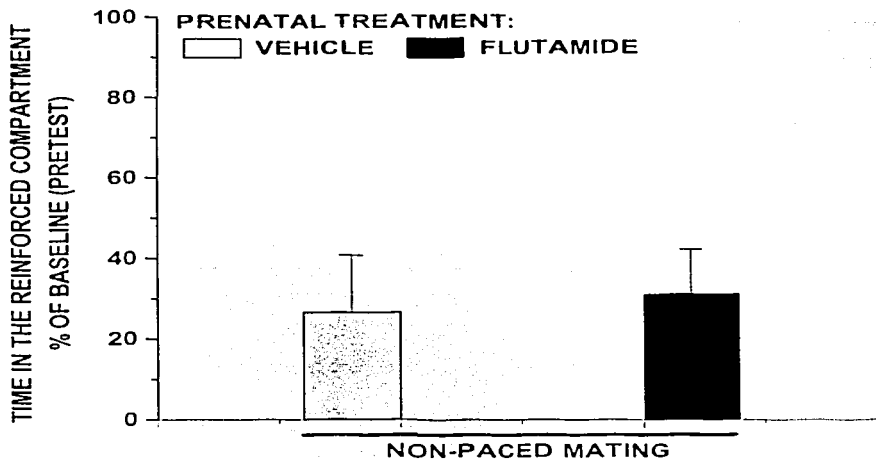


Figure 3. Effect of non-paced mating on CPP. No change in preference was observed when the females were not allowed to pace their sexual contacts. Time in the reinforced compartment was similar in the pretest (baseline) and test.
 Mean \pm S.E.M.

EXPERIMENTO 3.

**THE REWARD STATE INDUCED BY MATING IN
FEMALE RATS IS ORGANIZED PERINATALLY BY
ESTRADIOL**

**Emilio Domínguez-Salazar, Francisco J. Camacho
and Raúl G. Paredes**

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DOMINGUEZ-SALAZAR, E., F.J CAMACHO, R.G. PAREDES. **The reward state induced by mating in female rats is organized perinatally by estradiol.**

Paced mating induces a reward state evaluated by conditioned place preference (CPP) whereas non-paced mating does not. Female rats with perinatal inhibition of aromatization with ATD (1,4,6-androstatrieno-3,17-diona) were evaluated for CPP induced after paced and non-paced mating. During paced mating, control females showed increased return latencies after ejaculation compared with a mount or intromission whereas ATD-treated females showed similar return latencies after mount, intromission or ejaculation. Moreover, paced and non-paced mating induced a reward state in ATD-treated females. These results indicate that estradiol participate in the perinatal organization of paced mating and in the reward state induced by mating suggesting that estradiol is important for the sexual differentiation of the females.

Introduction

Proceptive or precopulatory behavior like hopping, darting, ear wiggling and soliciting mount [8,23] are evaluated during standard tests of sexual behavior, but the full range and complexity of solicitation behaviors exhibited by estrous females can only be observed under especial conditions. Observations in the wild [11,32], under semi-natural conditions [25-27] and in the laboratory [9,18,22,31] have demonstrated the strong influence of female behavior in mating. During copulation, the intermittent and periodic display of solicitation behaviors such as the approach/runaway (pacing) directly determines the type and timing of copulatory stimulation received. Pacing behavior is a mechanism that females use to reduce the aversive properties of mating by controlling the rate at which they receive cervical/vaginal stimulation [17-19,25] this stimulation induces neuroendocrine changes necessary for initiation of [1,2]. Individual differences in paced mating behavior have the potential to cause variation in fertility among females, playing a crucial role in ensuring reproductive success in the rat.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Studies in male rats have shown that ejaculation induces a reward state producing conditioned place preference (CPP) [4]. Using the CPP paradigm we have shown that paced mating behavior in females induces a reward state whereas non-pacing behavior does not [24,28]. In males, ejaculation is important for the induction of a reward state but, in females, 10-15 paced intromissions are enough to reach an affective-positive state without receiving an ejaculation [30] suggesting the existence of a threshold of cervical/vaginal stimulation, related with the rewarding properties of copulation.

The aromatization of testosterone to estradiol has been involved in the process of masculinization and defeminization of male rats. Male rats with perinatal blockade of aromatization show, when adults, a decrease in masculine coital behavior and/or an increase in lordosis behavior [5,10,12,16] but the role of aromatization in feminine sexual differentiation is controversial. Baum and Tobet [7] showed that the female ferrets deprived prenatally of estrogen via maternal ovariectomy plus administration of ATD (an aromatase inhibitor) were significantly less receptive than control females when were treated with a low doses of estradiol benzoate (EB), whereas, Witcher and Clemens [33] obtained opposite results, they showed that female rats with prenatal treatment with ATD increased their feminine sexual behavior with a low dose of EB. However, in both experiments, normal dose of EB induced a similar lordosis response that control females.

Previous results from our laboratory showed that estradiol can play an important role in feminine sexual differentiation. Perinatally ATD-treated females showed an increase in lordosis behavior when intact or treated with testosterone propionate with respect to control females (unpublished results). In order to determinate if estradiol plays a role in the sexual differentiation of females, we evaluate the effect of the perinatal inhibition of aromatization on pace and non-pace mating and on their capacity for induce a reward state.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Material and Methods

Female Sprague-Dawley rats obtained from the breeding colony at the Instituto de Neurobiología, (INB, UNAM, Querétaro, México) were maintained in a room with a reversed light-dark cycle (12h light/12h dark; lights off at 10:00) with food (5001 LabDiet) and water available *ad libitum*.

Female rats were time-mated. At day 12 of gestation, pregnant dams received under light ether anesthesia a subcutaneous (sc) implant of a silastic capsule (inner diameter 1.5 mm; outer diameter 2.1 mm; length: 5 cm) containing ATD (1,4,6-androstatriene-3,17-dione from Steraloids, INC.). Offspring from ATD-treated mothers continued to receive ATD by injection (1mg/rat; every other day with corn oil as the vehicle) from 1-3 hrs after birth until Day 11. Other group of pregnant dams was implanted with an empty capsule at day 12 of gestation and the pups were injected with 0.05 mL of corn oil every other day from birth until 11 days of age. Females were gonadectomized approximately at 3 months of age.

Conditioning place preference

A procedure similar to that used by Paredes and Alonso (1997) was followed. Three weeks after gonadectomy, females were tested in the place preference box for 10 min to determinate the initial preference (pretest). The place preference box has three compartments. The central compartment, painted gray, communicates with the lateral compartments trough sliding doors. The lateral compartments offered distinct stimuli in color, texture and odor, one compartment is white with sawdust on the floor and the other compartment is black with the walls moistened with a 2 % solution of glacial acetic acid. During conditioning, females were treated with estradiol benzoate (25 µg) and progesterone (0.5 mg) 52 and 4 h, respectively, before to reinforcing event (morphine in experiment 1, mating in experiment 2). After the pretest, during conditioning sessions, animals were placed, directly from their home cage, in the preferred compartment during 30 min. On alternate days the females were exposed to the reinforcing event and placed in the non-preferred

(rewarded) compartment for 30 min. After six conditioned sessions, three reinforced and three non-reinforced, the preference for each chamber was tested again (test) in exactly the same way as before conditioning (pretest).

Pacing and non-pacing behavior

The mating cages were equally divided by a removable wood partition (barrier) with a small hole through which the female could enter or exit to other half of the cage in which the male was confined. The groups of females that were not allowed to pace their coital contacts mated without the barrier.

During the mating test the following parameters of sexual behavior were recorder: latencies and number of mounts, intromissions and ejaculations. The interintromission interval (III, ejaculation latency divided by the number of intromission) was calculated. Lordosis intensity was rated on a scale of 0-2. In this way, the mean lordosis intensity (MLI, the sum of points divided by the number of mount plus intromission received) and the lordosis quotient (LQ, the total number of lordosis responses divided by the number of mount and intromissions multiplied by 100) were calculated. For the groups that paced their sexual contacts the percent of exits and the return latencies (time between an exit and the next enter) after mount, intromission and ejaculation were calculated.

Statistical Analysis:

The percent of exists and return latencies after mount, intromission or ejaculation; the number and latencies of mount, intromission and ejaculation and the III, the LQ and MLI were evaluated by an ANOVA for independent groups followed by a LSD's Fisher posthoc test when the ANOVA revealed a significant effect. For these parameters we calculated the average of the three conditioning sessions.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

We used two criteria to consider that a treatment induced a change in place preference. First, the preference score (time in reinforced compartment / [time in reinforced compartment + time in non-reinforced compartment]) should increase between pretest and test. Second, time in the reinforced compartment should increase between pretest and test. It was considered important to use both criteria because each them alone could indicate a false preference change. The preference score and the time spent in the reinforced compartment were evaluated by a 2 (test) X 3 (experiment 1) or 5 groups (experiment 2) ANOVA with repeated measures on the test factor (pretest-test).

Experiment 1: Conditioning with morphine.

In order to determine if ATD-treated females had a functional general reward system, we evaluated if a morphine injection could induce place preference. 18 control females and 9 ATD-treated females were used. All groups were injected with saline in the non-reinforced compartment. During reinforced sessions, 9 control females were injected only with saline and introduced by 30 min in the reinforced compartment. The remaining 9 control and ATD-treated females and were injected with 1 mg/kg of morphine sulfate dissolved in saline, 1 min after females were introduced by 30 min in the reinforced compartment.

Results: All females injected with morphine change their place preference

ANOVA of preference score revealed a significant effect of Session, $F(1,24)= 28.6$, $p < 0.001$ and Group, $F(2,24)= 7.4$, $p = 0.003$. Tests for simple main effects showed a significant increase in the preference score in control and ATD groups treated with morphine [CON-SAL, $F(1,24)= 2.07$, $p = 0.162$; CON-MOR, $F(1,24)= 25.9$, $p < 0.001$; ATD-MOR $F(1,24)= 7.4$, $p = 0.011$]. The analysis of the time spent in the reinforced compartment revealed a significant effect of the Session, $F(1,24)= 21.7$, $p < 0.001$; Group, $F(2,24)= 6.2$, $p = 0.006$ and Group X Session, $F(2,24)= 3.5$, $p = 0.046$. Tests for simple main effects showed a significant increase in the time spent in the reinforced compartment in control and ATD groups treated with morphine [CON-SAL, $F(1,24)=$

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1.5, $p = 0.236$; CON-MORF, $F(1,24) = 22.1$, $p < 0.001$; ATD-MORF, $F(1,24) = 4.42$, $p = 0.045$].

Figure 1 illustrates the clear change of preference induced by morphine. No change of preference was observed in control females injected with saline.

Experiment 2: Conditioning with mating.

Experiment 1 showed that the general reward system involved in the conditioning induced by mating [29] was intact, and then the state induced by mating could be evaluated. Twenty seven control females and 18 ATD-treated gonadectomized females were divided in the following groups: 1) Control females without mating (C-NM, $n=9$); 2) Control females with non-paced mating (C-NPM, $n=9$); 3) ATD-treated females with non-paced mating (ATD-NPM, $n=9$); 4) Control females with paced mating (C-PM, $n=9$) and 5) ATD-treated females with paced mating (ATD-PM, $n=9$). During reinforced sessions groups 4 and 5 were introduced in the mating cage and paced their sexual contacts. Groups 2 and 3 also mated but were not allowed paced the coital contacts. The females were gently introduced in the reinforced compartment after receiving 15 intromissions or 1 ejaculation. Group 1 was introduced in the reinforced compartment, directly from their home cage without mating.

Results: ATD treated females change their place preference with paced and non-paced mating.

Table 1 summarizes the behavior displayed by stimulus males and the LQ and LI of experimental females during paced and non-paced mating. ANOVA revealed no differences in any of the sexual behavior parameters (ML: $F(3,35) = 1.3$, $p = 0.288$; IL: $F(3,35) = 1.5$, $p = 0.228$; EL: $F(3,33) = 0.95$, $p = 0.428$; NM: $F(3,35) = 0.6$, $p = 0.619$; NI: $F(3,35) = 0.28$, $p = 0.8404$; NE: $F(3,35) = 0.15321$, $p = 0.93$; III: $F(3,35) = 0.51$, $p = 0.68$; LQ: $F(3,35) = 0.99$, $p = 0.412$; MLI: $F(3,35) = 1.35$, $p = 0.276$). With respect to pacing behavior (table 2) ANOVA revealed differences in return latencies (between behavioral pattern: $F(2,42) = 5.54$, $p = 0.008$) and percent of exists (between behavioral pattern: $F(2,46) = 28.3$, $p < 0.001$; between groups: $F(1,41) = 8.4$, $p = 0.006$) after mount,

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

intromissions and ejaculation. Posthoc analysis showed that return latency after ejaculation was increased with respect to return latencies after mount and intromission only in the control group. The percent of exits after ejaculation was increased with respect to percent of exits after mount and after intromission in control and ATD groups; moreover the percent of exits after ejaculation was increased with respect to control group.

ANOVA of preference score revealed a significant effect of Session, $F(1,40)=90.1$, $p<0.001$. Test for simple main effect showed a significant increase in the preference score in all groups [C-NM, $F(1,40)=15.4$, $p<0.001$; C-NPM, $F(1,40)=9.74$, $p=0.003$; ATD-NPM, $F(1,40)=13.1$, $p=0.001$; C-PM, $F(1,40)=27.2$, $p<0.001$; ATD-PM, $F(1,40)=27.6$, $p<0.001$]. The analysis of the time spent in the reinforced compartment revealed a significant effect of the Session, $F(1,40)=27.9$, $p<0.001$ and Group, $F(2,40)=3.2$, $p=0.023$. Tests for simple main effects showed a significant increase in the time spent in the reinforced compartment in control females with paced mating and in ATD-treated females with paced and non-paced mating [C-NM, $F(1,40)=2.28$, $p=0.139$; C-P, $F(1,40)=10.9$, $p=0.002$; ATD-P, $F(1,40)=5.1$, $p=0.03$; C-NP, $F(1,40)=2.27$, $p=0.14$; ATD-NP, $F(1,40)=9.27$, $p<0.004$]. Figure 2 illustrates the clear change of preference induced by paced mating in control females and by paced and non-paced mating in ATD-treated females. No change of preference was observed in the group of females without mating and in control females with non-paced mating.

Discussion

The administration of morphine to induce CPP allowed us to determinate that the reward system involved in the induction of CCP by mating [29] was intact in the ATD-treated females. The more important conclusion: paced and non-paced mating induced a reward state in perinatally ATD-treated females evaluated by CPP is supported by the data of paced mating. The increase of the return latencies normally is directly proportional to vaginal/cervical stimulation. It is interesting to note that the return latency after of ATD-treated females was not higher than that seen after an

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

intromission or after a mount in contrast to what is observed in control females. If non-paced mating induces a change of preference in ATD females then, it could be argued that the sexual behavior is rewarding independently of if it is paced or not.

Pacing is considered a mechanism to decrease the aversive properties of mating [19], the more obvious conclusion will be that the inhibition of perinatal aromatization eliminates the aversive properties of mating in females. This conclusion is supported by several experiments of Clemens and his coworkers. They demonstrated that during fetal development females received testosterone from adjacent males inducing an increase of ano-genital distance and masculine sexual behavior [13] and this effect is blocked by flutamide, an androgen receptor antagonist [20]. The prenatal administration of flutamide reduces the threshold of cervical/vaginal stimulation to induce a reward state when females paced their sexual contacts. However no change of preference was observed in flutamide treated females that were not allowed to pace the sexual interaction (unpublished results). In this context, testosterone from adjacent males will induce the aversive properties of mating, directly trough the stimulation of androgen receptors or indirectly trough estrogen receptors after aromatization.

Several results suggest that estradiol is involved in sexual differentiation of females [6,14,15,21,33]. Then, the alterations observed in pacing behavior and in the reward state induced by mating in females with perinatal inhibition of aromatization, could be the result of alterations in sexual differentiation. One function of pacing behavior is to facilitate the pregnancy [19], the number of intromission is fundamental for a successful pregnancy [1,3] and during paced mating females have the ability to discriminate between varying intensities of coital stimulation with an active pattern of approach/withdrawal controlling the stimulation and reducing the number of intromission needed for pregnancy [17]. Therefore, we suggest that paced mating is a mechanism to increase the probability of a successful pregnancy more than a mechanism to reduce the aversive properties of the mating and it is a behavior organized perinatally by estradiol.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

If estradiol is implicated in the regulation of an important mechanism to reach pregnancy then, high possibilities exist that perinatally ATD-treated females will show a high degree of sterility and preliminary results from our laboratory indicate this is the case. Our general suggestion is that estradiol play an important role in the differentiation of the sexual motivation and sexual performance in females and males.

Acknowledgments

This project was supported by DGAPA IN228199 and CONACyT 28039N. We thank Pilar Galarza, Martín García and Lourdes Lara for technical assistance.

References

- [1] Adler, N.T., Effects of the male's copulatory behavior on successful pregnancy of the female rat, *J Comp Physiol Psychol*, 69 (1969) 613-22.
- [2] Adler, N.T., Resko, J.A. and Goy, R.W., The effect of copulatory behavior on hormonal change in the female rat prior to implantation, *Physiol Behav*, 5 (1970) 1003-7.
- [3] Adler, N.T. and Toner, J.P., Jr., The effects of copulatory behavior on sperm transport and fertility in rats, *Ann N Y Acad Sci*, 474 (1986) 21-32.
- [4] Agmo, A. and Berenfeld, R., Reinforcing properties of ejaculation in the male rat: role of opioids and dopamine, *Behav Neurosci*, 104 (1990) 177-82.
- [5] Bakker, J., Brand, T., van Ophemert, J. and Slob, A.K., Hormonal regulation of adult partner preference behavior in neonatally ATD-treated male rats, *Behav Neurosci*, 107 (1993) 480-7.
- [6] Bakker, J., Honda, S., Harada, N. and Balthazart, J., The aromatase knock-out mouse provides new evidence that estradiol is required during development in the female for the expression of sociosexual behaviors in adulthood, *J Neurosci*, 22 (2002) 9104-12.
- [7] Baum, M.J. and Tobet, S.A., Effect of prenatal exposure to aromatase inhibitor, testosterone, or antiandrogen on the development of feminine sexual behavior in ferrets of both sexes, *Physiol Behav*, 37 (1986) 111-8.
- [8] Beach, F.A., Sexual attractivity, proceptivity, and receptivity in female mammals, *Horm Behav*, 7 (1976) 105-38.
- [9] Bermant, G. and Westbrook, W.H., Peripheral factors in the regulation of sexual contact by female rats, *J Comp Physiol Psychol*, 61 (1966) 244-50.
- [10] Brand, T., Kroonen, J., Mos, J. and Slob, A.K., Adult partner preference and sexual behavior of male rats affected by perinatal endocrine manipulations, *Horm Behav*, 25 (1991) 323-41.
- [11] Calhoun, J.B., *The Ecology and Sociology of the Norway Rat*, (U.S. Public Health Service Publication No. 1008) U.S. Government Printing Office, Washington, D.C., 1962.
- [12] Clemens, L.G. and Gladue, B.A., Feminine sexual behavior in rats enhanced by prenatal inhibition of androgen aromatization, *Horm Behav*, 11 (1978) 190-201.
- [13] Clemens, L.G., Gladue, B.A. and Coniglio, L.P., Prenatal endogenous androgenic influences on masculine sexual behavior and genital morphology in male and female rats, *Horm Behav*, 10 (1978) 40-53.
- [14] Dohler, K.D., Hancke, J.L., Srivastava, S.S., Hofmann, C., Shryne, J.E. and Gorski, R.A., Participation of estrogens in female sexual differentiation of the brain; neuroanatomical, neuroendocrine and behavioral evidence, *Prog Brain Res*, 61 (1984) 99-117.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- [15] Dohler, K.D., Srivastava, S.S., Shryne, J.E., Jarzab, B., Sipos, A. and Gorski, R.A., Differentiation of the sexually dimorphic nucleus in the preoptic area of the rat brain is inhibited by postnatal treatment with an estrogen antagonist, *Neuroendocrinology*, 38 (1984) 297-301.
- [16] Dominguez-Salazar, E., Portillo, W., Baum, M.J., Bakker, J. and Paredes, R.G., Effect of prenatal androgen receptor antagonist or aromatase inhibitor on sexual behavior, partner preference and neuronal Fos responses to estrous female odors in the rat accessory olfactory system, *Physiol Behav*, 75 (2002) 337-46.
- [17] Erskine, M.S., Solicitation behavior in the estrous female rat: a review, *Horm Behav*, 23 (1989) 473-502.
- [18] Erskine, M.S. and Baum, M.J., Effects of paced coital stimulation on termination of estrus and brain indoleamine levels in female rats, *Pharmacol Biochem Behav*, 17 (1982) 557-61.
- [19] Erskine, M.S., Kornberg, E. and Cherry, J.A., Paced copulation in rats: effects of intromission frequency and duration on luteal activation and estrus length, *Physiol Behav*, 45 (1989) 33-9.
- [20] Gladue, B.A. and Clemens, L.G., Androgenic influences on feminine sexual behavior in male and female rats: defeminization blocked by prenatal antiandrogen treatment, *Endocrinology*, 103 (1978) 1702-9.
- [21] Hines, M., Alsum, P., Roy, M., Gorski, R.A. and Goy, R.W., Estrogenic contributions to sexual differentiation in the female guinea pig: influences of diethylstilbestrol and tamoxifen on neural, behavioral, and ovarian development, *Horm Behav*, 21 (1987) 402-17.
- [22] Krieger, M.S. and Barfield, R.J., Masculine sexual behavior: pacing and ejaculatory patterns in female rats induced by electrical shock, *Physiol Behav*, 16 (1976) 671-5.
- [23] Madlafousek, J. and Hlinak, Z., Sexual behavior of the female laboratory rat: Inventory, patterning, and measurement, *Behaviour*, 63 (1977) 129-174.
- [24] Martinez, I. and Paredes, R.G., Only self-paced mating is rewarding in rats of both sexes, *Horm Behav*, 40 (2001) 510-7.
- [25] McClintock, M.K. and Adler, N.T., The role of the female during copulation in wild and domestic Norway rats (*Rattus norvegicus*), *Behaviour*, 67 (1978) 67-96.
- [26] McClintock, M.K. and Anisko, J.J., Group mating among Norway rat, I. Sex differences in the pattern and neuroendocrine consequences of copulation., *Anim Behav*, 30 (1982) 398-409.
- [27] McClintock, M.K., Anisko, J.J. and Adler, N.T., Group mating among Norway rats. II. The social dynamics of copulation: Competition, cooperation, and mate choice., *Anim Behav*, 30 (1982) 410-425.
- [28] Paredes, R.G. and Alonso, A., Sexual behavior regulated (paced) by the female induces conditioned place preference, *Behav Neurosci*, 111 (1997) 123-8.
- [29] Paredes, R.G. and Martinez, I., Naloxone blocks place preference conditioning after paced mating in female rats, *Behav Neurosci*, 115 (2001) 1363-7.
- [30] Paredes, R.G. and Vazquez, B., What do female rats like about sex? Paced mating, *Behav Brain Res*, 105 (1999) 117-27.
- [31] Peirce, J.T. and Nuttall, R.L., Self-paced sexual behavior in the female rat., *J Comp Physiol Psychol*, 54 (1961) 310-313.
- [32] Telle, H.J., Beitrag zur Kenntnis der Verhaltensweise von Ratten, vergleichend dargestellt bei *Rattus norvegicus* und *Rattus rattus*., *Zeit. Angew. Zoo*, 53 (1966) 129-196.
- [33] Witcher, J.A. and Clemens, L.G., A prenatal source for defeminization of female rats is the maternal ovary, *Horm Behav*, 21 (1987) 36-43.

Table 1. Masculine coital behavior displayed by stimulus males and LQ and MLI obtained from experimental females during paced and non-paced mating.

