



“ Caracterización Conductual de Machos No Copuladores: Discriminación
Olfatoria y Motivación Sexual Incentiva”

Biól. Gina Patricia De Gasperín Estrada

Instituto de Neurobiología
Universidad Nacional Autónoma de México

Tesis que presenta la pasante Gina Patricia De Gasperín Estrada como requisito
para obtener el grado de Maestro en Ciencias (Neurobiología)

Campus Juriquilla, Querétaro. Enero del 2006



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.

Agradecimientos

Al Dr. Paredes Guerrero Raúl Gerardo por su gran apoyo y enseñanza tanto en la investigación como fuera de ella, por haberme introducido en el mundo de la ciencia y por su gran amistad y cariño.

A los miembros de mi comité Tutorial: Dr. Jorge Larriva Sahd y Dr. Alfredo Varela Echavarría por el continuo seguimiento de este proyecto y sus valiosas aportaciones al mismo.

A los miembros de mi jurado de examen: Dr. León Cintra Mc Glone, Dr. Armando Ferreira, Dr. Jorge Larriva Sahd, Dra. Thalía Fernández Harmony por sus valiosos comentarios al trabajo escrito de tesis.

A los colaboradores de este proyecto de investigación:

M.V.Z. Francisco Camacho Barrios, por su asistencia técnica y participación directa en esta tesis.

Carmen Mejía Viggiano por su asistencia técnica en la extracción de RNA.

Leopoldo González Santos por su asistencia técnica en el procesamiento de datos para la identificación de genes.

María de Lourdes Lara Ayala por su asistencia técnica.

M.V.Z Martín García Servín por proporcionar, cuidar y mantener a las ratas.

Q en A. Leonor Casanova Rico, Yolanda Orduña Cruz y Magdalena Reyes Olán por todo su apoyo en el posgrado.

Lic. M. del Pilar Galarza Barrios y su equipo por los servicios de biblioteca.

Dedicatoria

A mis padres

Por el gran apoyo que siempre me han brindado para realizar mis proyectos, por todo el amor y por creer en mi mundo.

A mis hermanos Nora y Raúl y a mi cuñado Daniel

Por ser unos hermanos increíbles y estar conmigo compartiendo mi mundo.

A mi tío Mario

Por todo el apoyo, cariño, y hospitalidad que me brindó.

A mi madrina Carmelita

Por todos los sabios y buenos consejos, y el inmenso cariño y apoyo que me brinda.

A mis amigos

Raúl, Francisco, Juan Pablo, Claudita, Patricia, Arturo y Ofelia, Lucy, José Carmen, Juan Pablo II, Wendy, Rogelio, Doña Cipri, Daniela, Samuel, Néstor, Jeans, Miriam. Gracias por compartir tantos buenos momentos en el laboratorio y fuera de él, por todo su apoyo en los momentos difíciles y buenos, por todas sus enseñanzas. Por haber hecho el día a día más alegre y fácil.

“Mientras los animales inferiores sólo están en el mundo, el hombre trata de entenderlo”

“La ciencia es valiosa como herramienta para domar la naturaleza y remodelar la sociedad; es valiosa en sí misma, como clave para la inteligencia del mundo y del yo; y es eficaz en el enriquecimiento, la disciplina y la liberación de nuestra mente”

Mario Bunge

“La ciencia, su método y su filosofía”

ÍNDICE

RESUMEN	1
CAPÍTULO I. CONDUCTA SEXUAL DE LA RATA	3
Descripción de la conducta sexual	3
CAPÍTULO II. SISTEMA OLFATORIO	6
2.1 Sistema de proyección vomeronasal	6
2.2 Órgano vomeronasal	8
2.3 Bulbo Olfatorio Accesorio	8
2.4 Núcleo Lecho de la Estría Terminal	9
2.5 Amígdala.....	10
2.6 Área Preóptica Medial	10
CAPÍTULO III. MACHOS NO COPULADORES	12
3.1 Rata.....	12
3.2 Otras especies	14
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	15
HIPÓTESIS	17
OBJETIVOS.....	17
CAPÍTULO IV. MÉTODO	19
Experimento I. Pruebas conductuales.....	19
4.1.1 Animales.....	19
4.1.2 Pruebas de comportamiento sexual en machos.....	19
Experimento II. Pruebas de discriminación olfatoria	20
4.2.1 Procedimiento	21
4.2.2 Estadística.....	22
4.2.3 Resultados y discusión parcial	22
Experimento III. Pruebas de motivación sexual incentiva (MSI).....	26
4.3.1 Procedimiento	27
4.3.2 Estadística.....	28
4.3.3 Resultados	29

Experimento 4. Pruebas de estimulación sexual.....	30
4.3.1 Procedimiento.....	31
4.3.2 Estadística.....	31
4.3.3 Resultados.....	32
Experimento 5. Peso de órganos..	35
4.3.1 Procedimiento.....	35
4.3.2 Estadística.....	35
4.3.3 Resultados.....	35
DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN.....	37
CAPÍTULO V. MICROARREGLOS. IDENTIFICACIÓN DE GENES.....	40
5.1 Procedimiento.....	41
5.2 Resultados.....	44
5.3 Discusión.....	49
APÉNDICE.....	50
REFERENCIAS.....	51

RESUMEN

“CARACTERIZACIÓN CONDUCTUAL DE MACHOS NO COPULADORES: DISCRIMINACIÓN OLFATORIA Y MOTIVACIÓN SEXUAL INCENTIVA”

En la rata macho, el comportamiento sexual consiste de una serie de movimientos fácilmente distinguibles: montas, intromisiones (montas con intromisiones) y eyaculaciones. Los machos sexualmente expertos comienzan estos movimientos poco tiempo después de ser colocados con una hembra receptiva. Sin embargo, existen machos que no presentan conducta sexual alguna al estar en contacto con una hembra receptiva, estos son llamados machos no copuladores (MNC). Se han realizado estudios donde se comprueba que estos animales no tienen alteraciones en los mecanismos que controlan la erección, los movimientos peneanos ni en la eyaculación. Además, sus niveles plasmáticos de testosterona son normales. Las ratas macho fueron clasificadas como copuladoras (C), no copuladoras (NC) y lentas (L). El primer objetivo del presente estudio fue evaluar si los machos no copuladores pueden discriminar estímulos olfatorios sexualmente relevantes. La prueba consiste en colocar al animal experimental en una caja de acrílico tapada con una malla sobre las barras de acero de la tapa de la caja donde se coloca la comida. En primer lugar, se hacen dos presentaciones de agua desionizada en un papel filtro con 10 μ l durante dos minutos cada una para que el individuo se habitúe. Después de éstas, se hacen tres presentaciones de un olor sexualmente relevante en un papel filtro con 10 μ l durante dos minutos cada una seguidas de otras tres presentaciones de un olor sexualmente relevante diferente al primero. Los resultados de este experimento sugieren que los machos no copuladores y los machos lentos tienen la misma capacidad que los copuladores para discriminar los olores sexualmente relevantes. En un segundo experimento evaluamos si una hembra sexualmente receptiva tiene preferencia por un macho copulador o un no copulador. Los resultados del segundo experimento demuestran que los machos no copuladores y los machos copuladores son igualmente atractivos para una hembra sexualmente receptiva. En un tercer experimento, evaluamos si al observar a otro macho

copular, los machos no copuladores despliegan el patrón de conducta sexual. En esta prueba de estimulación sexual colocamos a un macho estímulo con una hembra sexualmente receptiva en una caja de cópula y al mismo tiempo colocamos al macho experimental (un macho NC, un C o un L). Evaluamos la conducta sexual en dos pruebas de 30 min cada una. Los resultados de esta prueba nos indican que la conducta sexual no se estimula en los machos lentos al observar la cópula con una pareja estímulo. En un cuarto experimento pesamos los órganos más representativos involucrados en el aspecto reproductivo para saber si los machos no copuladores tienen alguna alteración en el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas, con el cual encontramos que los machos no copuladores no tienen alguna alteración hormonal que no les permita desplegar la conducta sexual. En un último experimento identificamos mediante la técnica de microarreglos los genes expresados diferencialmente en el hipotálamo de las ratas macho copuladoras y no copuladoras.

CAPÍTULO I. CONDUCTA SEXUAL EN LA RATA

1.1 Descripción de la conducta sexual.

La conducta sexual de los mamíferos tiene dos componentes principales: el precopulatorio o motivacional, en el cual el sujeto busca e inicia la interacción con la pareja sexual y el consumatorio o de ejecución, el cual permite llevar a cabo dicha interacción (Beach, 1967). La conducta precopulatoria varía en cuanto al tiempo, ya que puede durar desde segundos o minutos hasta horas dependiendo de la especie y de la experiencia sexual previa. En la rata, esta conducta se basa en el olfateo de la región perianal, la exploración genital y el aseo de la pareja (Hlinák, 1986; Hlinák y col., 1987; Hlinák, 1990). Durante esta conducta, la hembra receptiva presenta además conductas de atracción tales como el desplazamiento en zig-zag, el brincoteo y el movimiento rápido de las orejas (Blaustein y Erskine, 2002).

En la conducta copulatoria de la rata macho se identifican tres patrones conductuales (Figura 1), que son:

- 1) Montas.- Este patrón consiste en una serie de movimientos pélvicos en donde el macho se posa sobre la parte posterior de la hembra, posteriormente la desmonta y en algunas ocasiones el macho realiza acicalamiento genital.
- 2) Intromisión .- Se lleva a cabo cuando el macho realiza una monta, insertando el pene en la vagina de la hembra seguido de movimientos pélvicos. La desmonta se da con la separación brusca del macho; finalmente el macho puede lamerse el pene. (Figura 1).
- 3) Eyaculación.- Se da cuando el macho ha presentado una serie de intromisiones que terminan con movimientos repetidos de los miembros anteriores. El macho inserta su pene en la vagina y esta penetración es

más larga y la desmonta es lenta. La eyaculación consiste en una expulsión de líquido seminal y espermatozoides en la vagina de la hembra. Después de la eyaculación, la desmonta es lenta y va acompañada de acicalamiento genital (los patrones conductuales se ejemplifican en la Figura 1).

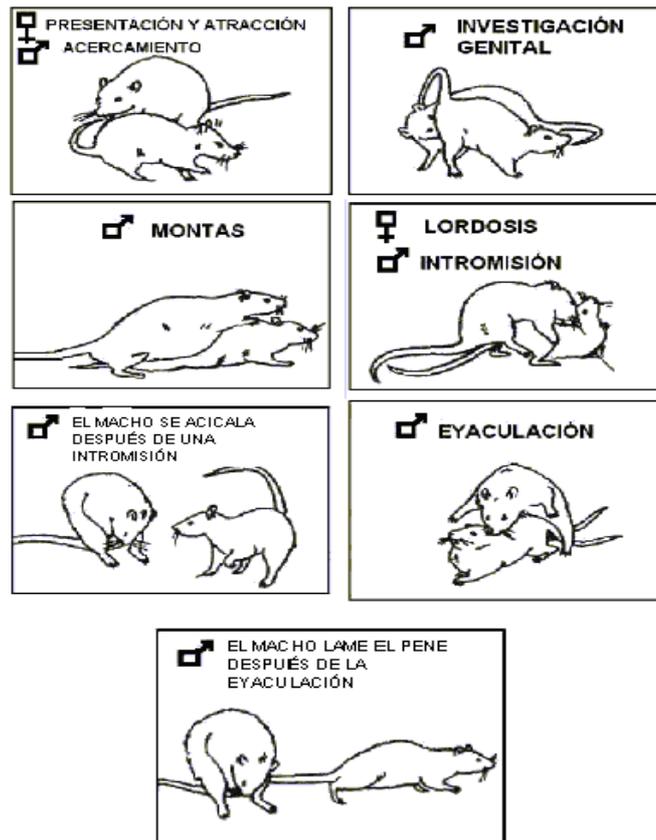


figura 1. Representación de los diferentes componentes del comportamiento sexual (Adaptado de Slob y Vander Werff ten Bosch, 1997).

Durante la cópula, el macho no necesariamente presenta montas y el número de intromisiones varía entre 8 y 15 antes de la eyaculación. Una vez que el macho ha eyaculado, se presenta un intervalo de 5 min aproximadamente en el cual el macho se aísla de la hembra y no presenta ninguna conducta sexual hacia ella, a esto se le llama intervalo

posteyaculatorio (Larsson, 1956). Conforme se van incrementando las series copulatorias, los patrones conductuales van cambiando, es decir, el macho se va volviendo “experto”, la latencia de montas e intromisiones va disminuyendo y el intervalo posteyaculatorio, que al principio tenía una duración de 4 a 5 minutos, puede durar de 1 a 2 minutos (Larsson, 1979).

Para que la cópula se lleve a cabo, es necesario que el macho esté en contacto con una hembra sexualmente receptiva (en estro). Los machos sexualmente expertos son aquellos que al momento de ser colocados con una hembra sexualmente receptiva, eyaculan en un intervalo de 10 a 15 minutos. Sin embargo, existen machos que no presentan conducta sexual alguna al estar en contacto con una hembra receptiva, estos son llamados machos no copuladores (MNC). Estos animales han sido descritos en varias especies de mamíferos como: la cabra, el conejillo de indias, el gerbo, el hámster, la rata y el ratón (Alexander et al. 1999; Anderson, 1936; Beach, 1942; Clark et al., 1992; Harding and Feder 1976; Perkins et al., 1992). En la rata, estos animales no tienen alteraciones en los mecanismos que controlan la erección, los movimientos peneanos ni la eyaculación (Stefanick y Davidson, 1985); y sus niveles plasmáticos de testosterona son normales (Damassa, et al. 1977).

Nuestro grupo de trabajo ha realizado la caracterización conductual de estos animales para determinar las posibles causas de este déficit conductual. Así, hemos determinado que estos animales no están conductualmente feminizados y tienen una menor preferencia por olores de hembras sexualmente receptivas que los machos copuladores (Portillo y Paredes, 2003). Esta menor preferencia puede deberse a un menor interés por estos estímulos o bien a una incapacidad para detectar olores sexualmente relevantes. Esto intentaremos discernir en el presente estudio por lo que en el siguiente capítulo describiremos el sistema olfatorio de los roedores.

CAPÍTULO II. SISTEMA OLFATORIO

2.1 Sistema de proyección vomeronasal

En los mamíferos existen dos sistemas olfatorios: el sistema de proyección vomeronasal (SVN) y el Sistema Olfatorio Principal, ambos involucrados en el control de la conducta sexual. El SVN proyecta al Bulbo Olfatorio Accesorio (BOA), es sexualmente dimórfico (Segovia y Guillamón, 1993; Segovia y Guillamón, 1996) y está involucrado en el control de la conducta sexual (Segovia y Guillamón, 1993; Portillo y Paredes, 1998).

El Bulbo Olfatorio Principal (BOP) recibe información del epitelio que recubre la cavidad nasal, donde son captados los olores volátiles, mientras que el BOA, que se encuentra en la porción dorsocaudal del bulbo olfatorio principal (Paxinos, 1995) recibe la información del órgano Vomeronasal y detecta moléculas grandes y olores no volátiles que también influyen en las funciones neuroendocrinas (Bargmann, 1997; Halpern, 1987; Keverne, 1999; Tirindelli et al., 1998); la información química que recibe es traducida a una señal eléctrica y enviada al BOA a través del nervio vomeronasal. La ablación de los bulbos olfatorios en la rata macho genera una reducción del porcentaje de animales que eyaculan (Larsson, 1975; Meisel y col., 1982), esto es generado por la incapacidad de algunos machos para iniciar la cópula (Larsson 1969; Meisel y col., 1980).

Se ha observado que si se lesionan bilateralmente el bulbo olfatorio principal y el accesorio se pierde la conducta sexual. Esto nos indica la gran importancia del sistema olfatorio en la expresión de la conducta sexual masculina (Winans y Powers, 1977). En la figura 2 se muestra el circuito funcional del sistema de proyección vomeronasal. En el macho las señales

emitidas por una hembra en estro activan principalmente al bulbo olfatorio accesorio, al núcleo de la cama de la estría terminal y a la amígdala; esta información llega y se integra en el área preóptica medial (una estructura fundamental para la expresión de la conducta sexual) lo que genera una señal para poder ejecutar la cópula.

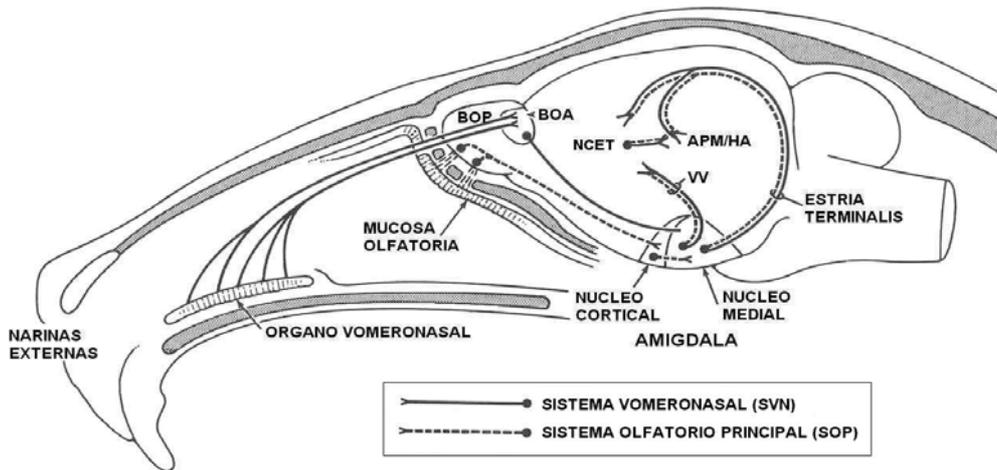


Figura 2. El sistema de proyección vomeronasal es un circuito neuronal que controla la conducta sexual de la ratona macho. Inicia con la detección de estímulos sexualmente relevantes por el órgano vomeronasal, el cual transmite esta información al bulbo olfatorio accesorio (BOA). El BOA establece conexiones directas con la amígdala y el núcleo lecho de la cama de la estría terminal (NCET), permitiendo que el macho detecte a una hembra en estro. La amígdala y el núcleo lecho de la estría terminal establecen conexiones con el área preóptica medial (APM). En este circuito se generan las conductas apetitivas de orientación, persecución a la hembra, así como la preferencia y reforzamiento sexual. Modificado de Baum, 1992.

A continuación, describiré brevemente las diferentes líneas de investigación que demuestran la importancia del sistema vomeronasal en el control de la conducta sexual.

2.2 Órgano vomeronasal

El órgano vomeronasal es una estructura quimiorreceptora fusiforme que se encuentra bilateralmente en la parte más ventral del septum nasal. La importancia del órgano vomeronasal se ha enfocado en el control de la conducta sexual masculina, esto se ha estudiado mediante técnicas de lesión. En estudios en los que se elimina el órgano vomeronasal en ratas macho sexualmente expertas se observa un incremento en la latencia de la primera intromisión, así como una reducción en el número de intromisiones. Sin embargo, todos los machos que copulan son capaces de eyacular (Kondo et al., 2003; Saito y Moltz, 1986). De la misma forma, no se han observado alteraciones en las erecciones sin contacto, las cuales son inducidas por olores de hembras sexualmente receptivas, estos olores son detectados por el sistema olfatorio principal (Kondo y col, 1990). Otros estudios han demostrado que la ablación del órgano vomeronasal, se disminuye la respuesta de Fos (gen de respuesta temprana que se utiliza como marcador de actividad neuronal en respuesta a varios estímulos sensoriales u homeostáticos) inducida por la cópula en la capa granular del bulbo olfatorio accesorio y en la amígdala medial (Kondo, et al., 2003). Los cambios conductuales no son los únicos observados cuando se lesiona esta estructura, también se ha reportado una disminución de los efectos estimulantes de los machos en la liberación de la hormona luteinizante (Rajendren, et al., 1990), pero no una disminución en los niveles de testosterona (Stowers, et al., 2002).

2.3 Bulbo Olfatorio Accesorio

El bulbo olfatorio accesorio (BOA) se localiza en la porción dorsocaudal del bulbo olfatorio principal y transmite información desde el OVN al glomérulo del BOA (Paxinos, 1995). El BOA tiene proyecciones a la amígdala, específicamente al núcleo cortical medial y posterior, el núcleo lecho de la estría Terminal y el núcleo del tracto olfatorio accesorio. El BOA se involucra en funciones como la habituación, agresión, regulación de la temperatura, en la memoria olfativa y el aprendizaje (Guan, et al., 1993).

Como ya se mencionó, si se eliminan los bulbos olfatorios en la rata macho, se genera una reducción en el porcentaje de machos que eyaculan (Larsson, 1975; Meisel y col., 1982). Resultados más severos en la pérdida de la conducta sexual se observan con lesiones bilaterales conjuntas del bulbo olfatorio principal y accesorio, ya que estas lesiones eliminan por completo la cópula (Winans y Powers, 1977; citado en Portillo, 2004). De la misma manera, la lesión de los bulbos afecta la preferencia sexual, ya que ha sido demostrado que mientras los machos intactos prefieren a las hembras en estro e inician la cópula con ellas, los animales lesionados en esta área no copulan y no muestran preferencia por las hembras en estro (Edwards et al, 1990; Edwards et al, 1996).

2.4 Núcleo Lecho de la Estría Terminal

El núcleo lecho de la estría terminal es una estructura del cerebro anterior definida como una masa prominente de materia gris rostral al núcleo olfatorio y caudal a ciertos componentes del complejo amigdaloides (Johnston, 1923; citado en Portillo, 2004). Esta estructura es considerada un regulador integral del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (Dong, et al., 2001). Está involucrada en la regulación de aspectos fisiológicos y conductuales de la reproducción; es una estructura sexualmente dimórfica, de mayor tamaño en el macho que en la hembra (Guillamón y Segovia, 1996) y establece conexiones recíprocas con la amígdala medial y el área preóptica medial (Canteras et al, 1992). Las lesiones del núcleo lecho de la estría terminal incrementan el número de montas e intromisiones así como la latencia de eyaculación (Giantonio et al, 1970).

2.5 Amígdala

La amígdala es un complejo nuclear que se continúa con la cola del núcleo caudado. Se localiza en la porción medial del lóbulo temporal. Está

involucrada en una serie de conductas y funciones reguladoras como son las emociones, la memoria, la modulación de los sistemas autónomos y neuroendocrinos, la reproducción y la agresión (Paxinos, 1995). La amígdala recibe información sensorial de los bulbos olfatorios y del órgano vomeronasal enviándola al área preóptica medial y otras estructuras (Wood, 1997). La amígdala es más grande en los machos que en las hembras (Hines et al., 1992; Guillamón y Segovia, 1996). Este dimorfismo sexual se debe a las hormonas gonadales, ya que cuando los machos son gonadectomizados el tamaño de este núcleo disminuye adquiriendo un tamaño similar al de las hembras (Cooke et al., 1998).

Lesiones en la amígdala medial producen latencias de eyaculación largas y pocas eyaculaciones (Giantonino, Lund y Gerall, 1970; citado en Portillo, 2004). Por otro lado, las lesiones en la amígdala basolateral no tienen efectos en la conducta copulatoria de las ratas macho (Harris y Sachs, 1975; citado en Portillo, 2004) ni de los hámsters (Lehman y Winans, 1982).

2.6 Área Preóptica Medial

El Área Preóptica Medial (APM) está localizada entre la porción caudal del quiasma óptico y por debajo de la comisura anterior. Está rodeada rostralmente por la lámina terminalis y caudalmente por la división medial del núcleo lecho de la estría terminal (Simerly, 1995); es una parte fundamental del sistema de proyección vomeronasal. El APM se conecta con varias regiones neuronales, entre ellas se han identificado vías eferentes con el septum lateral, el núcleo lecho de la estría terminal, la amígdala medial, varios núcleos hipotalámicos, el giro central, los núcleos del rafe (dorsal y medio), el área ventral tegmental y el núcleo del tracto solitario (Chiba y Murata, 1985; Conrad y Pfaff, 1976; Simerly et al., 1986; Simerly y Swanson, 1988).

El APM es filogenéticamente crucial para la expresión del comportamiento sexual en los machos. Se ha demostrado que las lesiones en esta estructura interrumpen la cópula en machos de diferentes especies incluyendo peces, ranas, lagartijas, víboras, pollos, ratones, hámster, ratas,

gerbos, cabras, gatos, perros, conejillo de indias, hurón, codorniz, marmota y el mono rhesus (Revisión de Hart y Leedy, 1985; Meisel y Sachs, 1994). Sin embargo, los estudios hormonales y conductuales más detallados se han realizado en ratas. Cuando las lesiones son pequeñas, el comportamiento sexual es temporalmente interrumpido mientras que si las lesiones son lo suficientemente grandes, la cópula se elimina permanentemente (Heimer y Larsson, 1966/ 1967). Estos déficits son debido a la destrucción de neuronas en el APM y no a la interrupción de fibras que pasan a través de esta área (Paredes, 2003). Lesiones electrolíticas (Heimer y Larsson, 1966/1967; Paredes y Agmo, 1992; Paredes, Highland y karma, 1993; Paredes, Tzschente y Nakach, 1998), con radiofrecuencia (Lupo, Dessi-Fulgheri, Musi y Larsson, 1983), cortes con navaja (Szechtman, Caggiula y Wulkan, 1978) o lesiones neurotóxicas que destruyen sólo cuerpos celulares (Hansen, Kohler, Goldstein y Steinbuch, 1982; Paredes y Baum, 1995) producen déficits similares en la conducta sexual en machos, y éstos son permanentes. Asimismo, se ha demostrado que mecanismos que se utilizan para inducir la conducta sexual en ratas macho con baja actividad sexual, como el pincharles la cola, manipular al macho o cambiar a la hembra estímulo son incapaces de inducir la conducta sexual en animales con lesiones en el APM (Caggiula, Antelman y Zigmond, 1974; Heimer y Larsson, 1966/1967; Lisk, 1968; Stefanick y Davidson, 1987).

Se han propuesto tres hipótesis para explicar cómo las lesiones del APM interrumpen la conducta sexual: la primera sugiere que las neuronas del APM controlan los aspectos consumatorios de la cópula, la segunda propone que el APM está involucrada en componentes motivacionales del comportamiento sexual masculino y la tercera plantea que las neuronas de esta región del cerebro están involucradas en la regulación de aspectos motivacionales y consumatorios del comportamiento sexual masculino (Paredes, 2003).

Los machos no copuladores son conductualmente parecidos a los machos lesionados en esta área, ya que a pesar de que son evaluados varias veces con hembras sexualmente receptivas no presentan conducta sexual. Se han realizado diversos estudios en los cuales se demuestra que estos animales

existen en diferentes especies de mamíferos como describiremos en el siguiente capítulo.

CAPÍTULO III. MACHOS NO COPULADORES

Como ya describimos anteriormente, los machos no copuladores son aquellos animales que, a pesar de ser evaluados repetidamente con hembras sexualmente receptivas no presentan ningún patrón de conducta sexual. Se han identificado animales que no copulan en varias especies de mamíferos incluyendo el carnero (Alexander et al., 1999), la cabra, el gerbo, el hámster, y el conejillo de indias (Harding y Feder, 1976). Estos machos han sido poco estudiados por lo que no se conocen las causas de la ausencia de conducta sexual. A continuación, mencionaremos los estudios realizados en los machos no copuladores en diferentes especies.

3.1 Rata

La rata, es el mamífero en el cual se han llevado a cabo la mayoría de los estudios de los machos no copuladores. En el laboratorio se ha realizado una caracterización conductual en la que se demostró que estos machos no están conductualmente feminizados, ya que al ser montados por otros machos su coeficiente e intensidad de lordosis es muy bajo al igual que en los machos copuladores. Los tratamientos hormonales con benzoato de estradiol o benzoato de estradiol más progesterona incrementan la respuesta de lordosis en la misma proporción en ambos grupos de machos (Portillo y Paredes 2004). En pruebas de preferencia sexual en las que los animales son libres de elegir entre interactuar (oler y/o desplegar la conducta sexual) con una hembra sexualmente receptiva o un macho activo, se demostró que los machos no copuladores invierten el mismo tiempo con una hembra en estro que con un macho sexualmente activo (Portillo y Paredes, 2004). Mediante pruebas de motivación sexual en la cual los animales pueden oler, ver, oír pero no tener contacto físico con las hembras en estro o con los machos sexualmente activos

(Agmo, 2003), se evaluó si las hembras son atractivas para los machos no copuladores. Se encontró que los machos no copuladores no tienen preferencia por ninguna de las zonas incentivadas, es decir, pasan el mismo tiempo en la zona incentivada de la hembra en estro y del macho sexualmente activo (Portillo y Paredes, 2004). Por medio de pruebas de preferencia olfatoria, se demostró que los machos no copuladores a diferencia de los copuladores pasan menos tiempo oliendo el aserrín expuesto a secreciones de hembras en estro (Portillo y Paredes, 2004). Esto no se debe a bajos niveles de testosterona, ya que los tratamientos con dosis altas de propionato de testosterona en estos machos no incrementa la preferencia por estos olores (Portillo y Paredes, 2003). A nivel fisiológico, se ha demostrado que estos machos no tienen alteraciones en los mecanismos que controlan la erección, los movimientos penianos y la eyaculación (Stefanick y Davidson, 1987) y sus niveles de testosterona son similares a los de los machos copuladores (Damassa, et al 1977). Por otro lado, se ha reportado que los machos con baja actividad sexual (machos “dud”) tienen bajos niveles de receptores a estrógenos en el área preóptica medial en comparación con los machos copuladores (Clark, et al., 1985 citado en Portillo, 2004). Otros experimentos han demostrado que el volumen del núcleo sexualmente dimórfico del APM de machos no copuladores es menor que el de los machos copuladores (Rhees, et al., 1999).

3.2 Otras especies

Estos machos no copuladores, también se han descrito en otras especies de mamíferos como son el hámster, el conejillo de indias, el ratón, el carnero y el gerbo. En el hámster, el conejillo de indias y el ratón sólo se ha demostrado que la ausencia de la conducta sexual no se debe a bajos niveles plasmáticos de testosterona (Harding y Feder, 1976). En el carnero, se ha

reportado que los machos orientados a machos (como en esta especie son llamados) no montan a las hembras en estro y en pruebas de preferencia sexual montan a otros machos (Perkins, et al., 1992). Asimismo, tienen un menor número de receptores a estrógenos ocupados en el APM y un mayor número en la adenohipófisis anterior que los machos copuladores (Alexander et al., 1993). También, se ha demostrado que los machos orientados a machos están neuroanatómicamente feminizados en las estructuras sexualmente dimórficas como son el APM y la amígdala, ya que son similares a las de las hembras (Alexander, et al., 2001).