PACED MATING									
GROUP	ML	IL	EL	NM	NI	NE	III	LQ	LI
CONTROL	58 ± 20	88 ± 22	479 ± 90	8 ± 2	11 ± 1	0.8 ± 0.1	54 ± 8	97 ± 1	1.7 ± 0.05
ATD	21 ± 4	41 ± 13	361 ± 24	11 ± 5	10 ± 1	0.8 ± 0.1	47 ± 7	96 ± 2	1.6 ± 0.06
NON-PACED MATING									
CONTROL	44 ± 14	72 ± 19	362 ± 54	10 ± 1	10 ± 1	0.8 ± 0.1	43 ± 5	99 ± 1	1.7 ± 0.06
ATD	36 ± 8	47 ± 12	340 ± 66	17 ± 8	10 ± 1	0.8 ± 0.1	58 ± 15	99 ± 1	1.7 ± 0.06

Mean ± S.E.M. ANOVA followed by LSD Fisher test. The data represent the average of the three tests of coital behavior. ML: mount latency; IL: intromission latency; EL: ejaculation latency; III: interintromission interval; number of mounts (NM), intromissions (NI) and ejaculations (NE); lordosis quotient (LQ) and lordosis intensity (LI).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Table 2. Return latency after mount (MRL), after intromission (IRL) and after ejaculation (ERL) and percent of exits after mount (%EM), intromission (%EI) or ejaculation (%EE) displayed by the females during paced mating. The data represent the average of the three tests.

PACING BEHAVIOR						
GROUP	MRL	IRL	ERL	%EM	%EI	%EE
CONTROL	18 ± 4	33 ± 7	75 ± 30 *	10 ± 4	20 ± 7	62 ± 13 ††
ATD	28 ± 6	36 ± 4	56 ± 8	24 ± 6	40 ± 8	86 ± 7 †† †

Mean ± S.E.M. ANOVA followed by LSD Fisher test. *, Different from the other return latencies in the same group, $p < 0.01$. ††, Different from %EM and %EI in the same group, $p < 0.01$. †, Different from control group, $p < 0.05$.

FIGURE LEGENDS

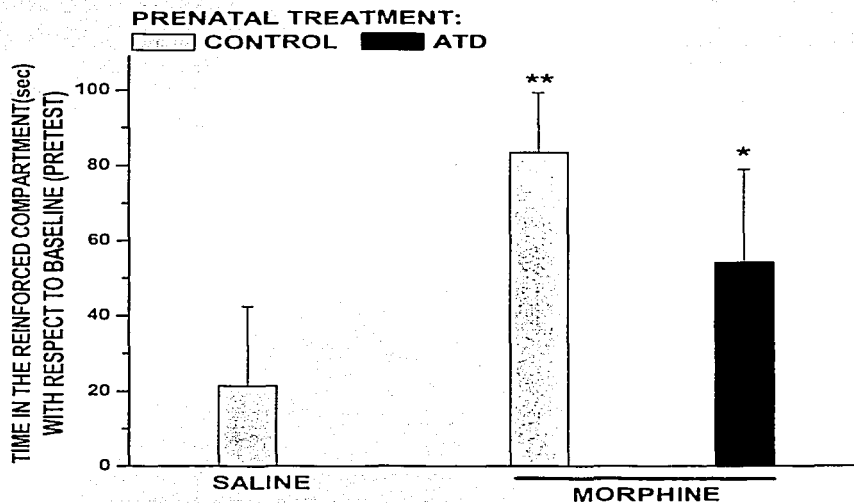


Figure 1. Effect of administration of morphine on CPP. A clear change of preference was observed in groups that received morphine. The time spent in the reinforced compartment increased from pretest condition (baseline) in Control and ATD females injected with morphine. Control females injected with saline did no change their place preference.

Mean \pm S.E.M. The time spent in the reinforced compartment was evaluated by a 2 (test) X 3 (group) ANOVA with repeated measures on the test factor (pretest-test). *, Different from pretest condition (baseline), $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

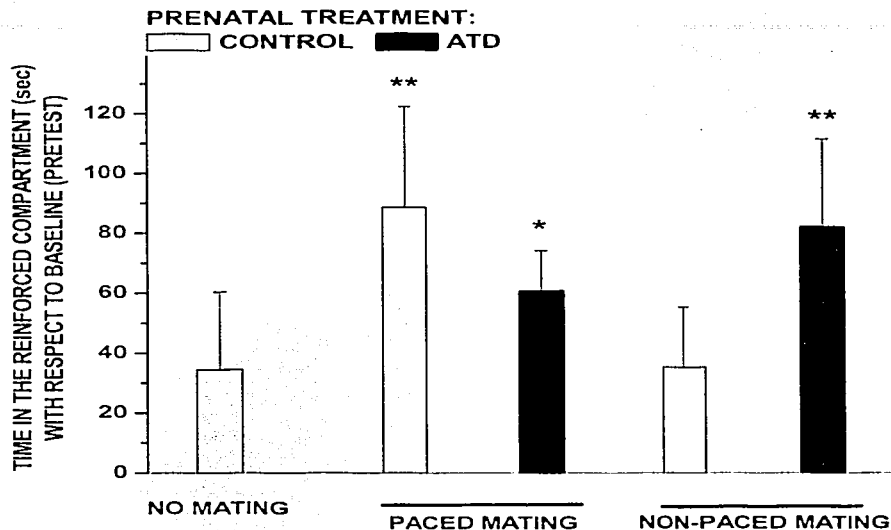


Figure 2. Effect of paced and non-paced mating on CPP. A clear change of preference was observed in control and ATD groups that paced their sexual contacts and in ATD females that did not paced their sexual interaction. The control group without mating and the control females did not paced their sexual contacts did no change their place preference.

Mean \pm S.E.M. The time spent in the reinforced compartment was evaluated by a 2 (test) \times 4 (group) ANOVA with repeated measures on the test factor (pretest-test).

*, Different from pretest condition (baseline) in the same group, $p < 0.01$; **, $p < 0.01$.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

EXPERIMENTO 4.

LA INTERACCIÓN SEXUAL CON MACHOS ESTÍMULO INDUCE CONDICIONAMIENTO DE PREFERENCIA DE LUGAR EN MACHOS.

Emilio Domínguez-Salazar, Francisco J. Camacho
y Raúl G. Paredes.

Introducción

Previamente hemos descrito que la cópula es capaz de inducir condicionamiento de preferencia de lugar siempre y cuando la interacción con el macho estímulo sea controlada o regulada (Paredes). Asimismo hemos descrito a lo largo de esta tesis que la inhibición perinatal de la aromatización induce en los machos una acentuación en la expresión de la conducta de lordosis (Vreeburg, 1977; Bakker y cols, 1993; Davies y cols., 1979) que ha llevado a confirmar la hipótesis de que el estradiol masculiniza y defeminiza el cerebro y por ende la conducta (Gorski, 1963; Tanaka, 1963; Whalen y Nadler, 1963; Kikuyama, 1963; Takasugi, 1963).

Los machos con bloqueo perinatal de la aromatización son clásicamente considerados como machos con un cerebro parcialmente femenino, varios núcleos neuronales sexualmente dimórficos en animales tratados con ATD son del tamaño o tienen características de los núcleos neuronales de las hembras (Vreeburg, 1977; Segovia y Guillamón, 1996). Sin embargo, no existen estudios que demuestren que la conducta de lordosis desplegada por el macho tratado con ATD induzca un estado afectivo positivo o reforzante que indique que la conducta femenina desplegada por esos machos sea preferida a la masculina, o al menos que permita sugerir que la conducta de lordosis mostrado por los machos tratados con ATD es una expresión de la motivación sexual del macho o, en caso contrario, un arco reflejo que es inhibido por la presencia del estradiol.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Con el objetivo de determinar si la conducta de lordosis es sexualmente reforzante en machos perinatalmente tratados con ATD, decidimos evaluar si el estado inducido por la interacción controlada con un macho estímulo era capaz de provocar un condicionamiento de preferencia de lugar. Además, decidimos evaluar el condicionamiento de preferencia de lugar inducido por la cópula regulada en machos prenatalmente tratados con flutamida por un lado como un control de manipulación hormonal pero sobretodo debido a que esos machos habían mostrado de manera consistente menos conducta de lordosis que los machos control, por lo que serían animales que prácticamente no desplegarían conducta de lordosis.

Métodos

Los animales fueron tratados con ATD, flutamida o vehículo como previamente se ha descrito.

En el primer experimento evaluamos si la morfina (1 mg/Kg vía sc) era capaz de inducir condicionamiento de preferencia de lugar en los machos tratados con ATD y flutamida para determinar si el sistema de reforzamiento regulado por péptidos opiodes (responsable de este tipo de condicionamiento) estaba intacto en los animales tratados. Se utilizaron 20 machos control, 10 tratados con flutamida y 10 tratados con ATD.

En el experimento 2 los machos fueron gonadectomizados alrededor de los 4 meses de edad y 3 semanas después inicio el protocolo experimental del condicionamiento de preferencia de lugar (descrito previamente) en los siguientes grupos: 1) Control negativo, los animales fueron colocados en el compartimento preferido y en el no-preferido durante 30 min directamente de su caja-hogar, fueron tratados con benzoato de estradiol y progesterona; 2) Machos control; 3) Machos tratados prenatalmente con flutamida y 4) Machos tratados perinatalmente con ATD. Los tres últimos grupos fueron colocados en el compartimento preferido durante 30 min directamente de su caja-hogar y en el compartimento no-preferido o reforzado durante 30 min después de interactuar sexualmente con un macho estímulo. Esta interacción sexual consistió en colocar al macho experimental, previamente tratado con estradiol y progesterona, en una caja de cópula regulada, donde el sujeto experimental podía cruzar una abertura para llegar a donde el macho estímulo, más grande, estaba confinado. La prueba terminó cuando el macho era montado en 15 ocasiones o cuando transcurrían 20 min. Se registró la latencia de entrada al compartimento del macho

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

estímulo, la latencia y el número de montas, el número de salidas, el porcentaje de salidas después de las montas, las latencias de regreso después de recibir una monta, el tiempo de duración de la prueba, el intervalo intercopulatorio (duración de la prueba dividido entre número de montas) el porcentaje de tiempo que permaneció con el macho, la intensidad de lordosis y el coeficiente de lordosis.

A los parámetros obtenidos durante la cópula se les realizó un ANDEVA y si resultaba significativo se realizó la prueba de diferencia mínima significativa de Fisher para determinar los grupos que eran diferentes al control. Los datos de preferencia de lugar fueron analizados de la misma manera que en los dos experimentos anteriores.

Resultados

Experimento 1:

En la figura 1 se observa el claro cambio de preferencia de lugar en todos los machos tratados con morfina, mientras que en el grupo de machos control tratados con solución salina no modifica su preferencia de lugar. (ANDEVA para el índice de preferencia: Grupo $F_{(3,34)}= 2.9$, $p= 0.048$; Sesión $F_{(1,34)}=70.5$, $p< 0.0001$; Grupo X Sesión $F_{(3,34)}=7$, $p= 0.001$. ANDEVA para tiempo en compartimento reforzado: Grupo $F_{(3,34)}= 3$, $p= 0.42$; Sesión $F_{(1,34)}= 66$, $p< 0.0001$; Grupo X Sesión $F_{(3,34)}= 7$, $p= 0.0001$).

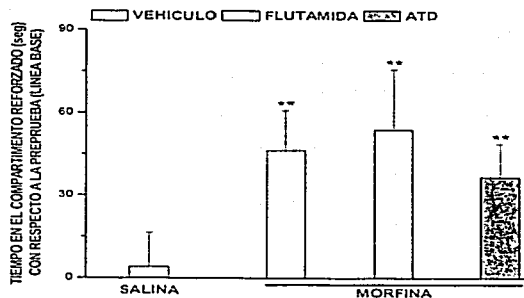


Figura 1. Aumento del tiempo en compartimento reforzado con morfina con respecto a la preferencia inicial (línea base, $y = 0$). Los machos inyectados con morfina cambiaron su preferencia de lugar mientras que los inyectados con solución salina conservaron su preferencia. Promedio \pm Error estándar. ANDEVA de medidas repetidas en el factor preprueba/prueba seguido del análisis de efectos principales simples. **, Diferente con respecto a la línea base (preprueba), $p< 0.01$.

Experimento 2:

La tabla 1 muestra los resultados obtenidos en las pruebas conductuales de cópula regulada. El ANDEVA mostró que no existían diferencias significativas en la latencia de monta (LM, $F_{(2,29)}=1.2$, $p=0.32$), en la duración de la prueba (TS, $F_{(2,29)}=1.4$, $p=0.26$), en el intervalo intercopulatorio (III, $F_{(2,29)}=0.4$, $p=0.68$), en el número de montas (NM, $F_{(2,29)}=1.2$, $p=0.32$), en el porcentaje de salidas (%SDM, $F_{(2,29)}=1.7$, $p=0.2$), en la latencia de regreso (LRM, $F_{(2,29)}=1.5$, $p=0.25$) ni en el porcentaje de tiempo con el macho (%TCM, $F_{(2,29)}=1.8$, $p=0.19$). El ANDEVA reveló diferencias significativas en la latencia de entrada (LE, $F_{(2,29)}=4.6$, $p=0.019$), en el coeficiente de lordosis (CL, $F_{(2,29)}=28$, $p<0.0001$) y en la intensidad de lordosis (IL, $F_{(2,29)}=21$, $p<0.0001$). El análisis *post hoc* muestra que los machos tratados con flutamida tardaron más tiempo en ingresar al compartimiento del macho estímulo y que los machos de ATD muestran significativamente mayor conducta de lordosis que los otros grupos.

En cuanto a la preferencia de lugar el ANDEVA reveló diferencias significativas tanto para el índice de preferencia (Grupo $F_{(3,36)}=2.9$, $p=0.048$; Sesión $F_{(1,36)}=70.5$, $p<0.0001$; Grupo X Sesión $F_{(3,36)}=7$, $p=0.001$) como para tiempo en compartimento reforzado (Grupo $F_{(3,36)}=3$, $p=0.42$; Sesión $F_{(1,36)}=66$, $p<0.0001$; Grupo X Sesión $F_{(3,36)}=7$, $p=0.0001$). El análisis de efectos principales simple mostró que las diferencias entre la preprueba y la prueba para ambos parámetros se encontraba en todos los machos que fueron montados por los estímulos, mientras que en los machos control tratados con benzoato de estradiol y progesterona que no fueron introducidos con el estímulo su preferencia de lugar no cambió (Fig. 2).

GRUPO	LEnt	LM	NM	%SDM	LRM	LS	III	%TCM	CL	IL
CONTROL	52 ± 17	190 ± 41	10 ± 1	5 ± 2	87 ± 48	1031 ± 43	166 ± 53	89 ± 5	26 ± 9	0.36 ± 0.13
FLUTAMIDA	122 ± 30 *	230 ± 45	8 ± 1	14 ± 6	137 ± 48	1091 ± 33	251 ± 58	76 ± 5	11 ± 4	0.12 ± 0.05
ATD	44 ± 8	140 ± 40	11 ± 2	21 ± 9	56 ± 18	916 ± 112	211 ± 86	79 ± 5	81 ± 7 **	1.17 ± 0.14 **

Tabla 1. Conducta coital masculina desplegada por los machos estímulo y conducta coital femenina y de cópula regulada mostrada por los machos experimentales. LEEnt: Latencia de entrada; LM: latencia de monta; %SDM: Porcentaje de salidas después de ser montados; LRM: Latencia de regreso al compartimento del macho estímulo después de salir cuando recibió una monta; LS: Latencia de salida (duración de la prueba); III: Intervalo intercopulatorio; %TCM: Porcentaje de tiempo que permaneció con el macho estímulo; CL: Coeficiente de Lordosis; IL: Intensidad de lordosis. Las latencias y el III se expresan en segundos. Promedio ± error estándar de las tres pruebas de cópula regulada. ANDEVA seguida de la prueba de diferencias mínimas significativas de Fisher. *, Diferente al grupo control, $p<0.05$; **, $p<0.01$.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

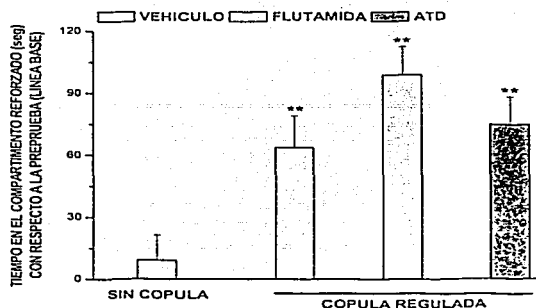


Figura 2. Aumento del tiempo en compartimiento reforzado con cópula regulada con respecto a la preferencia inicial (línea base, $y = 0$). Todos los machos que interactuaron sexualmente con el macho estímulo cambiaron su preferencia de lugar mientras que los controles inyectados únicamente con benzoato de estradiol y progesterona y no copularon conservaron su preferencia de lugar. Promedio \pm Error estándar. ANDEVA de medidas repetidas en el factor preprueba/prueba seguido del análisis de efectos principales simples. **, Diferente con respecto a la línea base (preprueba), $p < 0.01$.

Discusión

Las pruebas de conducta coital mostraron que los machos tratados perinatalmente con ATD presentan una conducta de lordosis elevada confirmando observaciones previas (Vreeburg, 1977; Bakker y cols, 1993; Davies y cols., 1979) y demostrando que el tratamiento con ATD fue efectivo. La respuesta de lordosis fue la única conducta típicamente femenina que desplegaron los machos tratados con ATD ya que no estuvieron un mayor tiempo con el macho y tampoco la latencia de regreso fue menor o el porcentaje de salidas mayor que los mostrados por los machos de los otros dos grupos, es decir, ningún grupo reguló su interacción con el macho. La cópula regulada es una conducta proceptiva que las hembras despliegan de manera constante cuando se les da la oportunidad de hacerlo (Erskine), debido a que los machos tratados con ATD no regularon la cópula, es posible que la conducta de lordosis que despliegan estos machos no sea una debido a una feminización (o no defeminización) de la

motivación sexual, sino más bien una desinhibición o no inhibición del mecanismo reflejo de lordosis.

Un resultado interesante fue el hecho de que los animales tratados con flutamida mostraron una latencia de entrada mayor que los otros dos grupos y la persistencia de valores bajos en los otros parámetros, lo que confirma que la ausencia de estimulación sobre los receptores a andrógenos no confiere características conductuales femeninas a pesar de presentar un fenotipo de hembra.

Con respecto a los resultados de preferencia de lugar hay que recordar que el objetivo principal de este trabajo era demostrar que el contacto sexual regulado con un macho estímulo inducía un estado efectivo positivo (reforzante) en los machos tratados perinatalmente con ATD. Esto mostraría que la respuesta de lordosis desplegada por estos machos no era solo un reflejo, sino una conducta que indicara la existencia de mecanismos motivacionales para desplegar conductas femeninas. Fue una sorpresa que en todos los machos se indujera un estado afectivo positivo por su interacción con el macho estímulo y no debido a la presencia de lordosis, ya que los machos control y los tratados con flutamida mostraron significativamente menos conducta de lordosis. Los resultados indican que la cópula regulada con un macho estímulo induce un estado afectivo positivo en el macho, independientemente del tratamiento hormonal perinatal. Sin embargo pudieran existir explicaciones alternativas. La primera explicación que surgió fue que el tratamiento hormonal era el responsable del efecto, ya que existen trabajos que demuestran que los hormonas esteroides inducen estados reforzantes (Edwards y cols, 1999a, 1999b), pero los machos que no copularon y fueron sometidos al mismo tratamiento hormonal no cambiaron su preferencia de lugar, mostrando que el estradiol y la progesterona no inducen por sí mismos un estado afectivo positivo. Otra posible explicación es que el estado reforzante inducido en los machos podría deberse a que la interacción social o los olores emitidos por un sujeto, pero no contamos con argumentos para sostener dichas hipótesis, será necesario probar ambas utilizando el olor de machos estímulo o a machos "estímulo" castrados como evento reforzante para, al menos, eliminar esas posibilidades. Consideramos, empero, que estos resultados abren una línea de investigación novedosa e interesante.

EXPERIMENTO 5

EFFECT OF PRENATAL RECEPTOR ANTAGONIST OR AROMATASE INHIBITOR ON SEXUAL BEHAVIOR, PARTNER PREFERENCE AND FOS RESPONSE TO ESTROUS FEMALE ODORS IN THE RAT ACCESSORY OLFACTORY SYSTEM

**Emilio Domínguez-Salazar, Wendy Portillo,
Michael J. Baum, Julie Bakker and Raúl G. Paredes.**

(Publicado en Physiology and Behavior)

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Effect of prenatal androgen receptor antagonist or aromatase inhibitor on sexual behavior, partner preference and neuronal Fos responses to estrous female odors in the rat accessory olfactory system

Emilio Domínguez-Salazar^a, Wendy Portillo^a, Michael J. Baum^b, Julie Bakker^b,
Raúl G. Paredes^{a,*}

^aCentro de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro, Qro. 76230, Mexico

^bDepartment of Biology, Boston University, Boston, MA 02215, USA

Received 4 October 2001; received in revised form 15 October 2001; accepted 8 November 2001

Abstract

Many socially relevant odors are detected in rodent species by the vomeronasal organ and subsequently processed by the accessory olfactory system (AOS). We previously found that gonadectomized male and female rats treated in adulthood with testosterone propionate (TP) showed equivalent Fos responses in the AOS to odors derived from estrous females. Likewise, in contrast with numerous other mammalian species, gonadectomized female rats show surprisingly high levels of male-typical mounting behavior in response to adult TP. We tested the hypothesis that prenatal testosterone (T) exposure, acting via androgen receptors (ARs) or via estrogen receptors, masculinizes the AOS in rats of both sexes. Pregnant dams were treated with either the AR blocker, Flutamide or the aromatase inhibitor, 1,4,6-androstatriene-3,17-dione (ATD), or nothing (control) to assess the role of prenatal androgen and estradiol receptor activation, respectively, in this masculinization. Beginning at birth, male and female offspring were injected subcutaneously (sc) every other day with either ATD (pre- and neonatal ATD group) or oil vehicle (Flutamide and control groups) until postnatal Day 12. Subjects were gonadectomized as adults, hormonally treated and tested for different behaviors before having their AOS Fos responses to estrous female odors assessed. Prenatal treatment with Flutamide (but not ATD) significantly decreased anogenital distance and severely impaired intromissive and ejaculatory behaviors in males tested after TP replacement without disrupting mounting capacity in either sex. Pre- and neonatal treatment with ATD (but not Flutamide) enhanced lordosis responsiveness in males tested after sc injections of estradiol and progesterone, whereas these perinatal treatments had no effect on any aspect of masculine coital performance in either sex. After TP treatment, male and female control subjects preferred to approach a tethered stimulus female as opposed to a male, and prenatal Flutamide or perinatal ATD treatments did not modify this pattern of partner preference. Neuronal Fos responses to estrous odors were (as in previous studies) identical in the AOS of gonadectomized TP-treated control males and females. Prenatal Flutamide or perinatal ATD treatments failed to disrupt consistently this profile of Fos responses to estrous odors in the AOS of rats of either sex. These behavioral and neuroanatomical findings raise the possibility that the similar level of male-typical responsiveness to social odors that occurs in male and female rats after adult TP treatment results from nonsteroid-hormone-dependent, species-specific factors that act perinatally in the brains of rats of both sexes. © 2002 Elsevier Science Inc. All rights reserved.

Keywords: Accessory olfactory system (AOS); 1,4,6-Androstatriene-3,17-dione (ATD); Flutamide; Partner preference; Estrous odors; Fos responses

1. Introduction

In many vertebrate species, olfactory communication is important for a variety of social functions, including the

attraction of conspecifics prior to mating, delineation of territories and communication between mother and young. Numerous studies have shown that olfactory cues contribute to sexual partner preference in mice [1,2], rats [3–6], hamsters [7], voles [8,9] and ferrets [10]. When tested in a T-maze, adult male rats preferred to investigate the arm containing odors from an estrous as opposed to an anestrus female [3]. Likewise, when given free access to soiled bedding from sexually active males and estrous females,

* Corresponding author. Centro de Neurobiología, Apartado Postal 1-1141, Querétaro, Qro. 76001, México. Tel.: +52-55-5623-4060; fax: +52-442-234-0344.

E-mail address: rparedes@servidor.unam.mx (R.G. Paredes).

male rats preferred to investigate bedding soiled by estrous females. Female rats, on the other hand, showed a small preference for soiled bedding from sexually active males as opposed to estrous females [6].

Many, though not all, socially relevant olfactory cues are detected and processed in rodent species by a polysynaptic accessory olfactory system (AOS) [11,12]. Nonvolatile socially relevant odors are detected by receptors in the vomeronasal organ whose axons project to the glomeruli of the accessory olfactory bulb (AOB) [11]. Mitral cells in the AOB project to the anterior–dorsal medial amygdala (MeAD) and the posterior–dorsal medial amygdala (MePD). Neurons of the MeAD project via the ventral amygdalofugal pathway to the hypothalamic ventromedial nucleus and the lateral preoptic area (POA) whereas neurons in the MePD project via the stria terminalis to the bed nucleus of the stria terminalis (BNST) and the medial POA [13–15]. In rats, the AOS is sexually dimorphic with males having more neurons in several of the above mentioned brain regions, except the lateral POA (reviewed in Ref. [16]).