En el gerbo se ha demostrado que la conducta sexual masculina está relacionada con los niveles sanguíneos de testosterona. En los adultos, los niveles de esta hormona están relacionados con la ubicación intrauterina que tuvieron durante la gestación. Los machos que en el útero se gestaron entre dos hembras, cuando alcanzan la edad adulta tienen aproximadamente la mitad de los niveles de testosterona que los machos gestados entre animales de su mismo sexo (Clark et al., 1992). De los machos gestados entre dos hembras, el 22% no muestran interés por las hembras en estro, no realizan ningún patrón de conducta sexual (es decir, no montan, no intrometen y no eyaculan); sin embargo, aunque no copulan, muestran mayor cantidad de conductas parentales que los machos copuladores, por ejemplo pasan más tiempo anidando, cuidando y transportando a los recién nacidos (Clark et al., 2000).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Para que la conducta sexual se despliegue en la rata, es necesario que los machos identifiquen a su pareja sexual, en este caso a una hembra en estro. Para este reconocimiento, los machos utilizan la vista, el olfato y la audición. Una vez que son reconocidas, el macho comienza a tener una interacción sexual con la hembra desarrollando así el patrón de conducta sexual que incluye las montas, las intromisiones y la eyaculación. Sin embargo, aunque la mayoría de los machos de todas las especies de mamíferos llevan a cabo la cópula cuando las condiciones son adecuadas, se han identificado machos aparentemente normales que, a pesar de ser evaluados repetidamente con hembras en estro, no muestran conducta sexual. Estos machos llamados “no copuladores” se han descrito en diferentes especies de mamíferos como son la cabra, el conejillo de indias, el gerbo, el hámster, la rata y el ratón (Alexander et al., 1999; Anderson, 1936; Beach, 1942; Clark et al., 1992; Harding y Feder, 1976; Perkins et al., 1992).

Estudios previos en nuestro laboratorio, han demostrado que estos machos no tienen alteraciones en la coordinación motora fina de sus movimientos que les impidan perseguir a las hembras en estro y copular con ellas (Portillo y Paredes, 2003); tampoco están conductualmente feminizados ya que al igual que los machos copuladores, cuando son montados por otros machos su coeficiente e intensidad de lordosis son muy bajos (Portillo y Paredes, 2003). Asimismo, utilizando pruebas de motivación sexual demostramos que, mientras los machos copuladores prefieren a las hembras en estro, los machos no copuladores independientemente de que puedan copular o no con los animales estímulo, no prefieren a las hembras en estro (Portillo y Paredes, 2004).

También demostramos que los machos no copuladores tienen una menor preferencia por los olores de hembras sexualmente receptivas. No sabemos si esta disminución en la preferencia por olores sexualmente relevantes se debe a que los machos no pueden identificar estos olores o si no tienen interés por los mismos. Así en el primer experimento evaluamos la capacidad de los machos no copuladores para identificar olores sexualmente

relevantes. En el segundo experimento determinamos si estos machos son atractivos para hembras sexualmente receptivas. En el tercer experimento evaluamos si es posible inducir la conducta sexual en estos animales al observar a otros animales copular. En el cuarto experimento pesamos los órganos más representativos involucrados en el aspecto reproductivo para saber si los machos no copuladores tienen alguna alteración en el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas. En un último experimento se identificaron genes que se expresan de manera diferencial en el APM de los machos copuladores y los machos no copuladores para ayudarnos a identificar la neurobiología de los machos no copuladores.

HIPÓTESIS

- * Si los machos no copuladores no pueden discriminar olores sexualmente relevantes, se espera que sean incapaces de discriminar los olores provenientes de hembras en estro en comparación con hembras que no están en estro o de machos intactos sexualmente activos.
- * Los machos no copuladores y los machos copuladores son igualmente atractivos para una hembra sexualmente receptiva.
- * La observación de la conducta sexual ejercida por una pareja estímulo desencadena la conducta sexual en los machos no copuladores.
- * La ausencia de conducta sexual en los machos no copuladores se debe a diferencias en la expresión de algunos genes en el hipotálamo.

OBJETIVOS

- * Determinar si los machos no copuladores pueden discriminar estímulos olfatorios sexualmente relevantes.
- * Determinar si los machos no copuladores pueden discriminar entre estímulos olfatorios no sexuales.
- * Evaluar si una hembra sexualmente receptiva tiene preferencia por un macho copulador o un no copulador.
- * Determinar si la observación de la conducta sexual ejercida por un macho estímulo desencadena la conducta sexual en un macho no copulador.
- * Determinar si el peso corporal, de los testículos, de las vesículas seminales y del epidídimo es similar entre los machos copuladores y los machos no copuladores.

* Identificar genes expresados diferencialmente en el Área Preóptica Medial en machos copuladores y no copuladores por medio de microarreglos.

CAPÍTULO IV. MÉTODO

EXPERIMENTO I. PRUEBAS CONDUCTUALES

4.1.1 Animales

Se utilizaron ratas macho adulto (Wistar) quedando después del proceso de selección como explicaré posteriormente, 34 ratas obtenidas del bioterio del Instituto de Neurobiología, mantenidas en un cuarto con temperatura controlada, con administración libre de agua y comida libre y bajo un ciclo invertido de luz-oscuridad (12 horas luz / 12 horas oscuridad). A las ratas hembra utilizadas como estímulo se les aplicó el siguiente tratamiento hormonal, debido a que induce altos niveles de receptividad en las hembras (Moralí y Beber, 1979): GDX + 25µg/rata de Benzoato de Estradiol (EB) 52- 56 horas antes + 1 mg/ rata de progesterona (P) 4-6 horas antes de la prueba de comportamiento sexual.

4.1.2 Pruebas de comportamiento sexual en machos

El comportamiento sexual en machos se registró durante 3 pruebas de 30 min cada una con hembras receptoras en una caja de cópula (40 x 60 x 40 cm), (como se observa en la Figura 3) donde el macho es introducido inmediatamente después de haber colocado a la hembra receptiva. Con base en estas pruebas los machos se clasificaron en 3 grupos: machos copuladores, no copuladores, y lentos. Para llevar a cabo esta clasificación, se tomaron en cuenta los siguientes parámetros: latencia de monta (monta sin intromisión), el número de montas, la latencia de intromisión (monta con intromisión), el número de intromisiones, la latencia de eyacuación (monta con una intromisión final “profunda”, desmonta lenta y aseo), el número de eyacuaciones y el intervalo posteyaculatorio. Aquellos machos que eyacularon durante las tres pruebas (de 30 min cada una) fueron incluidos en el grupo de las ratas copuladoras (C). Los machos que en un lapso de 30 min no mostraron ningún parámetro de conducta sexual, es decir, no montaron ni intromitieron en

ninguna de las 3 pruebas fueron considerados no copuladores (NC). Los machos que montaron, intromitieron pero que no eyacularon en ninguna de las pruebas o que eyacularon en una de las tres pruebas fueron incluidos en el grupo de los machos lentos (L). Los machos que eyacularon en dos de las tres pruebas fueron eliminados del estudio.

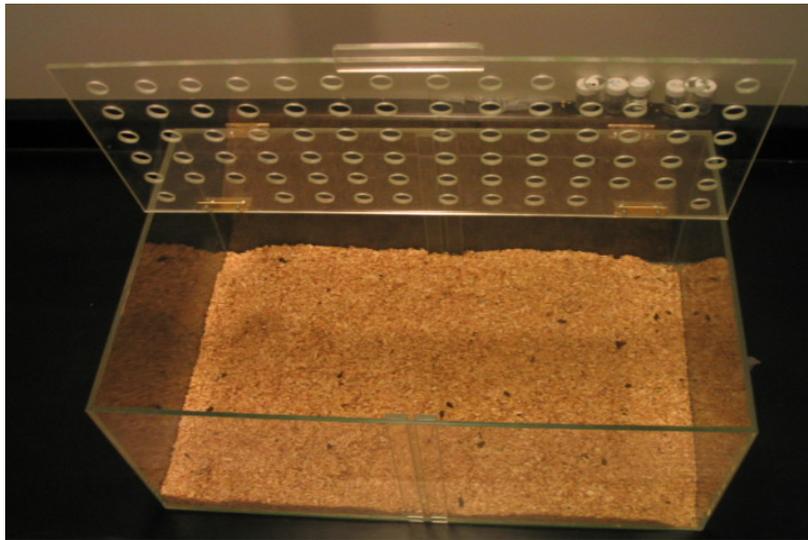


Figura 3. Caja de cópula para la prueba de comportamiento sexual.

EXPERIMENTO II. PRUEBAS DE DISCRIMINACIÓN OLFATORIA

4.2 Pruebas de discriminación olfatoria

Como ya se dijo, el sistema olfatorio es importante, entre otras funciones, para la reproducción. Por ejemplo, es importante en la detección de olores volátiles y no volátiles para el reconocimiento de una hembra sexualmente receptiva y así, poder llevar a cabo su reproducción. Con base en esto, decidimos utilizar una prueba de discriminación olfatoria para determinar si el olfato está alterado en la rata macho no copuladora y en los machos lentos.

4.2.1 Procedimiento

La prueba consiste en colocar al animal experimental en una caja de acrílico (15 x 33.5 x 23.5 cm) tapada con una malla sobre las barras de acero de la tapa de la caja donde se coloca la comida (Fig. 4). En primer lugar, se hacen dos presentaciones de agua desionizada en un papel filtro con 10 μ l durante dos minutos cada una para que el individuo se habitúe. Después de éstas, se hacen tres presentaciones de un olor sexualmente relevante (orina de hembra en estro, orina de hembra en anestro u orina de macho experto) en un papel filtro con 10 μ l durante dos minutos cada una seguidas de otras tres presentaciones de un olor sexualmente relevante diferente al primero.

En otra prueba se hacen dos presentaciones de agua y luego tres de un olor no sexualmente relevante (menta) seguido de otro olor no sexualmente relevante diferente (acetato de amilo –olor a plátano-). La menta y el acetato de amilo se diluyeron en glicerol 1:10 ml.

Si al haber algún olor (inicial referido al agua) o cambio de olor, el individuo dedica más tiempo (lo cual interpretamos como que vuelve a olfatear con interés) consideramos que ha logrado discriminar entre los dos olores. Para evaluar este interés se registra el tiempo que permanece oliendo el aroma nuevo, tal como lo describe Baum y Keverne (2002). Los olores sexualmente relevantes que se utilizaron fueron obtenidos colocando a los animales estímulo (8 hembras en estro, 8 hembras en anestro y 8 machos sexualmente expertos que no estaban dentro de los grupos experimentales) en una plancha de metal desinfectada con cloro minutos antes de dejar al animal estímulo sobre ella. Los animales se dejaron sobre la plancha hasta que orinaron. La orina se colectó con jeringas de 1 ml y se vació en tubos eppendorff etiquetados respectivamente y se colocaron a -6°C durante 10 días. Después de esto, se mezcló la orina de los ocho sujetos de un mismo tipo y se homogenizó la muestra en un vórtex y se hicieron alícuotas de 100 ml que fueron congeladas para su uso en las pruebas. Se realizó el mismo procedimiento para los demás sujetos.

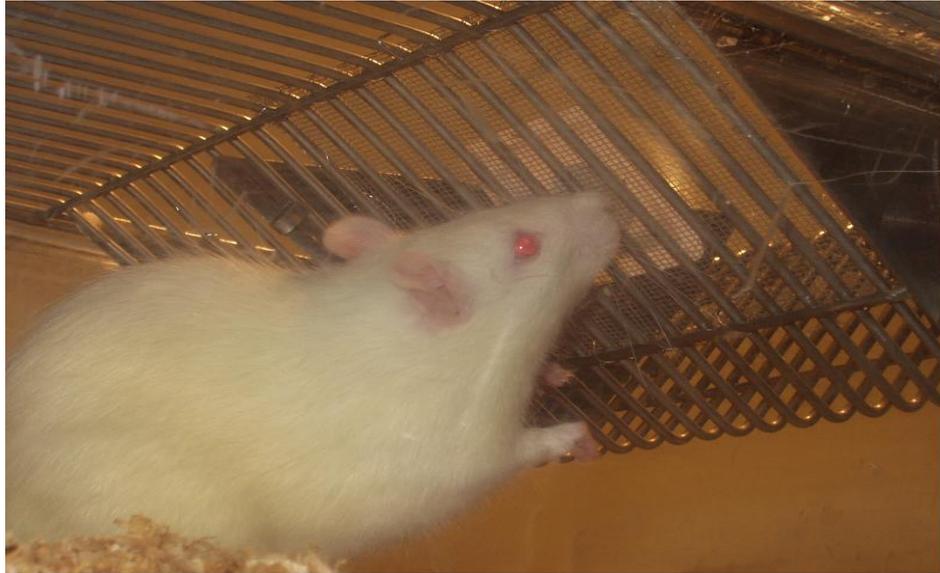


Figura 4. Fotografía de la caja para la prueba de discriminación olfatoria, en la cual se coloca el estímulo en un plato sobre la malla donde se coloca la comida habitualmente.

4.2.2 Estadística

Los datos se analizaron con un ANOVA 3 (niveles: C, NC y L) x 8 (estímulos), en caso de efectos significativos se hicieron comparaciones entre grupos con una prueba exacta de Fisher.

4.2.3 Resultados y discusión parcial

Como se observa en las figuras 5, 6 y 7 los tres grupos (C n=12, NC n=11 y L n=11) se comportaron de manera similar con todos los estímulos nuevos. En cada uno de los grupos se observó que tanto al olor de macho experto, como al olor de hembra en estro o en anestro o al olor de acetato de amilo o al de menta (en este último no fue tan claro) en la primera presentación, cuando el olor es novedoso, hubo diferencias significativas respecto al estímulo previo. En el caso de los machos lentos, la orina de macho experto vs la orina de hembra en estro, se encontró una diferencia significativa entre el tiempo que pasaron discriminando $[F(2,33)=4.04, P= 0.02]$, sesión $[F(7,33)= 23.915, P<$

0.01] interacción F [$F(14,33) = 2.52, P = 0.002$]]. La prueba post-hoc de Fisher nos indica que los machos lentos pasan mayor tiempo olfateando la orina de una hembra en estro que la de un macho experto. Cuando se comparó el tiempo de discriminación de la orina de una hembra en estro y una en anestro, también se encontraron diferencias significativas entre sesiones [$F(7,33) = 23.764, P < 0.0001$]]. Las pruebas post-hoc nos revelan que los machos copuladores pasan mayor tiempo olfateando la orina de una hembra en estro con respecto a los machos no copuladores (Figura 6). Por último, en el caso de los olores no sexuales, encontramos una diferencia significativa [grupo [$F(2,33) = 0.129, P = 0.878$], sesión [$F(7,33) = 19.277, P < 0.0001$] interacción F [$F(14,33) = 0.961, P = 0.4944$]] en la que las pruebas post-hoc nos indican que los machos copuladores y no lentos pasan mayor tiempo olfateando el olor de la menta que los machos no copuladores y más tiempo que los machos NC (Figura 7).

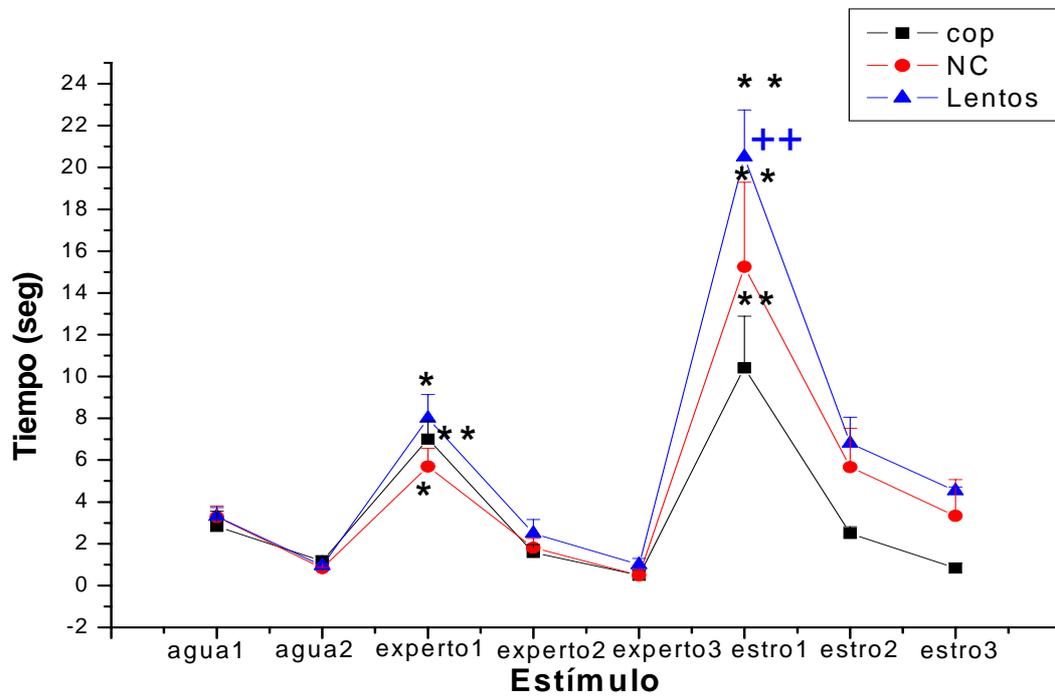


Figura 5. Tiempo que pasaron los machos copuladores (cop), los no copuladores (NC) y los lentos discriminando olores sexualmente relevantes orina de macho experto (ME) vs orina de hembra en estro (HE) y no relevante sexualmente como el agua (A).

* Diferente de estímulo previo en el mismo grupo $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.
 + + Diferente de los machos copuladores en la misma presentación $p < 0.05$.

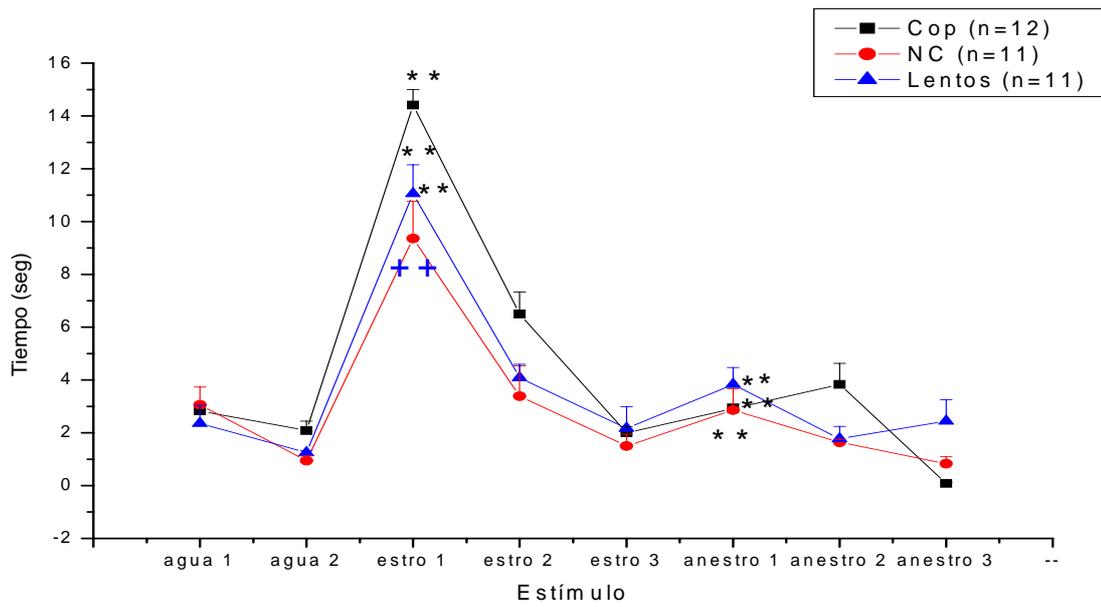


Figura 6. Tiempo que pasaron los machos copuladores, los no copuladores y los lentos discriminando olores sexualmente relevantes (orina de hembra en estro vs orina de hembra en anestro).

** Diferente de estímulo previo en el mismo grupo $p < 0.01$.

+ + Diferente de los machos copuladores en la misma presentación $p < 0.05$.

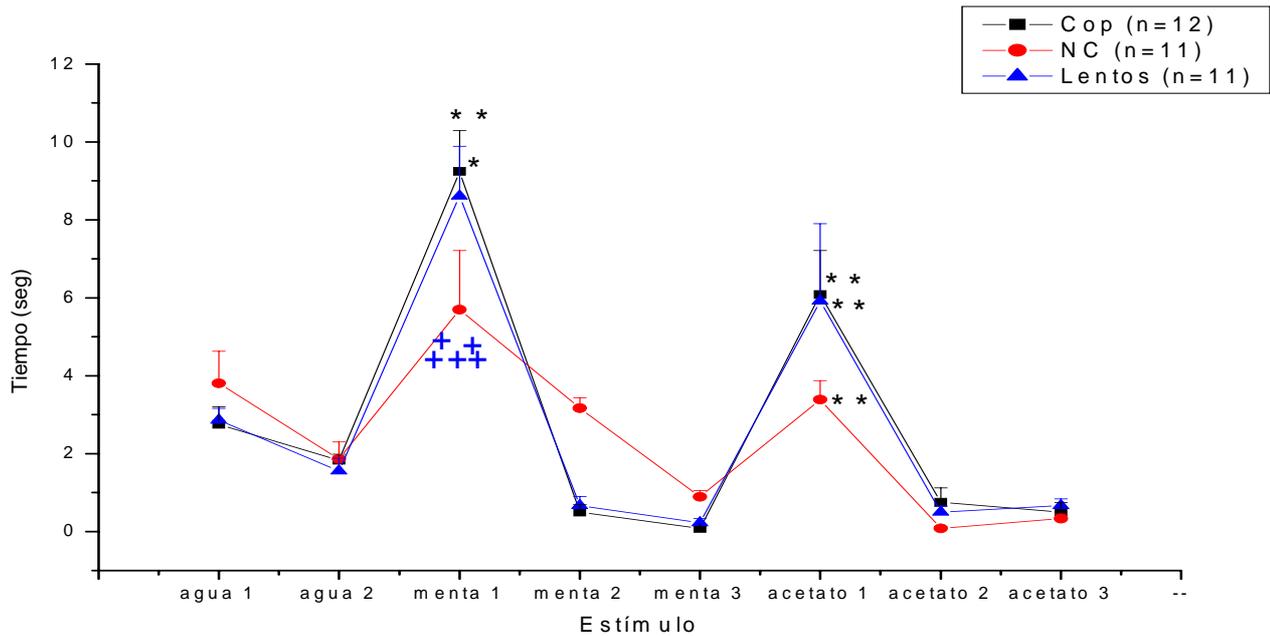


Figura 7. Tiempo que pasaron los machos copuladores, los no copuladores y los lentos discriminando olores no sexuales (menta vs acetato de amilo).

* Diferente de estímulo previo en el mismo grupo $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

+ + Diferente de los machos copuladores en la misma presentación $p < 0.05$.

+ + + Diferente de los machos lentos en la misma presentación $p < 0.05$.

EXPERIMENTO III. PRUEBAS DE MOTIVACIÓN SEXUAL INCENTIVA (MSI)

4.3 Pruebas de motivación sexual incentivada (MSI).

Se considera a la motivación sexual como un proceso en el cual un animal busca tener contacto con otro (Agmo, 1999). Este tipo de motivación se conoce como motivación sexual incentivada, y se da cuando se presentan animales estímulo al animal experimental, permitiéndoles olfatear y percibir sonidos del animal estímulo sin tener contacto sexual con éste. El animal estímulo tiene la función de activar el comportamiento de aproximación, que es lo que hace que funcione como un incentivo (Agmo, 1999) hacia el animal experimental. Con esta prueba evaluaremos si las hembras sexualmente

receptivas prefieren a un macho sexualmente activo (macho copulador) o a un macho no copulador.

4.2.4 Procedimiento

Después de seleccionar a los machos C, NC y L se realizaron las pruebas de MSI de acuerdo al procedimiento descrito por Agmo (2003). Este procedimiento se utilizó en una prueba para determinar si los machos NC son igual de atractivos para las hembras que los machos C. En otra prueba se determinó si los machos L son igual de atractivos para las hembras que los machos C. En estas pruebas se coloca a la hembra en el centro de una caja de acrílico (100 x 50 cm) con dos compartimentos laterales de 25 x 15 cm donde son colocados los animales estímulo como se muestra en la Figura 8. Antes de cada prueba, las hembras fueron habituadas a la caja; esta habituación consiste en colocar en el centro de la caja a la hembra durante 3 períodos de 10 min sin animales estímulo.

Durante la prueba, se coloca a los animales estímulo (en la prueba uno, a un macho copulador y a un macho no copulador; en la prueba dos, a un macho copulador y a un macho lento) en los compartimentos laterales y a la hembra receptiva en el centro de la caja. En estas pruebas, las hembras experimentales pudieron oír, ver y olfatear a los animales estímulo pero no copular con ellos. Estas pruebas se llevan a cabo durante 10 min, en los cuales se mide el tiempo que pasa la hembra receptiva en la zona incentivo de cada animal estímulo. Esto nos da un índice de motivación sexual incentivo y refleja la atracción de las hembras por alguno de los machos.

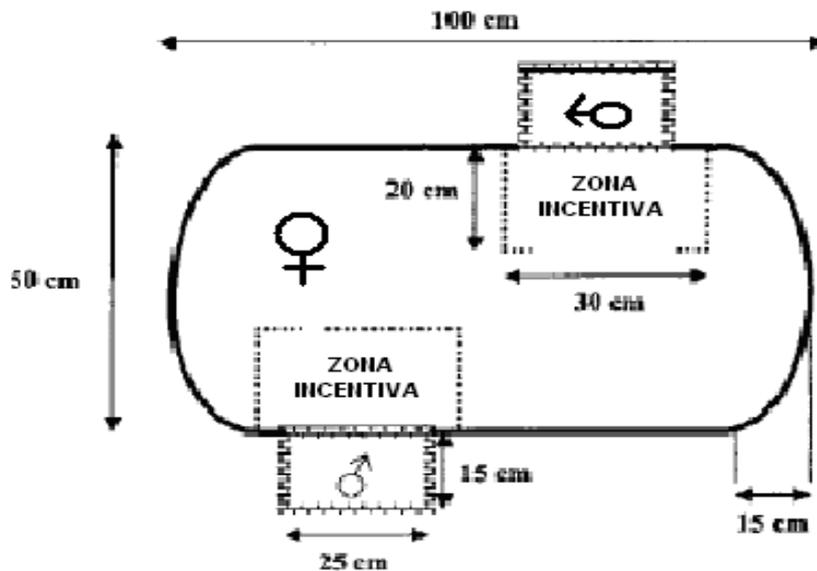


Figura 8. Diseño del aparato usado para la prueba de motivación sexual incentivada. Consiste básicamente en dos compartimentos de 25 cm x 15 cm de altura donde se coloca a los animales estímulo. Se marca una zona virtual conocida con el nombre de zona incentivada la cual cubre un área de 30 x 20 cm. Al centro de la caja se muestra el área donde se coloca el animal experimental. La caja se coloca al nivel del suelo. Adaptado de Agmo, 2003.

4.2.2 Estadística

Los resultados se analizaron con una prueba t-Student para comparar el tiempo que pasa la hembra con los machos copuladores y no copuladores. En otra prueba, se comparó el tiempo que pasa la hembra con los machos copuladores y los machos lentos. Esta prueba nos permite evaluar que tan atractivos son los machos para una hembra sexualmente receptiva.

4.2.3 Resultados

En la figura 9 se muestran los resultados del tiempo que pasó la hembra receptiva en cada una de las zonas incentivativas de los machos copuladores y no copuladores. Como puede observarse, al comparar el tiempo que pasa la hembra receptiva en la zona incentivativa del macho copulador con el tiempo que pasa en la zona incentivativa del macho NC, no se observaron diferencias significativas [$t_{(10)}=0.90$; $P=0.39$], esto sugiere que pasa el mismo tiempo en ambas zonas.

En la figura 10 se muestran los resultados del tiempo que pasó la hembra en cada una de las zonas incentivativas de los machos copuladores y los machos lentos. La hembra pasa significativamente más tiempo en la zona incentivativa de los machos lentos. Así, los machos no copuladores y los machos copuladores son igualmente atractivos para una hembra sexualmente receptiva. Esto sugiere que los machos lentos son más atractivos que los machos copuladores para una hembra sexualmente receptiva.

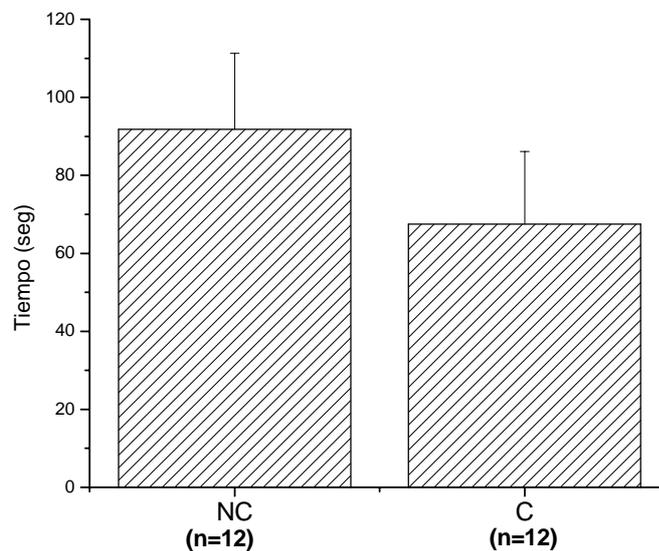


Figura 9. Tiempo que pasó la hembra sexualmente receptiva en las zonas incentivativas de los machos no copuladores (n=12) y copuladores (n=12).