Immunocytochemical visualization of the nuclear protein product of the immediate-early gene, *c-fos*, has provided useful information about the neural pathways, which are activated in response to mating-associated behaviors (e.g. Ref. [17]). Numerous studies have also assessed the ability of chemosensory cues to augment neuronal Fos immunoreactivity in the AOS of mice [18–20], rats [21–23] and hamsters [24,25]. In hamsters, but not in rats, estrous female odors differentially activated neurons in the AOS of males and females. Thus, exposure to female hamster vaginal secretions (FHV'S) induced Fos-IR in the MePD, BNST and the magnocellular medial preoptic nucleus in gonadectomized, testosterone-treated male hamsters. Ovariectomized female hamsters treated with testosterone showed significant increases in Fos-IR nuclei in the MePD, BNST, but not in the medial preoptic nucleus, after FHV'S exposure [25]. By contrast, estrous female odors augmented Fos-IR equivalently throughout the AOS, including the MPOA, of both male and female rats that were gonadectomized in adulthood and treated with testosterone propionate (TP) [22,23]. These species differences may reflect differences in circulating testosterone during development. Female rat fetuses are exposed to considerable amounts of testosterone of placental origin [26,27], which may promote aspects of male-typical neural differentiation. We use the term 'male-typical' here to refer to neural mechanisms controlling behaviors such as mounting and pelvic thrusting, which are displayed by males of essentially all mammalian species. Females of many mammalian species show less of these male-typical coital behaviors than male conspecifics; however, female rats, when they are ovariectomized and treated with TP in adulthood, show levels of mounting that are surprisingly comparable to those shown by males [28–31]. By contrast, female hamsters are not exposed prenatally to male-like levels of testosterone [32], and in adulthood they have a limited capacity to display male-typical coital behav-

iors [25,33]. Likewise, the content of whole body androgen between embryonic (E) day 26 and birth (E 41) is significantly lower in female than in male ferrets, and when ovariectomized and treated in adulthood with TP female ferrets show very little male-typical mating behavior [34]. Taken together, these examples raise the possibility that the capacity of females of particular species (e.g. the rat) to show male-typical sexual behaviors in adulthood reflects their prenatal exposure to high levels of testosterone or to neural estrogenic metabolites of this androgen.

In the present study, we asked whether prenatal blockade of androgen receptor (AR) activation in either male or female rats using Flutamide would attenuate later neuronal Fos responses in the AOS to estrous odors. We recently found [21] that Fos responses in the AOS to odors derived from sexually active males are sexually differentiated and that neonatal administration of the aromatase inhibitor 1,4,6-androstatriene-3,17-dione (ATD) to male rats made their later Fos responses to male odors more female-like. Therefore, in the present study we also asked whether the pattern of AOS Fos responses to female odors (normally seen in both sexes when treated with TP) depends on perinatal aromatization of testosterone (T). To answer this second question we gave ATD prenatally and neonatally to groups of male and female rats. As adults, subjects were gonadectomized and received a battery of behavioral tests. We assessed female-typical lordotic responsiveness after treatment with estradiol benzoate plus progesterone. All subjects then received TP followed by tests of masculine coital behavior and of preference to approach and interact with a sexually receptive female versus a sexually active male in a three compartment apparatus. Finally, while they continued to receive TP, we assessed neuronal Fos responses to estrous odors in the AOS of all subjects.

2. Materials and methods

2.1. Animals and treatments

Male and female Sprague–Dawley rats obtained from the breeding colony at the Centro de Neurobiología (CNB, Universidad Nacional Autónoma de México [UNAM], Querétaro, México) were housed in single-sex groups of two to three animals. Food and water were available ad libitum. Rats were maintained in a room with a reversed light–dark cycle (12 h light/12 h dark; lights off at 08:00 h).

The same protocol as described by Brand et al. [35] was used with a few modifications. Female rats were time-mated. At Day 12 of gestation, pregnant dams received under light ether anesthesia a subcutaneous (sc) implant of a silastic capsule (inner diameter 1.5 mm; outer diameter 2.1 mm; length: 5 cm) containing either ATD or nothing. An additional group of pregnant dams was injected twice daily (10 a.m. and 8 p.m.) with Flutamide (10 mg/kg,

dissolved in propylene glycol with 10% ethanol) from Day 12 of gestation until pups were born. Data from our laboratory indicate that no behavioral differences are present between the offspring of mothers implanted with an empty capsule and mothers injected with propylene glycol. Male and female offspring from ATD-treated mothers continued to receive ATD by injection (1 mg/rat; every other day with corn oil as the vehicle) until Day 12 after birth. Male and female offspring of Flutamide-treated and control mothers were injected every other day with vehicle until Day 12 after birth. Pups were weaned at 25 days of age and housed two to three of the same treatment and sex to a cage. At approximately 3 months of age, all subjects were gonadectomized under sterile conditions using ketamine (70 mg/kg) and xylazine (6 mg/kg).

Stimulus animals were sexually active males and estrous females. Male stimulus animals were gonadally intact and sexually experienced. Female stimulus animals were brought into behavioral estrus by injecting them with 25 µg of estradiol benzoate (EB) sc 48 h before testing and by an injection of 1 mg/kg progesterone (P) 4 h before mating tests or 6 h before the collection of bedding that was used to evaluate neuronal Fos responses.

2.2. Test procedure

Subjects treated with EB and P were tested twice for feminine sexual behavior with a sexually active male. Two weeks later, all subjects, males and females, received daily injections of TP. After 2 weeks of treatment, subjects were tested twice for masculine sexual behavior with an estrous female and twice for partner preference.

2.3. Behavioral testing

2.3.1. Female coital behavior

Subjects were tested for lordosis behavior using EB (25 µg, 52 h prior to testing) and P (1 mg/kg, 4 h before testing) as the activational steroid hormone. Each subject was tested twice for lordosis behavior on separate days; data from these 2 tests were combined. The lordosis responses and lordosis intensity (on a scale of 0-2; 0 = no lordosis, 1 = partial lordosis characterized by lateral tail deviation with moderate concave back flexion and neck extension, 2 = full lordosis characterized by lateral tail deviation with pronounced back flexion and neck extension) of experimental animals to the mounting of a stimulus male were scored. Tests lasted until the experimental animal had received 10 mounts (with or without intromission) by the stimulus male. Stimulus males that stopped mounting were replaced by other, active males. Usually subjects received 10 mounts or intromissions within 10 min. The lordosis quotient, LQ [(total number of lordosis responses/total number of mounts) × 100] and the mean lordosis intensity, LI (sum of points per test/number of mounts) were calculated.

2.3.2. Male coital behavior

Subjects were injected daily with TP (5 mg/kg) and beginning 14 days later were tested for masculine sexual behaviors with a behaviorally receptive female. The following sexual behaviors were scored: latency to the first mount and intromission, the number of mounts, intromissions and ejaculations, ejaculation latency and postejaculatory interval. In female subjects, which lack a penis, the terms intromission and ejaculation refer to behavioral patterns displayed that resemble those behaviors shown by males when they actually achieve penile intromission and/or ejaculate. Subjects were observed twice during 30-min tests that were separated by at least 2 days. Data from these two tests were combined.

2.3.3. Partner preference

While they continued to receive TP, subjects were tested twice for partner preference in a three-compartment box made of wood. The middle compartment (21 × 27 × 32 cm) was connected with the lateral compartments (36 × 27 × 32 cm) via a sliding door (10 × 10 cm). The lateral compartments contained in one side a sexually active male and in the other side an estrous female as stimulus animals. The stimulus animals were tethered to the rear of the compartment using a harness attached to a flexible rope. In this way, the tethered stimulus animals were able to display coital behaviors while being restricted to their respective compartments. During testing subjects were placed in the middle compartment, the sliding doors were removed after 1 min, and the time spent in each of the lateral compartments was recorded during a 10-min test. Data for the two tests were combined.

2.4. Neuronal Fos responses to estrous female odors

One day after the last behavioral test and injection of TP, male and female subjects that had received various perinatal treatments were randomly selected to be placed alone in a plastic cage (25 × 50 × 15 cm) that contained either clean or soiled estrous female bedding. The estrous bedding was collected from groups of five EB-treated stimulus females 6 h after they had received an injection of progesterone. Soiled bedding was used within 4 h after collection. These stimulus females had not been mated or used in behavioral tests for at least a week. Fresh sawdust was used as control bedding. After exposure to bedding for 90 min, subjects were anesthetized with sodium pentobarbital (100 mg/kg). The heart was exposed and the subject was perfused through the ascending aorta with 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.2) for 1 min followed by 4% paraformaldehyde in 0.1 M PBS (pH 7.4) for 6 min. The brains were removed and postfixed in 4% paraformaldehyde for 2 h before they were placed in 30% sucrose/PBS solution for cryoprotection. Brains were frozen on dry ice and cut in the coronal plane at 35 µm using a sledge microtome. Free-floating sections were pretreated with 1% hydrogen peroxide/PBS solution for

Table 2
Effect of Flutamide or ATD treatment on masculine and feminine coital behaviors in gonadectomized, TP-treated female and male rats

	n	Masculine sex behavior			Feminine sex behavior	
		Mount	Intromission	Ejaculation	LQ	LI
Females						
Control	11	15 ± 4	2 ± 1*	0 ± 0*	79 ± 8 [†]	1.5 ± 0.2 [†]
Flutamide	11	16 ± 3	1 ± 1*	0 ± 0*	88 ± 4 [†]	1.7 ± 0.1 [†]
ATD	11	15 ± 3	2 ± 1*	0 ± 0*	76 ± 7 [†]	1.4 ± 0.2 [†]
Males						
Control	11	28 ± 6	8 ± 2	1.2 ± 0.3	15 ± 9	0.3 ± 0.2
Flutamide	11	21 ± 4	1 ± 0.5*	0.1 ± 0.1*	11 ± 4	0.2 ± 0.1
ATD	11	33 ± 5	12 ± 2	1 ± 0.2	67 ± 9 [†]	1.2 ± 0.2 [†]

Data are expressed as mean number ± SE.

LQ, lordosis quotient, LI, lordosis intensity.

* Significantly different from control and ATD-treated males; $P < .05$.

[†] Significantly different from control and Flutamide-treated males; $P < .05$.

2.5. Statistics

Data from anogenital distance, feminine and masculine sexual behavior were evaluated by a 3 (group) × 2 (sex) ANOVA. A 3 (group) × 3 (compartment)-factor ANOVA for each sex was used to evaluate partner preference. Fos data were evaluated using a 3 (group) × 2 (bedding) factor

ANOVA for each sex. All ANOVAs were followed by post hoc comparisons using the Fisher procedure.

3. Results

3.1. Anogenital distance

Prenatal treatment with Flutamide significantly decreased anogenital distance in male rats compared to control and pre- and neonatally ATD-treated subjects (Table 1). There were significant differences in anogenital distance, body weight and in the anogenital distance/body weight ratio between males and females within the same group. The only exception was that there were no significant differences in body weight between males and females treated with Flutamide.

The ANOVAs revealed a significant effect in anogenital distance [group $F(2,60) = 25.11$, $P < .0001$; sex $F(1,60) = 236.62$, $P < .0001$; Group × Sex $F(2,60) = 21.37$, $P < .0001$], body weight [group $F(2,60) = 0.09$, $P = ns$; sex $F(1,60) = 10.53$, $P = .001$; Group × Sex $F(2,60) = 1.08$, $P = ns$] and in the anogenital distance/body weight ratio [group $F(2,60) = 50.55$, $P < .0001$; sex $F(1,60) = 335.63$, $P < .0001$; Group × Sex $F(2,60) = 23.68$, $P < .0001$].

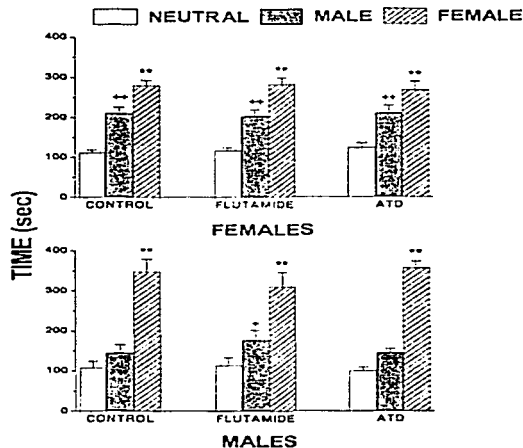


Fig. 2. Time spent in the compartment containing the estrous female versus the compartment containing the sexually active male versus the neutral compartment by prenatally Flutamide or perinatally ATD-treated males and females. Animals were gonadectomized in adulthood and received daily injections with TP. Data are expressed as mean ± S.E.M. ** Significantly different from time spent in the neutral compartment and from the time spent in the compartment containing the sexually active stimulus male, $P < .01$. + Significantly different from time spent in the neutral compartment, $P < .05$; ++ $P < .01$.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

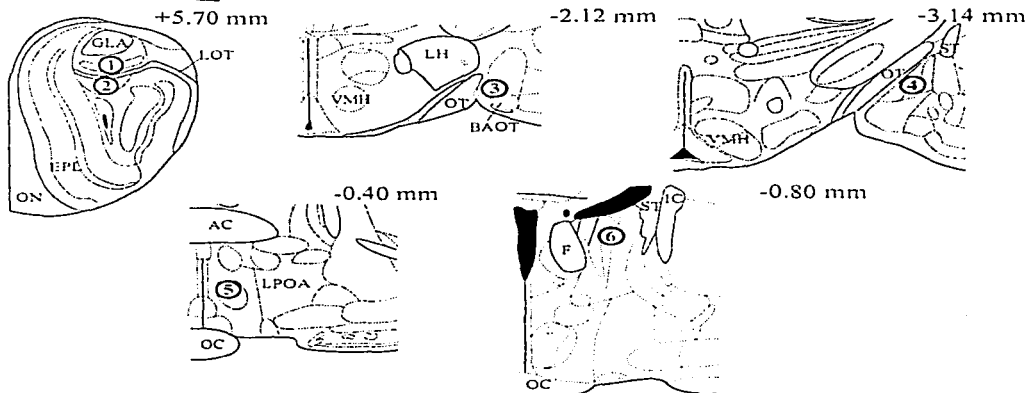


Fig. 1. Schematic diagrams showing the location of brain regions (dark circles containing numbers) in which Fos-IR cells were mapped and counted. 1, Mitral cell layer of the accessory olfactory bulb (AOB); 2, granular cell layer of the AOB; 3, anterior-dorsal medial amygdala (MeAD); 4, posterior-dorsal medial amygdala (MePD); 5, medial preoptic area (MPOA); 6, bed nucleus of the stria terminalis (BNST). GLA, glomerular layer of the AOB; LOT, lateral olfactory tract; EPL, external plexiform layer of the MOB; ON, olfactory nerve layer; AC, anterior commissure; LPOA, lateral preoptic area; OC, optic chiasm; IC, internal capsule; ST, stria terminalis; F, fornix; VMH, ventromedial nucleus of the hypothalamus; OT, optic tract; LH, lateral hypothalamus; BAOT, bed nucleus of the accessory olfactory tract. The distance (in millimeters) of each coronal brain section from bregma is given. Adapted from Ref. [23].

30 min. They were then rinsed with PBS and incubated overnight at room temperature in primary Fos antiserum diluted 1:5000 in PBS/0.52% Triton X-100 (DC11-1, a polyclonal antiserum raised in rabbit against the N-terminal sequence of rat Fos amino acids 2-17 (provided by Drs. Gerard Evans and David Hancock)). Brain sections were subsequently washed four times in PBS and incubated for 2 h at room temperature with biotinylated goat anti-rabbit IgG (Vector Laboratories, Burlington, CA: 1:200 in 0.1 M PBS/0.52% Triton X-100). Sections were then rinsed four times in PBS and incubated in ABC solution (Elite kit; Vector Laboratories) for 1.5 h at room temperature. Sections were rinsed four times in PBS and reacted with nickel chloride-3,3'-diaminobenzidine and 0.0003% hydrogen peroxide for 5-10 min (DAI kit, Vector Laboratories). The sections

were rinsed three times, mounted onto gelatin-coated slides and cover slipped using Permount.

To quantify the numbers of Fos-immunoreactive (IR) nuclei, all slides were coded so that the investigator had no knowledge of sex and treatment of the subjects. For each subject, one hemisphere from one brain section was chosen for analysis. Brain sections were selected at the level of the AOB (mitral and granule cell layers), the MeAD, MePD, BNST and medial POA (Fig. 1). Fos-IR nuclei were counted in an area of 0.22 mm² using an image-analysis system (Image-pro, Media Cybernetics, Silver Springs, MD) with a Hitachi digital color camera attached to an Olympus BX60 microscope.

Anogenital distances were measured when animals were anesthetized before brain perfusion.

Table 1
Effect of Flutamide or ATD treatment on anogenital distance in female and male rats

Group	n	Anogenital distance (cm)		Body weight (g)		(AG BW) × 100	
		Females	Males	Females	Males	Females	Males
Control	11	1.77 ± 0.07	3.77 ± 0.16 [†]	282 ± 13	343 ± 18 [†]	0.63 ± 0.02	1.11 ± 0.03 [†]
Flutamide	11	1.72 ± 0.09	2.34 ± 0.13 ^{**†}	304 ± 25	322 ± 24	0.57 ± 0.01	0.74 ± 0.03 ^{**†}
ATD	11	1.78 ± 0.08	3.86 ± 0.18 [†]	284 ± 18	356 ± 24 [†]	0.64 ± 0.02	1.10 ± 0.03 [†]

Data are expressed as mean ± SE.

** Significantly different from control and ATD males; *P* < .01.

[†] Significantly different from females within the same treatment group; *P* < .05.

3.2. Feminine coital behavior

Pre- and neonatal treatment with ATD attenuated the defeminization of lordotic responsiveness to ovarian hormones that otherwise occurred in control males. Thus, perinatally ATD-treated males had lordosis quotients that were similar to those seen in all groups of females (Table 2) [group $F(2,60)=6.39$, $P=.0032$; sex $F(1,60)=65.59$, $P<.0001$; Group \times Sex $F(2,60)=11.07$, $P<.0001$]. Furthermore, lordosis intensities were significantly greater in perinatally ATD-treated males compared to control and perinatally Flutamide-treated males [group $F(2,60)=3.99$, $P=.023$; sex $F(1,60)=58.19$, $P<.0001$; Group \times Sex $F(2,60)=7.89$, $P=.0009$]. Lordosis quotients and intensities were similar among groups of females (Table 2).

3.3. Masculine sexual behavior

Prenatal treatment with Flutamide severely impaired later intromissive and ejaculatory behaviors in males, but not in females (Table 2). By contrast, mounting behavior was not affected by prenatal Flutamide treatment in either sex. Intromission and ejaculation frequencies were significantly higher in control and perinatally ATD-treated males compared to perinatally Flutamide-treated males and all female groups [intromissions: group $F(2,37)=4.66$, $P=.015$; sex $F(1,37)=16.27$, $P=.0003$; Group \times Sex $F(2,37)=5.73$, $P=.0068$; ejaculations: group $F(2,37)=3.21$, $P=.051$; sex $F(1,37)=16.00$, $P=.0003$; Group \times Sex $F(2,37)=3.21$, $P=.051$].

$P=.051$]. There was only an effect of sex on mounting behavior, with males displaying more mounts than females [group $F(2,60)=0.33$, $P=.702$; sex $F(1,60)=5.19$, $P=.026$; Group \times Sex $F(2,60)=0.47$, $P=.62$].

3.4. Partner preference

When given TP in adulthood, all subjects showed a clear preference for an estrous female as opposed to a sexually active male (Fig. 2). There was a significant difference between time spent in the compartment containing the female versus time spent in the compartment containing the sexually active male or the neutral compartment [females: group $F(2,90)=0.00$, $P=1$; compartment $F(2,90)=84.3$, $P=.0001$; Group \times Compartment $F(4,90)=0.24$, $P=.91$; males: group $F(2,90)=0.00$, $P=1$; compartment $F(2,90)=91.15$, $P=.0001$; Group \times Compartment $F(4,90)=1.01$, $P=.40$]. Post hoc comparisons showed that female subjects and perinatally Flutamide-treated males spent significantly more time in the compartment containing the sexually active male than in the neutral compartment.

3.5. Neuronal Fos immunoreactivity to estrous female bedding

After exposure to soiled estrous female bedding, significant increments in the number of Fos-IR neurons were seen in various segments of the AOS of males and females

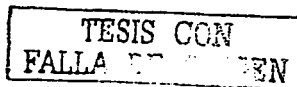
Table 3
Mean (\pm SE) number of Fos-IR cells in different brain regions included in the AOS of female and male subjects treated perinatally with either Flutamide or ATD

	AOB		Medial amygdala		BNST	POA
	Mitral	Granular	Anterior	Posterior		
Females						
Control						
Clean	12 \pm 3 (6)	1 \pm 0 (6)	9 \pm 6 (6)	5 \pm 2 (6)	6 \pm 2 (6)	6 \pm 1 (6)
Estrous	18 \pm 3 (5)	42 \pm 8 (5)**	6 \pm 2 (5)	14 \pm 4 (5)*	8 \pm 2 (5)	18 \pm 3 (5)*
Flutamide						
Clean	12 \pm 8 (5)	7 \pm 3 (5)	4 \pm 1 (5)	3 \pm 2 (5)	2 \pm 1 (5)	9 \pm 3 (5)
Estrous	16 \pm 5 (6)	13 \pm 3 (6)	7 \pm 3 (6)	8 \pm 3 (5)	2 \pm 1 (5)	20 \pm 6 (6)*
ATD						
Clean	14 \pm 11 (5)	3 \pm 1 (5)	4 \pm 2 (5)	3 \pm 1 (4)	2 \pm 1 (5)	2 \pm 1 (5)
Estrous	31 \pm 13 (6)	44 \pm 13 (6)**	6 \pm 4 (5)	13 \pm 3 (5)*	2 \pm 1 (6)	33 \pm 8 (6)**
Males						
Control						
Clean	18 \pm 6 (6)	3 \pm 2 (6)	5 \pm 1 (6)	1 \pm 1 (6)	5 \pm 2 (5)	6 \pm 1 (6)
Estrous	20 \pm 3 (5)	30 \pm 5 (5)**	8 \pm 3 (5)	13 \pm 3 (5)**	9 \pm 2 (5)	20 \pm 4 (4)**
Flutamide						
Clean	7 \pm 2 (6)	2 \pm 1 (6)	3 \pm 1 (6)	1 \pm 0 (6)	0 \pm 0 (6)	3 \pm 1 (6)
Estrous	17 \pm 4 (5)	21 \pm 8 (5)**	9 \pm 4 (5)	8 \pm 2 (5)	4 \pm 3 (5)	10 \pm 3 (5)*
ATD						
Clean	21 \pm 8 (5)	14 \pm 2 (5)	6 \pm 4 (5)	6 \pm 2 (5)	4 \pm 1 (5)	8 \pm 2 (5)
Estrous	22 \pm 5 (6)	39 \pm 6 (6)**	4 \pm 2 (6)	16 \pm 2 (6)**	1 \pm 1 (6)	16 \pm 2 (6)*

The number of animals is given in parentheses.

* Significantly different from clean bedding ($P<.05$).

** ($P<.01$).



of all treatment groups except for Flutamide-treated females (Table 3). Even in the latter group of females the number of Fos-IR cells in most brain regions tended to be higher in animals killed after exposure to estrous as opposed to clean bedding. Only in one region, the POA, was the number of

Fos-IR cells significantly greater ($P=0.052$) by a post-hoc test in Flutamide-treated females exposed to estrous as opposed to clean bedding. Table 3 shows that the mean numbers of Fos-IR cells in several brain regions after exposure to estrous odors did not differ between Fluta-

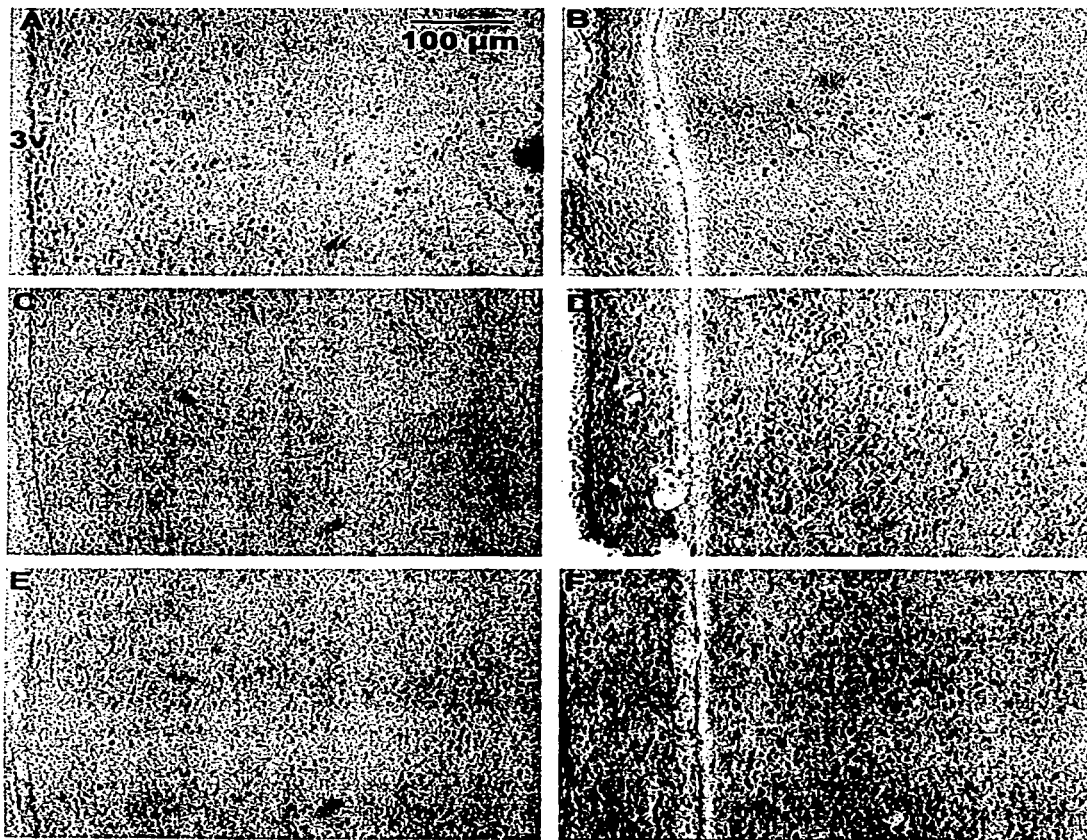


Fig. 3. Representative photomicrographs showing neuronal Fos-IR in the MPOA of female subjects prenatally treated with oil (A and B), ATD (C and D) or Flutamide (E and F). Subjects were gonadectomized as adults and received daily injections with TP before they were exposed to clean (A, C and E) or soiled estrous bedding (B, D and F). 3v, third ventricle.

mid-treated and control females. These results suggest that in females treated prenatally with Flutamide, as in control as well as ATD-treated female subjects (and in all groups of males), exposure to estrous odors stimulated neuronal Fos-IR in the AOS.

Statistical analysis showed a significant effect of bedding in the granular layer of the AOB [females: $F(1,28) = 42.10$, $P < .0001$; males: $F(1,28) = 34.69$, $P < .0001$]; the MePD [females: $F(1,26) = 12.39$, $P = .0017$; males: $F(1,28) = 26.53$, $P < .0001$] and the POA [females: $F(1,27) = 17.93$, $P = .0003$; males: $F(1,27) = 26.00$, $P < .0001$]. Examples of neuronal Fos responses to estrous female bedding are shown in Fig. 3.

4. Discussion

Our finding that Flutamide reduced anogenital distance and anogenital distance/body weight ratios in males when compared to control and ATD-treated males resembles those previously reported by Clemens et al. [36]. In that study Flutamide blocked the masculinizing action (longer anogenital distance and increased mounting behavior potential) in females that developed in utero between two males. Likewise, in Clemens et al. [36] and in the present study, males that were treated prenatally with Flutamide and later gonadectomized and treated with TP showed a drastic reduction in introgressive behavior. Similar results have been described after prenatal treatment with the anti-androgen, cyproterone acetate [37]. The reduction in introgressive behavior appears to be associated to an abnormal development of male penis in animals in which androgens are blocked perinatally [38].

In addition, the effects of perinatal ATD were also consistent with those previously described [21,35]. That is, perinatal treatment with ATD greatly facilitated feminine sexual behavior in male subjects that were later gonadectomized and treated with EB and P. Perinatally ATD-treated males had similar lordosis quotients and display lordosis with the same intensity as all groups of females. Considered together, these results clearly indicate that our prenatal treatments with Flutamide and ATD successfully reached the gestating fetuses.

Despite the successful prenatal blockade of AR by Flutamide or the perinatal interruption of estradiol biosynthesis by ATD, there was a surprising persistence of responsiveness to female bedding in subjects of both sexes that were treated in adulthood with TP. Neuronal Fos-IR after exposure to soiled bedding from estrous females was similar in the AOS of control males and females, confirming previous observations [22,23]. In those earlier studies, gonadectomized TP-treated males and females showed a preference for estrous as opposed to anestrus or clean bedding and similar increments in neuronal Fos-IR throughout the AOS when exposed to estrous odors [22,23]. The latter study [23] also showed that testosterone is required in order for gonadectomized male and female rats to show

significant increments in neuronal Fos-IR throughout the AOS after exposure to soiled estrous bedding. Gonadectomized animals treated with oil showed no preference for estrous bedding and subsequently no increments in Fos-IR in the AOS [23]. Likewise, in the male hamster [39] mating behavior is activated by integration in the AOS of the actions of testosterone and olfactory signals from FHV5. In the present study, prenatal Flutamide treatment had no consistent disruptive effects on the responsiveness of the AOS to estrous odors in either male or female rats. This persistence of responsiveness to female bedding in subjects in which AR activation was attenuated during fetal life argues against our original hypothesis that both male and female rats' brains are masculinized during fetal life in response to testosterone derived from the placenta (both sexes) as well as the testes (males only).

Fos responses were similar in the AOS of perinatally ATD-treated males and females and in control animals of both sexes, suggesting that there was no effect of perinatal estrogen deprivation on subjects' later neural responsiveness to odors from estrous females. Similar results were described for neonatally ATD-treated male rats that were castrated in adulthood and given estradiol [21]. Taken together, these results further suggest that the functional activity of the AOS to odors from females is not affected by perinatal actions of estradiol in the developing brain. This outcome differs from the case of AOS responses to male odors for which a clear-cut sexual dimorphism was revealed [21]. In that study, exposure to male odors augmented neuronal Fos-IR in the BNST and the medial POA of female subjects, but not in males that were gonadectomized and given EB in adulthood. By contrast, males treated neonatally with ATD later showed female-like Fos-IR responses in both of these brain regions [21]. The lack of a significant disruption by prenatal Flutamide or by perinatal ATD treatments on the ability of estrous female odors to stimulate Fos in the AOS and in subjects' preference to approach an estrous female raises the possibility that these male-typical characteristics occur in both male and female rats as a result of some nonsteroid-dependent, species-specific process that acts during development in both sexes.

There is a body of evidence suggesting that differentiation of the male-typical profile of partner preference depends on the neonatal action of estradiol in the male brain [21,35,37,40–42]. Thus, perinatal treatment with ATD dramatically decreased the preference of adult male rats for an estrous female over a sexually active male. However, in the present study, partner preference was not altered by pre- and neonatal ATD treatment in either sex. All male and female groups preferred an estrous female as opposed to a sexually active male (albeit male subjects did show a stronger preference for the estrous female than did female subjects). The present study differed in two ways from previous studies [21,35,42]. First, male and female subjects used in the present study were gonadectomized and treated with high doses of TP prior to partner preference testing

whereas subjects were previously tested for partner preference either when gonadally intact [35,42] or when gonadectomized and primed with estradiol [42]. It has previously been shown that ovariectomized female rats treated with high doses of testosterone switched their preference to an estrous female when given free access to an estrous female versus a sexually active male [40]. Indeed a single injection of 500 µg TP to ovariectomized female rats stimulated a preference for an estrous female over a stimulus male [43]. Second, in the present study all behavioral testing was conducted during the second half of the dark phase of the light-dark cycle. It was previously found that neonatal ATD treatment to male rats induced nocturnal fluctuations in coital performance and sexual partner preference [44,45]. When tested in the first half of the dark phase, neonatally ATD-treated male rats showed feminine sexual behaviors while showing a preference for a sexually active male over an estrous female. By contrast, when tested late in the dark phase, ATD-treated males readily showed masculine sexual behaviors, including ejaculation, and preferred to interact with an estrous female as opposed to a sexually active male—thereby resembling control males.

In a previous study [37], no facilitation of lordosis behavior was observed in females that had been treated prenatally with the antiandrogen, cyproterone acetate. Likewise, in the present experiment no facilitation of feminine sexual behavior was observed in Flutamide-treated subjects. These observations are at variance with previous studies in which higher lordosis quotients were observed in prenatally Flutamide-treated male and female rats when they were given ovarian hormones and tested in adulthood [46]. One possible explanation for these differences is that in the present study subjects were injected only once with EB 52 h prior to testing whereas Gladue and Clemens [46] gave EB 72, 48 and 24 h before testing. Another important difference is that Gladue and Clemens [46] injected Flutamide once a day to pregnant mothers. In the present experiment, we injected Flutamide twice a day because of the short serum half-life of the compound [47].

Our results corroborate those of two earlier studies by Brand and Slob [40,41] in which prenatal administration of Flutamide failed to disrupt the later capacity of female rats, treated with TP in adulthood, to show a male-typical preference to approach estrous females in choice tests and to display high levels of mounting behavior in tests with estrous females. In the present study prenatal Flutamide treatment of male as well as female rats also failed to disrupt their later preference to approach an estrous female or to display mounting behavior. These results argue against any essential role for neural AR activation during prenatal life in the differentiation of the neural systems that control motivational aspects of masculine sexual behavior in either sex. It would be interesting to assess these functions (along with olfactory responsiveness to estrous odors) in male and female rats treated with a regimen of antiandrogenic drug treatment that completely blocks the masculinization of the

male's external genitalia. This result will assure that the treatment completely blocked ARs and would provide a stronger test of the contribution of AR activation to the prenatal development of neural systems controlling these male-typical behavioral functions. Finally, it is possible that drug-induced reductions in neural AR activation are compensated for by the persisting activation of estradiol receptors in Flutamide-treated rats. It would be interesting to test this possibility by assessing the effects of combined prenatal treatment with Flutamide and ATD on later male-typical behaviors and neuronal Fos responses to estrous odors.

Acknowledgments

Supported by CONACYT (28039N), DGAPA (IN228199) and NSF INT 96 00 261. The excellent technical assistance of Francisco Camacho is gratefully acknowledged.

References

- [1] Mossman CA, Dickamer LC. Odor preferences of female house mice (*Mus domesticus*) in seminatural enclosures. *J Comp Psychol* 1996; 110:131-8.
- [2] Ninomiya K, Kimura T. Male odors that influence the preference of female mice: roles for urinary and preputial factors. *Physiol Behav* 1988;44:791-5.
- [3] LeMagnan J. Les phenomenes olfacto-sexuels chez le rat blanc. *Arch Sci Physiol* 1952;6:295-332.
- [4] Carr WJ, Loeb LS, Dissinger ML. Responses of rats to sex odors. *J Comp Physiol Psychol* 1965;59:370-7.
- [5] Stern JJ. Responses of male rats to sex odors. *Physiol Behav* 1970; 5:519-24.
- [6] Bakker J, Van Ophemert J, Slob AK. Sexual differentiation of odor and partner preference in the rat. *Physiol Behav* 1996;60:489-94.
- [7] Petrucci A, Peng M, Johnston RE. Effects of vomeronasal organ removal on individual odor discrimination, sex-odor preference, and scent marking by female hamsters. *Physiol Behav* 1999;66:73-83.
- [8] Ferkin AH, Gorman MR. Photoperiod and gonadal hormones influence odor preferences of the male meadow vole, *Microtus pennsylvanicus*. *Physiol Behav* 1992;51:1087-91.
- [9] Sawrey DK, Dewsbury DA. Conspecific odor preferences in Muntane voles (*Microtus montanus*): effects of sexual experience. *Physiol Behav* 1994;56:339-49.
- [10] Kelliher KR, Chang YM, Wersinger SR, Baum MJ. Sex differences and testosterone modulation of pheromone-induced neuronal Fos in the ferret's main olfactory bulb and hypothalamus. *Biol Reprod* 1998; 59:1454-61.
- [11] Scalia F, Winans SS. The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals. *J Comp Neurol* 1975;161: 31-56.
- [12] Gomez DM, Newman SW. Differential projections of the anterior and posterior regions of the medial amygdaloid nucleus in the Syrian hamster. *J Comp Neurol* 1992;317:195-218.
- [13] Lehman MN, Winans SS. Evidence for a ventral non-striatal pathway from the amygdala to the bed nucleus of the stria terminalis in the male golden hamster. *Brain Res* 1983;268:139-46.
- [14] Maragos WF, Newman SW, Lehman MN, Powers JB. Neurons of origin and fiber trajectory of amygdalofugal projections to the medial preoptic area in Syrian hamsters. *J Comp Neurol* 1989;280:59-71.

- [15] Wood R. Thinking about networks in the control of male hamster sexual behavior. *Horm Behav* 1997;40:–5.
- [16] Segovia A, Guilleman A. Sexual dimorphism in the vomeronasal pathway and sex differences in reproductive behaviors. *Brain Res Rev* 1993;18:51–74.
- [17] Baum MJ, Everitt BJ. Increased expression of c-fos in the medial preoptic area after mating in male rats: role of afferent inputs from the medial amygdala and midbrain central tegmental field. *Neuroscience* 1992;50:627–46.
- [18] Brennan PA, Hancock D, Keverne EB. The expression of the immediate-early genes c-fos, egr-1 and c-jun in the accessory olfactory bulb during the formation of an olfactory memory in mice. *Neuroscience* 1992;49:277–84.
- [19] Dudley CA, Moss RL. Activation of an anatomically distinct subpopulation of accessory olfactory bulb neurons by chemosensory stimulation. *Neuroscience* 1999;91:1549–56.
- [20] Halem HA, Cherry JA, Baum MJ. Vomeronasal neuroepithelium and forebrain Fos responses to male pheromones in male and female mice. *J Neurobiol* 1999;39:249–63.
- [21] Bakker J, Baum MJ, Slob AK. Neonatal inhibition of brain estrogen synthesis alters adult neural fos responses to mating and pheromonal stimulation in the male rat. *Neuroscience* 1996;74:251–60.
- [22] Bressler SC, Baum MJ. Sex comparison of neuronal fos immunoreactivity in the rat vomeronasal projection circuit after chemosensory stimulation. *Neuroscience* 1996;71:1063–72.
- [23] Paredes RG, Lopez ME, Baum MJ. Testosterone augments neuronal Fos responses to estrous odors throughout the vomeronasal projection pathway of gonadectomized male and female rats. *Horm Behav* 1998;33:48–57.
- [24] Fernandez-Fewell GD, Meredith M. C-fos expression in vomeronasal pathways of mated or pheromone stimulated male golden hamsters: contributions from vomeronasal sensory input and expression related to mating performance. *J Neurosci* 1994;14:3643–54.
- [25] Fiber JM, Swann J. Testosterone differentially influences sex-specific pheromone-stimulated Fos expression in limbic regions of Syrian hamsters. *Horm Behav* 1996;30:455–73.
- [26] Weisz J, Ward JL. Plasma testosterone and progesterone titers of pregnant rats, their male and female fetuses and neonatal offspring. *Endocrinology* 1980;106:81–7.
- [27] Baum MJ, Woutersen PJA, Slob AK. Sex difference in whole-body androgen content in rats on fetal days 18 and 19 without evidence that androgen passes from male to female. *Biol Reprod* 1991;44:747–51.
- [28] Beach FA. Sexual behavior of prepubertal male and female rats treated with gonadal hormones. *J Comp Psychol* 1942;34:285–92.
- [29] Baum MJ, Sodersten P, Vreburg JTM. Mounting and receptive behavior in the ovariectomized female rat: influence of estradiol, dihydrotestosterone, and genital anesthesia. *Horm Behav* 1974;5:175–90.
- [30] Emery DE, Sachs BD. Ejaculatory pattern in female rats without androgen treatment. *Science* 1975;190:484–6.
- [31] Oboh AM, Paredes RG, Baum MJ. A sex comparison of increments in Fos immunoreactivity in forebrain neurons of gonadectomized, testosterone-treated rats after mounting an estrous female. *Neurobiol Learn Mem* 1995;63:66–73.
- [32] Vomachka AJ, Lisk RD. Androgen and estradiol levels in plasma and amniotic fluid of late gestational male and female hamster: uterine position effects. *Horm Behav* 1986;20:181–93.
- [33] Noble RG. Mounting in female hamsters: effects of different hormone regimens. *Physiol Behav* 1977;19:519–26.
- [34] Baum MJ, Carroll RN, Cherry JA, Tobet SA. Steroidal control of behavioural, neuroendocrinol, and brain sexual differentiation: studies in a carnivore, the ferret. *J Neuroendocrinol* 1990;2:401–18.
- [35] Brand T, Kroonen J, Moss J, Slob AK. Adult partner preference and sexual behavior of male rats affected by perinatal endocrine manipulations. *Horm Behav* 1991;25:323–41.
- [36] Clemens LG, Gladue BA, Comblin LP. Prenatal endogenous androgenic influences on masculine sexual behavior and genital morphology in male and female rats. *Horm Behav* 1978;10:40–53.
- [37] Vega Matuszczyk J, Larsson K. Sexual preference and feminine and masculine sexual behavior of male rats prenatally exposed to antiandrogen or antiestrogen. *Horm Behav* 1995;29:191–206.
- [38] Nadler RD. Differentiation of the capacity for male sexual behavior in the rat. *Horm Behav* 1969;1:53–63.
- [39] Wood RI, Coelen LM. Integration of chemosensory and hormonal cues is essential for sexual behaviour in the male Syrian hamster: role of the medial amygdaloid nucleus. *Neuroscience* 1997;78:1027–35.
- [40] Brand T, Slob AK. Neonatal organization of adult partner preference behavior in male rats. *Physiol Behav* 1991;49:107–11.
- [41] Brand T, Slob AK. Perinatal flutamide and mounting and lordosis behavior in adult female Wistar and Sprague-Dawley rats. *Behav Brain Res* 1991;44:43–51.
- [42] Bakker J, van Ophemert J, Slob AK. Organization of partner preference and sexual behavior and its nocturnal rhythmicity in male rats. *Behav Neurosci* 1993;107:1049–58.
- [43] De Jonge FH, Muntjewerff JW, Louwerse AL, van de Poll NE. The influence of estrogen, testosterone, and progesterone on partner preference, receptivity and proceptivity. *Physiol Behav* 1986;37:885–92.
- [44] Bakker J, Brand T, van Ophemert J, Slob AK. Hormonal regulation of adult partner preference behavior in neonatally ATD-treated male rats. *Behav Neurosci* 1993;107:480–7.
- [45] Bakker J, van Ophemert J, Timmerman MA, de Jong FH, Slob AK. Endogenous reproductive hormones and nocturnal rhythms in partner preference and sexual behavior of ATD-treated male rats. *Neuroendocrinology* 1995;62:396–405.
- [46] Gladue BA, Clemens LG. Androgenic influences on feminine sexual behavior in male and female rats: defeminization blocked by prenatal antiandrogen treatment. *Endocrinology* 1978;103:1702–9.
- [47] Fuh VL, Stoner E. Androgen inhibitors antiandrogens. In: Knobil E, Neill JD, editors. *Encyclopedia of reproduction*, vol. 1. San Diego, CA Academic Press, 1998. pp. 166–73.

TESIS CON
FALLA DE OVIENEN

CAPÍTULO V. DISCUSIÓN GENERAL

En la tabla 5.1 se muestran un resumen cualitativo de los resultados obtenidos. A continuación se discute cada uno de los experimentos. Se procuró no repetir demasiado lo mencionado en las discusiones de cada uno de los experimentos.

Experimento 1:

Conducta coital femenina

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Demostremos que las hembras y machos tratados con ATD, ya sea intactos o gonadectomizados y tratados con PT, presentan mayor conducta de lordosis que los sujetos control. Esto indica que el aumento en la conducta de lordosis en estos animales no depende del estado hormonal (efecto activacional inducido por hormonas), por lo que concluimos que este es un efecto organizacional producido a nivel perinatal por la inhibición de la aromatización. Esta facilitación de la conducta de lordosis en hembras con inhibición perinatal de la aromatización no había sido confirmada, sino al contrario, hurones hembra tratados prenatalmente con ATD muestran una disminución de la conducta de lordosis con dosis bajas de benzoato de estradiol pero su conducta es similar a las hembras control con dosis normales (Baum y Tobet, 1986). Sin embargo, Clemens y Gladue (1978) mostraron que el tratamiento prenatal con ATD aumenta la conducta de lordosis en las hembras cuando son tratados con dosis bajas (0.175 μg) de estradiol, mientras con dosis más altas (0.25, 0.5 ó 1 μg) muestran una respuesta de lordosis similar a la mostrada por las hembras control. Además existen varios estudios que apoyan indirectamente nuestros resultados. Hembras y machos, tratados con ATD no responden a la retroalimentación negativa inducida por estradiol sobre la liberación de la LH (Choate y Resko, 1994). Las hembras tratadas postnatalmente con BE muestran menos conducta femenina que las hembras control y las hembras tratadas prenatalmente con ATD (Parsons et al., 1984) y se ha observado un aumento en la conducta sexual femenina de las crías provenientes de una hembra gestante ovariectomizada a los 10 días de preñez lo cual eliminó la vía de estradiol proveniente del ovario materno (Witcher y Clemens, 1987). Estos datos indican que la presencia de estradiol en la etapa perinatal, al menos en la rata, provoca una disminución de la conducta de lordosis, y apoyan nuestros resultados que muestran que la falta de aromatización, es decir la supresión o disminución de estradiol, produce un aumento en la expresión de la conducta de lordosis tanto en hembras como en machos.

GRUPO	CONDUCTA COITAL FEMENINA	CONDUCTA COITAL MASCULINA	PREFERENCIA SEXUAL	PREFERENCIA OLFATORIA	COPULA REGULADA	CONDICIONAMIENTO DE PREFERENCIA DE LUGAR	PESO DE LAS GONADAS	RESPUESTA DEL SISTEMA DE PROYECCIÓN VOMERONASAL
HEMBRAS								
CONTROL	****	**	****	****	*****	***	*****	****
FLUTAMIDA	***	**	0	**	*****	****	***	*
ATD	*****	**	***	****	*	*****	***	****
MACHOS								
CONTROL	**	*****	*****	*****	0	***	*****	*****
FLUTAMIDA	*	***	*****	***	0	***	***	****
ATD	*****	*****	*****	0	0	***	*****	*****

Tabla 5.1. Resumen cualitativo de los resultados obtenidos en esta tesis. Los asteriscos representan la cantidad relativa de conducta o respuesta con respecto al grupo que la presentó con mayor intensidad (5 asteriscos) y/o al grupo control; 0 significa que no presentó la conducta o respuesta. La conducta coital femenina a la que se refiere es la conducta de lordosis. La preferencia sexual y olfatoria para las hembras fue por los machos estímulos y para los machos por las hembras en estro. El condicionamiento de preferencia de lugar se refiere al condicionamiento inducido por la cópula regulada. La respuesta del sistema de proyección vomeronasal fue a las señales químiosensoriales sexualmente relevantes provenientes de una hembra en estro.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Con respecto a las hembras tratadas con flutamida, mostramos que su conducta de lordosis era significativamente menor a las hembras control cuando fueron probadas intactas. Sin embargo su comportamiento de lordosis se asemejó al de las hembras control al ser tratadas con BE y P. Estos resultados contrastan parcialmente con los obtenidos por Brand y cols. (Brand y Slob, 1991c, 1991b). Ellos mostraron que la conducta de lordosis no era modificada por el bloqueo prenatal de los receptores de andrógenos, pero sólo evaluaron la conducta de lordosis en respuesta al tratamiento hormonal y no en sujetos intactos. Nuestros resultados sugerirían que la disminución en la respuesta lordótica observada en los animales tratados con flutamida pudiera ser debida a una mala organización del sistema responsable de la secreción de hormonas esteroides en la edad adulta. Sin embargo, en un experimento preliminar realizado con hembras tratadas con flutamida 9 de 10 ratas quedaron preñadas y sus crías nacieron y sobrevivieron. Lo que indica que al menos la secreción de estradiol y progesterona es suficiente para inducir la ovulación y mantener la preñez. Estos resultados sugieren que el sistema de secreción de hormonas esteroides en la edad adulta no está mal organizado en las hembras tratadas prenatalmente con flutamida.