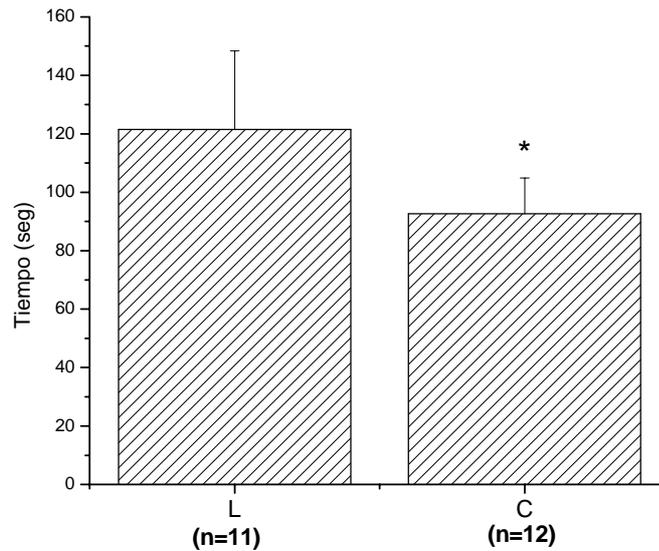


Figura 10. Tiempo que pasó la hembra sexualmente receptiva en las zonas incentivativas de los machos lentos (L, n=11) y copuladores (C, n=12).

Diferente del tiempo que pasó la hembra sexualmente receptiva con los machos lentos * $p < 0.05$.

EXPERIMENTO IV. PRUEBAS DE ESTIMULACIÓN SEXUAL

4.4 Pruebas de estimulación sexual.

Se ha demostrado que en algunas especies como los toros, los caballos y los cerdos la conducta sexual del sujeto se facilita al observar a otro macho copular con una hembra sexualmente receptiva (Kerruish, 1955; Pickett et al, 1977; Hemsworth y Galloway, 1979; Blockey, 1981; Mader y Price, 1984; Price et al., 1984; citados en Price,1998). El objetivo de este experimento fue evaluar si durante estas pruebas, las ratas macho no copuladoras despliegan el patrón de conducta sexual al estar observando la cópula entre un macho estímulo y una hembra sexualmente receptiva, a la cual tiene acceso. También, se evaluó si esta prueba facilita la conducta sexual en los machos lentos.

4.4.1 Procedimiento

Después de identificar y clasificar a los animales en las tres pruebas de comportamiento sexual con hembras sexualmente receptivas, con un intervalo de 48 hrs entre cada una, se les realizaron dos pruebas más en las cuales se colocó a una hembra sexualmente receptiva y a un macho sexualmente experto en una caja de cópula. Al mismo tiempo, dentro de la misma jaula se colocó un macho experimental (ya sea un no copulador, un copulador o un lento) por 30 min o hasta la primera eyaculación del macho estímulo sexualmente experto. Los animales estímulo copularon libremente y se registró la conducta sexual de los machos estímulo y de los sujetos experimentales tomando en cuenta los siguientes parámetros: latencia de monta, el número de montas, la latencia de intromisión, el número de intromisiones, la latencia de eyaculación y el intervalo posteyaculatorio. Esto nos permite investigar si los machos experimentales, al estar observando copular a un macho estímulo y a una hembra sexualmente receptiva, despliegan la conducta sexual (en los machos no copuladores) o en el caso de los machos copuladores y lentos se modifica el patrón de conducta sexual. En las primeras tres pruebas los sujetos copularon con una hembra sexualmente receptiva y en las pruebas cuatro y cinco se realizó la prueba de estimulación sexual previamente descrita.

4.4.2 Estadística

Los datos se analizaron con un ANOVA de 2 factores: grupo (3 niveles) x sesión (5 niveles), en caso de efectos significativos se hicieron comparaciones entre grupos con una prueba de Fisher. En el caso de los porcentajes de montas, intromisiones y eyaculaciones, los datos se analizaron con una chi-cuadrada y en caso de efectos significativos, se compararon los grupos con una prueba exacta de Fisher.

4.4.3 Resultados

Como se observa en la tabla 1 ni en los machos no copuladores ni en los machos lentos se modificó el porcentaje de sujetos que desplegaron la conducta sexual al estar en contacto con un macho estímulo sexualmente experto y una hembra sexualmente receptiva. En la tabla 2 se observan los parámetros de conducta sexual durante las cinco sesiones. Como puede observarse, se encontraron diferencias significativas entre los grupos en las variables latencia de monta [$F(1,90)=15.962$, $P= 0.0001$], sesión [$F(4,90)= 1.410$, $P< 0.236$] interacción F [$F(4,90)= 0.2791$, $P= 0.890$] e intromisión [grupo [$F(1,85)=15.29$, $P= 0.0002$], sesión [$F(4,85)= 0.560$, $P< 0.692$] interacción F [[$F(4,85)= 0.4702$, $P= 0.757$]]. También se encontraron diferencias entre sesiones en el número de intromisiones [grupo [$F(1,87)=1.308$ $P=0.255$], sesión [$F(4,87)= 4.211$, $P< 0.0036$] interacción F [$F(4,90)= 0.713$, $P= 0.585$]] siendo menor el número de intromisiones en la sesión 5 que en las previas. Estas diferencias sólo se presentaron entre el grupo de los machos lentos y el de los machos copuladores, sin embargo, dentro del mismo grupo no se presentaron diferencias significativas. Estos datos sugieren que, a diferencia de otras especies, en las ratas no es estimulante para un macho no copulador, un copulador y un lento el estar observando la cópula con una pareja estímulo.

Tabla 1. Porcentaje de machos que desplegaron montas (%SsM), Intromisiones (%Ssl) y eyaculaciones (%SsE) en las pruebas de estimulación sexual. Sesiones 1, 2 y 3: Macho experimental con hembra sexualmente receptiva. Sesiones 4 y 5: Macho experimental, macho estímulo y hembra sexualmente receptiva.

Sesión		Copuladores	No Copuladores	Lentos
1	% SsM	100 %	0 % *	63 % ⁺
	% Ssl	100 %	0 % *	63 % ⁺
	% SsE	100 %	0 % *	27 % [*]
2	% SsM	100 %	0 % *	81 % ⁺
	% Ssl	100 %	0 % *	63 % ^{* +}
	% SsE	100 %	0 % *	18 % [*]
3	% SsM	100 %	0 % *	81 % ⁺
	% Ssl	100 %	0 % *	81 % ⁺
	% SsE	100 %	0 % *	45 % ^{* +}
4	% SsM	100 %	0 % *	81 % ⁺
	% Ssl	91 %	0 % *	81 % ⁺
	% SsE	91 %	0 % *	45 % ^{* +}
5	% SsM	100 %	0 % *	45 % ^{* +}
	% Ssl	83 %	0 % *	36 % ^{* +}
	% SsE	83 %	0 % *	25 % ^{* +}

* Diferente de los machos Copuladores $p < 0.05$. + Diferente de los machos No Copuladores $p < 0.01$.

Tabla 2. Parámetros de conducta sexual en las pruebas de estimulación sexual. Sesiones 1, 2 y 3: Macho experimental con hembra sexualmente receptiva. Sesiones 4 y 5: Macho experimental, macho estímulo y hembra sexualmente receptiva. Las latencias se expresan en segundos (media \pm el error estándar). En el número de montas e intromisiones se presenta la media \pm el error estándar.

Sesión		Lentos	Copuladores
Latencia de Monta	1	336 \pm 144	160 \pm 37
	2	505 \pm 196	230 \pm 81 ^a
	3	513 \pm 134	190 \pm 55 ^a
	4	387 \pm 131	78 \pm 20 ^a
	5	255 \pm 80	88 \pm 19
Latencia de Intromisión	1	384 \pm 145	182 \pm 37
	2	433 \pm 186	289 \pm 85
	3	562 \pm 128	241 \pm 57 ^a
	4	529 \pm 159	112 \pm 16 ^b
	5	391 \pm 272	125 \pm 20
Latencia de Eyacuación	1	1393 \pm 172	898 \pm 116
	2	993 \pm 203	1051 \pm 92
	3	1203 \pm 161	789 \pm 59
	4	764 \pm 328	699 \pm 160
	5	906 \pm 202	838 \pm 172
Número de montas	1	8.6 \pm 1.6	7.3 \pm 1.6
	2	10.4 \pm 2.5	7.2 \pm 1.4
	3	10.9 \pm 3.1	9.8 \pm 2.3
	4	5.9 \pm 2	5.3 \pm 1.2
	5	6 \pm 1.3	6.8 \pm 1.5
Número de Intromisiones	1	16.4 \pm 2.7	17.3 \pm 2
	2	14.8 \pm 2.7	17.5 \pm 1.7
	3	16.6 \pm 2.6	14 \pm 1.3
	4	7.7 \pm 1.7 ^c	10.8 \pm 1.7 ^d
	5	12.9 \pm 1.3	16.2 \pm 2.5

^{a, b} Diferente de los machos lentos en la misma sesión; ^ap < 0.05 ; ^b p < 0.01.

^{c, d} Diferente de las primeras tres sesiones en el mismo grupo. ^cp < 0.05; ^dp < 0.01.

EXPERIMENTO V. PESO DE ÓRGANOS

4.5 Experimento 4. Peso de órganos

El eje hipotálamo-hipófisis-gónadas es fundamental para la conducta sexual. Una manera indirecta de saber si este eje está funcionando adecuadamente en los machos no copuladores es comparando el peso de los órganos más representativos tales como los testículos, las vesículas seminales y el epidídimo involucrados en el aspecto reproductivo. El objetivo de esta prueba es saber si los machos no copuladores tienen alguna alteración en este eje que no les permita llevar a cabo la conducta sexual y compararlos con los machos copuladores.

4.5.1 Procedimiento

Antes de ser sacrificados, los animales se pesaron en una balanza. Posteriormente se obtuvieron y pesaron los testículos, las vesículas seminales y el epidídimo de cada rata, con el fin de comparar y saber si hay alguna diferencia entre los pesos de los machos no copuladores y los machos copuladores. El grupo de los machos lentos no fue incluido en este experimento.

4.5.2 Estadística

Los resultados se analizaron con una prueba t para comparar el peso entre grupos.

4.5.3 Resultados

En la tabla 3 se muestran los datos correspondientes a los pesos, observando así que no hay diferencia alguna entre el peso corporal [$t(21) = -0.50, P=0.6208$], el peso de los testículos derecho [$t(21) = 0.60, P=0.05538$] e izquierdo [$t(21) = 0.72, P=0.4737$], de las vesículas seminales derecha [$t(13) = -0.15, P=0.8773$] e izquierda [$t(13) = 0.49, P=0.6321$]. Estos resultados sugieren

que los machos no copuladores no tienen alguna alteración hormonal que no les permita desplegar la conducta sexual. En el peso del epidídimo izquierdo se observó una diferencia significativa entre los grupos: en los machos no copuladores es menor que en los machos copuladores. Esto pudiera ser una diferencia espuria, ya que en los otros parámetros no se observaron diferencias.

Tabla 3. Peso de órganos de los machos no copuladores (n=11) y de los machos copuladores (n=12).

		Copuladores	No Copuladores
	Peso corporal	520.04 ± 14.70	507.78 ± 19.83
Testículo	Derecho	1.55 ± 0.04	1.52 ± 0.07
	Izquierdo	1.59 ± 0.04	1.52 ± 0.08
Vesícula seminal	Derecha	0.32 ± 0.03	0.32 ± 0.02
	Izquierda	0.33 ± 0.03	0.31 ± 0.02
Epidídimo	Derecho	0.69 ± 0.04	0.61 ± 0.02
	Izquierdo	0.67 ± 0.02	0.56 ± 0.02 *

* p < 0.05 diferente del epidídimo izquierdo de los machos copuladores

CAPÍTULO V. MICROARREGLOS. IDENTIFICACIÓN DE GENES

En la Biología Molecular y en las Ciencias Genómicas se han desarrollado diferentes técnicas para la identificación de genes, entre ellas, los Microarreglos: una técnica que permite analizar simultáneamente un número grande de genes, ya que constituye un arreglo de secuencias de fragmentos de DNA (sondas) adheridas a una superficie sólida (puede ser cristal o nylon). Esta técnica es de gran importancia en la Neurobiología ya que permite observar la expresión de genes a nivel celular.

Los microarreglos se clasifican en dos tipos: Microarreglos de puntos (Spotted Microarrays) o de cDNA y Microarreglos de oligonucleótidos de alta densidad (High density oligonucleotide microarrays). En el caso de los microarreglos de cDNA se depositan gotas de una solución con secuencias de genes expresados conocidos sobre un portaobjeto usando un brazo robótico, cada gota representa un gen particular. Para comparar la abundancia relativa de cada uno de estos genes en dos muestras determinadas, las dos muestras se marcan utilizando fluorocromos diferentes. Posteriormente ambas muestras se mezclan y se utilizan como sonda de hibridación sobre los cDNA de los microarreglos. Finalmente un "scanner" con láser, ilumina los puntos y determina la intensidad de los fluorocromos sobre cada uno de ellos, presentando así la abundancia relativa de esa secuencia en ambas muestras. Los microarreglos de oligonucleótidos de alta densidad se basan en la síntesis química sobre un cristal de silicio, de una secuencia de 25 pares de bases de DNA correspondiente a algún gen conocido.

Esta síntesis se lleva a cabo utilizando métodos de construcción de procesadores informáticos, para poder crear secuencias específicas en puntos definidos del microarreglo. En este tipo de microarreglo, el RNAm de la muestra se marca con fluorescencia y posteriormente se utiliza como sonda de hibridación sobre el arreglo. De esta forma, se evalúa la concentración de ese

mensajero en una sola población obteniéndose el perfil de expresión génica. Este tipo de microarreglos es de alta exactitud, ya que utiliza oligonucleótidos cortos, de una longitud de 20 a 25 nucleótidos.

Los microarreglos que utilizamos en este proyecto son los punteados, ya que se utilizan para comparar la expresión genética de dos muestras biológicas y son los de mayor precisión y exactitud; en el presente trabajo, comparamos la expresión entre los machos copuladores y los machos no copuladores.

5.1 Procedimiento

Los animales fueron sacrificados por decapitación y sin anestesia previa. Con la ayuda de un microscopio estereoscópico se extrajo el cerebro, se localizó el hipotálamo anterior y posterior de cada animal y se realizó la biopsia de éstos. Posteriormente, se procesaron las muestras para la extracción del mRNA de acuerdo a la técnica mostrada en el apéndice.

Los arreglos utilizados para este trabajo se adquirieron a través de la Unidad de Microarreglos del Instituto de Fisiología Celular (IFC) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), provenientes de la Universidad de Stanford (USA), con el número de catálogo MWG-Rat5k, correspondiente a un microarreglo de 5760 cDNA's del género *Rattus norvegicus* (rata albina), distribuidos en matrices de 4*8*12*15.

Se realizaron 4 pruebas de microarreglos con diferentes animales, utilizando 4 ratas macho copuladoras y 4 ratas macho no copuladoras para cada ensayo. El RNA de cada grupo se debe marcar con marcadores fluorescentes (en este caso marcadores de Cianina) Cy3 (rojo) y Cy5 (verde), como se muestra en la Fig. 11.

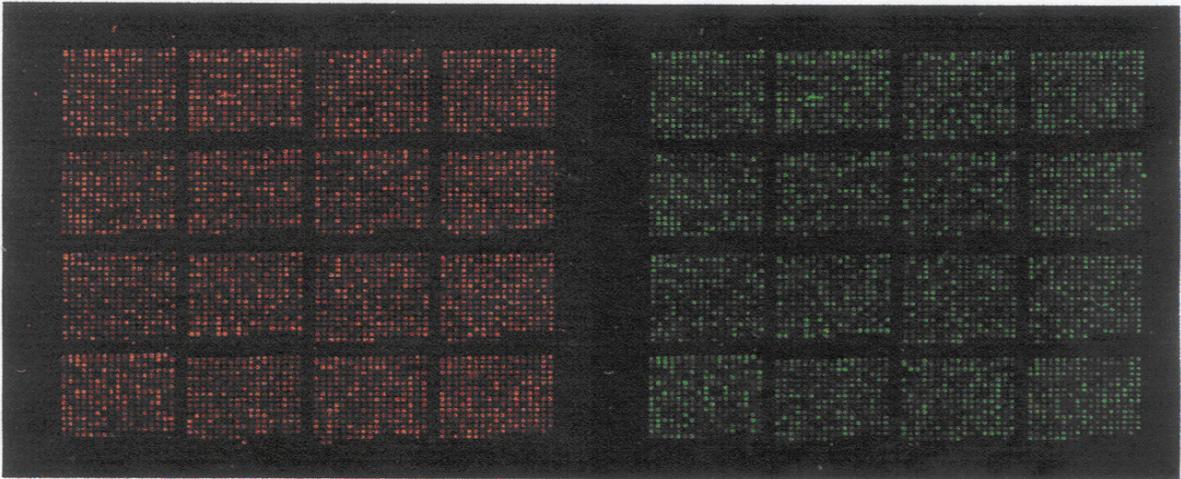


Figura 11. Imagen de fluorescencia para un microarreglo hibridizado con una sonda marcada con Cy3 (rojo) y una sonda marcada con Cy5 (verde).

Una vez obtenido el mRNA de las muestras, los microarreglos corrieron a cargo de la Unidad de Microarreglos del Instituto de Fisiología Celular (IFC) de la Universidad Autónoma de México a cargo del Dr. Jorge Ramírez Salcedo.

Posterior a esto, y siguiendo con la técnica desarrollada en el IFC se hibridiza la muestra con el cDNA complementario fijo en el portaobjetos del microarreglo, por medio de incubaciones y lavados y bajo condiciones de temperatura y pH específicos que permiten el reconocimiento y la unión de los nucleótidos (Fig. 12).

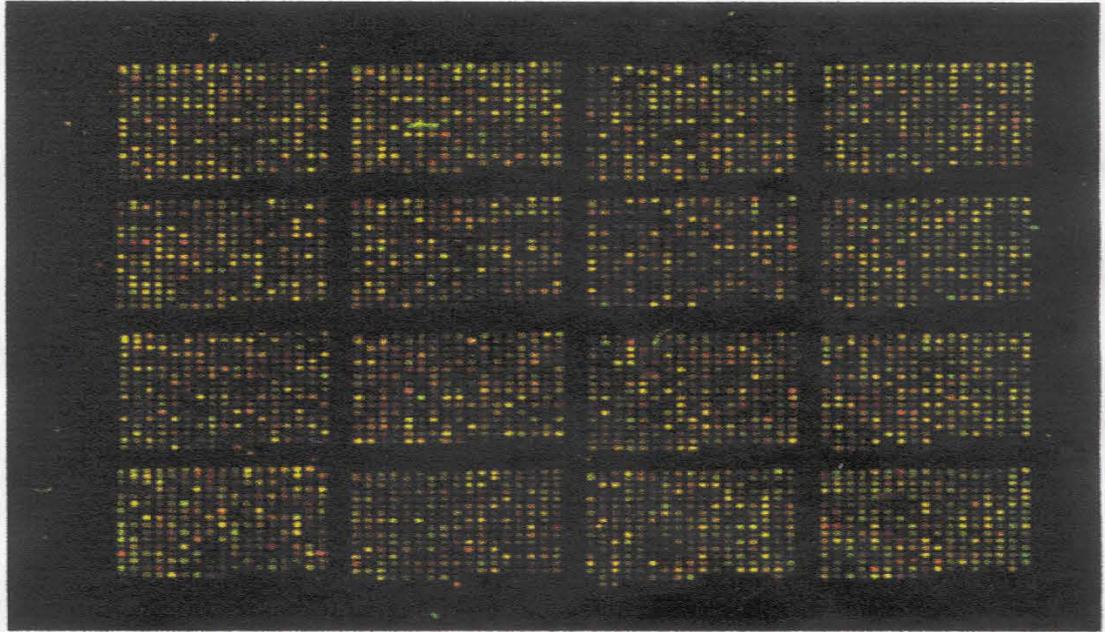


Figura 12. Imagen combinada de las imágenes de la Fig. 10

Una vez hibridado, se cuantifica la señal emitida por los fluoróforos de la sonda marcada de cada uno de los puntos y para cada una de las señales marcadas con Cy3 y Cy5, de acuerdo a la longitud de onda de cada marcador; por lo tanto, la densidad óptica será de acuerdo al nivel de expresión del mRNA de cada muestra (Fig. 13). La señal es leída por un Scanner y cuantificada por un Software (Stanford University Microarray Software) para asignar valores numéricos y poder ser graficados (Box-Plot) para su posterior análisis mediante el Programa "R". De este análisis estadístico, determinamos aquellos genes de expresión diferencial.

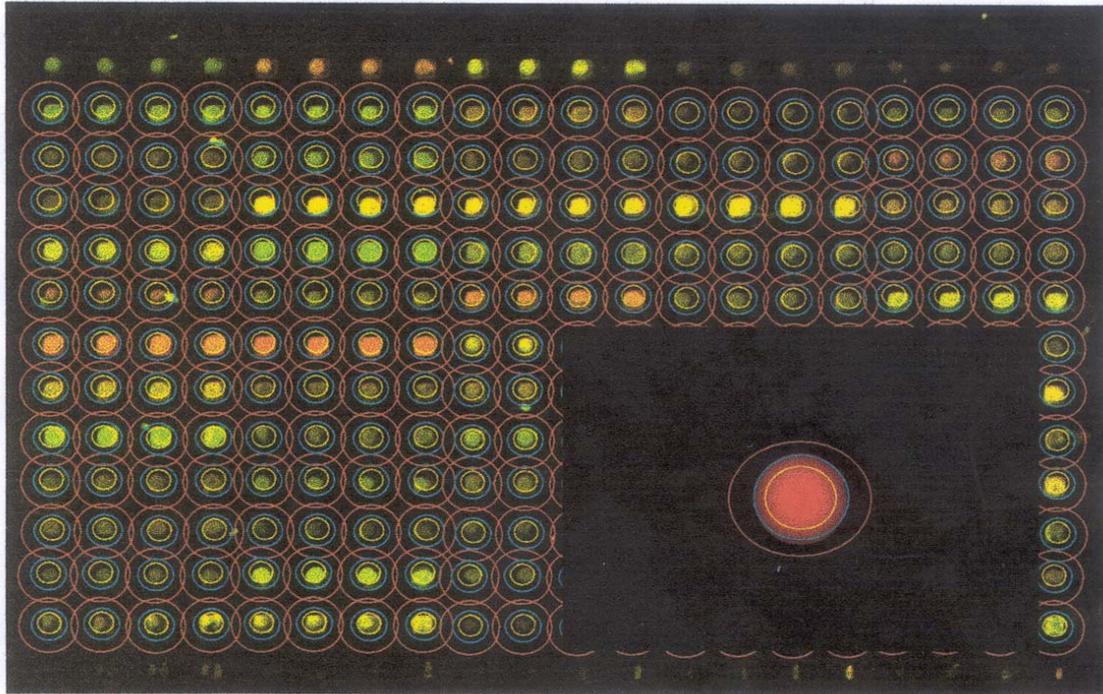


Figura 13. Cuantificación de la señal de un microarreglo. En el recuadro dentro del círculo amarillo, está la zona para obtener la densidad real, entre el círculo amarillo y el azul está la zona no considerada y entre el círculo azul y el rojo la zona para determinar la señal de fondo.

5.2 Resultados

Una vez procesadas las muestras por la Unidad de Microarreglos, analizamos estadísticamente los resultados mediante el programa "R". Los resultados obtenidos por la cuantificación de puntos se agruparon en matrices en tablas de Excel, mostrando los datos de densidad óptica y su fondo para cada una de las lecturas. El primer paso para el análisis de los datos es eliminar el fondo para cada una de las densidades mediante una fórmula (Fig. 14), posterior a esto, se normalizan los datos con la ayuda del programa y de la siguiente fórmula:

$$I_g = (\log)_2 \left[\frac{\text{Densidad óptica del mRNA de machos no copuladores}}{\text{Densidad óptica del mRNA de machos copuladores}} \right]$$

Donde:

I_g = Intensidad del gen

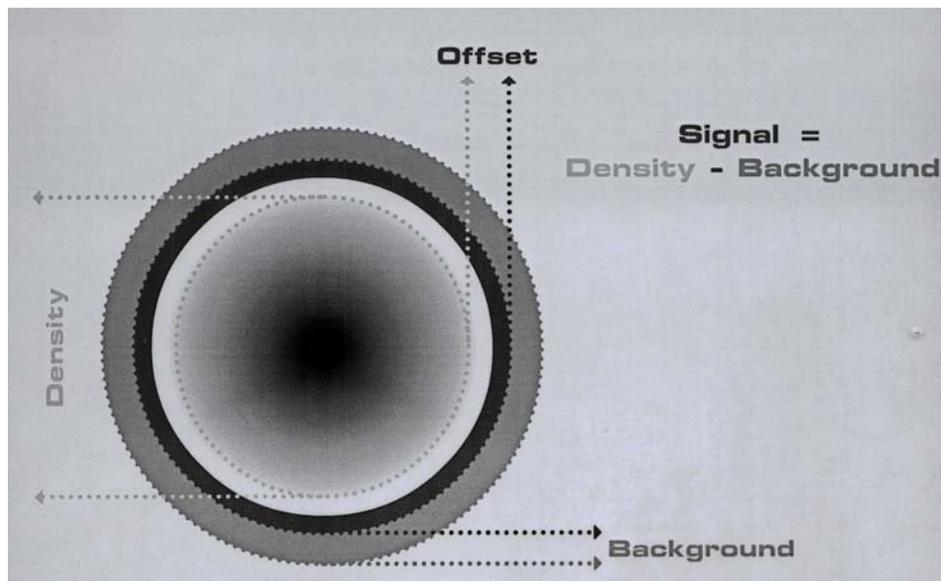
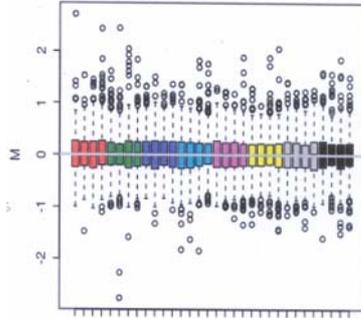


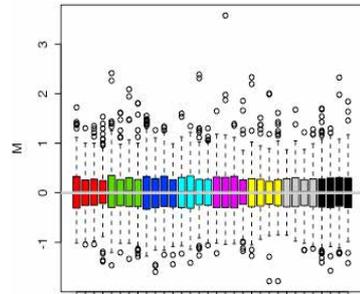
Figura 14. Obtención de la señal emitida por el gen.

Ya normalizados los datos, elegimos el intervalo adecuado para determinar la sub o sobreexpresión del gen, en este caso de [0.4 a 2.5]. Con base a esto, obtuvimos lo siguiente:

Arreglo 1



Arreglo 2



Arreglo 3

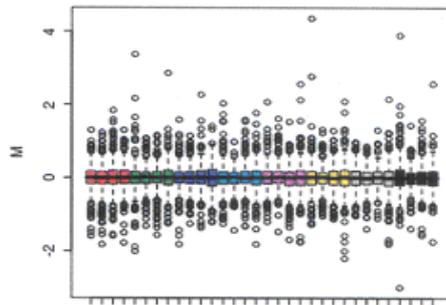


Figura 15. Gráficos de los datos normalizados para cada uno de los 3 microarreglos para un intervalo de [0.4 a 2.5].

En la tabla 4 se muestran los genes de expresión diferencial con un intervalo de [0.4 a 2.5] encontrados en el hipotálamo de ratas macho.

Tabla 4. Genes de expresión diferencial en el hipotálamo de ratas macho Copuladoras y No Copuladoras.

Nombre	Nombre	Localización	Función
Retinol deshidrogenasa tipo III	Rdh7	7q22	Oxidoreductasa.
Proteína ribosomal subunidad grande L36a	Rp136a	6q24	Proteína ribosomal L36a.
Factor de crecimiento fibroblasto 12	Fgf12	11q22	Involucrado en el desarrollo y función del sistema nervioso.
ESTs		Xq22	Similar a Acyl-Coa Tioesterasa.
Syndecan	Sdc4	3q42	Papel en la organización del citoesqueleto en relación al microambiente extracelular.
Apolipoproteína C1	ApoC-I	1q21	Modula la interacción de APOE con VLDL Beta e inhibe la unión de B-VLDL.
BCL2-antagonista/killer 1	Bak1	20p12	No disponible
Proteína de músculo pequeño	Smpx	Xq21	Homólogo de proteína humana pequeña expresada en el músculo estriado.
Proteína Rab3b	Rab3b	5q35	Papel en la función de la gránula secretora y exocitosis en células acinares pancreáticas.
Sortilina 1	Sort1	2q34	Une el receptor asociado a proteína (RAP). Puede estar involucrado en la distribución de la proteína endosomal.
Sulfotransferasa tiosulfato (Rhodanasa)	Tst	7q34	
mRNA para vesículas asociado a proteínas de membrana 2B	Vamp2	10q24	Involucrado en la fusión de transporte de vesículas a su membrana blanco.
Glutaminasa	Gls	9q31-q32	Cataliza la primera reacción en la vía primaria para el catabolismo renal de glutamina.
Proteína ribosomal L39	Rp139	Xq12	Pertenece a la familia de proteínas ribosomales L39E.
Proteína marcadora de la senescencia gen 2A axones 1 y 2	Smp2a	1q21	Sulfotransferasa.Papel en el metabolismo de esteroides y en la modificación de la excreción de componentes xenobióticos hidrofóbicos.
Rattus norvegicus beta-1 adducin (Add1) mRNA, partial cds	Add2	4q34	Proteína asociada al citoesqueleto de membrana que promueve el ensamblaje de la red espectrina-actina. Se une a calmodulina.
Proteína chaperona del estrés 70, asociada a microsoma,homólogo humano 60 kD	Stch	11p11	Actividad ATPasa asociada a microsoma independiente a la estimulación peptídica.