Los machos tratados con flutamida mostraron significativamente menos conducta de lordosis con respecto a los machos control. Estos resultados nos permiten sugerir que los andrógenos no participan prenatalmente para organizar la conducta de lordosis. Sin embargo, este resultado y el obtenido con las hembras tratadas con flutamida, llevó a especular que estos animales tuvieran mayor concentración de estradiol que los controles en su desarrollo prenatal. Si el estradiol es responsable de disminuir o eliminar la conducta de lordosis, entonces los animales tratados con flutamida que tienen menos conducta de lordosis probablemente tienen mayor estradiol circulante. Esto se explicaría con el hecho de que la concentración de testosterona aumenta en los animales tratados con flutamida (Neri, 1976; Raynaud, 1988), probablemente la aromatización sería mayor cuando mayor fuera la concentración de testosterona. Esta sugerencia debe ser probada midiendo la concentración de estradiol cerebral cuando los animales son tratados con flutamida prenatalmente. En este sentido, el grupo de Wallen utilizó este último argumento, entre otros, para explicar la razón por la cual la flutamida masculinizó las vocalizaciones de separación o rechazo sexualmente dimórficas en hembras de mono *rhesus*. (Tomaszycki et al., 2001), las explicaciones propuestas en ese trabajo para ese efecto masculinizante de la flutamida fueron dos. La primera es que puede ser reflejo de una acción directa de un metabolito activo de la flutamida, la hidroxiflutamida, sobre: a) los mecanismos esteroidogénicos del ovario o la placenta o b) los receptores de andrógenos al actuar como agonista (Tomaszycki et al., 2001) y así inhibir la respuesta vocal típicamente femenina. La segunda explicación del efecto masculinizante de la flutamida es que se puede estar reflejando su capacidad para inhibir la retroalimentación positiva sobre la secreción gonadotrópica (Veldhuis et al., 1992), lo que ocasionaría un aumento en la secreción de estrógeno ovárico o placentario, ocasionando que este aumento en estradiol pudiera masculinizar el sustrato neuronal responsable de la lordosis. Esta última explicación coincide con

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

nuestra conclusión. Es interesante hacer notar que también se menciona el efecto androgénico de un metabolito de la flutamida, la hidroxiflutamida. El trabajo que demuestra que el antiandrógeno hidroxiflutamida actúa como andrógeno (Tomaszycki et al., 2001) propone la participación del coactivador ARA70 para que ese antiandrógeno actúe como activador del factor de transcripción formado por el antiandrógeno y el receptor. Sin embargo, creemos que la cantidad de hidroxiflutamida que podría unirse al receptor es baja, debido, en primer lugar, a que la cantidad de hidroxiflutamida que se forma en nuestras ratas tratadas con flutamida es baja, nosotros administramos 3 veces menos flutamida que el grupo de Wallen; en segundo termino, pero no menos importante, la hidroxiflutamida, al igual que la testosterona, tendría que competir con la flutamida por el receptor para así poder activarlo. Por tal razón, creemos que la posibilidad de inhibir la retroalimentación positiva y que el ovario o la placenta secreten más estradiol y este actúe sobre el proceso de masculinización es más probable. Otra alternativa que apoyaría la noción de que los andrógenos son los únicos responsables del proceso de masculinización tiene que ver con que el periodo crítico de diferenciación que se extiende al periodo neonatal, periodo que no fue bloqueado con flutamida en nuestros experimentos. Es posible que el aumento de testosterona y la presencia de hidroxiflutamida provocados por la presencia de flutamida inmediatamente después del nacimiento sean capaces de provocar la inhibición de la lordosis y la presencia de conducta coital en las hembras y los machos prenatalmente tratados con flutamida. Este aumento en la concentración de andrógenos después del tratamiento con flutamida se conoce como el síndrome del retiro (withdrawal) de flutamida (Kelly y Scher, 1993; Scher y Kelly, 1993). En contra de esta posibilidad se encuentran los datos que muestran que el tratamiento postnatal con testosterona en machos prenatalmente tratados con flutamida provoca una disminución aún mayor del tamaño de los testículos, lo que no es provocado por la administración neonatal de flutamida (van der Schoot, 1992). Es necesario diseñar estrategias experimentales encaminadas a probar estas diferentes alternativas, como lo hemos mencionado, en un futuro nuestros esfuerzos se enfocaran en demostrar la alternativa de que tanto los andrógenos como los estrógenos participan en el establecimiento de la conducta coital masculina y otras conducta sexuales.

Conducta coital masculina

En las hembras ninguno de los tratamientos (ATD o flutamida) aumentó o disminuyó de manera importante la conducta coital masculina. Lo cual no apoya la hipótesis planteada. Si el estradiol participa en los procesos de masculinización y desfeminización, entonces la inhibición de la aromatización debió haber provocado que la conducta coital masculina en las hembras fuera prácticamente eliminada. En este caso, mostramos que el estradiol no participa, al menos de manera independiente, en el proceso de masculinización de la conducta coital.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los machos tratados con ATD desplegaron conducta coital masculina con la misma intensidad que los machos control, tanto intactos como tratados con PT. Sin embargo, cuando fueron tratados con BE y P desplegaron una frecuencia de monta similar a la mostrada por las hembras, lo cual contrastó con los machos control: éstos prácticamente no mostraron conducta coital masculina bajo el tratamiento con BE y P. El hecho de que las hembras mostraran conducta de monta bajo tratamiento con BE y P y los machos no, nos lleva a sugerir que la conducta de monta puede ser interpretada como conducta proceptiva o de solicitud. Beach (1976) ya había sugerido que la conducta de monta que realizan las hembras puede ser interpretada como conducta de proceptividad y hay varios experimentos que podrían reinterpretarse bajo esta perspectiva (i. e. Fang y Clemens, 1999).

Debido a que los machos ATD mostraron una conducta coital masculina igual a la mostrada por los machos control cuando intactos o bajo tratamiento con PT, concluimos que la inhibición de la aromatización no interviene con la organización de la conducta coital masculina. A pesar de que existe controversia acerca del efecto del tratamiento con ATD sobre la conducta coital masculina, ya que algunos experimentos muestran una disminución de la conducta coital masculina [Bakker, 1993 #91; Brand, 1991 #3536; Brand, 1991 #425; Gladue, 1980 #77] y otros muestran que el tratamiento no altera la expresión de esta (McEwen et al., 1977; Vreeburg et al., 1977; Davis et al., 1979; Whalen y Olsen, 1981), recientemente se ha mostrado que la aromatización no participa en el proceso de masculinización de la conducta coital, ya que ratones macho que no tienen el gen responsable de sintetizar la aromatasa (knock out de aromatasa, ArKO) presentan una conducta coital masculina normal (Bakker et al., 2002b).

Los machos tratados con flutamida mostraron poca conducta coital masculina cuando intactos, probablemente debido a que la reducción del tamaño de los testículos se correlaciona con una menor secreción de testosterona. Aún al ser tratados con dosis normales o altas de PT, lo cuál aumentó su frecuencia de monta e intromisión, la conducta eyaculatoria de dichos animales nunca alcanzó la frecuencia de los machos control. Estos datos señalan la importancia de la acción androgénica para la virilización normal del sustrato neuronal que regula la conducta coital masculina. Sin embargo, al no impedir completamente la organización de las vías neuronales responsables del despliegue de conducta coital masculina, sugieren que: 1) tanto los andrógenos como los estrógenos participan en la organización de las vías responsables de la conducta coital masculina o 2) que la flutamida, después de biotransformarse en su metabolito hidroxiflutamida, pueda tener un efecto androgénico. Es necesario evaluar la conducta coital masculina de animales perinatalmente tratados con flutamida y ATD o evaluar esta conducta en animales tratados con antiandrógenos como el RU58841 que *in vitro* muestran una actividad androgénica todavía menor que el metabolito antiandrogénico de la flutamida, la hidroxiflutamida, que muestra un efecto agonístico sobre los receptores de andrógenos (Miyamoto et al., 1998).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Preferencia sexual

Nuestros resultados indican que las vías neuronales responsables de la preferencia sexual no son organizadas, al menos de manera independiente, por andrógenos o estrógenos. Los machos, independientemente del tratamiento perinatal, siempre mostraron preferencia por la hembra en todas las condiciones hormonales probadas. Estudios previos muestran que la aromatización es importante para la preferencia de compañero sexual en el macho: la inhibición de la aromatización con ATD provocó que los machos prefirieran estar con un macho en lugar de con una hembra. Esos estudios mostraron que la preferencia por el macho sólo se daba si el macho estímulo no estaba amarrado (Brand et al., 1991), ó si se observaba la preferencia inmediatamente después de que la luz se apagaba (Bakker et al., 1995), en ambos casos, si las condiciones eran cambiadas se observaba una preferencia por la hembra en estro. Los mismos autores también mostraron que los machos ATD preferían estar con un macho después de varias pruebas de preferencia (Brand y Slob, 1991a; Bakker et al., 1996b). Esto último es de tenerse en cuenta porque previamente se ha mostrado que la preferencia por una hembra disminuye con saciedad sexual moderada (Vega Matuszczyk y Larsson, 1993). En oposición con los trabajos realizados con ATD, recientemente Bakker y colaboradores (2002b) mostraron que los ratones ArKO presentan preferencia por la hembra y debido a su diseño experimental muestran de manera indirecta que la preferencia sexual observada previamente en los machos ATD fue debida a la falta de preferencia olfatoria.

Las hembras control intactas con estro conductual mostraron preferencia por interaccionar con el macho mientras que en anestro conductual no mostraron preferencia. Resultados similares ya han sido descritos (Meyerson y Lindstrom, 1973). Mientras que las hembras tratadas con ATD o flutamida no mostraron preferencia por el macho durante el estro conductual, el tratamiento con BE y P revirtió la falta de preferencia de compañero sexual aunque sólo en las hembras tratadas con ATD. En el experimento 2 mostramos que las hembras tratadas con flutamida regulan más la cópula que las hembras control. Creemos que debido a tal circunstancia las hembras flutamida no mostraron preferencia por el macho, ya que la caja de preferencia sexual puede ser utilizada para controlar la cópula. Otra posible explicación podría ser que las hembras tratadas con flutamida necesiten más experiencia sexual que las hembras control, pues se ha mostrado que las hembras sin experiencia sexual tratadas con E no muestran una clara preferencia sexual (Vega Matuszczyk y Larsson, 1991). Los resultados muestran que el estradiol perinatal no es importante para la organización de la preferencia sexual en la hembra. Los resultados obtenidos con las hembras tratadas con flutamida no nos permiten concluir si la estimulación androgénica prenatal participa o no en la organización de la preferencia sexual en la hembra.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Preferencia olfatoria

Existen pocos trabajos donde se ha estudiado la preferencia olfatoria de las hembras. En ellos se muestra que la hembra en estro prefiere el olor proveniente de la cama de aserrín de una caja de machos sobre el olor del aserrín proveniente de la cama hembras receptivas (Meyerson y Lindstrom, 1973; Bakker et al., 1996b). Si la hembra se encuentra en anestro, no muestra preferencia (Meyerson y Lindstrom, 1973). En contraste, la preferencia olfatoria en machos ha sido ampliamente estudiada. LeMagnen (1952) fue el primero en mostrar que las ratas macho tenían preferencia por las hembras en estro, tanto por su presencia como por su olor. Carr y cols. (1965) ampliaron estas observaciones mostrando que los machos no tenían preferencia por hembras ovariectomizadas y sí por aquéllas tratadas con BE y P. Posteriormente Stern (1970) mostró que esta preferencia se debía al olor que producen las hembras en estro y también que esta preferencia depende de la experiencia sexual previa del animal; machos sin experiencia sexual no mostraban preferencia por el olor de hembras receptivas. Nuestros animales control se comportaron como en los estudios mencionados: las hembras en estro conductual y tratadas con BE y P mostraron preferencia olfatoria por el macho, mientras que las hembras en anestro conductual, no mostraron preferencia; los machos control prefirieron el olor de hembras en estro. Hay que resaltar uno de nuestros resultados obtenidos con los machos control, bajo tratamiento con BE y P y con experiencia sexual "femenina" (con machos), prefirieron el olor de machos. Ya se mencionó que la experiencia sexual es fundamental para que se desarrolle la preferencia por el olor de hembras en estro, y sin esa experiencia los machos no tienen preferencia. Este resultado sugiere que la experiencia sexual previa, independientemente si es masculina o femenina, es lo que determina la preferencia olfatoria en los machos.

Las hembras tratadas con ATD mostraron una preferencia olfatoria similar a la mostrada por las hembras control, mientras que los machos tratados con ATD no presentaron preferencia olfatoria, bajo ninguna condición hormonal. Nuestros resultados sugieren que el estradiol perinatal es fundamental para que el macho muestre preferencia olfatoria. Sabemos que la inhibición neonatal de la aromatización no interfiere en la formación de las vías que se encargan de la detección de señales químiosensoriales: el sistema de proyección vomeronasal de machos neonatalmente tratados con ATD es activado con el olor proveniente de hembras en estro o con el olor de machos (Bakker et al., 1996a). Sugerimos, entonces, que la falta de preferencia olfatoria en los machos tratados con ATD es debida a una falta de integridad de las vías neuronales encargadas del aprendizaje asociativo (revisado en Keverne, 1995), es decir, a pesar de que estos animales detectan las señales químiosensoriales, estos animales no tienen la capacidad de almacenar esta información para posteriormente interpretar, y así preferir, estas señales químiosensoriales. Stern (1970), como habíamos mencionado, propone que la detección de señales químiosensoriales en machos depende de la experiencia sexual previa, mientras que el grupo de Moncho-Bogani (2002) llegó a la conclusión que la

preferencia olfatoria en hembras no necesita de experiencia sexual previa. Estos resultados explican por qué las hembras tratadas con ATD muestran preferencia olfatoria y apoyan esta nueva hipótesis de que sean las vías neuronales responsables de procesar el aprendizaje asociativo las que se encuentren alteradas en los animales con inhibición perinatal de la aromatización.

Por su parte, los machos tratados prenatalmente con flutamida no mostraron preferencia por el olor de las hembras en ninguna condición hormonal. Sin embargo, se comportaron igual que los machos control cuando fueron tratados con BE y P, esto es, mostraron preferencia por el olor de los machos. Creemos que si en la rata macho el estradiol es importante para formar la vía responsable del aprendizaje para detectar las señales quimiosensoriales, nuestros resultados obtenidos en los machos tratados con flutamida sugieren que la testosterona contribuye a diferenciar esas señales hacia una respuesta típicamente masculina. Ambos resultados indican la existencia de una cooperación entre los andrógenos y estrógenos para determinar la preferencia olfatoria en la rata macho.

Nuestros resultados sugieren que la participación de los estrógenos y los andrógenos es importante para el establecimiento de la preferencia olfatoria en machos pero no en hembras. Las hembras tratadas con flutamida durante el estro conductual responden de diferente manera que las hembras control, pero estas diferencias desaparecen cuando se tratan con BE y P; las hembras tratadas con ATD siempre respondieron de manera parecida a las hembras control. Es decir, nuestros resultados indican que el estradiol y los andrógenos no participan de manera importante, al menos de forma independiente, en la organización del sistema olfatorio accesorio en las hembras.

Recientemente Bakker y colaboradores (2002b) publicaron que los ratones ArKO machos no tienen preferencia por los olores volátiles provenientes de hembras en estro, lo cual coincide con nuestros resultados obtenidos en los machos tratados prenatalmente con ATD. Sin embargo, ellos también mostraron que las hembras ArKO tampoco detectan las señales volátiles provenientes de la orina de los ratones macho (Bakker et al., 2002a). El hecho de que nosotros no encontráramos ninguna modificación en la preferencia olfatoria en las hembras tratadas con ATD sugiere que en la rata hembra el proceso de organización del sistema responsable se organiza en etapas posteriores al desarrollo perinatal, ya que los ratones ArKO tienen significativamente menos estradiol que los animales normales durante todo su desarrollo perinatal y peripuberal por lo que posiblemente el estradiol sea importante para el establecimiento de la preferencia olfatoria en hembras durante la pubertad.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Experimentos 2, 3 y 4:

Cópula regulada y condicionamiento de preferencia de lugar inducido por la cópula regulada en las hembras.

Los resultados obtenidos durante las pruebas de cópula regulada ("pacing") en las hembras tratadas con flutamida sugieren que la testosterona, posiblemente la proveniente de machos adyacentes durante el desarrollo prenatal (Clemens et al., 1978; Gladue y Clemens, 1980a), induce características aversivas a la cópula en la hembra. Esta posibilidad ya ha sido planteada anteriormente (Erskine, 1989) pero no se había demostrado. Las hembras tratadas con flutamida necesitaron una menor estimulación vagino-cervical para alcanzar un estado reforzante con respecto a las hembras control. Es decir, el bloqueo prenatal de los receptores de andrógenos, y por lo tanto el bloqueo de la estimulación proveída por la testosterona proveniente de los machos adyacentes, propició que las hembras necesitaran un menor número de intromisiones para alcanzar un estado reforzante. Sin embargo, la disminución de las propiedades aversivas de la cópula fue parcial, ya que las hembras necesitaban regular la interacción con el macho para que se indujera el estado reforzante.

Considerando que las propiedades aversivas inducidas por la testosterona proveniente de los machos adyacentes pudieran estar mediadas por la aromatización de dicha testosterona, se decidió evaluar la cópula regulada en las hembras perinatalmente tratadas con ATD. Los resultados obtenidos con las hembras tratadas con ATD mostraron que la inhibición perinatal de la aromatización provocaba que las hembras no tuvieran la necesidad de regular la cópula para alcanzar un estado reforzante, es decir bloqueó las propiedades aversivas de la cópula que tendían que ser disminuidas regulando la interacción con el macho. Sin embargo, la facilitación del estado efectivo positivo observado en las hembras tratadas con ATD puede ser también interpretado como una modificación en la diferenciación sexual de la hembra, debido a que las hembras no regularon la cópula. De tal manera sugerimos que el estradiol está implicado en la diferenciación sexual de la conducta coital de la hembra. Aparentemente el estradiol participa perinatalmente tanto en la modulación de la conducta de lordosis como en la organización de la capacidad para controlar la cópula.

Cópula regulada y condicionamiento de preferencia de lugar inducido por la cópula regulada en los machos.

La evaluación de la conducta de "pacing" en los machos arrojó resultados totalmente alejados del objetivo del experimento: todos los machos cambiaron su preferencia de lugar después de interactuar con el macho estímulo, sin embargo, ninguno de los machos experimentales reguló la interacción con el macho estímulo. Al principio de esta discusión mencionamos que considerábamos a la respuesta de lordosis una

LEBID UEN
FALLA DE ORIGEN

conducta refleja que tenía poco que ver con la motivación de los machos y los resultados lo apoyan: los machos ATD no muestran preferencia por el macho, tienen una conducta coital masculina normal y no regulan la interacción sexual con otro macho, a pesar de tener una respuesta de lordosis tan marcada.

Sin embargo, los resultados obtenidos abren una nueva línea de investigación: ¿cuál es la razón por la cual todos los machos cambiaron su preferencia de lugar después de interactuar con otro macho?, es decir, ¿por qué la interacción coital con un macho estímulo produjo la inducción de un estado reforzante o afectivo positivo en todos los machos experimentales? Nuestras hipótesis son que la interacción social o el olor son los responsables de inducir el estado reforzante y no la interacción coital por sí misma. Realizar el mismo procedimiento pero usando como estímulo a un macho o una hembra gonadectomizados o el olor del aserrín proveniente de una caja de machos intactos nos indicará lo acertado de las proposiciones.

Experimentos 5:

Respuesta de sistema de olfatorio accesorio al olor de hembras en estro

La traducción del gen de respuesta temprana c-fos hacia la proteína Fos en respuesta a olores provenientes de la cama de hembras en estro mostró la activación del sistema accesorio olfatorio o vomeronasal en hembras y machos gonadectomizados tratados perinatalmente con vehículo, ATD o flutamida cuando fueron tratados con PT. A pesar de que la respuesta de Fos en los animales tratados con flutamida, en particular las hembras, no difirió en varias regiones cerebrales entre aserrín limpio y el aserrín proveniente de las hembras en estro, la disminución en la respuesta no fue estadísticamente diferente a la de los machos control, por lo que concluimos que la aromatización y los receptores de andrógenos no estaban involucrados de manera independiente en la respuesta a feromonas femeninas. Nuevamente nuestra hipótesis no fue confirmada ya que de manera independiente el estradiol no masculiniza y no desfeminiza el sistema de proyección vomeronasal. Si así fuera, nuestros resultados mostrarían que tanto las hembras como los machos tratados con ATD no responden al olor de hembras en estro.

En ese trabajo sugerimos la posibilidad de que la diferenciación del sistema olfatorio accesorio pudiera darse tanto por estrógenos como por andrógenos, es decir, el mecanismo que masculiniza el sistema vomeronasal sería redundante. Por supuesto es necesario evaluar la respuesta de Fos al olor estral en hembras tanto con inhibición de la aromatización como con bloqueo de los receptores de andrógenos para determinarlo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Consideraciones Generales

Una crítica importante a este trabajo tiene que ver con el hecho de que en los experimentos no se evaluó el efecto que los fármacos pudieran tener sobre la conducta materna. Existen experimentos que muestran que la conducta materna influye en la diferenciación sexual. Por ejemplo Moore y colaboradores han mostrado que si las crías macho no reciben una estimulación sensorial adecuada (mayor cantidad de lamidos que las crías hembra), entonces muestran una conducta coital disminuida cuando adultos (Moore, 1984, 1992). En nuestros animales tratados con ATD esto no podría ser el caso, ya que mostraron una conducta coital masculina semejante a la mostrada por los sujetos control: los machos tuvieron una conducta masculina normal. En el caso de los machos tratados con flutamida Brand y Slob (1991c) usaron un tratamiento idéntico al nuestro y descartaron el posible efecto del fármaco sobre la madre (utilizaron hembras nodrizas al momento del parto). Nuestros resultados con flutamida son muy similares a los descritos por Brand y Slob, lo que sugiere que es poco probable que se afectara la conducta materna de las hembras tratadas. Sin embargo, no es posible descartar por completo esta alternativa. Para futuros experimentos se sugiere diseñar estrategias experimentales para controlar el efecto de los fármacos sobre la madre y así determinar la contribución de las hormonas maternas y/o fetales versus la contribución de los estímulos somatosensoriales que recibe el crío durante la lactancia temprana sobre el proceso de diferenciación sexual cerebral.

Otro punto de controversia surge de un resultado de los trabajos que han sido utilizados para apoyar nuestros resultados. Los ratones hembra ArKO presentaron una menor conducta de lordosis (Bakker et al., 2002a) mientras que nuestras hembras tratadas perinatalmente con ATD mostraron una facilitación en dicha conducta. Aparentemente en ambos casos se disminuyó de manera importante la síntesis de estradiol. Sin embargo, en nuestros animales la secreción de estradiol se puede dar en la edad adulta, mientras que los ArKO en principio no pueden sintetizarlo normalmente tampoco en la edad adulta por lo que esos animales fueron tratados con BE durante 5 semanas antes de las pruebas de lordosis y mostraron niveles sumamente bajos de receptividad. Es inquietante que nuestras hembras tratadas con el inhibidor de aromatización, ATD, durante un periodo de diferenciación particularmente importante, 10 días antes y 12 después del nacimiento, se comporten de manera radicalmente opuesta, es decir, presentan mayor conducta de receptividad que las hembras control. Creemos que la razón estriba en la existencia de un segundo periodo de diferenciación para la conducta de lordosis en la hembra durante el desarrollo prepuberal o puberal, y que el remplazó de estradiol que recibieron las hembras ArKO no simuló de manera adecuada la presencia de estradiol durante la

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

pubertad o el periodo en que recibieron el reemplazo de estradiol no fue adecuado (alrededor de la semana 35 de edad). Esto puede ser posible ya que el estradiol es responsable de iniciar los ciclos estrales y la pubertad en general (Ruf et al., 1976; Docke y Dömer, 1978). Además en hembras ovariectomizadas neonatalmente la secreción de LH y FSH es menor (Christakos et al., 1976). Esto hace suponer que la disminución de conducta de lordosis observada en las hembras ArKO pueda deberse a un efecto sobre la iniciación de la pubertad y no a un efecto sobre la diferenciación perinatal.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES

Con respecto a los objetivos particulares:

- Los objetivos particulares del experimento 1 fueron:
 - 1) Analizar el efecto de la administración perinatal de ATD o flutamida sobre la conducta coital tanto masculina como femenina como en las preferencias olfatoria y sexual
- 2) Determinar si el efecto inducido por cada uno de los tratamientos era un efecto organizacional o activacional.

Como se mencionó, el experimento fue diseñado para determinar si los efectos observados en la conducta coital eran debidos a un procesamiento inadecuado de las señales olfatorias o a un cambio real de preferencia de compañero sexual. Nuestros resultados mostraron que el aumento de conducta de lordosis observado en las hembras de ATD puede ser debido a que la ausencia de estradiol es la señal para que la vía neuronal responsable de la lordosis se forme. Por lo tanto, sugerimos que la conducta de lordosis mostrada por los machos ATD no es debida a una preferencia por los machos, sino a un aumento o desinhibición del reflejo de lordosis.

Para determinar si el tratamiento perinatal modificaba la conducta de manera activacional u organizacional sugerimos que si la conducta observada en los animales se modificaba o reestablecía con reemplazo hormonal, entonces se trataba de una activación de la conducta por las hormonas administradas en la vida adulta. Si por el contrario, la terapia hormonal no modificaba la conducta observada, entonces el tratamiento perinatal había afectado la organización del o de los sistemas neuronales o neuroendócrinos durante el desarrollo. Bajo este punto de vista concluimos que:

- La inhibición de la aromatización interviene en la organización de los sistemas neuronales responsables de la respuesta de lordosis, la preferencia olfatoria en el macho, la conducta de cópula regulada en la hembra y la capacidad reproductiva en las hembras: sólo 1 de 4 hembras tratadas perinatalmente con ATD quedó preñada pero sus crías murieron antes de los 5 días de edad; estos datos coinciden con los obtenidos con antiestrógenos (Dohler et al., 1984b).
- Los andrógenos participan en la organización de los sistemas neuronales responsables de la conducta coital masculina y de la preferencia olfatoria en el macho; nuestros

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

resultados sugieren que modulan la respuesta del sistema hacia una respuesta típicamente masculina. Además participan en el desarrollo de los testículos. Sin embargo, existen mecanismos compensatorios que permiten que al menos uno de los dos testículos se desarrolle hasta su tamaño normal; por razones que desconocemos se privilegia el desarrollo del testículo izquierdo sobre el derecho.

- La falta de estimulación androgénica o estrogénica no participa, al menos de forma independiente, en la organización de la conducta coital masculina mostrada por las hembras, en la organización de la preferencia sexual de hembras y machos y tampoco en la organización de la preferencia olfatoria en las hembras.
 - Los andrógenos y los estrógenos intervienen en el desarrollo de los ovarios y de la próstata.
 - La conducta coital masculina es activada por propionato de testosterona, mientras que el tratamiento con BE y P activa la conducta de montas de solicitud en hembras.
 - La preferencia sexual de la hembra es activada por BE y P. El PT o el BE y la P no participan de manera diferencial para activar la preferencia sexual del macho por la hembra.
 - La experiencia sexual previa determina el papel activacional de las hormonas sobre la preferencia olfatoria del macho: si tienen experiencia masculina, el PT activa la preferencia por el olor de hembras receptoras, mientras que si los machos sólo tienen experiencia coital femenina (con un macho) el tratamiento con BE y P propiciará la activación de la preferencia por el olor de machos. En las hembras, el tratamiento con BE y la P activa la preferencia por el macho.
- Los objetivos de los experimentos 2 y 3 fueron demostrar que la testosterona (experimento 2) y/o el estradiol (experimento 3) participan en la diferenciación sexual femenina, particularmente en la diferenciación de una conducta proceptiva (la capacidad de controlar la cópula) y en la diferenciación de las propiedades reforzantes de la cópula regulada. Nuestras conclusiones son las siguientes:
 - Los andrógenos no participan en la diferenciación sexual femenina de la conducta coital controlada por las hembras ("pacing") ni tampoco en el estado reforzante inducido por la cópula. Al contrario, mostramos que la influencia androgénica proveniente de los testículos fetales de los machos adyacentes a las hembras durante el desarrollo embrionario induce ciertas características aversivas a la cópula que son eliminadas al bloquear dicha estimulación

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

androgénica. Sin embargo, aparentemente existen otras características aversivas de la cópula que no son dadas por la presencia prenatal de andrógenos.

- El estradiol parece intervenir en la diferenciación de la conducta de cópula regulada y en el estado afectivo positivo inducido por la misma, ya que las hembras tratadas perinatalmente con ATD no regulan la cópula y desarrollaron un cambio de preferencia de lugar independientemente de si se les dió o no la oportunidad de regularla.
- El objetivo del experimento 4 fue determinar si los machos tratados perinatalmente con ATD eran capaces de regular la interacción sexual con otro macho estímulo y si esta actividad era capaz de inducirles un estado afectivo positivo (reforzante). Concluimos que:
 - Los machos tratados con ATD no regulan la interacción coital con otro macho.
 - La interacción coital indujo un cambio de preferencia de lugar no sólo en los machos tratados con ATD, sino también en los otros animales control, por lo que en este sentido sólo podemos concluir que es necesario determinar las causas que propiciaron la inducción del estado reforzante en los machos al interaccionar sexualmente con los machos estímulo.
- En el experimento 5 se trataron de alcanzar dos objetivos, dichos objetivos y las conclusiones se describen a continuación:
 - El primer objetivo de este experimento fue determinar si el bloqueo de la aromatización tanto prenatal como postnatal era capaz de feminizar la respuesta del sistema responsable de responder al olor estral (sistema de proyección vomeronasal u olfatorio accesorio).
 - Concluimos que la aromatización no interviene de manera independiente en la feminización de la respuesta del sistema olfatorio accesorio a olores de hembra en estro.
 - El segundo objetivo fue evaluar la posibilidad de que fuera la testosterona por sí misma la responsable de organizar (masculinizar) la respuesta del sistema de proyección vomeronasal tanto en hembras como en machos. Es decir que fuera la testosterona proveniente de los testículos fetales adyacentes a las hembras la responsable de que las ratas hembras respondieran al olor de hembras en estro.
 - Concluimos que los andrógenos provenientes de los testículos fetales son sólo parcialmente responsables de la activación del sistema olfatorio accesorio a las señales provenientes de la orina de hembras en estro en las hembras tratadas con propionato de testosterona.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Con respecto al objetivo general:

El objetivo general de esta tesis fue investigar el efecto de la inhibición perinatal de la formación de estrógeno o del bloqueo prenatal de la acción de andrógenos sobre la diferenciación sexual conductual y cerebral en ratas.

Concluimos que el objetivo general fue cumplido de manera parcial. Existen aspectos de la diferenciación sexual conductual y cerebral que no fueron abarcados en el trabajo. Sólo como ejemplo baste mencionar la evaluación sistemática de las conductas proceptivas, la secreción cíclica (hembras) o continua (machos) de gonadotropinas, los núcleos neuronales sexualmente dimórficos y la respuesta del sistema olfatorio accesorio al olor de machos.

Con respecto a la hipótesis:

Nuestra hipótesis de trabajo fue que la inhibición de la aromatización de la testosterona a estradiol inducirá que los machos no mostren conducta coital masculina sino conducta de lordosis y que sus preferencias sexual y olfatoria sean como las de las hembras, es decir, que mostren preferencia por el macho y por el olor proveniente del macho. Bajo esta hipótesis los sujetos tratados con ATD, tanto hembras como machos, no debieron mostrar conductas típicamente masculinas. Nuestros resultados mostraron que la aromatización es importante para el proceso de "desfeminización" de la conducta coital, pero no para el de masculinización. Por lo tanto, nuestra hipótesis es rechazada.

Nuestros experimentos mostraron que la conducta de lordosis desplegada por los machos ATD no necesita de una hormona activacional particular: los machos ATD muestran conducta de lordosis cuando se les trata con testosterona o con estradiol y progesterona. Esto, junto con el hecho de no presentar preferencia sexual por el macho, indica que la ausencia de estradiol facilita el reflejo de lordosis, más que aumentar la motivación para interactuar con un macho.

Aparentemente los andrógenos van organizando gradualmente las vías neuronales de las conductas típicamente masculinas, de tal manera que lo hacen de menor a mayor complejidad: primero la monta, luego la intromisión y finalmente la eyaculación. Podemos suponer que una cantidad relativamente pequeña de testosterona no es capaz de completar el proceso gradual de masculinización de las vías neuronales.

Por lo tanto, postulamos dos hipótesis que surgen del trabajo:

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- 1) La conducta coital masculina no es organizada perinatalmente en la rata, sino lo que es organizado es la sensibilidad a la testosterona. Es decir, las vías neuronales responsables de la expresión de las conductas de monta, intromisión y eyaculación se encuentran tanto en machos como en hembras, pero en las hembras el funcionamiento de dichas vías se encuentre altamente inhibido. Por lo tanto, en la hembra la conducta de monta se induciría con dosis más altas de testosterona. Nombramos a esta posibilidad "hipótesis de desinhibición".
- 2) La otra hipótesis es que la organización de las vías neuronales que regulan la conducta sexual masculina depende de la presencia de testosterona o de estradiol, cualquiera de estas hormonas sería suficiente para que a falta de una la otra pueda inducir ciertas características para la expresión de la conducta coital masculina. A esta otra posibilidad la llamamos "hipótesis de redundancia" y podría explicar los efectos encontrados en la conducta coital masculina, en la preferencia sexual, en el condicionamiento de preferencia de lugar y en la respuesta del sistema olfatorio accesorio a las señales provenientes de una hembra en estro. Previamente se ha demostrado que la administración conjunta de un antagonista de receptores de andrógenos (flutamida) y de un inhibidor de la aromatización (fadrazol) bloquea la masculinización de la conducta de agresión en el pichón macho, conducta que no puede ser eliminada por la administración separada de los fármacos (Soma et al., 1999). Esto concuerda con nuestra "hipótesis de redundancia", es decir, al bloquear solo el efecto androgénico o el estrogénico el otro sería capaz de inducir la diferenciación de las vías neuronales responsables de la conducta.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

REFERENCIAS

- Adler, N y Allen, T (1983). The origin of sexual behavior. Handbook of behavioral neurobiology, Stainoff y Teitelbaum. New York, Plenum Press: 475-509.
- Al Sati, M y Aron, C. 1977. Influence of olfactory bulb removal on sexual receptivity in the rat. Psychoneuroendocrinology 2: 399-407.
- Allen, L.S, Hines, M, Shryne, JE y Gorski, R.A. 1989. Two sexually dimorphic cell groups in the human brain. J Neurosci 9: 497-506.
- Alleva, FR, Alleva, JJ y Umberger, EJ. 1969. Effect of a single prepubertal injection of testosterone propionate on later reproductive functions of the female golden hamster. Endocrinology 85: 312-8.
- Allison, A. 1953. The morphology of the olfactory system in the vertebrates. Biol Rev 28: 195-244.
- Bakker, J (1996). Sexual differentiation of the brain and partner preference in the male rat. Endocrinologic & Voortplanting. Rotterdam, Erasmus Universiteit Rotterdam: 255.
- Bakker, J, Baum, MJ y Slob, AK. 1996a. Neonatal inhibition of brain estrogen synthesis alters adult neural Fos responses to mating and pheromonal stimulation in the male rat. Neuroscience 74: 251-60.
- Bakker, J, Honda, S, Harada, N y Balthazart, J. 2002a. The aromatase knock-out mouse provides new evidence that estradiol is required during development in the female for the expression of sociosexual behaviors in adulthood. J Neurosci 22: 9104-12.
- Bakker, J, Honda, S, Harada, N y Balthazart, J. 2002b. Sexual partner preference requires a functional aromatase (cyp19) gene in male mice. Horm Behav 42: 158.
- Bakker, J, Van Ophemert, J y Slob, AK. 1996b. Sexual differentiation of odor and partner preference in the rat. Physiol Behav 60: 489-94.
- Bakker, J, Van Ophemert, J, Timmerman, M.A, de Jong, FH y Slob, AK. 1995. Endogenous reproductive hormones and nocturnal rhythms in partner preference and sexual behavior of ATD-treated male rats. Neuroendocrinology 62: 396-405.
- Balthazart, J, Foidart, A, Surllement, C, Harada, N y Naftolin, F. 1992. Neuroanatomical specificity in the autoregulation of aromatase-immunoreactive neurons by androgens and estrogens: an immunocytochemical study. Brain Res 574: 280-90.
- Balthazart, J, Foidart, A, Surllement, C, Voelck, A y Harada, N. 1990. Distribution of aromatase in the brain of the Japanese quail, ring dove, and zebra finch: an immunocytochemical study. J Comp Neurol 301: 276-88.
- Barber, PC y Raisman, G. 1974. An autoradiographic investigation of the projection of the vomeronasal organ to the accessory olfactory bulb in the mouse. Brain Res 81: 21-30.
- Barfield, RJ, Busch, DE y Wallen, K. 1972. Gonadal influence on agonistic behavior in the male domestic rat. Horm Behav 3: 247-59.
- Barr, GA, Gibbons, JL y Moyer, KE. 1976. Male-female differences and the influence of neonatal and adult testosterone on intraspecies aggression in rats. J Comp Physiol Psychol 90: 1169-83.
- Baulieu, EE, Robel, P y Schumacher, M. 2001. Neurosteroids: beginning of the story. Int Rev Neurobiol 46: 1-32.
- Baum, MJ (1992). Neuroendocrinology of sexual behavior in the male. Behavioral Endocrinology. J. B. Becker, S. M. Breedlove y D. Crews: 97-139.
- Baum, MJ, Sodersten, P y Vreeburg, JT. 1973. Mounting and receptive behavior in the ovariectomized female rat: influence of estradiol, dihydrotestosterone, and genital anesthesia. Horm Behav 5: 175-90.
- Baum, MJ y Tobet, SA. 1986. Effect of prenatal exposure to aromatase inhibitor, testosterone, or antiandrogen on the development of feminine sexual behavior in ferrets of both sexes. Physiol Behav 37: 111-8.
- Baum, MJ y Vreeburg, JT. 1973. Copulation in castrated male rats following combined treatment with estradiol and dihydrotestosterone. Science 182: 283-5.
- Baum, MJ y Vreeburg, JT. 1976. Differential effects of the anti-estrogen MIER-25 and of three 5alpha-reduced androgens on mounting and lordosis behavior in the rat. Horm Behav 7: 87-104.
- Baum, MJ, Woutersen, PJ y Slob, AK. 1991. Sex difference in whole-body androgen content in rats on fetal days 18 and 19 without evidence that androgen passes from males to females. Biol Reprod 44: 747-51.
- Beach, FA. 1942a. Analysis of factors involved in the arousal, maintenance and manifestation of sexual excitement in male animals. Psychosom Med 4: 173-198.
- Beach, FA. 1942b. Importance of progesterone for induction of sexual receptivity in spayed female rats. Proc Soc Exp Biol Med 51: 369-371.
- Beach, FA. 1942c. Male and female mating behavior in prepuberally castrated female rats treated with androgen. Endocrinology 31: 373-378.
- Beach, FA (1956). Characteristics of masculine "sex drive". Nebraska Symposium on Motivation. R. M. Jones, University of Nebraska Press, Lincoln: 1-32.
- Beach, FA. 1976. Sexual attractivity, proceptivity, and receptivity in female mammals. Horm Behav 7: 105-38.
- Beach, FA, Noble, RG y Orndoff, RK. 1969. Effects of perinatal androgen treatment on responses of male rats to gonadal hormones in adulthood. J Comp Physiol Psychol 68: 490-7.
- Beach, FA y Westbrook, WH. 1968. Morphological and behavioural effects of an "antiandrogen" in male rats. J Endocrinol 42: 379-82.
- Beato, M. 1989. Gene regulation by steroid hormones. Cell 56: 335-44.
- Beato, M, Herrlich, P y Schutz, G. 1995. Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. Cell 83: 851-7.
- Beatty, WW (1992). Gonadal hormones and sex differences in nonreproductive behaviors. Sexual differentiation. A. A. Gerall, H. Moltz y I. L. Ward. New York, Plenum Press. 11: 85-128.
- Benjamin, RM, Jackson, JC, Golden, GT y West, CH. 1982. Sources of olfactory inputs to opossum mediadorsal nucleus identified by horseradish peroxidase and autoradiographic methods. J Comp Neurol 207: 355-68.
- Bernard, BK y Paolino, RM. 1975. Temporal effects of castration on emotionality and shock-induced aggression in adult male rats. Physiol Behav 14: 291-6.
- Berta, P, Hawkins, JR, Sinclair, AH, Taylor, A, Griffiths, BL, Goodfellow, PN y Fellous, M. 1990. Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. Nature 348: 448-50.
- Beyer, C (1980). A model for explaining estrogen progesterone interaction in induction of lordosis behavior. Endocrinology. I. A. Cummins, J. W. Funder y M. F.A.D. Cambera, Australia Academic of Sciences: 101-104.

- Beyer, C, Larsson, K, Perez Palacios, G y Morali, G. 1973. Androgen structure and male sexual behavior in the castrated rat. Horm Behav 4: 99-108.
- Beyer, C, Morali, G, Naftolin, F, Larsson, K y Perez, p. 1976. Effect of some antiestrogens and aromatase inhibitors on androgen induced sexual behavior in castrated male rats. Horm Behav 7: 353-63.
- Beyer, C, Morali, G y Vargas, R. 1971. Effect of diverse estrogens on estrous behavior and genital tract development in ovariectomized rats. Horm Behav 2: 273-277.
- Blizard, D y Dener, C. 1973. Neonatal androgen effects on open-field activity and sexual behavior in the female rat: the modifying influence of ovarian secretions during development. Physiol Behav 11: 65-9.
- Boling, JL y Blandau, RJ. 1939. The estrogen-progesterone induction of mating responses in the spayed female rat. Endocrinology 25: 359-364.
- Booth, JE. 1977. Sexual behaviour of male rats injected with the anti-oestrogen MER-25 during infancy. Physiol Behav 19: 35-9.
- Booth, JE. 1978. Effects of the aromatization inhibitor androst-4-ene-3,6,17-irione on sexual differentiation induced by testosterone in the neonatally castrated rat. J Endocrinol 79: 69-76.
- Brackett, NL y Edwards, DA. 1984. Medial preoptic connections with the midbrain tegmentum are essential for male sexual behavior. Physiol Behav 32: 79-84.
- Bradbury, JT. 1941. Endocrinology 28: 101-106.
- Brand, T, Kroonen, J, Mos, J y Slob, AK. 1991. Adult partner preference and sexual behavior of male rats affected by perinatal endocrine manipulations. Horm Behav 25: 323-41.
- Brand, T y Slob, AK. 1991a. Neonatal organization of adult partner preference behavior in male rats. Physiol Behav 49: 107-11.
- Brand, T y Slob, AK. 1991b. On the organization of partner preference behavior in female Wistar rats. Physiol Behav 49: 549-55.
- Brand, T y Slob, AK. 1991c. Perinatal flutamide and mounting and lordosis behavior in adult female Wistar and Sprague-Dawley rats. Behav Brain Res 44: 43-51.
- Bressler, SC y Baum, MJ. 1996. Sex comparison of neuronal Fos immunoreactivity in the rat vomeronasal projection circuit after chemosensory stimulation. Neuroscience 71: 1063-72.
- Caggiula, AR, Antelman, SM y Zigmond, MJ. 1974. Ineffectiveness of sexually arousing stimulation after hypothalamic lesions in the rat. Physiol Behav 12: 313-6.
- Cain, DP. 1974. The role of the olfactory bulb in limbic mechanisms. Psychol Bull 81: 654-71.
- Caminero, AA, Segovia, S y Guillamon, A. 1991. Sexual dimorphism in accessory olfactory bulb mitral cells: a quantitative Golgi study. Neuroscience 45: 663-70.
- Carr, WJ, Loeb, LS y Dissinger, ML. 1965. Responses of rats to sex odors. J Comp Physiol Psychol 59: 370-377.
- Carrer, H, Asch, G y Aron, C. 1973. New facts concerning the role played by the ventromedial nucleus in the control of estrous cycle duration and sexual receptivity in the rat. Neuroendocrinology 13: 129-38.
- Carrer, HF. 1975. Mesencephalic participation in the control of sexual behavior in the female rat. J Comp Physiol Psychol 92: 877-87.
- Clark, AS, Pfeiffer, JK y Edwards, DA. 1981. Ventromedial hypothalamic damage and sexual receptivity in female rats. Physiol Behav 27: 597-602.
- Clemens, LG y Christensen, LW (1975). Sexual behavior. The behaviour of domestic animals. Hafetz. London, Bailliere Tindal: 108-143.
- Clemens, LG y Gladue, BA. 1978. Feminine sexual behavior in rats enhanced by prenatal inhibition of androgen aromatization. Horm Behav 11: 190-201.
- Clemens, LG, Gladue, BA y Coniglio, LP. 1978. Prenatal endogenous androgenic influences on masculine sexual behavior and genital morphology in male and female rats. Horm Behav 10: 40-55.
- Clemens, LG y Weaver, DR (1955). The role of gonadal hormones in the activation of feminine sexual behavior. Handbook of Behavioral Neuroendocrinology. N. Adler, D. Pfaff y R. W. Goy. New York and London, Plenum Press. 7: 1833-1858.
- Commins, D y Yahr, P. 1984. Adult testosterone levels influence the morphology of a sexually dimorphic area in the Mongolian gerbil brain. J Comp Neurol 224: 132-40.
- Conrad, LC y Pfaff, DW. 1976a. Efferents from medial basal forebrain and hypothalamus in the rat. I. An autoradiographic study of the medial preoptic area. J Comp Neurol 169: 185-219.
- Conrad, LC y Pfaff, DW. 1976b. Efferents from medial basal forebrain and hypothalamus in the rat. II. An autoradiographic study of the anterior hypothalamus. J Comp Neurol 169: 221-61.
- Chiba, T y Murata, Y. 1955. Afferent and efferent connections of the medial preoptic area in the rat: a WGA-HRP study. Brain Res Bull 14: 261-72.
- Choate, JV y Resko, JA. 1994. Prenatal inhibition of aromatase activity affects luteinizing hormone feedback mechanisms and reproductive behaviors of adult guinea pigs. Biol Reprod 51: 1273-8.
- Christakos, S, Sinha, D y Dao, TL. 1976. Neonatal modification of endocrine functions and mammary carcinogenesis in the rat. Br J Cancer 34: 55-63.
- Christensen, LW y Clemens, LG. 1974. Intrahypothalamic implants of testosterone or estradiol and resumption of masculine sexual behavior in long-term castrated male rats. Endocrinology 95: 984-90.
- Christensen, LW y Gorski, RA. 1978. Independent masculinization of neuroendocrine systems by intracerebral implants of testosterone or estradiol in the neonatal female rat. Brain Res 146: 325-40.
- Christie, MH y Barfield, RJ. 1979. Effects of aromatizable androgens on aggressive behaviour among rats (*rattus norvegicus*). J Endocrinol 83: 17-26.
- Davidson, JM. 1966. Activation of male rat's sexual behavior by intracerebral implantation of androgen. Endocrinology 79: 783-794.
- Davies, P, Syme, JS y Nicholson, RI. 1979. Effects of estradiol and the antiestrogen tamoxifen on steroid hormone receptor concentration and nuclear ribonucleic acid polymerase activities in rat uteri. Endocrinology 105: 1336-42.
- Davis, PG y Barfield, RJ. 1979. Activation of masculine sexual behavior by intracranial estradiol benzoate implants in male rats. Neuroendocrinology 28: 217-27.
- Davis, PG, Chaptal, CV y McEwen, BS. 1979. Independence of the differentiation of masculine and feminine sexual behavior in rats. Horm Behav 12: 12-9.