Nombre	Nombre	Localización	Función
Proteína ribosomal L24	Rp12 4	11q12	Pertenece a la familia de proteínas ribosomales L24e.
Proteína de unión al nucleótido G, beta polipéptido 2	Gnb2	12q12	Proteína de unión a nucleótido G.
Ribosomal protein S12	Rps1 2	1p12	Pertenece a la familia de las proteínas ribosomales S12e.
mRNA para PSD-Zip70, cds completo	Lzts1	16p14	
Factor de crecimiento de fibroblasto 8	Fgf8	1q54	Molécula de señalización en la inducción y el patrón del cerebro embrionario.
Brevican	Bcan	2q34	Proteoglicano
Homólogo de cdc 37 (ciclina) (S. cerevisiae)	Cdc3 7	8q13	Regulación del ciclo celular.
Lisofosfolipasa	LOC 2462 66	6q32	Lisofosfolipasa
Canal iónico-dependiente de nucleótidos cíclicos alfa 3	Cnga 3	9q21	Subunidad activado por un canal de nucleótidos cíclicos.Papel en olfacción y visión.
Carboxilesterasa inducible por fenobarbital (hígado)	LOC 1922 57	19p14	Carboxilesterasa en hígado.
Glutamate receptor, ionotropic, kainate 5	Grik	1q21	Receptor a glutamato subunidad KA2.
Proteína ribosomal S13	Rps1 3	1q34	Proteína ribosomal L36a.
Receptor purinérgico P2Y, proteína G	P2ry 2	1q32	Purireceptor
Sintasa ThromboxA 1	Tbxa s1	4q21-q22	Actividad catalítica. Pertenece a la familia del citocromo P450-
Acidic ribosomal protein P0	Arbp	12q16	Proteína ribosomal.
Proteína ribosomal S9	Rps9	1q12	Proteína ribosomal de la familia S4P.
Gen relacionado al retinoblastoma	Rb12	19p11	Miembro de la familia del gen de retinoblastoma. Contiene un dominio de unión E1A.
ESTs, proteína similar a RalBP1[Mus musculus]	RalB P1	1p12	
Probable receptor a feromonas (Go-VN7) mRNA, cds completo	LOC 2869 85	1q21	Indica cambios en la concentración extracelular de iones de calcio.
Cadena pesada Dineína 2	Dnch 2	8q11	Involucrada en procesos de transporte dependientes de microtúbulos.
Elemento VL30			

Nombre	Nombre	Localización	Función
Similar a proteína PiUS [R.norvegicus]	lhpk2	8q32	
Diskarina	Dkc1		Necesario para la biogenesis ribosomal y para el mantenimiento de los telómeros.
Ciclina D1	Ccnd1		Necesario para el control del ciclo celular en G1/S.
Matrina 3	Matr3	18q12.1	Papel en la transcripción o con otras proteínas de matriz nuclear para formar una red fibrogranular interna.
Proteína de unión a fosfatidiletanolamina	Pbp	12q16	Une ATP, opioides y fosfatidietanolamina.
ESTs, Similar a ligasa metionina tRNA [H.sapiens]		7q22	
Proteína específica de melanocitos	Msg1	Xq31	Factor de transcripción.
Receptor a Histamina H3	Hrh3	3q43	Inhibe la producción de cAMP estimulado por forskolina en respuesta a histamina.
Receptor GABA-A , subunidad alpha 4	Gabra4	14p11	Receptor a GABA (neurotransmisor inhibitor).
Ciclina p55CDC			

Discusión

Los resultados que obtuvimos en este experimento son los genes que identificamos , sin embargo, en estudios posteriores haremos otro ensayo y la hibridación in situ para saber si estos genes están realmente expresados en el Área Preóptica Medial de los machos copuladores y de los machos no copuladores.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

Estudios previos en el laboratorio, han demostrado mediante la prueba de motivación sexual incentiva que mientras los machos copuladores prefieren a las hembras en estro, los machos no copuladores no prefieren ni a las hembras en estro ni a los machos sexualmente activos (Portillo y Paredes, 2004). En el presente proyecto lo que nos interesaba era determinar, mediante la misma prueba, si un macho no copulador es igualmente atractivo que un macho copulador para una hembra sexualmente receptiva. En esta prueba los animales experimentales pueden oler, oír, ver pero no tener contacto físico con el macho copulador o con el macho no copulador (Agmo, 2003). Los resultados demuestran que los machos no copuladores y los machos copuladores son igualmente atractivos para una hembra sexualmente receptiva. Sin embargo, al comparar entre los machos copuladores y los machos lentos encontramos que los machos lentos son más atractivos que los machos copuladores para una hembra sexualmente receptiva. Esto podría deberse a que los machos lentos emiten sonidos y olores diferentes a los de los machos copuladores y a los de no copuladores.

En otro experimento, mediante pruebas de estimulación sexual demostramos que, a diferencia de otras especies, como es el caso de los toros, los caballos y los cerdos (Kerruish, 1955; Pickett et al, 1977; Hemsworth y Galloway, 1979; Blockey, 1981; Mader y Price, 1984; Price et al., 1984; citados en Price,1998) en la rata macho no se desencadena la conducta sexual en un macho no copulador al estar observando una pareja estímulo copular. Asimismo, la conducta sexual en los machos copuladores y en los machos lentos de manera general no se modificó; pero sí hubo una disminución significativa en el número de intromisiones sugiriendo con esto que no es estimulante para las ratas macho el observar la cópula de una pareja estímulo. Estos datos sugieren que a diferencia de otras especies, en las ratas no es estimulante para un macho no copulador, un copulador o un lento el estar observando la cópula con una pareja estímulo. De la misma manera, esta prueba no

induce la conducta sexual en el carnero y la cabra (Price et al, 1991 citado en Price, 1998).

Para que una rata reconozca a un individuo de su misma especie, es necesario el sentido del olfato; en estudios previos de nuestro laboratorio, mediante pruebas de preferencia olfatoria, Portillo y Paredes (2003) demostraron que los machos no copuladores al igual que los copuladores prefieren el aserrín expuesto a secreciones de hembras en estro, aunque la preferencia fue significativamente menor en los machos no copuladores. Sin embargo, no se había evaluado si los machos no copuladores tienen la misma capacidad que los machos copuladores para discriminar entre olores sexualmente relevantes. Utilizamos la técnica desarrollada por Baum y Keverne (2002) para evaluar la capacidad discriminatoria cuando se presentan diferentes estímulos olfatorios, en este caso orina de machos expertos, orina de hembras en estro y orina de hembras en anestro. Cuando los animales reconocen el estímulo nuevo y se les presenta dos veces más el mismo, los animales se habitúan. Con esta prueba demostramos que los machos no copuladores y los machos lentos tienen la misma capacidad para discriminar entre olores sexualmente relevantes. Esto nos indica que los machos no copuladores no tienen alterado el sistema olfatorio y que por ello no logren identificar a una hembra sexualmente receptiva y no puedan llevar a cabo la conducta sexual. Sin embargo, en el caso de la orina del macho experto contra la orina de la hembra en estro encontramos que los machos lentos pasan mayor tiempo olfateando la orina de una hembra en estro que los machos copuladores. Por otro lado, en el caso de la orina de hembras en estro contra la orina de hembras en anestro, los machos no copuladores pasan menor tiempo olfateando la orina de hembras en estro que los machos copuladores, coincidiendo así con los datos obtenidos por Portillo y Paredes (2003). Con la misma técnica y para comprobar que los machos no solamente pueden discriminar entre olores sexualmente relevantes, utilizamos olores no sexuales como la menta y el acetato de amilo (olor a plátano). Encontramos que en promedio, todos los individuos logran discriminar olores sexualmente relevantes y todos, excepto los No Copuladores,

logran discriminar olores sin relevancia sexual. Los machos no copuladores pasan menor tiempo olfateando el olor de la menta que los machos copuladores. Esto podría deberse a que el olor a menta no es estimulante para ellos como el olor a plátano, con ello, podríamos suponer que para los machos copuladores los olores alimenticios más comunes (como el caso del olor a plátano) son más importantes que los olores sexuales en comparación con los machos no copuladores. Aunque no existen evidencias, estudios posteriores podrían confirmar esta hipótesis.

Finalmente pesamos a los machos copuladores y a los machos no copuladores así como algunos de los órganos representativos de la conducta sexual como los testículos, las vesículas seminales y el epidídimo, involucrados en el aspecto reproductivo para investigar si los machos no copuladores tienen alguna alteración en éstos que no les permita ejecutar la conducta sexual. No encontramos diferencias entre los grupos. Sin embargo, el peso del epidídimo izquierdo de los machos no copuladores es significativamente menor que el de los machos copuladores.

Tomando en cuenta la caracterización conductual y los estudios que realizamos, los machos no copuladores son conductualmente machos normales. Sin embargo pueden ser animales que tengan alguna alteración que modificó la expresión génica que regula la conducta sexual masculina en el APM (estructura involucrada en la conducta sexual masculina) es por esto, que en el próximo capítulo detallaremos el uso de una herramienta de Biología Molecular (en este caso Microarreglos) para identificar genes de expresión diferencial en el APM de machos no copuladores y copuladores.

APÉNDICE

Extracción de RNA

Trizol

1. Disectar el tejido rápidamente en PBS, de preferencia en una cama de hielo. Se pueden reunir varios tejidos iguales para juntar 100 mg.
2. Homogeneizar 100 mg en 1 ml de Trizol. Usar una jeringa de 3 ml (Aguja verde).
3. Incubar a temperatura ambiente durante 5 min. Agregar 0.2 ml de cloroformo por cada ml de Trizol. Agitar en el vortex e incubar 2-3 min.
4. Centrifugar a 12000g por 15 min a 4°C. Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo.
5. Agregar 0.5 ml de isopropanol por cada ml de Trizol. Incubar a temperatura ambiente 10 min. Centrifugar a 12000 g 5 min a 4°C.
6. Desechar el sobrenadante. Lavar dos veces el botón con 1 ml de etanol al 75 % (en agua DEPC o libre de RNAsas), centrifugando a 7500 g durante 5 min a 4 °C.
7. Secar el botón y resuspender en 30 ml de agua DEPC o libre de RNAsa.
8. Cuantificar en el espectrofotómetro.

REFERENCIAS

- Agmo, A. (1999). Sexual motivation-an inquiry into events determining the occurrence of sexual behavior. *Brain. Res.* 105: 129-150.
- Agmo, A. (2002). Copulation-contingent aversive conditioning and sexual incentive motivation in male rats: evidence for a two stage process of sexual behavior. *Physiol. Behav.* 77: 425-435.
- Agmo, A. (2003). Unconditioned sexual incentive motivation in the male Norway rat (*Rattus norvegicus*). *J. Comp. Psychol* 117(1): 3-14.
- Alexander, B. M., J. N. Stellflug, et al. (1999). Behavior and endocrine changes in high-performing, low-performing, and male-oriented domestic rams following exposure to rams and ewes in estrus when copulation is precluded. *J. Anim Sci* 77(7): 1869-74.
- Alexander, B.M., Rose, J.D., Stellflug, J.A., Moss, G.E. (2001). Low sexually performing rams but not male-oriented rams can be discriminated by cell size in the amygdala and preoptic area: a morphometric study. *Behav. Brain. Res.* 119:15-21.
- Anderson, E. E. (1936). Consistency of test of copulatory frequency in the male albino rat. *J. Comp. Psychol* 21: 447-459.
- Bakker, J., T. Brand, et al. (1993). Hormonal regulation of adult partner preference behavior in neonatally ATD-treated male rats. *Behav. Neurosci* 107(3): 480-7.
- Bakker, J., Baum, M.J., y Slob, K. (1996). Neonatal inhibition of brain estrogen synthesis alters adult neural fos responses to mating and pheromonal stimulation in the male rat. *Neurosc.* 74 (1): 251-260.
- Bakker, J., Ophemert, J.V., y Slob, K. (1996). Sexual differentiation of odor and partner preference in the rat. *Physiol. Behav.* 60 (2): 489-494.

- Bargmann, C.I. (1997). Olfactory receptors, vomeronasal receptors, and the organization of olfactory information. *Cell*. 90: 585-587.
- 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. (1942). Analysis of factor involved in the arousal, maintenance and manifestation of sexual excitement in male animals. *Physiol. Med.* 4:173-198.
- Beach, F. A. and G. Levinson (1950). Effects of androgen in the glans penis and mating behavior of castrated male rats. *J. Exp. Zool.* 114: 159-171.
- Beach, F.A. (1967). Cerebral and hormonal control of reflexive mechanisms involved in copulatory behavior. *Physiol. Rev.* 47:289-316.
- Blaustein, J.D., Erskine, M.S. (2002). Feminine sexual behavior: Cellular integration of hormonal and afferent information in the rodent brain. *Hormon.and Behav.* 139-214.
- Bloch, G.J. y Mills, R. (1995). Prepubertal testosterone treatment of neonatally gonadectomized male rats: Defeminization and Masculinization of behavioral and endocrine function in adulthood. *Neurosc. and Biobehav. Rev.* 19 (2): 187-200.
- Bonsall, W.R., Clancy, A.N., y Michael R.P. (1992). Effects of the nonsteroidal aromatase inhibitor, Fradozole, on sexual behavior in male rats. *Horm. Behav.* 26: 240-254.
- Caggiula, A.R., Antelman, S.M y Zigmond, M.J. (1974). Ineffectiveness of sexually arousing stimulation after hypothalamic lesions in the rat. *Physiol. Behavior.* 12: 313-316.
- Canteras, N.S., Simerly, R.B., Swanson, L.W. (1992). Connections of the posterior nucleus of the amygdala. *J. Comp. Neurol.* 324: 143-179.
- Chiba, T. Murata, Y. (1985). Afferent and efferent connections of the medial preoptic area in the rat: a WGA-HRP study. *Brain. Res. Bull.* 14: 261-272.

- Clark, M.M., Vom Saal, F.S., Galef, B.G. (1992). Intrauterine positions and testosterone levels of adult male gerbils and correlated. *Physiol.Behav.* 51: 957-60.
- Clark, M.M., Galef, B.G. (2000). Why some male Mongolian gerbils may help at the nest: testosterone, asexuality and alloparenting. *Anim. Behav.* 59: 801-806.
- Claro, F., Segovia, S., Guillamón, A., Abril, A. (1995). Lesions in the medial posterior region of the BST impair sexual behavior in sexually experienced and inexperienced male rats. *Brain. Res. Bull.* 36: 1-10.
- Conrad, L.C.A., Pfaff, D.W. (1976). Efferents from medial basal forebrain and hypothalamus in the rat. I. An autoradiographic study of the medial preoptic area. *J. Comp. Neurol.* 169: 185-220.
- Cooke, B.M., Hegstrom, C.D., Villeneuve, L.S., Breedlove, S.M. (1998). Sexual differentiation of the vertebrate brain: principles and mechanisms. *Front Neuroend.* 19:323-362.
- Craig, V. J., Casida, L.E., y Chapman, B. (1954). Male infertility associated with lack of libido in the rat. *The am. natur.* 84 (842): 365-372.
- Crowley, W.R., Popolow, H.B., y Ward, B.JR. (1973). From dud to stud: copulatory behavior elicited through conditioned arousal in sexually inactive male rats. *Physiol. Behav.* 10: (391-394).
- Cutmore, T.R.H., y Zamble, E. (1988). A Pavlovian procedure for improving sexual performance of Non copulating male rats. *Archiv. of sex behav.* 17 (4): 371-380.
- Damassa, D. A., E. R. Smith, et al. (1977). The relationship between circulating testosterone levels and male sexual behavior in rats. *Horm. Behav* 8(3): 275-86.
- Dong, H.W., Petrovich, G.D., Swanson, L. W. (2001). Topography of projections from amygdala to bed nuclei of the stria terminalis. *Brain. Res. Rev.* 38: 192-246.
- Edwards, D.A. (1974). Non-sensory involvement of the olfactory bulbs in the mediation of social behaviors. *Behav. Biol.* 11:287-302.
- Edwards, D.A., Griffis, K.T., Tardivel, C. (1990). Olfactory bulb removal: effects on sexual behavior and partner preference in male rats. *Physiol. Behav.* 48: 447-450.

- Edwards, D.A, Walter, B., Liang, P. (1996). Hypothalamic and olfactory control of sexual behavior and partner preference in male rats. *Physiol. Behav.* 60: 1347-1354.
- Forger, N.G., Fishman, R.B., y Breedlove, M.S.(1992). Differential effects of testosterone metabolites upon the size of sexually dimorphic motoneurons in adulthood. *Horm. Behav.* 26: (204-213).
- Gerardin, D.C.C., Pereira, O. C.M., Kempinas, W.G., Florio, J.C., Moreira, E.G y Bernardi, M.M. (2005). Sexual behavior, neuroendocrine, and neurochemical aspects in male rats exposed prenatally to stress. *Physiol. Behav.* 84: 97-104.
- Giantonio, G.W., Lund, N.L., Gerall, A.A. (1970). Effect of diencephalic and rhinencephalic lesions on the male rat's sexual behavior. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 73: 38-46.
- Giuliani, D., Ottani, A., Ferrari, F. (2001). Influence of sildenafil on copulatory behaviour in sluggish or normal ejaculator male rats: a central dopamine mediated effect?. *Neuroph.* 42 (2002): 562-567.
- Guan, X., Blank J., Dluzen, D. (1993). Depletion of olfactory bulb norepinephrine by 6-OHDA disrupts chemical cue but not social recognition responses in male rats. *Brain. Res.* 622: 51-7.
- Guillamón, A., Segovia, S. (1996). Sexual dimorphism in the CNS and the role of steroids. In *CNS neurotransmitters and neuromodulators neuroactive steroids*. T.W. Stone (Ed). 127-152.
- Guillamón, A., Segovia,S. (1997). Sex differences in the vomeronasal system. *Brain. Res. Bull.* 44: 377-82.
- Halpern, M. (1987). The organization and function of the vomeronasal system. *Ann. Rev. Neurosc.* 10: 325-362.
- Hard, E., y Larsson, K. (1970). Effects of delaying intromissions on the male rat's mating behavior. *Journ. of Comp and Physiol Psych.* 70 (3): 413-416.
- Harding, C. F. and H. H. Feder (1976). Relation between individual differences in sexual behavior and plasma testosterone levels in the guinea pig. *Endocrin.* 98(5): 1198-205.

- Harding, M.S., y McGinnis, Y.M. (2003). Effects of testosterone in the VMN on copulation, partner preference, and vocalizations in male rats. *Horm. and Behav.* 43: 327-335.
- Harris, V.S., Sachs, B.D. (1975). Copulatory behavior in male rats following amygdaloid lesions. *Brain. Res.* 86: 514-518.
- Hansen, S., Kohler, C. Goldstein, M., Steinbusch, HVM. (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: 213-232.
- Hennessey, A.C., Wallen, K., y Edwards, D.A. (1986). Preoptic lesions increase the display of lordosis by male rats. *Brain. Res.* 370: 21-28.
- Heimer, L., Larsson, K. (1966/1967). Impairment of mating behavior in male rats following lesions in the preoptic-anterior hypothalamic continuum. *Brain. Res.* 3: 248-263.
- Hines, M., Allen, L.S., Gorski, R.A. (1992). Sex differences in subregions of the medial nucleus of the amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis of the rat. *Brain. Res.* 579: 321-326.
- Hlinak, Z. (1986). Precopulatory behavior of laboratory rat: an ethological approach. *Activit. Nerv, Sup.* 28: 108-116.
- Hlinak, Z., Madlafousek, K., Spinka, M. (1987). Transition from precopulatory to copulatory behavior in male rats with lesions in medial preoptic area: dependance on precopulatory pattern of female. *Activit. Nerv. Sup.* 29: 257- 262.
- Hlinak, Z. (1990). Precopulatory behavior of male rats: developmental aspects and dependence on female's solicitation. *Activit. Nev. Sup. (Praha).* 32: 264-82.
- Huang, L., y Bittman, E.L. (2002). Olfactory bulb cells generated in adult male golden hamsters are specifically activated by exposure to estrous females. *Hormones and Behavior.* 41: 343-350.
- Hurtazo, H. A. (2000). Análisis de la preferencia olfatoria y el condicionamiento de lugar en ratas macho con lesiones en el área preóptica media del hipotálamo anterior (APM/HA). Tesis de Licenciatura. Instituto de Neurobiología. Querétaro, Qro., México, Universidad Nacional Autónoma de México: 98.
- Hurtazo, H. A. (2002). Evaluación del funcionamiento del sistema vomeronasal por fos en ratas macho con lesiones en área preóptica media del

hipotálamo anterior (APM/HA). Tesis de Maestría. Instituto de Neurobiología. Querétaro, Qro., México, Universidad Nacional Autónoma de México: 80.

Kagan, J., y Beach, A.F. (1952). Effects of early experience on mating behavior in male rats. Department of Psychology and Institute of Human Relations.

Kaplan, E.M., y McGinnis, M.Y. (1989). Effects of ATD on male sexual behavior and androgen receptor binding: a reexamination of the aromatization hypothesis. *Horm. and Behav.* 23: 10-26.

Kelliher, K.R., Baum, M.J. y Meredith, M. (2001). The ferret's vomeronasal organ and accessory olfactory bulb: Effect of hormone manipulation in adult males and females. *The Anatomical Record.* 263: 280-288.

Kelliher, K.R., y Baum, M.J. (2002). Effect of steroids and coital experience on ferret's preference for the smell, sight and sound of conspecifics. *Physiol. and Behav.* 76: 1-7.

Keverne, E.B. (1999). The vomeronasal organ. *Scien.* 286: 716-723.

Kondo, Y., Shinoda, A., Yamanouchi, K., Ari, Y. (1990). Role of septum and preoptic area in regulating masculine and feminine sexual behavior in male rats. *Horm. Behav.* 24: 421-434.

Kondo, Y., Sudo, T., Tomihara, K., Sakuma, Y. (2003). Activation of accessory olfactory bulb neurons during copulatory behavior after deprivation of vomeronasal inputs in male rats. *Brain. Res.* 962: 232-236.

Larriva S, J. y Matsumoto, A. (1994). The vomeronasal system and its connections with sexually dimorphic neural structures. *Zool. Sci.* 11: 495-506.

Larsson, K. (1956) The Pattern of sexual behavior in the male rat. En: *Conditioning and sexual behavior in the male albino rat.* J. Emgren (Ed). Almqvist & Wiksell, Stockhol: 1-269.

Larsson, K. (1969). Failure of gonadal and gonadotrophic hormones to compensate for an impaired sexual function in anosmic male rats. *Physiol. Behav.* 4:733-737.

- Larsson, K. (1975). Sexual impairment of inexperienced male rats following pre- and postpubertal olfactory bulbectomy. *Physiol. Behav.* 14: 195-199.
- Larsson, K. (1979). Features of the neuroendocrine regulation of masculine sexual behavior. En: *Endocrine control of sexual behavior*. C. Beyer (Ed). Raven Press. New York. 77-169.
- Lehman, M.N., Winans, S.S. (1982). Vomeronasal and olfactory pathways to the amygdala controlling male hamster sexual behavior: Autoradiographic and behavioral analyses. *Brain. Res.* 240: 27-41.
- Lisk, R.D. (1968). Copulatory activity of the male rat following placement of preoptic-anterior hypothalamic lesions. *Exp. Brain. Res.* 5: 306-313.
- Lupo, C., Dessi-Fulgheri, F., Musi, B., Larsson, K. (1983). The effect of medial preoptic-anterior hypothalamic lesions on testosterone plasma levels and testosterone conversion in the hypothalamus of male rats. *Neurosc. Lett.* 39: 261-265.
- Meisel, R.L., Lumia, A.R., Sachs, B.D. (1980). Effects of olfactory bulb removal and flank shock on copulation in male rats. *Physiol. Behav.* 25: 383-387.
- Meisel, R.L., Lumia, A.R., Sachs, B.D. (1982). Disruption of copulatory behavior of male rats by olfactory bulbectomy at two, but not ten days of age. *Exp. Neurol.* 77: 612-624.
- Morali, G y Beber, C. Neuroendocrine control of mammalian estrous behavior. *Endocrine Control of Sexual Behavior*, edited by C. Beyer, Raven Press, New York. 1979.
- Pankevich, D.E., Baum, M.J., y Cherry, J.A. (2004). Olfactory sex discrimination persists, whereas the preference for urinary odorants from estrous females disappears in male mice after vomeronasal organ removal. *Journal of Neuroscience.* 24 (42): 9451-9457.
- Paredes, R., A. E. Haller, et al. (1990). Medial preoptic area kindling induces sexual behavior in sexually inactive male rats. *Brain. Res.* 515(1-2): 20-6.
- Paredes, R.G., Highland, L., Karam, P. (1993). Socio-sexual behavior in male rats after lesions of the medial preoptic area: evidence for reduced sexual motivation. *Brain. Res.* 618: 271-276.

Paredes, R.G., y Baum, M.J. (1997). Role of the medial preoptic area/anterior hypothalamus in the control of masculine sexual behavior. *Annual Review of Sex Research*. 8: 68-101.

Paredes, R.G., Tzschentke, T., Nakach, L. (1998). Lesions of the medial preoptic area/anterior hypothalamus (MPOA/HA) modify partner preference in male rats. *Brain. Res.* 81: 1-8.

Paredes, R. G. (2003). Medial preoptic area/anterior hypothalamus and sexual motivation. *Scand J. Psychol* 44(3): 203-12.

Paredes, R. and A. Agmo (2004). Has dopamine a physiological role in the control of sexual behavior? A critical review of the evidence. *Prog. Neurobiol.* 73: 179-226.

Paxinos, G., Watson, C H. (1982). The rat brain in stereotaxic coordinates. G. Paxinos. Academic Press. New York.1-400.

Paxinos (1995). The rat nervous system. G. Paxinos (Ed). Academic Press, London. 899-921.

Perkins, A., Fitzgerald, J.A., Price, E.O. (1992). Luteinizing hormone and testosterone response of sexually active and inactive rams. *J. Anim. Sci.*70: 2086-2093.

Phoenix, C. H., R. W. Goy, et al. (1959). Organizing action of prenatally administered testosterone propionate on the tissues mediating mating behavior in the female guinea pig. *Endocrinology* 65: 369-82.

Portillo, W y Paredes, R.G. (1998). Control neural de la conducta sexual masculina. En : *Biología de la Reproducción*. J. Velázquez (Ed). Universidad Metropolitana, Unidad Iztapalapa. 335-364.

Portillo, W y Paredes, R.G. (2003). Sexual and olfactory preference in non copulating male rats. *Physiol. Behav.* 80: 155-162.

Portillo, W. y R. Paredes (2004). Sexual incentive motivation, olfactory preference and activation of the vomeronasal projection pathway by sexually relevant cues in non-copulating and naive male rats. *Horm. Behav.* 46: 330-40.

- Puttman, K.S., Jianfang, D., Sato, S., y Hull, M.E. (2001). Testosterone restoration of copulatory behavior correlates with medial preoptic dopamine release in castrated male rats. *Horm. Behav.* 39: 216-224.
- Price, E.O., Borgwardt, R., et al. (1998). Sexual stimulation in male sheep and goats. *Animal Behav. Scie.* 59: 317-322.
- Rajendren, G., Dudley, C.A., Moss, R.L. (1990). Role of the vomeronasal organ in the male-induced enhancement of sexual receptivity in female rats. *Neuroendocrinology.* 52: 368-72.
- Rhees , R.W., Al-Saleh, N.H., Kinghorn, E.W., Fleming, D.E., Lephart, E.D.(1999) Relationship between sexual behavior and sexually dimorphic structures in the anterior hypothalamus in control and prenatally stressed male rats. *Brain Res. Bull.* 50: 193-199.
- Roffi, J., Chami, F., et al. (1987). Testicular hormones during the first few hours after birth augment the tendency of adult male rats to mount receptive females. *Physiol. Behav.* 39: 625-628.
- Saito, T.R., Moltz, H. (1986). Copulatory behavior of sexually naive and sexually experienced male rats following removal of the vomeronasal organ. *Physiol. Behav,* 37: 507-510.
- Salazar, D.E. Portillo, W.,et al. (2002). Effect of prenatal androgen receptor antagonist or aromatase inhibitor on sexual behavior, partner preference and neural Fos responses to estrous female odors in the rat accesory olfactory system. *Physiol. Behav.* 72: 337-346.
- Segovia, A., Guillamón, A. (1993). Sexual dimorphism in the vomeronasal pathway. *Horm. Behav.* 18:51-74.
- Segovia, A., Ghillamón, A. (1996). Searching for sex differences in the vomeronasal pathway. *Horm. Behav.* 30:618-626.
- Simerly, R.B., Gorski, R.A., Swanson, L.W. (1986). Neurotransmitter specificity of cells and fibers in the medial preoptic nucleus: An immunohistochemical study in the rat. *J. Comp. Neurol.* 246: 343-363.

- Simerly, R.B., Swanson, L.W. (1988). Projections of the medial preoptic nucleus: a phaseolus vulgaris leucoagglutinin anterograde tracing study in the rat. *J. Comp. Neurol.* 270: 209-242.
- Slob, A.K., Van der Werff, J.J., Bosch, T. (1997). The fundamental role of gonadal steroids in sexual behavior. *Bailliere's Clin Psychiatry.* 31: 1-24.
- Stowers, L., Holy, T.E., Meister, M., Dulac, C., Koentges, G. (2002). Loss of sex discrimination and male-male aggression in mice deficient for TRP2. *Science.* 295: 1493-1500.
- Sodersten, P. (1973). Estrogen-Activated sexual behavior in male rats". *Horm and Behavior.* 4 : 247-256.
- Stefanick, L.M., y Davidson, M.J. (1985). Genital responses in non copulators and rats with lesions in the medial preoptic area or midthoracic spinal cord. *Physiol. Behav.* 41: 439-444.
- Szechtman, H., Caggiula, A. R., Wulkan, D. (1978). Preoptic knife cuts and sexual behavior in male rats. *Brain. Res.* 3:569-95.
- Thrin K., Storm, R.D. (2003). Vomeronasal organ detects odorants in absence of signaling through main olfactory epithelium. *Nat. Neurosc.* 6: 519-525.
- Tirindelli, R., Mucignat-Caretta, C., y Ryba, J.P.N. (1998). Molecular aspects of pheromonal communication via the vomeronasal organ of mammals. *Trends Neurosci.* 21: 482-486.
- Whalen, R. E. (1961). Effects of mounting without intromission and intromission without ejaculation on sexual behavior and maze learning. *J. Comp. Physiol Psychol* 54: 409-15.
- Whalen, R. E., F. A. Beach, et al. (1961). Effects of exogenous androgen on sexually responsive and unresponsive male rats. *Endocrinology* 69: 373-380.
- Winans, S.S., Powers, J. B. (1977). Olfactory and vomeronasal desferentiation of male hamsters: histological and behavioral analyses. *Brain. Res.* 126: 325-344.
- Wood, R.I. Integration of chemosensory and hormonal input in the male syrian hamster brain. *Annals New York Academy of Sciences.* 362-372.

Wood, R.I. (1997). Thinking about networks in the control of male hamster sexual behavior. *Horm. Behav.* 32: 40-45.