- de Olmos, J., Hardy, H y Heimer, L. 1978. The afferent connections of the main and the accessory olfactory bulb formations in the rat: an experimental HRP-study. J Comp Neurol 181: 213-44.
- del Abril, A, Segovia, S y Guillamon, A. 1987. The bed nucleus of the stria terminalis in the rat: regional sex differences controlled by gonadal steroids early after birth. Brain Res 429: 295-300.
- Dempsey, EW, Hertz, R y Young, WC. 1936. The experimental induction of oestrous (sexual receptivity) in the normal and ovariectomized guinea pig. Am J Physiol 116: 201-209.
- Docke, F y Dorner, G. 1978. Anovulation in adult female rats after neonatal intracerebral implantation of oestrogen. Endokrinologie 65: 375-7.
- Docke, F y Dorner, G. 1978. [Animal experiment studies on the neurohumoral control of female puberty]. Zentralbl Gynakol 100: 3-12.
- Dohler, KD, Coquelin, A, Davis, F, Hines, M, Shryne, JE y Gorski, RA. 1982. Differentiation of the sexually dimorphic nucleus in the preoptic area of the rat brain is determined by the perinatal hormone environment. Neurosci Lett 33: 295-8.
- Dohler, KD, Coquelin, A, Davis, F, Hines, M, Shryne, JE y Gorski, RA. 1984a. Pre- and postnatal influence of testosterone propionate and diethylstilbestrol on differentiation of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in male and female rats. Brain Res 302: 291-5.
- Dohler, KD, Ganzemüller, C y Veit, C (1993). The development of sex differences and similarities in brain anatomy, physiology and behavior is under complex hormonal control. The development of sex differences and similarities in behavior. M. Haug. The Netherlands, Kluwer Academic Publisher: 341-361.
- Dohler, KD, Srivastava, SS, Shryne, JE, Jarzab, B, Sipos, A y Gorski, RA. 1984b. Differentiation of the sexually dimorphic nucleus in the preoptic area of the rat brain is inhibited by postnatal treatment with an estrogen antagonist. Neuroendocrinology 38: 297-301.
- Dohler, KD y Wutke, W. 1975. Changes with age in levels of serum gonadotropins, prolactin and gonadal steroids in prepubertal male and female rats. Endocrinology 97: 898-907.
- Dorner, G. 1980. Sexual differentiation of the brain. Vitam Horm 38: 325-81.
- Dorner, G, Docke, F y Goiz, F. 1975. Male-like sexual behaviour of female rats with unilateral lesions in the hypothalamic ventromedial nuclear region. Endokrinologie 65: 133-7.
- Dorner, G, Docke, F y Hinz, G. 1969. Homo- and hyper-sexuality in rats with hypothalamic lesions. Neuroendocrinology 4: 20-24.
- Dorner, G, Docke, F y Hinz, G. 1971. Paradoxical effects of estrogen on brain differentiation. Neuroendocrinology 7: 146-55.
- Doughty, C, Booth, JE, McDonald, PG y Parrott, RF. 1975. Effects of oestradiol-17beta, oestradiol benzoate and the synthetic oestrogen RU 2858 on sexual differentiation in the neonatal female rat. J Endocrinol 67: 419-24.
- Edwards, DA. 1971. Neonatal administration of androstenedione, testosterone or testosterone propionate: effects on ovulation, sexual receptivity and aggressive behavior in female mice. Physiol Behav 6: 223-8.
- Edwards, DA y Einhorn, LC. 1986. Preoptic and midbrain control of sexual motivation. Physiol Behav 37: 329-35.
- Edwards, DA y Pfeifle, JK. 1983. Hormonal control of receptivity, proceptivity and sexual motivation. Physiol Behav 30: 437-43.
- Edwards, DA y Warner, P. 1972. Olfactory bulb removal facilitates the hormonal induction of sexual receptivity in the female rat. Horm Behav 3: 321-332.
- Edwards, DA, Whalen, RE y Nadler, RD. 1968. Induction of estrus: estrogen-progesterone interactions. Physiol Behav: 29-33.
- Emery, D y Moss, RL. 1984. Lesions confined to the ventromedial hypothalamus decrease the frequency of coital contacts in female rats. Horm Behav 18: 313-29.
- Emery, DE y Sachs, BD. 1975. Ejaculatory pattern in female rats without androgen treatment. Science 190: 484-6.
- Emery, DE y Sachs, BD. 1976. Hormonal and monoaminergic influences on masculine copulatory behavior in the female rat. Horm Behav 7: 341-52.
- Erskine, MS. 1989. Solicitation behavior in the estrous female rat: a review. Horm Behav 23: 473-502.
- Everitt, BJ y Stacey, P. 1987. Studies of instrumental behavior with sexual reinforcement in male rats (*Rattus norvegicus*): II. Effects of preoptic area lesions, castration, and testosterone. J Comp Psychol 101: 407-19.
- Fang, J y Clemens, LG. 1999. Vaginoocervical stimulation inhibits female-female mounting in laboratory rats. Physiol Behav 67: 75-9.
- Feder, HH. 1971. The comparative actions of testosterone propionate and 5-androstan-17-ol-3-one propionate on the reproductive behaviour, physiology and morphology of male rats. J Endocrinol 51: 241-52.
- Feder, HH y Whalen, RE. 1965. Science 147: 306-307.
- Fernandez-Guasti, A, Larsson, K y Beyer, C. 1985. Comparison of the effects of different isomers of bicuculline infused in the preoptic area on male rat sexual behavior. Experientia 41: 1414-6.
- Fleming, AS y Rosenblatt, JS. 1974. Olfactory regulation of maternal behavior in rats. II. Effects of peripherally induced anosmia and lesions of the lateral olfactory tract in pup-induced virgins. J Comp Physiol Psychol 86: 233-46.
- Flerko, B, Petrusz, P y Tima, L. 1967. On the mechanism of sexual differentiation of the hypothalamus. Factors influencing the "critical period" of the rat. Acta Biol 18: 27-36.
- Fuller, GN y Burger, PC. 1990. Nervus terminalis (cranial nerve zero) in the adult human. Clin Neuropathol 9: 279-83.
- Gerall, AA. 1967. Effects of early postnatal androgen and estrogen injections on the estrous activity cycles and mating behavior of rats. Anat Rec 157: 97-104.
- Giantonio, WG, Lund, NL y Gerall, AA. 1970. Effect of diencephalic and rhinencephalic lesions on the male rat's sexual behavior. J Comp Physiol Psychol 73: 36-46.
- Gibori, G, Basuray, R y Reynolds, B. 1981. Lutetotropic role of the decidual tissue in the rat: dependency on intraluteal estradiol. Endocrinology 108: 2060-6.
- Ginton, A y Merari, A. 1977. Long range effects of MPOA lesion on mating behavior in the male rat. Brain Res 120: 158-63.
- Giordano, M, Guemes, M, Lopez-Arias, V y Paredes, RG. 1998. Socio-sexual behavior in male rats after lesions of the dorsolateral tegmentum. Physiol Behav 65: 89-94.
- Gladue, BA y Clemens, LG. 1978. Androgenic influences on feminine sexual behavior in male and female rats: defeminization blocked by prenatal antiandrogen treatment. Endocrinology 103: 1702-9.
- Gladue, BA y Clemens, LG. 1980a. Flutamide inhibits testosterone-induced masculine sexual behavior in male and female rats. Endocrinology 106: 1917-22.

- Gladue, BA y Clemens, LG. 1980b. Masculinization diminished by disruption of prenatal estrogen biosynthesis in male rats. Physiol Behav 25: 589-93.
- Gladue, BA, Dohanich, GP y Clemens, LG. 1978. Hormonally mediated lordosis in female rats: actions of flutamide and an aromatization inhibitor. Pharmacol Biochem Behav 9: 827-32.
- Glaser, JH, Rubin, BS y Barfield, RJ. 1983. Onset of the receptive and proceptive components of feminine sexual behavior in rats following the intravenous administration of progesterone. Horm Behav 17: 18-27.
- Gore-Langton, RE y Armstrong, DT (1994). Follicular steroidogenesis and its control. The physiology of reproduction. E. Knobil y J. D. Neill. New York, Raven Press. 1: 571-627.
- Gorski, RA. 1963. Modification of ovulatory mechanisms by postnatal administration of estrogen to the rat. Am J Physiol 205: S42-4.
- Gorski, RA, Gordon, JH, Shryne, JE y Southam, AM. 1978. Evidence for a morphological sex difference within the medial preoptic area of the rat brain. Brain Res 148: 333-46.
- Gorski, RA, Harlan, RE, Jacobson, CD, Shryne, JE y Southam, AM. 1980. Evidence for the existence of a sexually dimorphic nucleus in the preoptic area of the rat. J Comp Neurol 193: 529-39.
- Grady, KL y Phoenix, CH. 1963. Am Zool 3: 482-483.
- Greco, B, Allegretto, EA, Tetel, MJ y Blaustein, JD. 2001. Coexpression of ER beta with ER alpha and progesterin receptor proteins in the female rat forebrain: effects of estradiol treatment. Endocrinology 142: 5172-81.
- Greco, B, Edwards, DA, Michael, RP y Clancy, AN. 1998. Androgen receptors and estrogen receptors are colocalized in male rat hypothalamic and limbic neurons that express Fos immunoreactivity induced by mating. Neuroendocrinology 67: 18-28.
- Gubbay, J, Collignon, J, Koopman, P, Capel, B, Economou, A, Munsterberg, A, Vivian, N, Goodfellow, P y Lovell-Badge, R. 1990. A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. Nature 346: 245-50.
- Guillamon, A y Segovia, S. 1997. Sex differences in the vomeronasal system. Brain Res Bull 44: 377-82.
- Guldner, FH. 1982. Sexual dimorphisms of axo-spine synapses and postsynaptic density material in the suprachiasmatic nucleus of the rat. Neurosci Lett 28: 145-50.
- Halpern, NI. 1987. The organization and function of the vomeronasal system. Annu Rev Neurosci 10: 325-62.
- Hamilton, LW y Timmons, CR. 1976. Sex differences in response to taste and postingestive consequences of sugar solutions. Physiol Behav 17: 221-5.
- Handa, RJ, Corbier, P, Shryne, JE, Schoonmaker, JN y Gorski, RA. 1985. Differential effects of the perinatal steroid environment on three sexually dimorphic parameters of the rat brain. Biol Reprod 32: 555-64.
- Hansen, S. 1982. Hypothalamic control of motivation: the medial preoptic area and masculine sexual behaviour. Scand J Psychol Suppl 1: 121-6.
- Hansen, S, Kohler, C, Goldstein, M y Steinbusch, HV. 1982. Effects of ibotenic acid-induced neuronal degeneration in the medial preoptic area and the lateral hypothalamic area on sexual behavior in the male rat. Brain Res 239: 213-32.
- Hansen, S, Stanfield, EJ y Everitt, BJ. 1980. The role of ventral bundle noradrenergic neurones in sensory components of sexual behaviour and coitus-induced pseudopregnancy. Nature 286: 152-4.
- Hansen, S, Stanfield, EJ y Everitt, BJ. 1981. The effects of lesions of lateral tegmental noradrenergic neurones on components of sexual behavior and pseudopregnancy in female rats. Neuroscience 6: 1105-17.
- Hardy, DF y De Bold, JF. 1972. Effects of coital stimulation upon behavior of the female rat. J Comp Physiol Psychol 78: 400-408.
- Hardy, DF y DeBold, JF. 1971. The relationship between levels of exogenous hormones and the display of lordosis by the female rat. Horm Behav 2: 287-297.
- Harris, GW. 1964. Endocrinology 75: 627-648.
- Harris, VS y Sachs, BD. 1975. Copulatory behavior in male rats following amygdaloid lesions. Brain Res 86: 514-8.
- Hart, BL y Leedy, NG (1985). Neurological bases of male sexual behavior: A comparative analysis. Handbook of behavioral neurobiology. N. Adler, D. Pfaff y R. W. Goy. New York, Plenum Press. 2: 373-422.
- Heimer, L y Larsson, K. 1964. Drastic changes in the mating behaviour of male rats following lesions in the junction of diencephalon and mesencephalon. Experientia 20: 460-1.
- Heimer, L y Larsson, K. 1966-1967. Impairment of mating behavior in male rats following lesions in the preoptic-anterior hypothalamic continuum. Brain Research 3: 248-263.
- Hennessey, AC, Camak, L, Gordon, F y Edwards, DA. 1990. Connections between the pontine central gray and the ventromedial hypothalamus are essential for lordosis in female rats. Behav Neurosci 104: 477-88.
- Hines, M, Davis, FC, Coquelin, A, Goy, RW y Gorski, RA. 1985. Sexually dimorphic regions in the medial preoptic area and the bed nucleus of the stria terminalis of the guinea pig brain: a description and an investigation of their relationship to gonadal steroids in adulthood. J Neurosci 5: 40-7.
- Houtsmuller, EJ, Brand, T, de Jonge, FH, Joosten, RN, van de Poll, NE y Slob, AK. 1994. SDN-POA volume, sexual behavior, and partner preference of male rats affected by perinatal treatment with ATD. Physiol Behav 56: 535-41.
- Hughes, AM, Everitt, BJ y Herbert, J. 1990. Comparative effects of preoptic area infusions of opioid peptides, lesions and castration on sexual behaviour in male rats: studies of instrumental behaviour, conditioned place preference and partner preference. Psychopharmacology (Berl) 102: 243-56.
- Jacobson, CD y Gorski, RA. 1981. Neurogenesis of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in the rat. J Comp Neurol 196: 519-29.
- Jager, RJ, Anvret, M, Hall, K y Scherer, G. 1990. A human XY female with a frame shift mutation in the candidate testis-determining gene SRY. Nature 348: 452-4.
- Johnston, P y Davidson, JM. 1972. Intracerebral androgens and sexual behavior in the male rat. Horm Behav 3: 345-357.
- Keel, BA y Abney, TO. 1984. The kinetics of o-rogen binding to rat alpha-fetoprotein. Experientia 40: 503-5.
- Kelly, WK y Scher, HL. 1993. Prostate specific antigen decline after antiandrogen withdrawal: the flutamide withdrawal syndrome. J Urol 149: 607-9.
- Kennedy, GC. 1963. Hypothalamic control of energy balance and the reproductive cycle in the rat. J Physiol (Lond) 166: 395-407.
- Kennedy, GC. 1964. Hypothalamic control of the endocrine and behavioral changes associated with oestrous in the rat. J Physiol (Lond) 172: 383-392.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Keverne, EB. 1995. Olfactory learning. *Curr Opin Neurobiol* 5: 482-8.
- Kikusui, T, Takigami, S, Takeuchi, Y y Mori, N. 2001. Alarm pheromone enhances stress-induced hyperthermia in rats. *Physiol Behav* 72: 45-50.
- Knapstein, P, David, A, Wu, CH, Archer, DF, Flickinger, GL y Toehstone, JC. 1968. Metabolism of free and sulfoconjugated DHEA in brain tissue in vivo and in vitro. *Steroids* 11: 885-96.
- Kobayashi, F. 1967. [Prenatal effect of androgen administration on the differentiation of sexual function in rats. (II) Estrus cycle, copulatory ability and anatomical results]. *Nippon Naibunpi Gakkai Zasshi* 43: 30-42.
- Kolonie, JM y Stern, JM. 1995. Maternal aggression in rats: effects of olfactory bulbectomy, ZnSO₄-induced anosmia, and vomeronasal organ removal. *Horm Behav* 29: 492-518.
- Komisaruk, B (1974). Neural and hormonal interaction in the reproductive behavior of female rats. *Reproductive behavior*. Montagna y Sadler. New York, Plenum Publishing Co.
- Komisaruk, B (1978). The nature of neural substrate of female sexual behavior in mammals and its hormonal sensitivity: "Review and speculations". *Biological determinants of sexual behavior*. D. L. Hutchinson y A. A. Wiley. New York, Prentice Hall: 97-123.
- Komisaruk, B, Teresawa, E y Rodriguez-Sierra, JF (1981). How the brain mediates ovarian responses to environmental stimuli. *Neuroendocrinology of Reproduction*. N. Adler. New York, Plenum Press: 349-368.
- Koopman, P, Munsterberg, A, Capel, B, Vivian, N y Lovell-Badge, R. 1990. Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature* 348: 450-2.
- Kreeck, J. 1973. Sex differences in salt taste: the effect of testosterone. *Physiol Behav* 10: 683-8.
- Kreeck, J. 1978. Effect of ovariectomy of females and oestrogen administration to males during the neonatal critical period on salt intake in adulthood in rats. *Physiol Bohemoslov* 27: 1-5.
- Kreeck, J, Novakova, V y Stibrak, K. 1972. Sex differences in the taste preference for a salt solution in the rat. *Physiol Behav* 8: 183-8.
- Labrie, F, Simard, J, Luu-The, V, Pelletier, G, Belghmi, K y Belanger, A. 1994. Structure, regulation and role of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase, 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase and aromatase enzymes in the formation of sex steroids in classical and peripheral intracrine tissues. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 8: 451-74.
- Larriva-Sahd, J, Rondan, A, Orozco-Estevéz, H y Sanchez-Robles, MR. 1993. Evidence of a direct projection of the vomeronasal organ to the medial preoptic nucleus and hypothalamus. *Neurosci Lett* 163: 45-9.
- Larsson, K. 1956. Conditioning and sexual behavior in the male albino rat. *Acta Psychol Gothoburgensia* 1.
- Larsson, K. 1975. Sexual impairment of inexperienced male rats following pre- and postpubertal olfactory bulbectomy. *Physiol Behav* 14: 195-9.
- Larsson, K (1979). Features of the neuroendocrine regulation of masculine sexual behavior. *Endocrine control of sexual behavior*. C. Beyer. New York, Raven Press.
- Larsson, K, Sodersten, P y Beyer, C. 1973. Induction of male sexual behaviour by oestradiol benzoate in combination with dihydrotestosterone. *J Endocrinol* 57: 563-4.
- Law, T y Meagher, W. 1958. Hypothalamic lesions and sexual behavior in the female rat. *Science* 128: 1626-1627.
- Leblond, CB, Morris, S, Karakulakus, G y Thomas, PJ. 1952. Development of sexual dimorphism in the suprachiasmatic nucleus of the rat. *J Endocrinol* 95: 137-145.
- Lehman, MN y Winans, SS. 1982. Vomeronasal and olfactory pathways to the amygdala controlling male hamster sexual behavior: autoradiographic and behavioral analyses. *Brain Res* 240: 27-41.
- LeMagnen, J. 1952. Les phenomenes olfacto-sexuels chez le rat blanc. *Arch Sci Physiol* 6: 295-332.
- Levine, S y Mullins, RF. 1964. *Science* 144: 185-187.
- Li, HY, Blaustein, JD, De Vries, GJ y Wade, GN. 1993. Estrogen-receptor immunoreactivity in hamster brain: preoptic area, hypothalamus and amygdala. *Brain Res* 631: 304-12.
- Lieberburg, I y McEwen, BS. 1975. Estradiol-17beta: a metabolite of testosterone recovered in cell nuclei from limbic areas of neonatal rat brains. *Brain Res* 85: 165-70.
- Lieberburg, I, Wallach, G y McEwen, BS. 1977. The effects of an inhibitor of aromatization (1,4,6-androstatriene-3,17-dione) and an anti-estrogen (CI-628) on in vivo formed testosterone metabolites recovered from neonatal rat brain tissues and purified cell nuclei. Implications for sexual differentiation of the rat brain. *Brain Res* 128: 176-81.
- Lisk, RD. 1968. Copulatory activity of the male rat following placement of preoptic-anterior hypothalamic lesions. *Exp Brain Res* 5: 306-13.
- Lumia, AR, Meisel, RL y Sachs, BD. 1981. Induction of female and male mating patterns in female rats by gonadal steroids: effects of neonatal or adult olfactory bulbectomy. *J Comp Physiol Psychol* 95: 497-509.
- Lupo, C, Dessi-Fulgheri, F, Musi, B y Larsson, K. 1953. The effect of medial preoptic-anterior hypothalamic lesions on testosterone plasma levels and testosterone conversion in the hypothalamus of male rats. *Neurosci Lett* 39: 261-5.
- Luttge, WC y Whalen, RE. 1970. Dihydrotestosterone, androstenedione, testosterone: comparative effectiveness in masculinizing and defeminizing reproductive system in male and female rats. *Horm Behav* 1: 265-281.
- Madlafousek, J, Freund, K y Grofova, I. 1970. Variables determining the effect of electrostimulation in the lateral preoptic area on the sexual behavior of male rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology* 72: 28-44.
- Malsbury, CW, Kow, LM y Pfaff, DW. 1977. Effects of medial hypothalamic lesions on the lordosis response and other behaviors in remale golden hamsters. *Physiol Behav* 19: 223-37.
- Malsbury, CW, Pfaff, DW y Malsbury, AM. 1980. Suppression of sexual receptivity in the female hamster: neuroanatomical projections from preoptic and anterior hypothalamic electrode sites. *Brain Res* 181: 267-84.
- Mathews, GA, Brenowitz, EA y Arnold, AP. 1988. Paradoxical hypermasculinization of the zebra finch song system by an antiestrogen. *Horm Behav* 22: 540-51.
- Matsumoto, A y Arai, Y. 1981. Neuronal plasticity in the deafferented hypothalamic arcuate nucleus of adult female rats and its enhancement by treatment with estrogen. *J Comp Neurol* 197: 197-205.
- Matsumoto, A y Arai, Y. 1986. Development of sexual dimorphism in synaptic organization in the ventromedial nucleus of the hypothalamus in rats. *Neurosci Lett* 68: 165-8.
- McDonald, P, Beyer, C, Newton, F, Brien, B, Baker, K, Tan, HS, Sampson, C, Kitching, P, Greenhill, R y Pritchard, D. 1970. Failure of Salpha-dihydrotestosterone to initiate sexual behaviour in the castrated male rat. *Nature* 227: 964-5.

- McDonald, PG y Doughty, C. 1972. Inhibition of androgen-sterilization in the female rat by administration of an antiestrogen. J. Endocrinol 55: 455-6.
- McDonald, PG y Doughty, C. 1974. Effect of neonatal administration of different androgens in the female rat: correlation between aromatization and the induction of sterilization. J. Endocrinol 61: 95-103.
- McEwen, BS, Lieberburg, I, Chaptal, C y Krey, LC. 1977. Aromatization: important for sexual differentiation of the neonatal rat brain. Horm Behav 9: 249-63.
- McGinnis, M, Nance, DM y Gorski, RA. 1978. Olfactory, septal and amygdala lesions alone or in combination: effects on lordosis behavior and emotionality. Physiol Behav 20: 435-40.
- Meijs-Roclofs, H.M, Uilenbroek, J.T, de Jong, FH y Welschen, R. 1973. Plasma oestradiol-17beta and its relationship to serum follicle-stimulating hormone in immature female rats. J. Endocrinol 59: 295-304.
- Meisel, RL, Lumia, AR y Sachs, BD. 1982. Disruption of copulatory behavior of male rats by olfactory bulbectomy at two, but not ten, days of age. Exp Neurol 77: 612-24.
- Meisel, RL, y Sachs, BD (1994). The physiology of male sexual behavior. The physiology of reproduction. E. Knobil y J. D. Neill. New York, Raven Press. 1: 3-105.
- Mennella, JA y Moltz, H. 1988. Infanticide in the male rat: the role of the vomeronasal organ. Physiol Behav 42: 303-6.
- Merari, A y Ginton, A. 1975. Characteristics of exaggerated sexual behavior induced by electrical stimulation of the medial preoptic area in male rats. Brain Res 86: 97-108.
- Meyerson, BJ y Lindstrom, LH. 1973. Sexual motivation in the female rat. A methodological study applied to the investigation of the effect of estradiol benzoate. Acta Physiol Scand Suppl 389: 1-80.
- Miller, WL. 1988. Molecular biology of steroid hormone synthesis. Endocr Rev 9: 295-318.
- Miyamoto, H, Yeh, S, Wilding, G y Chang, C. 1998. Promotion of agonist activity of antiandrogen by the androgen receptor coactivator, ARA70, in human prostate cancer DU145 cells. Proc Natl Acad Sci U S A 95: 7379-7384.
- Mizukami, S, Nishizuka, M y Arai, Y. 1983. Sexual difference in nuclear volume and its ontogeny in the rat amygdala. Exp Neurol 79: 569-75.
- Modianos, DT, Pitt, JC y Popelow, HB. 1975. Habenular lesions and feminine sexual behavior of ovariectomized rats: diminished responsiveness to the synergistic effects of estrogen and progesterone. J Comp Physiol Psychol 89: 231-7.
- Modianos, DT y Pfaff, DW. 1976. Brain stem and cerebellar lesions in female rats. II. Lordosis reflex. Brain Res 106: 47-56.
- Monchio-Bogani, J, Lanuza, E, Hernandez, A, Novejarque, A y Martinez-Garcia, F. 2002. Attractive properties of sexual pheromones in mice: innate or learned? Physiol Behav 77: 167-76.
- Montano, MM, Welshons, WV y vom Saal, FS. 1995. Free estradiol in serum and brain uptake of estradiol during fetal and neonatal sexual differentiation in female rats. Biol Reprod 53: 1198-207.
- Moore, CL. 1984. Maternal contributions to the development of masculine sexual behavior in laboratory rats. Dev Psychobiol 17: 347-56.
- Moore, CL. 1992. The role of maternal stimulation in the development of sexual behavior and its neural basis. Ann N Y Acad Sci 662: 160-77.
- Morali, G (1995). Regulación hormonal de la conducta sexual masculina. Biología de la reproducción. J. Velazquez-Moctezuma. México. UAM-I: 399-417.
- Morali, G y Beyer, C (1979). Neuroendocrine control of mammalian estrous behavior. Endocrine control of sexual behavior. C. Beyer. New York, Raven Press: 33-75.
- Morali, G, Larsson, K y Beyer, C. 1977. Inhibition of testosterone-induced sexual behavior in the castrated male rat by aromatase blockers. Horm Behav 9: 202-13.
- Morali, G, Larsson, K, Perez-Palacios, G y Beyer, C. 1974. Testosterone, androstenedione, and androstenediol: effects on the initiation of mating behavior of inexperienced castrated male rats. Horm Behav 5: 103-10.
- Morali, G, Lemus, AE, Munguia, R, Artega, M, Perez-Palacios, G, Sundaram, K, Kumar, N y Bardin, CW. 1993. Induction of male sexual behavior in the rat by 7 alpha-methyl-19-nortestosterone, an androgen that does not undergo 5 alpha-reduction. Biol Reprod 49: 577-81.
- Morali, G, Oropeza, MV, Lemus, AE y Perez-Palacios, G. 1994. Mechanisms regulating male sexual behavior in the rat: role of 5 alpha- and 3 beta-androstenediols. Biol Reprod 51: 562-71.
- Moreins, JK y Powers, JB. 1977. Effects of acute ovariectomy on the lordosis response of female rats. Physiol Behav 19: 277-83.
- Moss, RL. 1971. Modification of copulatory behavior in the female rat following olfactory bulb removal. J Comp Physiol Psychol 74: 374-82.
- Nadler, RD. 1972. Intrahypothalamic locus for induction of androgen sterilization in neonatal female rats. Neuroendocrinology 9: 349-57.
- Naftolin, F, Ryan, KJ, Davies, J, Petro, Z y Kuhn, M. 1975. The formation and metabolism of estrogens in brain tissues. Adv Biosci 15: 105-21.
- Naftolin, F, Ryan, KJ y Petro, Z. 1971. Aromatization of androstenedione by limbic system tissue from human foetuses. J. Endocrinol 51: 795-6.
- Naftolin, F, Ryan, KJ y Petro, Z. 1972. Aromatization of androstenedione by the anterior hypothalamus of adult male and female rats. Endocrinology 90: 295-8.
- Nance, DM, Shryne, J y Gorski, RA. 1974. Septal lesions: effects on lordosis behavior and pattern of gonadotropin release. Horm Behav 5: 73-81.
- Nance, DM, Shryne, J y Gorski, RA. 1975. Effects of septal lesions on behavioral sensitivity of female rats to gonadal hormones. Horm Behav 6: 59-64.
- Nance, DM, Shryne, JE, Gordon, JH y Gorski, RA. 1977. Examination of some factors that control the effects of septal lesions on lordosis behavior. Pharmacol Biochem Behav 6: 227-34.
- Negri Cesi, P, Melcangi, RC, Celotti, F y Martini, L. 1992. Aromatase activity in cultured brain cells: difference between neurons and glia. Brain Res 589: 327-32.
- Nelson, DR, Kamataki, T, Waxman, DJ, Guengerich, FP, Estabrook, RW, Feyereisen, R, Gonzalez, FJ, Coon, MJ, Gunsalus, IC, Gotoh, O y et al. 1993. The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. DNA Cell Biol 12: 1-51.
- Neri, RO. 1976. Antiandrogens. Adv Sex Horm Res 2: 233-62.
- Neumann, F y Elger, W. 1966a. [The effect of the anti-androgen 1,2-alpha-methylene-6-chloro-delta-4,6-pregnadiene-17-alpha-ol-3,20-dione-17-alpha-acetate (cyproterone acetate) on the development of the mammary glands of male foetal rats.]. J. Endocrinol 36: 347-52.
- Neumann, F y Elger, W. 1966b. Permanent changes in gonadal function and sexual behavior as a result of early feminization of male rats by treatment with an antiandrogenic steroid. Endokrinologie 50: 209-24.

- Neumann, F, Elger, W y Kramer, M. 1966. Development of a vagina in male rats by inhibiting androgen receptors with an anti-androgen during the critical phase of organogenesis. Endocrinology 78: 628-32.
- Nishizuka, M y Arai, Y. 1981a. Organizational action of estrogen on synaptic pattern in the amygdala: implications for sexual differentiation of the brain. Brain Res 213: 422-6.
- Nishizuka, M y Arai, Y. 1981b. Sexual dimorphism in synaptic organization in the amygdala and its dependence on neonatal hormone environment. Brain Res 212: 31-8.
- Nunez, E, Engelmann, F, Benassayag, C y Jayle, MF. 1971. [Identification and preliminary purification of the feto-protein binding the estrogens in the serum of newborn rats]. C.R. Acad. Sci. (Heb. Seances. Acad. Sci. D) 273: 831-4.
- Oboh, AM, Paredes, RG y Baum, MJ. 1995. A sex comparison of increments in FOS immunoreactivity in forebrain neurons of gonadectomized, testosterone-treated rats after mounting an estrous female. Neurobiol. Learn. Mem. 63: 66-73.
- Paredes, R, Haller, AE, Manero, MC, Alvarado, R y Agmo, A. 1990. Medial preoptic area kindling induces sexual behavior in sexually inactive male rats. Brain Res 515: 20-6.
- Paredes, RG y Alonso, A. 1997. Sexual behavior regulated (paced) by the female induces conditioned place preference. Behav. Neurosci. 111: 123-8.
- Paredes, RG y Baum, MJ. 1997. Role of the medial preoptic area/anterior hypothalamus in the control of masculine sexual behavior. Annu. Rev. Sex Res. 8: 68-101.
- Paredes, RG, Lopez, ME y Baum, MJ. 1998a. Testosterone augments neuronal Fos responses to estrous odors throughout the vomeronasal projection pathway of gonadectomized male and female rats. Horm. Behav. 33: 48-57.
- Paredes, RG, Tschentke, T y Nakach, N. 1998b. Lesions of the medial preoptic area/anterior hypothalamus (MPOA/AH) modify partner preference in male rats. Brain Res 813: 1-8.
- Parsons, B, Rainbow, TC y McEwen, BS. 1984. Organizational effects of testosterone via aromatization on feminine reproductive behavior and neural progesterin receptors in rat brain. Endocrinology 115: 1412-7.
- Pedernera, E (1993). Cooperación celular en la biosíntesis de hormonas esteroides. Comunicación neuroendócrina. Bases celulares y moleculares. C. Clapp y G. Martínez de la Escalera. México, SMCF y CoNaCYT: 33-46.
- Peirce, JT y Nattall, RL. 1961. Self-paced sexual behavior in the female rat. J. Comp. Physiol. Psychol. 54: 310-313.
- Pfaff, D (1980). Estrogens and brain function. Berlin-Heidelberg-New York, Springer-Verlag.
- Pfaff, DW. 1970. Nature of sex hormone effects on rat sex behavior: specificity of effects and individual patterns of response. J. Comp. Physiol. Psychol. 73: 349-358.
- Pfaff, DW y Conrad, LC. 1978. Hypothalamic neuroanatomy: steroid hormone binding and patterns of axonal projections. Int. Rev. Cytol. 54: 245-65.
- Pfaff, DW y Sakuma, Y. 1979. Facilitation of the lordosis reflex of female rats from the ventromedial nucleus of the hypothalamus. J. Physiol. (Lond.) 288: 189-202.
- Pfaff, DW, Schwartz-Giblin, S, McCarthy, MM y Kow, LM (1994). Cellular and molecular mechanism of female reproductive behaviors. The physiology of reproduction. E. Knobil y J. D. Neill. New York, Raven Press. 2: 107-220.
- Pfaff, DW, Vasudevan, N, Kia, HK, Zhu, YS, Chan, J, Garey, J, Morgan, M y Ogawa, S. 2000. Estrogens, brain and behavior: studies in fundamental neurobiology and observations related to women's health. J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 74: 365-73.
- Pfaff, DW y Zigmund, RE. 1971. Neonatal androgen effects on sexual and non-sexual behavior of adult rats tested under various hormone regimes. Neuroendocrinology 7: 129-45.
- Pfeifle, JK y Edwards, DA. 1983. Midbrain lesions eliminate sexual receptivity but spare sexual motivation in female rats. Physiol. Behav. 31: 385-9.
- Pfeifle, JK, Shivers, M y Edwards, DA. 1980. Parasagittal hypothalamic knife cuts and sexual receptivity in the female rat. Physiol. Behav. 24: 145-50.
- Phoenix, CH, Goy, RW, Gerall, AA y Young, WC. 1959. Organizing action of prenatally administered testosterone propionate on the tissues mediating mating behavior in the female guinea pig. Endocrinology 65: 369-382.
- Powers, B y Valenstein, ES. 1972. Sexual receptivity: facilitation by medial preoptic lesions in female rats. Science 175: 1003-5.
- Powers, JB. 1970. Hormonal control of sexual receptivity during the estrous cycle of the rat. Physiol. Behav. 5: 831-5.
- Powers, JB y Wimsan, SS. 1975. Vomeronasal organ: critical role in mediating sexual behavior of the male hamster. Science 187: 961-3.
- Price, JL, Russchen, FF y Amaral, DG (1987). The limbic region II. The amygdaloid complex. Handbook of chemical neuroanatomy: integrated system of the CNS. A. Bjorklund y T. Hökfelt. Amsterdam, Elsevier: 279-388.
- Pritchard, CA, Goodfellow, PJ y Goodfellow, PN. 1987. Mapping the limits of the human pseudoautosomal region and a candidate sequence for the male-determining gene. Nature 328: 273-5.
- Quadagno, DM, Shryne, J, Anderson, C y Gorski, RA. 1972. Influence of gonadal hormones on social, sexual, emergence, and open field behaviour in the rat (*Rattus norvegicus*). Anim. Behav. 20: 732-40.
- Raisman, G y Field, PM. 1971. Sexual dimorphism in the preoptic area of the rat. Science 173: 731-3.
- Raisman, G y Field, PM. 1973a. A quantitative investigation of the development of collateral reinnervation after partial deafferentation of the septal nuclei. Brain Res. 50: 241-64.
- Raisman, G y Field, PM. 1973b. Sexual dimorphism in the neuropil of the preoptic area of the rat and its dependence on neonatal androgen. Brain Res. 54: 1-29.
- Rao, ZR, Shin-saka, S y Tohyama, M. 1987. Origin of cholinergic fibers in the basolateral nucleus of the amygdaloid complex by using sensitive double-labeling technique of retrograde biotinylated tracer and immunocytochemistry. J. Hirnforsch. 28: 553-60.
- Raynaud, JP. 1973. Influence of rat estradiol binding plasma protein (EBP) on uterotropic activity. Steroids 21: 249-58.
- Raynaud, JP. 1988. Antiandrogens in combination with LH-RH agonists in prostate cancer. Am. J. Clin. Oncol. 11 Suppl 2: S132-47.
- Rhoda, J, Corbier, P y Roth, J. 1984. Gonadal steroid concentrations in serum and hypothalamus of the rat at birth: aromatization of testosterone to 17 beta-estradiol. Endocrinology 114: 1754-60.
- Robaire, B y Bayly, SF. 1989. Testicular signaling: incoming and outgoing messages. Ann. N.Y. Acad. Sci. 564: 250-60.
- Robinson, SM, Fox, TO, Dikkes, P y Pearlstein, RA. 1986. Sex differences in the shape of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area and suprachiasmatic nucleus of the rat: 3-D computer reconstructions and morphometrics. Brain Res. 371: 380-4.

- Rodgers, CII y Law, OT. 1967. The effects of habenular and medial forebrain bundle lesion on sexual behavior. Psychon Sci 8: 1-2.
- Romero, PR, Beltramo, CA y Carrer, HF. 1990. Participation of the olfactory system in the control of approach behavior of the female rat to the male. Physiol Behav 47: 685-90.
- Roos, J, Roos, M, Schaeffer, C y Aron, C. 1988. Sexual differences in the development of accessory olfactory bulbs in the rat. J Comp Neurol 270: 121-31.
- Roselli, CE, Horton, LE y Resko, JA. 1985. Distribution and regulation of aromatase activity in the rat hypothalamus and limbic system. Endocrinology 117: 2471-7.
- Roselli, CE y Resko, JA. 1987. The distribution and regulation of aromatase activity in the central nervous system. Steroids 50: 495-508.
- Roy, E y Wade, G. 1975. Role of estrogen and androgen-induced spontaneous activity in male rats. J Comp Physiol Psychol 89: 573-579.
- Ruf, KB, Kitchen, JH y Wilkinson, M. 1976. Synergistic effects of oestrogen and brain stimulation on precocious sexual maturation in the female rat. Acta Endocrinol (Copenh) 82: 225-37.
- Ryan, KJ, Nafolin, F, Reddy, V, Flores, F y Petro, Z. 1972. Estrogen formation in the brain. Am J Obstet Gynecol 114: 454-60.
- Saito, TR y Moltz, H. 1986a. Copulatory behavior of sexually naive and sexually experienced male rats following removal of the vomeronasal organ. Physiol Behav 37: 507-10.
- Saito, TR y Moltz, H. 1986b. Sexual behavior in the female rat following removal of the vomeronasal organ. Physiol Behav 38: S1-7.
- Sakuma, Y y Pfaff, DW. 1979. Facilitation of female reproductive behavior from mesencephalic central gray in the rat. Am J Physiol 237: R278-84.
- Scalia, F y Winans, SS. 1975. The differential projections of the olfactory bulb and accessory olfactory bulb in mammals. J Comp Neurol 161: 31-55.
- Schaeffer, C, Roos, J y Aron, C. 1986. Accessory olfactory bulb lesions and lordosis behavior in the male rat feminized with ovarian hormones. Horm Behav 20: 118-27.
- Scher, HI y Kelly, WK. 1993. Flutamide withdrawal syndrome: its impact on clinical trials in hormone-refractory prostate cancer. J Clin Oncol 11: 1566-72.
- Segovia, S y Guillonon, A. 1982. Effects of sex steroids on the development of the vomeronasal organ in the rat. Brain Res 281: 209-12.
- Segovia, S y Guillonon, A. 1993. Sexual dimorphism in the vomeronasal pathway and sex differences in reproductive behaviors. Brain Research 618: 18-24.
- Segovia, S y Guillonon, A. 1996. Searching for sex differences in the vomeronasal pathway. Horm Behav 30: 61S-26.
- Shay, H, Gershon-Cohen, J, Pashkhis, KE y Fels, SS. 1939. Endocrinology 25: 933-943.
- Shinoda, K, Yagi, H, Fujita, H, Osawa, Y y Shtotani, Y. 1989. Screening of aromatase-containing neurons in rat forebrain: an immunohistochemical study with antibody against human placental antigen X-P2 (hPAX-P2). J Comp Neurol 290: 502-15.
- Shiple, MT y Adamek, GD. 1984. The connections of the mouse olfactory bulb: a study using orthograde and retrograde transport of wheat germ agglutinin conjugated to horseradish peroxidase. Brain Res Bull 12: 669-88.
- Shughrue, PJ, Lane, MV y Merchenthaler, I. 1997. Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. J Comp Neurol 388: 507-25.
- Simerly, RB, Chang, C, Muramatsu, M y Swanson, LW. 1990. Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: an in situ hybridization study. J Comp Neurol 294: 76-95.
- Simerly, RB y Swanson, LW. 1986. The organization of neural inputs to the medial preoptic nucleus of the rat. J Comp Neurol 246: 312-42.
- Simerly, RB y Swanson, LW. 1988. Projections of the medial preoptic nucleus: a Phascolus vulgaris leucoagglutinin anterograde tract-tracing study in the rat. J Comp Neurol 270: 209-42.
- Sinclair, AH. 1998. Human sex determination. J Exp Zool 281: 501-5.
- Singer, JF. 1968. Hypothalamic control of male and female sexual behavior in female rats. J Comp Physiol Psychol 66: 738-42.
- Slimp, JC, Hart, BL y Goy, RW. 1978. Heterosexual, autosexual and social behavior of adult male rhesus monkeys with medial preoptic-anterior hypothalamic lesions. Brain Res 142: 105-22.
- Smith, CI, O'Malley, BW. 1999. Evolving concepts of selective estrogen receptor action: from basic science to clinical applications. Trends Endocrinol Metab 10: 299-300.
- Smith, MS, Freeman, ME y Neill, JD. 1978. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroids levels associated with of the corpus luteum of pseudopregnancy. Endocrinology 96: 219-226.
- Sodersten, P. 1973. Estrogen-activated sexual behavior in male rats. Horm Behav 4: 247-56.
- Sodersten, P. 1978. Effects of anti-oestrogen treatment of neonatal male rats on lordosis behaviour and mounting behaviour in the adult. J Endocrinol 76: 241-9.
- Sodersten, P y Hansen, S. 1977. Effects of oestradiol and progesterone on the induction and duration of sexual receptivity in cyclic female rats. J Endocrinol 74: 477-85.
- Soma, KK, Sullivan, K y Wingfield, J. 1999. Combined aromatase inhibitor and antiandrogen treatment decreases territorial aggression in a wild songbird during the nonbreeding season. Gen Comp Endocrinol 115: 442-53.
- Stefanick, ML y Davidson, JM. 1987. Genital responses in noncopulators and rats with lesions in the medial preoptic area or midthoracic spinal cord. Physiol Behav 41: 439-44.
- Stern, JJ. 1970. Responses of male rats to sex odors. Physiol Behav 5: 519-24.
- Stockman, ER, Callaghan, RS y Baum, MJ. 1985. Effects of neonatal castration and testosterone treatment on sexual partner preference in the ferret. Physiol Behav 34: 409-14.
- Stumpf, WE y Sar, M (1982). The olfactory system as a target organ for steroid hormones. Olfaction and endocrine regulation. W. Breithol. London, IRL Press: 11-21.
- Swaab, DF y Fliers, E. 1985. A sexually dimorphic nucleus in the human brain. Science 228: 1112-5.
- Swanson, HE y van Werff ten Bosch, JJ. 1965. Modification of male rat reproductive tract development by a single injection of testosterone propionate shortly after birth. Acta Endocrinol (Copenh) 50: 310-6.
- Swanson, HE y Werff ten Bosch, JJ. 1965. The "early-androgen" syndrome; effects of pre-natal testosterone propionate. Acta Endocrinol (Copenh) 50: 379-90.
- Szechman, H, Caggiola, AR y Wulkan, D. 1978. Preoptic knife cuts and sexual behavior in male rats. Brain Res 150: 569-95.

- Taylor, GT, Haller, J, Rupich, R y Weiss, J. 1984. Testicular hormones and intermale aggressive behaviour in the presence of a female rat. J Endocrinol 100: 315-21.
- Taylor, JG y Keverne, EB. 1991. Accessory olfactory learning. Biol Cybern 64: 301-5.
- Tobet, SA, Chickering, TW, Fox, TO y Baum, MJ. 1993. Sex and regional differences in intracellular localization of estrogen receptor immunoreactivity in adult ferret forebrain. Neuroendocrinology 58: 316-24.
- Tobet, SA y Fox, TO (1992). Sex differences in neuronal morphology influenced hormonally throughout life. Sexual differentiation: Handbook of Behavioral. A. A. Gerall, H. Moltz y L. L. Ward. New York, Plenum. 11: 41-83.
- Tobet, SA, Zahniser, DJ y Baum, MJ. 1986. Sexual dimorphism in the preoptic/anterior hypothalamic area of ferrets: effects of adult exposure to sex steroids. Brain Res 364: 249-57.
- Tomaszycki, ML, Davis, JE, Gouzoules, H y Wallen, K. 2001. Sex differences in infant rhesus macaque separation-rejection vocalizations and effects of prenatal androgens. Horm Behav 39: 267-76.
- Tsuruo, Y, Ishimura, K, Fujita, H y Osawa, Y. 1994. Immunocytochemical localization of aromatase-containing neurons in the rat brain during pre- and postnatal development. Cell Tissue Res 278: 29-39.
- Valenstein, ES, Kakolewski, JW y Cox, VC. 1967. Sex differences in taste preference for glucose and saccharin solutions. Science 156: 942-3.
- van de Poll, NE, de Jonge, F, van Oyen, HG, van Pelt, J y de Bruin, JP. 1981. Failure to find sex differences in testosterone activated aggression in two strains of rats. Horm Behav 15: 94-105.
- van der Schoot, P. 1980. Effects of dihydrotestosterone and oestradiol on sexual differentiation in male rats. J Endocrinol 84: 397-407.
- van der Schoot, P. 1992. Disturbed testicular descent in the rat after prenatal exposure to the antiandrogen flutamide. J Reprod Fertil 96: 483-96.
- van der Shoot, P y Zeilmaker, GH. 1972. Aspects of the function of ovarian grafts in neonatally castrated male rats. Endocrinology 91: 389-95.
- Vega Matuszyck, J y Larsson, K. 1991. Role of androgen, estrogen and sexual experience on the female rat's partner preference. Physiol Behav 50: 139-42.
- Vega Matuszyck, J y Larsson, K. 1993. Sexual orientation and sexual motivation of the adult male rat. Physiol Behav 53: 747-50.
- Veldhuis, JD, Utban, RJ y Dufau, ML. 1992. Evidence that androgen negative feedback regulates hypothalamic gonadotropin-releasing hormone impulse strength and the burst-like secretion of biologically active luteinizing hormone in men. J Clin Endocrinol Metab 74: 1227-1235.
- Vreeburg, JF, Groeneweld, JO, Post, PE y Ooms, MP. 1983. Concentrations of testosterone and androstene in peripheral and umbilical venous plasma of fetal rats. J Reprod Fertil 68: 171-5.
- Vreeburg, JT, van der Vaart, PD y van der Schoot, P. 1977. Prevention of central defeminization but not masculinization in male rats by inhibition neonatally of oestrogen biosynthesis. J Endocrinol 74: 375-82.
- Wade, GN y Zucker, I. 1969. Hormonal and developmental influences on rat saccharin preferences. J Comp Physiol Psychol 69: 291-300.
- Weisz, J y Gibbs, C. 1974. Metabolites of testosterone in the brain of the newborn female rat after an injection of tritiated testosterone. Neuroendocrinology 14: 72-86.
- Whalen, RE y Lutge, WC. 1971. Testosterone, androstenedione and dihydrotestosterone: Effects on mating behavior of male rats. Horm Behav 2: 117-125.
- Whalen, RE y Nadler, RD. 1965. Modification of spontaneous and hormone-induced sexual behavior by estrogen administration to neonatal female rats. J Comp Physiol Psychol 60: 150-152.
- Whalen, RE y Olsen, KL. 1981. Role of aromatization in sexual differentiation: effects of prenatal ATD treatment and neonatal castration. Horm Behav 15: 107-22.
- Wilson, JD y Gloyna, RE. 1970. The intranuclear metabolism of testosterone in the accessory organs of reproduction. Recent Prog Horm Res 26: 309-56.
- Wilson, JG. 1943. Anat Rec 86: 341-363.
- Witcher, JA y Clemens, LG. 1987. A prenatal source for defeminization of female rats is the maternal ovary. Horm Behav 21: 36-43.
- Yamanouchi, K. 1980. Inhibitory and facilitatory neural mechanisms involved in the regulation of lordosis behavior in female rats: effects of dual cuts in the preoptic area and hypothalamus. Physiol Behav 25: 721-5.
- Yanase, M y Gorski, RA. 1976. Sites of estrogen and progesterone facilitation of lordosis behavior in the spayed rat. Biol Reprod 15: 536-43.
- Zasorin, N, Malsbury, CW y Pfaff, DW. 1977. Suppression of lordosis in the hormone-primed female hamster by electrical stimulation of septal area. Physiol Behav 14: 595-599.
- Zemlan, FP y Adler, NT. 1977. Hormonal control of female sexual behavior in the rat. Horm Behav 9: 345-57.
- Zucker, I y Gos, RW. 1967. Sexual receptivity in the guinea pig: inhibitory and facilitatory actions of progesterone and related compounds. J Comp Physiol Psychol 64: 378-83.
- Zucker, I, Wade, GN y Ziegler, R. 1972. Sexual and hormonal influences on eating, taste preferences, and body weight of hamsters. Physiol Behav 5: 101-11.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN