



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

---

---

**“NEUROGÉNESIS EN EL BULBO OLFATORIO  
INDUCIDA POR CONDUCTA SEXUAL  
EN LA RATA HEMBRA”**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS**  
P R E S E N T A  
**BIOL. REBECA CORONA GARCÍA-CABRAL**

TUTOR: Dr. Raúl Gerardo Paredes Guerrero

Juriquilla, Querétaro. Agosto 2008



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México por la oportunidad de realizar mis estudios de maestría.

Al Dr. Raúl Paredes un enorme agradecimiento por dejarme ser parte de su grupo de trabajo, por haber confiado en mí, por su paciencia, consejos y por guiarme durante la realización de este trabajo.

A las Doctoras María Magdalena Giordano y María Teresa Morales por sus comentarios, consejos y enseñanzas.

A mis compañeros del laboratorio por brindarme su amistad y enseñanzas en todo momento.

A los estudiantes de los programas de verano de la investigación científica que auxiliaron al desarrollo de este trabajo.

A mis compañeros de la maestría y a los buenos amigos que encontré en el instituto.

Al M.V.Z. Francisco Camacho, la Biol. Soledad Mendoza y a la M.enC. Gema Martínez por la asistencia técnica brindada.

A la I.S.C. Elsa Nydia Hernández de la Unidad de Microscopía, a Ma. Del Pilar Galarza de la Biblioteca, al M.V.Z. Martín García del Bioterio y a la Lic. Ma. De Lourdes Lara de Videoconferencia, gracias por todo su apoyo; especialmente a la M.enC. Leonor Casanova por su respaldo incondicional y amistad.

Al CONACYT (No. de Registro 209275) por la beca otorgada y por el apoyo con los proyectos V40286M y 53547, DGAPA-PAPIT IN204206.

A Ethel, Mónica, Yolanda, Myrna, Patricia, Uriel Eva, Gina, Iris, Ramón, Rafael, Marcelino y Salvador por ser parte importante en mi vida y por su amistad.

A mis tíos: Arturo, Liz, Bertha, Jaime y a mi abuela: María de la Luz por su cariño.

Particularmente quiero agradecer a mi tía Tere por los múltiples consejos académicos y personales, así como por el apoyo y el cariño que siempre me ha ofrecido.

*Quiero dedicar esta tesis a mi familia por ser mi soporte y darme todo su amor. A mis padres que siempre han sido un ejemplo de entereza y constancia. A mi madre, Sylvia por ser mi compañera en todo momento. A mi padre, Rodolfo por mostrarme siempre que las ilusiones superan las adversidades. A mis hermanos, María y Alonso por comprenderme y apoyarme.*

# ÍNDICE

<b>ABSTRACT.....</b>	<b>7</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>8</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>9</b>
<b>ANTECEDENTES.....</b>	<b>11</b>
CAPÍTULO 1.....	11
CONDUCTA SEXUAL EN LA RATA HEMBRA .....	11
1. <i>Patrones conductuales</i> .....	11
2. <i>Condiciones fisiológicas que determinan la receptividad sexual en la rata hembra</i> .....	13
2.1 Ciclo estral .....	13
2.2 Manejo del ciclo estral en condiciones de laboratorio.....	17
2.3 Control endocrino de la conducta proceptiva y receptiva.....	18
2.3.1 Conductas proceptivas .....	19
2.3.2 Conductas receptivas.....	20
3. <i>Cópula regulada por la hembra</i> .....	22
CAPÍTULO 2.....	26
SISTEMAS OLFATORIOS .....	26
2. <i>Sistema Olfatorio</i> .....	26
2.1 Sistema Olfatorio Accesorio.....	28
2.2 Sistema Olfatorio Principal .....	30
2.3 Neurogénesis en el bulbo olfatorio.....	32
CAPÍTULO 3.....	33
PLASTICIDAD.....	33
3. <i>Plasticidad en el cerebro adulto</i> .....	33
3.1 Neurogénesis en el cerebro adulto.....	35
3.1.1 Proceso de neurogénesis en el bulbo olfatorio .....	37
3.2 Papel de las hormonas ováricas en la Neurogénesis .....	41
3.3 Herramientas experimentales destinadas al estudio de proliferación celular y neurogénesis .....	43
3.3.1 Técnicas .....	43
<b>TRABAJO DE INVESTIGACIÓN.....</b>	<b>46</b>
CAPÍTULO 4.....	46
TRABAJO DE INVESTIGACIÓN .....	46
4. <i>Planteamiento del problema</i> .....	46
4.1 Hipótesis.....	48
4.2 Objetivo General .....	48
4.2.1 Objetivos Específicos.....	48
4.3 Sujetos, Material y Método .....	49
4.3.1 Análisis de imagen y cuantificación de células inmunorreactivas a BrdU .....	58
4.3.2 Análisis Estadístico.....	61
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>62</b>
CAPÍTULO 5.....	62
RESULTADOS.....	62
5.1 <i>Análisis de Datos Conductuales</i> .....	62
5.2 <i>Análisis y Cuantificación de Proliferación Celular</i> .....	64

<b>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES .....</b>	<b>69</b>
CAPÍTULO 6 .....	69
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES .....	69
6.1 <i>Discusión</i> .....	69
6.2 <i>Conclusiones</i> .....	74
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>75</b>
CAPÍTULO 7 .....	75
BIBLIOGRAFÍA .....	75
<b>ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....</b>	<b>80</b>
CAPÍTULO 8 .....	80
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS .....	80
8.1 <i>Índice de Figuras</i> .....	80
8.2 <i>Índice de Tablas</i> .....	85

## **ABSTRACT**

Sexual behavior is a representative response of the physiological and emotional mood of the organisms. The feminine sexual behavior is characterized for a proceptive stage, in which female presents a variety of patterns to bring the male, one of this is the approaching and runaway from the male that is evident when female can paced mating behavior, and the other stage is the receptive one in which the female assumes a lordosis posture to allow mount from a male. There are physiological and behavioral implications that favor reproduction when mating is paced by the female. In rodents olfaction is important to determine this behavior. There are two olfactory structures that process sexually relevant cues: the main olfactory bulb (MOB) and the accessory olfactory bulb (AOB), which is really important for the process of pheromones and the display of feminine sexual behavior. The olfactory bulb is a plastic structure, sensitive to novel and relevant olfactory stimuli. This structure receives and integrates new neurons during life that modulates the sensory information process. In this work we evaluated plastic changes in the female rodent brain, specifically the possible influence of sexual behavior (paced or non-paced by the female) in the incorporation of new cells in the olfactory bulb 15 days after the stimuli was evaluated. The mitotic marker BrdU was administered on the stimulus day. The cells marked localized in the glomerular, mitral and granular layers of the MOB and AOB were counted. The quantitative analysis shows an increase in the number of BrdU+ cells in the mitral and granular layers of the AOB in the group that paced the mating, however there weren't any differences in the MOB between stimuli. The results of this work suggest that paced mating behavior is a stimulus capable to have an influence in the number of new cells in the AOB but not in the MOB.



## RESUMEN

La conducta sexual es representativa del estado fisiológico y emocional de los organismos. La conducta sexual femenina se caracteriza por una etapa de proceptividad, en la cual la hembra realiza una serie de patrones para atraer al macho, entre ellos acercamientos y alejamientos hacia el mismo, que son más evidentes cuando la cópula es regulada por la hembra, y una etapa de receptividad en la cual la hembra asume una postura de lordosis para permitir la penetración del macho. Cuando la hembra regula la cópula hay implicaciones fisiológicas y conductuales que favorecen la reproducción. El olfato en los roedores es importante para el despliegue de esta conducta. Existen dos estructuras olfatorias que se encargan de procesar los olores: el bulbo olfatorio principal (BOP) y el bulbo olfatorio accesorio (BOA), el cual es muy importante para el reconocimiento de feromonas y el despliegue de la conducta sexual femenina. El bulbo olfatorio es una estructura plástica, sensible a estímulos olfatorios novedosos y relevantes. Esta estructura recibe e integra nuevas neuronas a lo largo de la vida las cuales modulan el procesamiento de la información sensorial. En éste trabajo se evaluaron cambios plásticos en el cerebro de la rata hembra, en específico la influencia de la conducta sexual (regulada ó no regulada por la hembra) en la incorporación de células nuevas en el bulbo olfatorio 15 días después del estímulo. Se utilizó el marcador mitótico BrdU administrado el día del estímulo. Se cuantificaron las células marcadas y localizadas en las capas glomerular, mitral y granular del bulbo olfatorio principal y accesorio. El análisis cuantitativo mostró un incremento de células BrdU+ en las capas mitral y granular del BOA de las hembras que regularon la cópula, sin embargo no hubo diferencias en el BOP entre los estímulos. Los resultados de este trabajo sugieren que la cópula regulada por la hembra es un estímulo capaz de influir en el número de células nuevas en el BOA pero no en el BOP.

## INTRODUCCIÓN

La conducta sexual desde un punto de vista evolutivo es fundamental para la supervivencia, generación tras generación de las especies, sin embargo, de acuerdo a Agmo (1999) no tiene otro propósito más para el individuo que su propia ejecución. En los mamíferos, la conducta sexual consta de dos etapas, la primera motivacional en la cual el individuo comienza la interacción con la pareja y se da la atracción y la segunda es la etapa de ejecución en la cual se presentan una serie de parámetros conductuales fácilmente identificables. En la rata hembra, el despliegue de esta conducta es altamente dependiente de las hormonas estradiol y progesterona. La estimulación que la hembra recibe de la cópula es importante para la eficiencia reproductiva, ya que se ha descrito que cuando la hembra controla los contactos copulatorias regula también la estimulación vagino-cervical que recibe, lo cual incrementa la probabilidad de reproducirse mediante la activación del sistema de control hormonal (Erskine 1989).

Para la expresión de la conducta sexual se requieren de estímulos olfatorios quimiosensoriales sexualmente relevantes, como las feromonas (Keller et al. 2006 a,b), por lo que el olfato en los roedores juega un papel importante. Existen dos estructuras olfatorias encargadas del procesamiento de estímulos olfatorios, cada uno de ellos procesa un tipo de olor en específico: el bulbo olfatorio principal (BOP) y el bulbo olfatorio accesorio (BOA). El BOA, en particular, se encarga de captar los olores producidos antes y durante la cópula, los cuales inducen una activación del circuito de control hormonal en las hembras (Rajendren y cols. 1993).

El bulbo olfatorio es una estructura plástica con capacidad de neurogénesis que incorpora nuevas neuronas a lo largo de la vida, las cuales son sensibles a estímulos olfatorios que favorecen su supervivencia (Petreanu y Alvarez-Buylla 2002). Olores diversos, novedosos, (Rocheffort y cols. 2002 y 2005; Taupin 2005), exposición a pareja heterosexual (Mak y cols. 2007) ó la inducción de la receptividad sexual en las hembras por la presencia de un macho (Smith y cols. 2001) pueden modular esta neurogénesis. Por consiguiente, los olores sexualmente relevantes que se liberan antes, durante y después de la cópula podrían influir también en el proceso de neurogénesis del bulbo olfatorio.

Utilizando el marcador mitótico BrdU, en este trabajo se propuso evaluar la influencia de la conducta sexual femenina cuando la hembra regulara los contactos copulatorios ó cuando el macho regulara los contactos copulatorios, sobre el número de células nuevas en el bulbo olfatorio principal y accesorio quince días después del estímulo.

# **ANTECEDENTES**

## ***Capítulo 1.***

### ***Conducta Sexual en la rata hembra***

#### **1. Patrones conductuales**

La conducta sexual está presente en diversos organismos y es indispensable para la preservación de las especies de generación a generación pero no para la supervivencia del individuo, siendo para ésta última una conducta motivacional, por lo tanto la conducta sexual no tiene otra finalidad o propósito para el individuo más que su propia ejecución (Agmo 1999).

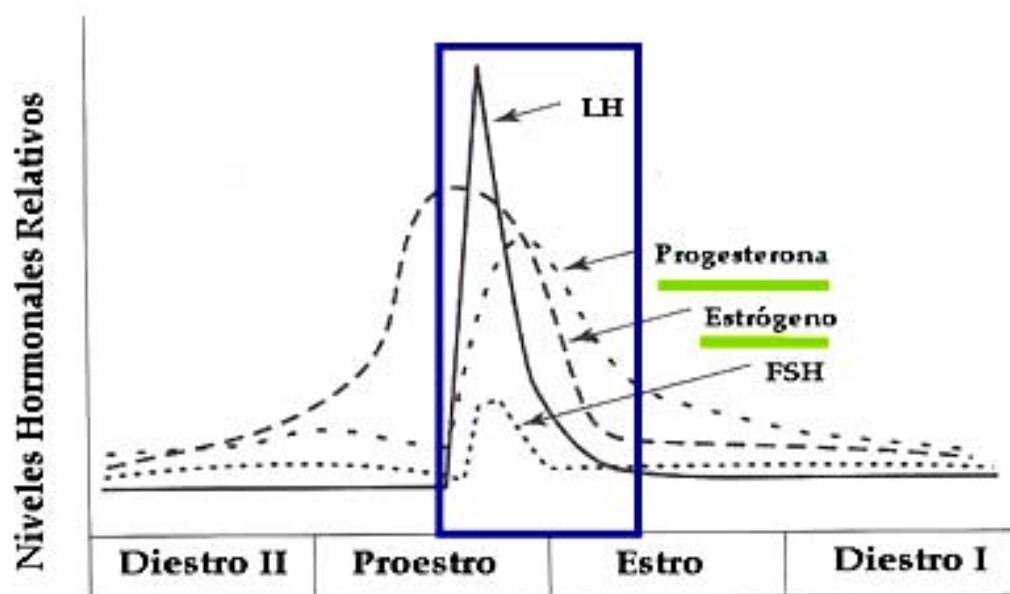
En los roedores la conducta sexual presenta dos fases, la primera precopulatoria ó motivacional, la cual inicia el contacto y acercamiento entre los individuos y la segunda, es propiamente la ejecución de la cópula. En la conducta sexual de la rata hembra se distinguen dos componentes: el proceptivo y el receptivo que permiten al macho interactuar con la hembra y presentar montas, intromisiones y eyaculación. Las conductas proceptivas se encuentran en la fase de conductas precopulatorias ó motivacionales que las hembras presentan para atraer al macho y son un conjunto de despliegues: pequeños saltos, movimientos en zig-zag y movimientos repetidos de orejas. La receptividad está asociada con el componente consumatorio de la cópula y se manifiesta con la postura de lordosis que la hembra despliega como un reflejo-respuesta a la monta de un macho. Un componente importante de la conducta sexual de la rata hembra es la regulación de la cópula que le permite a la hembra controlar la estimulación que reciba (Erskine 1989, Beach 1976, Jenkins y Becker 2005).

El inicio del contacto sexual y de todos los patrones conductuales en las hembras antes mencionados, es altamente dependiente de hormonas, ya que requieren niveles fisiológicos adecuados de estradiol para inducir la receptividad y de progesterona para la proceptividad. También depende de la interacción de la hembra con los estímulos

ambientales que ésta reciba, como lo es la estimulación del macho (Jenkins y Becker 2005).

La conducta copulatoria ocurre cuando la hembra se encuentra en el periodo de *receptividad sexual* que comienza al final de la etapa de proestro y principio del estro, que es cuando se elevan los niveles de progesterona y estrógeno preparando así al organismo para la fertilización (ver Fig.1).

El ciclo ovárico de la rata y sus variaciones hormonales se describirán más adelante.



**Fig.1** Esquema representativo del estro conductual en la rata hembra (recuadro) que ocurre cuando los niveles de estrógeno disminuyen y se elevan los niveles de progesterona. (Imagen modificada de Jenkins y Becker 2005).

La conducta de cópula consiste de varios patrones conductuales característicos que la hembra despliega para atraer al macho y de ésta manera comenzar el contacto sexual. El macho, a su vez, al ser atraído por la hembra, se acerca y comienza a presentar el patrón de conductas típicas de su género, como lo es montar a la hembra apoyándose de su lomo con sus patas delanteras, contacto que genera que la hembra despliegue el reflejo de lordosis,

que es el arqueamiento del lomo de la hembra con elevación de la cabeza y el tren posterior moviendo la cola para permitir la intromisión.

## **2. Condiciones fisiológicas que determinan la receptividad sexual en la rata hembra**

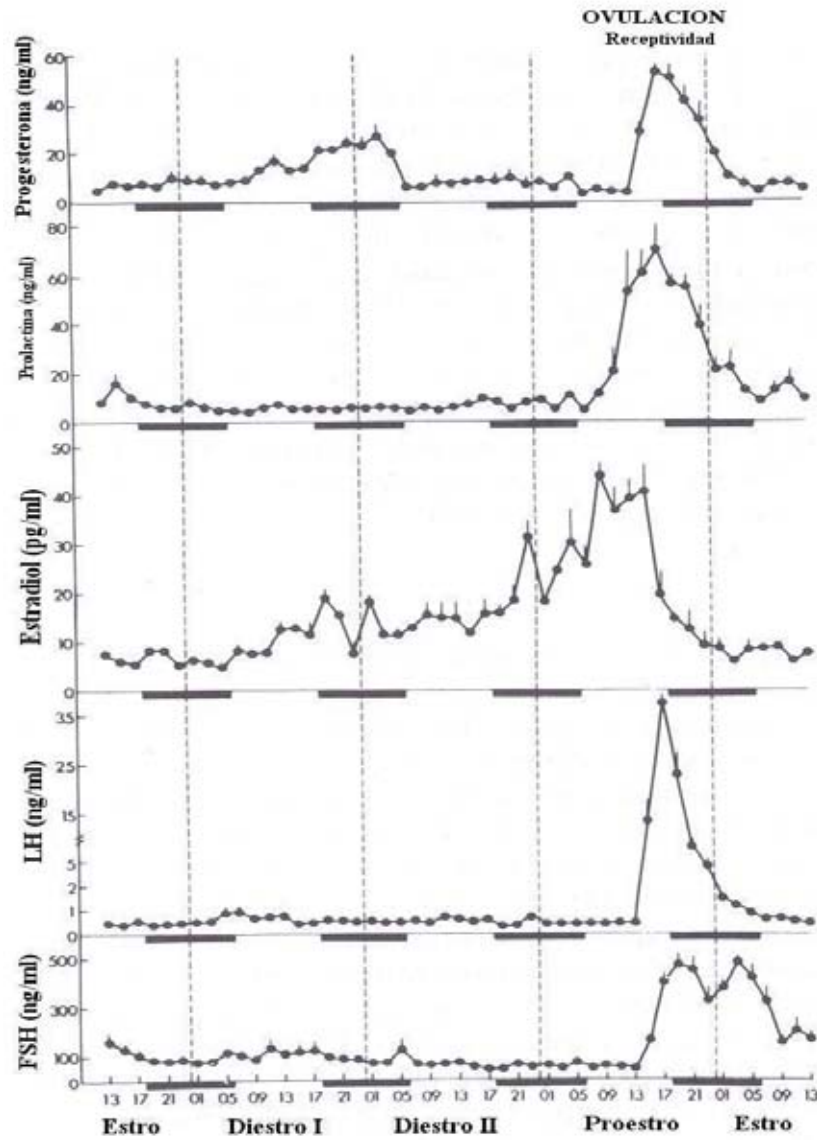
### **2.1 Ciclo estral**

Las ratas presentan un ciclo reproductivo llamado ciclo estral que consiste en la ovulación de manera cíclica (con una duración de 4 a 5 días) pasando por cuatro estados básicos en los que se presentan cambios en el tipo de células que están presentes en el útero de la hembra, y son: metaestro ó diestro I, diestro II, proestro y estro.

El ciclo ovárico comienza con una estimulación por parte de las neuronas hipotalámicas hacia la hipófisis. El hipotálamo produce una liberación pulsátil de GnRH (hormona liberadora de gonadotropinas) que estimula la liberación de dos hormonas gonadotrópicas primarias de la glándula pituitaria anterior: la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH), las cuales a su vez llevan a la liberación de hormonas sexuales (esteroides) de las gónadas. La FSH estimula el crecimiento de los folículos del ovario (células epiteliales que se encuentran rodeando cada óvulo); conforme los ovarios maduran secretan estradiol que genera un crecimiento epitelial de las paredes del útero (preparación para la implantación del óvulo). El incremento de estradiol genera una activación en la hipófisis y se libera LH, la cual genera la ovulación (rompimiento de los folículos generados anteriormente). La influencia continua de LH genera que la ruptura del ovario se vuelva cuerpo lúteo que produce estradiol y sobretodo progesterona. Por lo tanto FSH y LH son las encargadas de estimular el crecimiento de los folículos y la síntesis de esteroides en el ovario. En la rata, este periodo dura dos días. La secreción de estradiol se incrementa gradualmente durante esta fase. La retroalimentación negativa se da cuando las hormonas sexuales se incrementan, la secreción de gonadotropinas se reduce, las cuales estimulan el decremento de la síntesis de hormonas esteroides (Nelson 2000). El primer día

es llamado diestro 1 ó metaestro, y el segundo es llamado diestro 2 ó diestro (Jenkins y Becker 2005). Durante el periodo de diestro y proestro del ciclo estral de la rata, los folículos son estimulados para producir hormonas esteroides sexuales en concentraciones elevadas. En la tarde del proestro, la amplitud de los pulsos y la frecuencia de la liberación de GnRH, y por ende de la amplitud y frecuencia del pulso de liberación de LH y FSH aumentan también. Bajo estas condiciones, la retroalimentación negativa falla momentáneamente y los folículos liberan concentraciones altas de estrógenos, y tiempo después, concentraciones bajas de progesterona. Esta liberación preovulatoria de LH estimula la ovulación, reflejando la retroalimentación positiva que ocurre en el mecanismo de control hipotálamo-hipófisis-gonadal. La concentración elevada en sangre de estrógeno y progesterona también estimula el estro conductual. Los niveles de estrógeno caen a los niveles base rápidamente, pero el nivel de progesterona en sangre permanece alto durante varias horas ó durante algunos días si no ocurre la cópula. La liberación tónica de GnRH en el ciclo estral involucra a regiones como el hipotálamo anterior, el área preóptica, regiones del núcleo supraquiasmático y el núcleo arcuato, que son las regiones donde se localiza ésta hormona (Nelson 2000).

La concentración de estradiol en sangre fluctúa alrededor de 40 ng/ml en el proestro, aproximadamente 6 a 12 horas antes de la ovulación. Este incremento de estradiol produce la liberación de la hormona GnRH del hipotálamo y a su vez la liberación de LH y FSH. De 8 a 10 horas más tarde, el folículo maduro es liberado y transformado en el cuerpo lúteo. La progesterona se incrementa unas horas (4 a 6 horas) antes de la ovulación después de la liberación del estradiol durante el proestro. La prolactina es otra de las hormonas que se libera a partir de los lactotrofos localizados en la glándula pituitaria anterior, esta hormona se incrementa en la etapa de proestro y, en caso de haber fecundación en los animales, se incrementan los pulsos de liberación de la misma y se mantiene durante un tiempo hasta que la progesterona vuelva a incrementar sus niveles y se mantenga durante la preñez (Jenkins y Becker 2005). Estos cambios en la concentración de hormonas durante el ciclo estral de la rata se ejemplifican en la Fig.2.

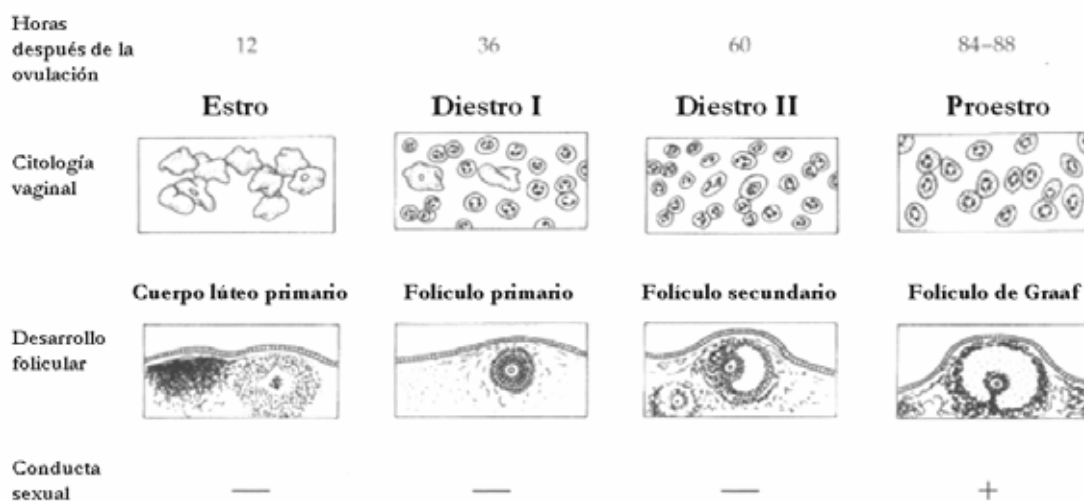


**Fig.2** Patrón hormonal del ciclo estral de la rata. Concentración hormonal en plasma en el transcurso del ciclo expresado en ng/ml. En la gráfica se indica el período en el cual ocurre la receptividad sexual y la ovulación. Las barras negras representan el intervalo de oscuridad en un ciclo 12-12 (Imagen modificada de Freeman 1994).

Los cambios cíclicos en la estructura de los ovarios han sido correlacionados con los cambios cíclicos en la citología vaginal, ya que ambos se presentan de manera organizada y simultánea. Los cambios que se generan en el útero debidos a las variaciones morfológicos



en las células son los que se presentan a lo largo del ciclo estral o ciclo vaginal y son dependientes de los cambios hormonales generados y regulados por el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas. La función ovárica también se regula por el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas y las hormonas que de aquí se liberan. Las hormonas que son indispensables para generar tanto la función ovárica como los cambios en el útero son LH y FSH (por la hipófisis) y estradiol y progesterona (por las gónadas) como se observa en la Fig.3.



**Fig.3** Patrón hormonal del ciclo estral de la rata. Concentración hormonal en plasma en el transcurso del ciclo expresado en ng/ml. En la gráfica se indica el período en el cual ocurre la receptividad sexual y la ovulación. Las barras negras representan el intervalo de oscuridad en un ciclo 12-12 (Imagen modificada de Freeman 1994).

Así, entonces el estro vaginal ocurre después de la ovulación, la cual ocurre en la tardía del proestro y da lugar a la formación del cuerpo lúteo. La función del cuerpo lúteo se ve disminuida cuando hay ausencia de estímulos asociados con la cópula, lo que produce que éste degenera. Es entonces cuando nuevos folículos comienzan su desarrollo (durante diestro I y diestro II).

El proestro vaginal coincide con el desarrollo máximo folicular y es en este momento cuando se encuentra en etapa de ovulación y se presenta el “estro conductual”. El

estro conductual determina la etapa en la que los animales están listos para la cópula y la reproducción. El periodo de estro por lo tanto, es un indicador de la ovulación y la receptividad sexual de la rata que ocurre a finales de la etapa de proestro y principios del estro. La ovulación, que está inducida por la liberación de LH en el proestro, ocurre de 4 a 6 horas después del incremento de estradiol, es decir, cuando se incrementa la progesterona. Ésta persiste de 12 a 20 horas (Jenkins y Becker 2005).

## **2.2 Manejo del ciclo estral en condiciones de laboratorio**

La mayoría de los estudios en laboratorio que se realizan en torno a la fisiología y la conducta reproductiva femenina se han realizado con hembras que presentan ciclos hormonales repetidos, como es el caso de la rata hembra. Las fluctuaciones hormonales que presentan las hembras debido al ciclo estral presentan variaciones individuales. Aún cuando los animales en condiciones naturales están en la misma etapa del ciclo estral, se presentan diferencias individuales en los niveles hormonales entre éstas, razón por la cual se tienen dificultades al momento de hacer comparaciones entre organismos.

El estro conductual que ocurre de manera natural se presenta como resultado de altas concentraciones de estrógeno por un periodo prolongado seguidos de altas concentraciones de progesterona. La remoción de ovarios elimina la retroalimentación negativa que regula la secreción de gonadotropinas, resultando en concentraciones elevadas de gonadotropinas, así como de la hormona liberadora de gonadotropinas. El modelo de la ovariectomía (remoción de gónadas-ovarios) se ha utilizado como una herramienta que permite el estudio de la conducta sexual de una manera más controlada. Cuando una hembra es ovariectomizada los ciclos hormonales desaparecen y el animal permanece en diestro I continuo. Solamente la administración de estradiol y progesterona de manera secuencial activarán la aparición de el ciclo hormonal-estral nuevamente. Al inducir el estro conductual en los animales administrando hormonas (estradiol y progesterona) de manera exógena se pueden controlar varios aspectos: niveles circulantes en sangre de hormonas esteroideas, evitar la pseudopreñez y la preñez, que implican cambios hormonales rápidos y liberación de otras hormonas que pudieran alterar el resultado de algunos experimentos. También se puede controlar el momento en que las

hembras se encuentren en estro conductual de manera que se puede tener controlado el tiempo de las pruebas conductuales. Además, al administrar hormonas exógenas, se genera una variación menor entre organismos estandarizándolas en una misma etapa del ciclo ya que se administran las mismas concentraciones hormonales para todas ellas, pudiendo comparar a partir de niveles hormonales que se administren, entre animales control con animales expuestos a alguna otra estimulación específica (Jenkins y Becker 2005).

### **2.3 Control endocrino de la conducta proceptiva y receptiva**

Diversos estudios en donde se ha examinado el papel de los esteroides ováricos en la inducción de la receptividad sexual en la rata hembra han demostrado que la respuesta sexual completa depende de la acción combinada de estrógenos y progesterona (Hardy y DeBold 1971). La conducta precopulatoria que despliega la hembra en estro durante el curso normal de la cópula incluye pequeños saltos, movimiento de orejas y una postura de presentación, así como una secuencia rápida de acercamientos y alejamientos de la proximidad de un macho sexualmente activo. La importancia del estradiol y la progesterona en la determinación de la receptividad sexual femenina ha sido demostrada en diversos experimentos con animales ovariectomizados en los que se elimina la fuente de hormonas ováricas y se impide el despliegue de la receptividad sexual. Si no se les provee de hormonas a las hembras ovariectomizadas, éstas no presentan receptividad y rechazan al macho. El estradiol ó benzoato de estradiol (EB) estimula el despliegue de conductas receptivas como es el reflejo de lordosis. En hembras ovariectomizadas ó ovariectomizadas-adrenalectomizadas, que ya no producen hormonas, se suministran estrógenos exógenamente y se restaura el despliegue del reflejo de lordosis. La progesterona por su parte produce las conductas proceptivas como pequeños saltos, acercamientos, movimientos en zig-zag y movimiento de orejas. Esto sugiere que la presencia de ambas hormonas es requerida para que una rata hembra despliegue el patrón típico de conductas precopulatorias (Blaustein y Erskine 2002; Erskine 1989; Pfaff 1971).

Si se les administra únicamente estradiol, después de 6 a 10 días presentan receptividad sexual (reflejo de lordosis), pero los parámetros de la conducta sexual no serán los característicos. Los estrógenos inducen un incremento en la sensibilidad de los nervios

pélvicos y pudendos para la estimulación copulatoria, permitiendo así el despliegue de la postura de lordosis. Por otro lado, si sólo se les administra progesterona, la conducta sexual no se induce incluso después de varias semanas. Sin embargo la progesterona puede regular los intervalos entre intromisiones y permitir que se presente todo el patrón de cópula completo cuando se administra junto con estradiol (Jenkins y Becker 2005).

La conducta receptiva ocurre de 36 a 48 horas después de que los niveles de estradiol incrementan su concentración induciendo la síntesis de receptores de progesterona en el hipotálamo sobre los que actúa esta hormona 4 a 6 horas después (Jenkins y Becker 2005). El estradiol y la progesterona administradas exógenamente a ratas hembra ovariectomizadas inducen los patrones indispensables para que se de la conducta de cópula en un nivel comparable al observado en hembras ciclantes en estro (Erskine 1989).

### ***2.3.1 Conductas proceptivas***

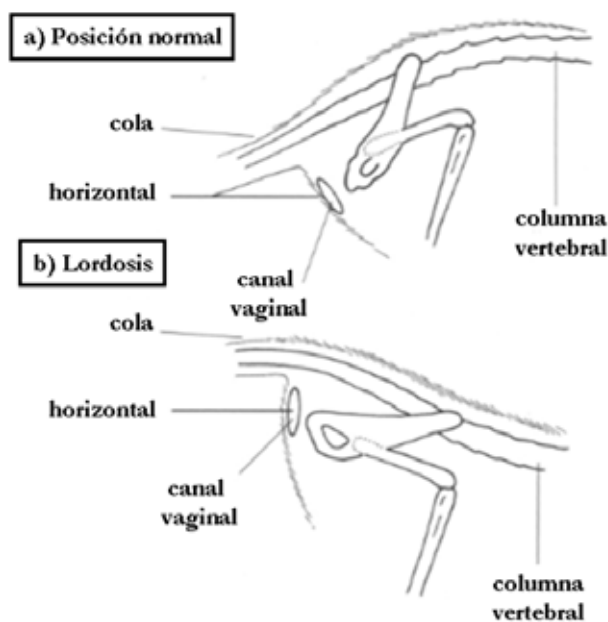
La descripción de las conductas proceptivas se basa en gran medida en los estudios de Erskine (para una revisión ver Erskine 1989). Las conductas proceptivas se presentan cuando la hembra está receptiva sexualmente y se definen como todas aquellas conductas de solicitud que despliega la hembra para atraer al macho y permitir la cópula. Estas conductas ocurren antes y durante la cópula y sirven como indicadores del estado de la hembra así como para regular el intervalo de tiempo entre las montas e intromisiones que esté recibiendo (Jenkins y Becker 2005).

La conducta proceptiva se presenta cuando hay receptividad sexual. Dentro de las conductas proceptivas se encuentran una serie de patrones conductuales característicos mencionados previamente y que son: pequeños saltos alrededor del macho (*hopping*), movimiento rápido de orejas (*ear wiggling*), movimientos en zigzag y carreras cortas para huir y regresar con el macho (*darting*). Estos patrones conductuales han sido utilizados como un indicador de la motivación sexual femenina.

Una de las funciones adicionales de las conductas proceptivas, como indicador de preparación de la hembra para el contacto sexual, es la regulación de la cópula por parte de la hembra, a través de la cual, la hembra determina los intervalos entre cada contacto sexual con el macho.

### 2.3.2 Conductas receptoras

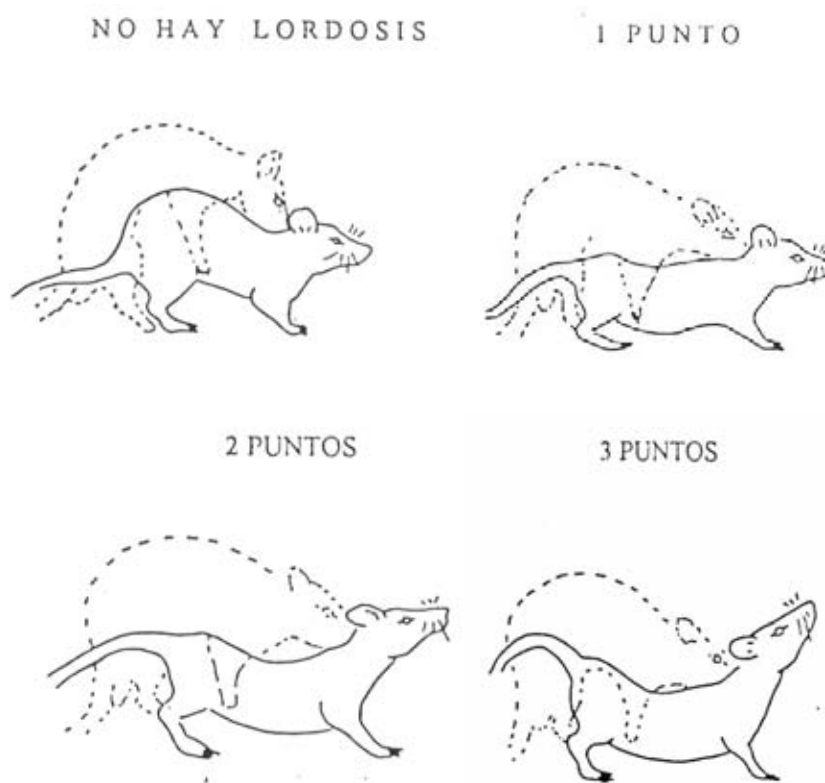
La receptividad es la conducta que exhibe una hembra en respuesta a la estimulación física de un macho. Esta conducta y su expresión durante el estro de la hembra han sido utilizadas como una medida de la intensidad de la respuesta de receptividad. Cuando la hembra está receptiva sexualmente y la monta el macho ésta asume una postura refleja conocida como lordosis (Jenkins y Becker 2005), en donde la hembra arquea el lomo, eleva la cabeza y el tren posterior y finalmente mueve la cola hacia un lado permitiendo que el macho pueda lograr una intromisión (penetración) como se puede observar en la Fig.4.



**Fig.4** En este esquema se muestra a) la postura normal que presenta una ratona hembra y b) la postura de lordosis en donde se observa como el canal vaginal al volverse completamente horizontal se vuelve accesible al macho y se facilita la penetración. (Imagen modificada de Nelson 2000).

El reflejo de lordosis es dependiente principalmente de los niveles hormonales de estradiol. En la ratona, se han identificado diferentes grados de lordosis de acuerdo a la clasificación propuesta por Hardy y DeBold (1972). Cuando no se observa ningún cambio en la posición normal del dorso de la hembra ante la monta de un macho, se habla de un

grado 0 de lordosis ó no lordosis, y esto indica la ausencia de receptividad sexual. La graduación con que se ha clasificado la lordosis, es de acuerdo a los puntos de contacto que el macho tenga con la hembra cuando la monta y a la inclinación de la columna de la rata. El grado 0 de lordosis, como ya se describió con anterioridad, es cuando no se observa ningún arqueamiento de la columna de la rata, el grado 1 de lordosis es cuando el dorso de la rata se encuentra casi ó completamente en posición recta, con una clara diferencia respecto al grado 0; el grado 2 de lordosis se observa cuando la rata presenta un ligero arqueamiento del dorso, la columna, cabeza y cola; y, finalmente, el grado 3 de lordosis se distingue por un arqueamiento pronunciado de todo el dorso, la columna, cabeza y cola de la rata, lo que facilita la intromisión por parte del macho (ver esquemas ilustrativos del grado de lordosis en Fig.5).



**Fig. 5** Esquema ilustrativo de la cuantificación del grado de lordosis de la rata hembra. (Imagen modificada de Hardy y DeBold 1972).

### **3. Cópula regulada por la hembra**

Los estudios en condiciones naturales y seminaturales del patrón de interacción sexual en roedores tanto en machos como en hembras es altamente promiscuo e indican que ambos regulan los contactos copulatorios (McClintock y Adler 1978; McClintock y cols. 1982). En la rata hembra, los estímulos somatosensoriales de las áreas perigenitales y del tracto reproductivo son importantes durante el despliegue de la conducta reproductiva, la cópula, y el inicio de cambios neuroendócrinos necesarios para la preñez (Erskine 1992). Como se describió previamente, durante el estro conductual la hembra despliega la postura receptiva de lordosis, y un variado y complejo patrón de conductas preceptivas o de solicitud que desencadenan una respuesta copulatoria del macho. Las ratas hembra tienen una influencia importante en determinar en la interacción sexual en la cópula, y lo hace mediante el despliegue intermitente y periódico de conductas de solicitud. Hay dos aspectos que componen la cópula regulada por la hembra: el componente sensorial que involucra la respuesta conductual al estímulo (acercamientos y alejamientos hacia el macho, medidos en el laboratorio como porcentaje de entradas y salidas hacia y del compartimento del macho) y el componente motivacional que involucra los cambios para iniciar el contacto sexual que ocurre como consecuencia de recibir una estimulación (tiempo que tarda en entrar en contacto con el macho, medido en el laboratorio como latencia de contacto). Los cambios neuroendócrinos necesarios para la preñez (mantenimiento de concentraciones altas de progesterona y liberación de prolactina) dependen del estímulo recibido durante la cópula. Son aspectos específicos de la estimulación genitosensorial que recibe la hembra durante la cópula los que desencadenan los cambios: reciben un menor número de intromisiones y dejan pasar periodos más largos entre cada intromisión (Kornberg y Erskine 1994).

El método tradicional utilizado para estudiar la conducta sexual permite al macho regular la cópula teniendo el control de cada interacción con la hembra. Sin embargo, una característica importante en la conducta sexual de la rata hembra es que la interacción sexual tiene tanto componentes positivos como aversivos.

Cuando la hembra está receptiva sexualmente y se le pone en contacto con un macho, ésta se aproxima y se aleja en varias ocasiones para estimular lo suficiente al

macho de tal manera que se de la cópula, por lo que la hembra tiene una gran influencia en el patrón de la cópula.

El tipo de conducta de aproximación y alejamiento (solicitud-proceptividad) permite que la hembra pueda mantener contacto con el macho y controle la estimulación, que ella regule la cópula (*pacings*). Esto es importante para la hembra, porque de esta manera puede evitar una sobre-estimulación, lo cual ocurre constantemente cuando el macho regula los contactos copulatorios montando e intrometiendo constantemente a la hembra. La cópula regulada por la hembra se caracteriza por presentar intervalos de tiempo más amplios entre cada intromisión, y un mayor tiempo de duración de las intromisiones mismas, lo que incrementa la estimulación vagino-cervical que la hembra recibe en cada intromisión. Sin embargo, la duración de la eyaculación no presenta variaciones (Erskine 1989, 1992).

El estudio de la cópula regulada por la hembra es muy particular, porque además de ser un modelo semi-natural que refleja lo que ocurre en la naturaleza con la cópula, desencadena consecuencias neuroendocrinas y conductuales que no ocurren cuando el macho regula la cópula. Se ha reportado que las hembras que regulan la cópula requieren menos intromisiones para aumentar la probabilidad de quedar preñadas. Esto debido a que, se incrementa la estimulación vagino-cervical recibida en cada contacto haciendo que las intromisiones resulten más efectivas, reduciendo así el número de intromisiones necesarias para transportar el espermatozoides a través del cérvix y desencadenar el reflejo neuroendocrino que resulta en preñez o pseudo-preñez. La estimulación vagino-cervical activa el reflejo neuroendocrino que inicia patrones de liberación de prolactina dos veces por día. Esta liberación nocturna y diurna es necesaria para la secreción prolongada de progesterona por el cuerpo lúteo que se presenta en la preñez o pseudo-preñez. Cuando hay ausencia de fertilización las hembras pueden entrar en un estado de pseudopreñez que dura 12 días aproximadamente (Erskine y cols. 2004). Los cambios hormonales ocurren solo después de que la hembra ha recibido una estimulación genitosensorial por arriba del umbral para inducir los cambios hipotalámicos necesarios responsables de la preñez. Como Rajendren y cols. (1993) lo describieron, esta activación del reflejo neuroendocrino parece iniciar cuando la hembra recibe la información olfatoria que el macho libera, principalmente las feromonas, que son detectadas por el órgano vomeronasal, y esa información es enviada,



para su procesamiento, al primer relevo del sistema olfatorio accesorio que es el bulbo olfatorio accesorio, que posteriormente enviará ésta información al resto del circuito olfatorio hasta llegar al área preóptico medial del hipotálamo donde se encuentran las células GnRHérgicas que son activadas; al activarse las células GnRHérgicas inducen la liberación hormonal por parte de la hipófisis y es entonces cuando se presentan las condiciones fisiológicas adecuadas para la preñez de la rata.

Se ha observado de igual manera que este patrón de aproximación y alejamiento frente a un macho sexualmente activo se presenta de manera muy clara cuando la hembra se encuentra en una caja de prueba en la que se le permite la entrada y salida libre hacia donde se encuentra el macho (Jenkins y Becker 2005; Erskine 1989). Las cajas de prueba que se utilizan para evaluar éste tipo de conducta son cajas que tienen una división removible con un pequeño orificio por el cual la hembra puede entrar y salir del compartimento donde se encuentra el macho las veces que ésta quiera. El macho por ser de mayor tamaño no puede pasar al otro lado y seguir a la hembra. El regreso hacia el lado donde se encuentra el macho depende del antecedente estimuladorio, es decir, las hembras pueden diferenciar entre intensidades de los estímulos copulatorios, ya que, si recibieron una eyaculación por parte del macho, el tiempo (latencia) que tardarán en regresar al lado del macho será mayor que si sólo recibieron una intromisión. Por ésta razón, estudiar el fenómeno conductual de la cópula regulada por la hembra, en el cual la hembra regula los tiempos y los estímulos copulatorios que recibe, además de que provee de cambios neuroendocrinos y conductuales importantes como mayor probabilidad de quedar preñada, es un buen modelo para el estudio de cambios neuroanatómicos, morfológicos y fisiológicos que ocurren en la hembra asociados a la cópula (Erskine 1989).

Por otro lado, es muy importante que la hembra sea capaz de regular esta estimulación que recibe del macho para no ser sobre-estimada y entonces la cópula se vuelva aversiva ó simplemente no se presente (Erskine, 1989). Estudios realizados por nuestro grupo de trabajo (Martínez y Paredes 2001; Paredes y Alonso 1997; Paredes y Vázquez 1999), han demostrado que cuando la hembra regula los contactos copulatorios se produce un estado placentero evaluado por el condicionamiento de preferencia de lugar (CPL). En este estudio se utilizaron ratas hembra ovariectomizadas sexualmente inexpertas e inyectadas con benzoato de estradiol y progesterona, a las cuales se les permitió que

regularan la cópula, lo que les indujo un estado de recompensa de suficiente intensidad como para producir CPL. Otros estudios han demostrado que 10 intromisiones reguladas son suficientes para inducir CPL (Paredes y Vázquez 1999). Este estado afectivo positivo inducido por la cópula regulada en hembras parece estar mediado por opioides (Martínez y Paredes 2001).

En el presente trabajo compararemos el efecto de la cópula regulada por la hembra y la cópula regulada por el macho como estímulo para generar cambios plásticos neuroanatómicos vistos en el número de células en el bulbo olfatorio, por lo que el papel del bulbo olfatorio en los sistemas olfatorios se describe a continuación.

## **Capítulo 2.**

### **Sistemas Olfatorios**

#### **2. Sistema Olfatorio**

El sistema olfatorio es importante para la interacción de los roedores con su medio externo. Es indispensable para el reconocimiento de individuos de la misma especie, depredadores y presas. Regula funciones neuroendocrinas. Tiene un papel muy importante en el control de algunas conductas como la reproductiva, la materna y de agresión (Shipley 2004). Este sistema permite la comunicación a través de feromonas, que son moléculas químicas que transmiten información importante del estado fisiológico o conductual de los congéneres, edad, sexo, territorialidad, estatus de dominancia, depredadores, información de supervivencia, etc., (Karlson y Luscher 1959). Los receptores olfatorios son complejos ya que son capaces de detectar una gran diversidad de moléculas y están comunicados con las neuronas olfatorias sensoriales. Los bulbos olfatorios son muy prominentes en los roedores, y son el paso de la información al sistema nervioso central que recibe las aferencias de los receptores olfatorios (localizados en el órgano vomeronasal ó en la mucosa olfatoria principal) y procesan la información discriminando los olores. Los bulbos olfatorios a su vez envían proyecciones eferentes al resto de las vías neurales que componen los sistemas olfatorios. Por lo tanto la función de los bulbos olfatorios es indispensable para el procesamiento de las señales olfatorias, ya que es el primer relevo por el que pasa la información sensorial olfatoria.

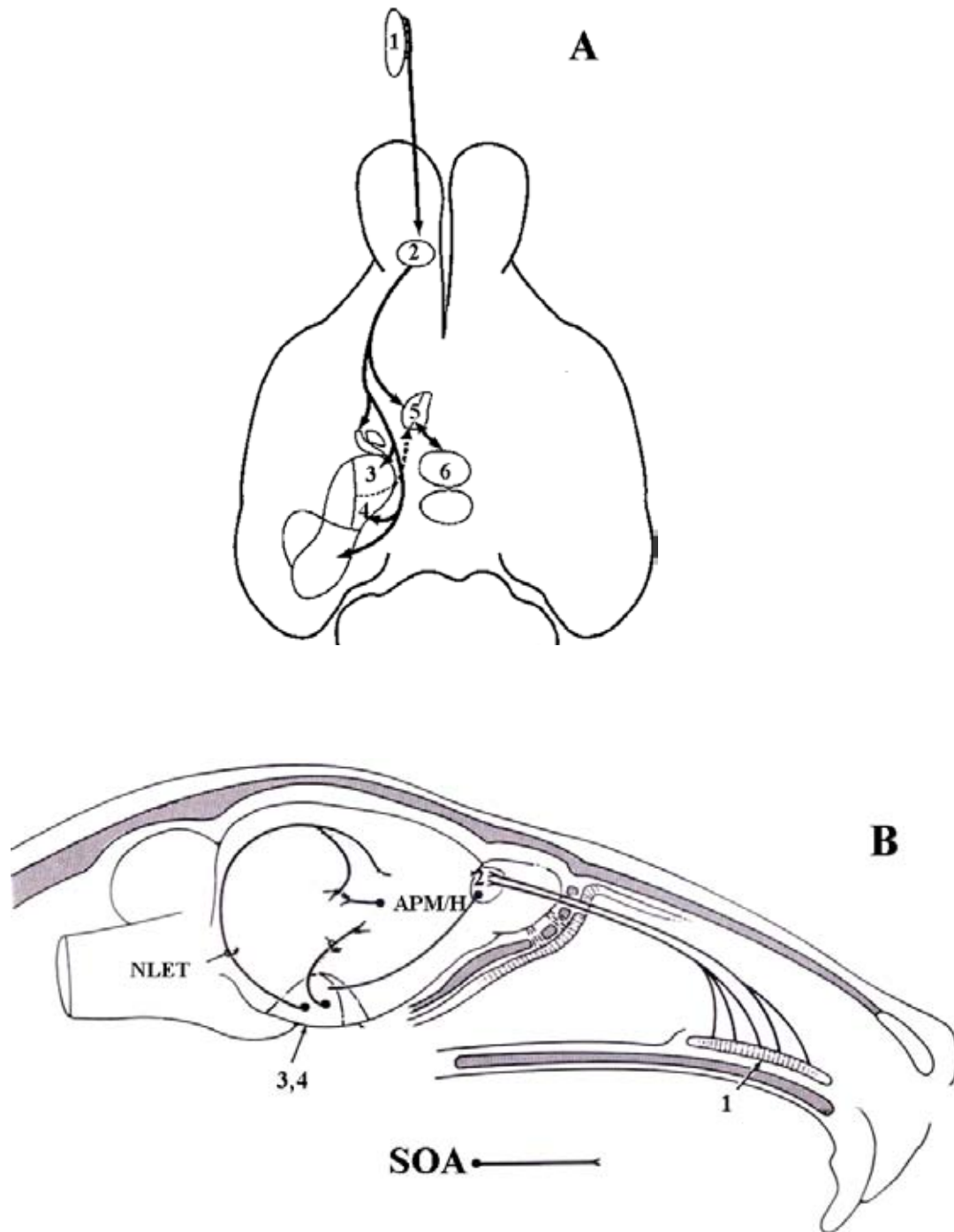
El sistema olfatorio es importante para la detección de olores sexualmente relevantes (feromonas) y es capaz de iniciar algunas conductas dependientes de éstos olores, como la reproductiva (Shipley 2004). Una de las estructuras que conforman el circuito es el hipotálamo, particularmente el área preóptica medial, importante para la regulación de hormonas. En esta región hipotalámica se libera la hormona liberadora de gonadotropinas encargada de estimular a la glándula hipófisis anterior para la liberación de hormona folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH) determinantes de la producción de hormonas ováricas estradiol y progesterona que se requieren para la receptividad sexual femenina y por lo tanto para el despliegue de la conducta sexual (Nelson 2000).

Existen dos sistemas neurales de procesamiento olfatorio los cuales están separados anatómicamente: el sistema olfatorio principal (SOP) y el sistema olfatorio accesorio (SOA). Al parecer, ambos sistemas se encargan de procesar diferentes tipos de olores (Keller y cols. 2006 a,b). Los olores no-volátiles como las feromonas, que requieren del acercamiento físico por parte del roedor para ser detectados, son procesados por el SOA. Los olores volátiles, que pueden ser detectados a distancia, y que son muy importantes para la detección de la presencia de un depredador son procesados por el SOP. En estudios realizados por Keller y cols. (2006 a,b) describieron que la lesión tanto del órgano vomeronasal (parte del SOA) como del epitelio olfatorio principal (parte del SOP) afectan la receptividad sexual de la hembra. En el caso de la remoción total del órgano vomeronasal se observó que el despliegue de la lordosis disminuyó notablemente, pero no desapareció. Al lesionar con sulfato de zinc ( $ZnSO_4$ ) el epitelio olfatorio principal, la lordosis disminuyó poco y no tan drásticamente. Estos resultados muestran que aunque clásicamente se ha diferenciado el tipo de olores que procesa cada sistema olfatorio, al parecer existe una cooperación entre ambos sistemas que es relevante para el despliegue de parámetros de la conducta sexual, ya que, como se mencionó, al inhabilitar tanto el órgano vomeronasal como el epitelio olfatorio principal por separado, se disminuye en mayor o menor medida el despliegue de la conducta, pero no desaparece por completo. Esto sugiere una conexión interna importante entre ambos sistemas que pueden funcionar supliendo la falta de la otra estructura, lo que habla de la complejidad del sistema olfatorio y la importancia que tienen ambos sistemas, el principal y el accesorio en la captación de olores. A continuación se describirán brevemente estos dos sistemas.

## 2.1 Sistema Olfatorio Accesorio

El SOA ó sistema vomeronasal (SVN) es el principal circuito mediador de feromonas el cual puede desencadenar respuestas fisiológicas y conductuales en consecuencia. Lo componen una serie de estructuras: el órgano vomeronasal (OVN), el bulbo olfatorio accesorio (BOA), el núcleo medial de la amígdala (AMG), el núcleo lecho de la estría terminal (NLET) y el área preóptica medial (APM) del hipotálamo. Éste sistema capta los olores gracias a sus receptores localizados en el órgano vomeronasal, el cual se ubica bilateralmente en la parte superior del paladar y es llamado así porque se encuentra recargado en el hueso vómer. Las claves olfatorias que son percibidas por el OVN pueden modificar la liberación de hormonas por parte del hipotálamo y producir cambios fisiológicos y en la conducta (Keller y cols. 2006 a,b). El bulbo olfatorio accesorio (BOA) es una estructura a donde llegan las proyecciones nerviosas del OVN, y está localizada en la región dorsal en posición dorso-caudal del bulbo olfatorio principal (Paxinos y Watson, 1997). La información es detectada por receptores olfatorios localizados en el órgano vomeronasal (OVN), que reconocen claves olfatorias no-volátiles. Estas neuronas reconocen las moléculas a través de las señales químicas y las transducen a señales eléctricas, las cuales son enviadas a través de fibras del OVN hacia el BOA. La información llega al BOA a la capa glomerular. A partir de éste momento, la información es transmitida por varias capas del BOA (glomerular, mitral, granular) donde es procesada, hasta que es enviada al núcleo medial de la AMG, pasando por el NLET y finalmente hacia el APM del hipotálamo como se observa en la Fig.6.

Cada una de estas estructuras procesa diferentes aspectos de la información olfatoria, el BOA se encarga de discriminar el tipo de olor, la AMG medial se encarga de recibir la información, procesarla y enviarla hacia el APM donde se regula la liberación hormonal.

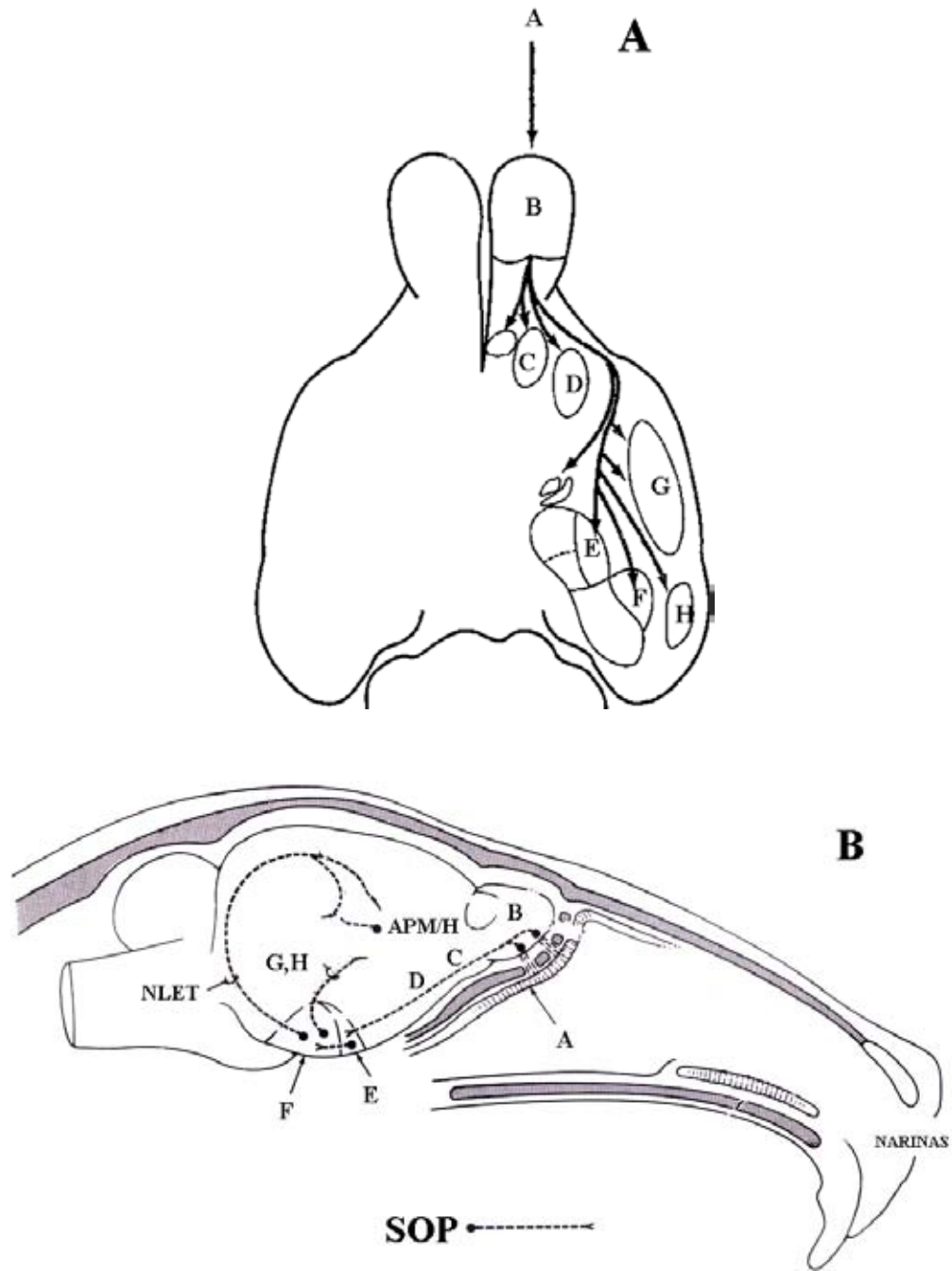


**Fig.6** Esquema representativo del Sistema Olfatorio Accesorio (SOA) de roedor. En A) están representadas las vías de proyección involucradas en éste circuito (*Imagen modificada de Winans y Powers 1977*) y en B) en vista sagital se observan las estructuras (*Imagen modificada de Baum 1992*). 1-órgano vomeronasal, 2-bulbo olfatorio accesorio, 3,4-núcleos de la amígdala, 5,NLET-núcleo lecho de la estría terminal, 6,APM/H-área preóptico medial del hipotálamo.

## **2.2 Sistema Olfatorio Principal**

El SOP ha sido considerado como un analizador molecular general que detecta y diferencia entre señales quimiosensoriales complejas. . Las claves olfatorias volátiles son reconocidas por receptores localizados en neuronas del epitelio olfatorio principal localizado en la cavidad nasal. Estas neuronas reconocen las moléculas a través de los compuestos químicos y las transducen a señales eléctricas, las cuales son enviadas a través del nervio olfatorio hacia el bulbo olfatorio principal (BOP). Al transducir la información química en los receptores, hay proyecciones que son enviadas a los glomérulos del bulbo olfatorio principal (Keller y cols. 2006a), los cuales transmiten la información a las células mitrales y éstas a su vez a las granulares dándose una retroalimentación interna en el bulbo olfatorio.

La información sigue un circuito neural diferente al del sistema olfatorio accesorio, ya que después del BOP es enviado hacia regiones corticales como el núcleo olfatorio anterior, tubérculo olfatorio, corteza piriforme y corteza entorinal, y es hasta después que la información llega a algunos núcleos de la amígdala y es ahí donde se conjunta con el sistema olfatorio accesorio y es enviada por una vía similar hacia el área preóptica medial del hipotálamo como se observa en la Fig.7.



**Fig.7** Esquema representativo del Sistema Olfatorio Principal (SOP) de roedor. En A) están representadas las vías de proyección involucradas en éste circuito (*Imagen modificada de Winans y Powers 1977*) y en B) en vista sagital se observan las estructuras (*Imagen modificada de Baum 1992*). A-epitelio olfatorio, B-bulbo olfatorio principal, C-núcleo olfatorio anterior, D-núcleo cortical anterior y E-núcleo posterolateral de la amígdala, G-corteza piriforme, H-corteza entorinal, NLET-núcleo lecho de la estría terminal, APM/H-área preóptico medial del hipotálamo.



### **2.3 Neurogénesis en el bulbo olfatorio**

El bulbo olfatorio es una estructura que constantemente sufre recambio de neuronas. Este recambio lo realiza mediante un proceso plástico que se conserva aún en el animal adulto y es la generación de nuevas neuronas (neurogénesis). Ésta neurogénesis no surge en el propio bulbo olfatorio, sino que las nuevas neuronas se generan de manera constante en la zona subventricular (ZSV) localizada en las paredes de los ventrículos laterales (Bonfanti y cols. 1997, Gould 2007).

Las células generadas en la ZSV migran indiferenciadas a través de una vía establecida llamada corriente ó vía migratoria rostral (VMR) hasta alcanzar el bulbo olfatorio (BO) donde maduran y se integran de manera funcional. Diversos estudios indican que estímulos olfatorios, incluyendo los sexualmente relevantes pueden modular la neurogénesis del BO (Rochefort y cols 2002, 2005; Taupin 2005; Mak y cols. 2007).

El proceso de neurogénesis en el BO se describirá con más detalle en el siguiente capítulo.

## **Capítulo 3.**

### **Plasticidad**

#### **3. Plasticidad en el cerebro adulto**

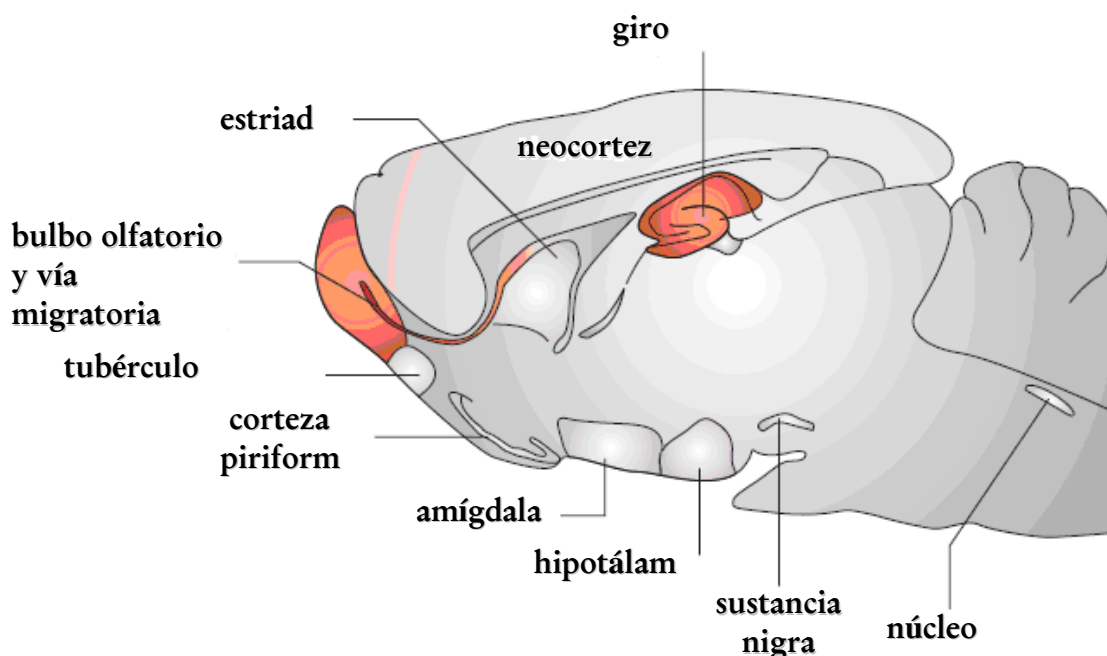
La idea de que el cerebro no se mantiene estático proviene de los estudios de Santiago Ramón y Cajal, quien propuso que “los procesos de extensión, crecimiento y multiplicación neural no terminan al momento del nacimiento, sino que continúan después” (Routtenberg 2000).

El cerebro es capaz de presentar cambios, ya sean estructurales y/o funcionales, y éstos ocurren durante la maduración, el aprendizaje, las modificaciones ambientales y patológicas. Todos estos cambios están dados por la plasticidad (Gheusi y Lledo 2007). Aunque sigue siendo complicado definir la plasticidad, podemos decir que es una característica del sistema nervioso para desarrollarse, reaccionar ó ajustarse a los cambios internos ó externos, bajo condiciones fisiológicas o patológicas, presentando cambios en la estructura y/o en la función de los circuitos neuronales (Kolb 1995; Kempermann 2006; Lledo y cols. 2006). Esta plasticidad se ha observado en varios niveles de la organización neuronal, tales como: dendrogénesis, espinogénesis, morfogénesis, neurogénesis, formación de nuevas proteínas, vesículas sinápticas, entre otros (Kolb 1995).

En 1948, gracias a los trabajos de Jerzy Konorski se sugirió que algunos estímulos sensoriales producían cambios en las conexiones neuronales. En 1962 Joseph Altman reportó por primera vez la presencia de nuevas neuronas en un cerebro adulto. Años más tarde (1990) y gracias al avance de técnicas para la detección de nuevas células se estableció la existencia de la formación de nuevas neuronas en un cerebro adulto de roedor (para una revisión ver Gould y Gross 2002).

La neurogénesis, uno de los mecanismos plásticos que se dan en el cerebro, es la constante generación de neuronas. Este proceso se da en la formación del sistema nervioso de los organismos durante el desarrollo, la etapa juvenil para la maduración y en el adulto. La capacidad de generación de nuevas neuronas en un organismo adulto, representa una

posibilidad de que este constante reemplazo sea un mecanismo para el mantenimiento y adaptación del organismo, a los continuos cambios que los rodean ó como un elemento de reparación de daño neuronal, de estructura ó para mejorar alguna tarea ó aprendizaje. La neurogénesis, se lleva a cabo principalmente en dos estructuras cerebrales en el adulto: en el giro dentado de la formación hipocámpica y en la zona subventricular de los ventrículos laterales (Gould y Gross 2002; Kempermann 2006) aunque también se han encontrado indicios de formación de nuevas neuronas en algunas otras regiones (como se observa en la Fig.8) como la neocorteza, el estriado, corteza piriforme, amígdala, hipotálamo, sustancia nigra y núcleo del vago (Gould 2007).



**Fig.8** Principales regiones donde se ha observado la presencia de neuronas nuevas en un cerebro adulto, dentro de las cuales se observan las dos regiones neurogénicas mayormente estudiadas: bulbo olfatorio y giro dentado. (Imagen modificada de Gould 2007).

### **3.1 Neurogénesis en el cerebro adulto**

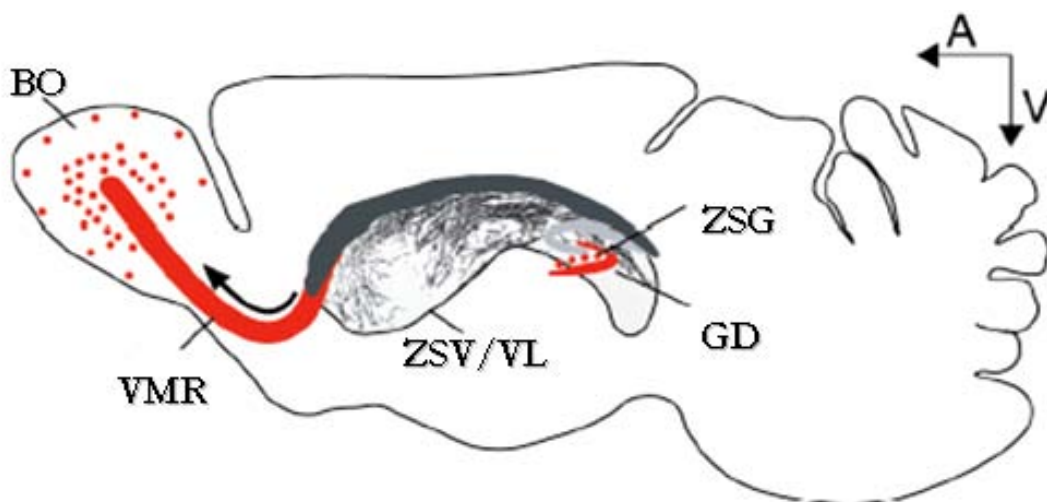
La neurogénesis en el adulto consta de una serie de eventos plásticos que culminan en la producción de nuevas neuronas que se integran en un cerebro ya estructurado y maduro. Este mecanismo ocurre gracias a la presencia de células precursoras en el cerebro adulto que pueden dividirse y generar células constantemente.

Nuevas neuronas están constantemente siendo integradas en el cerebro adulto. Dos regiones: el bulbo olfatorio y el giro dentado del hipocampo, reciben e integran las nuevas neuronas a lo largo de la vida. En ambas regiones, la adición de nuevas neuronas representa la posibilidad de que el cerebro pueda presentar cambios, rearrreglos ó renovaciones funcionales y estructurales en sus circuitos neuronales. De hecho, la renovación celular no es meramente restaurativa, sino que constituye una respuesta adaptativa a los retos impuestos por el medio ambiente o el estado interno del organismo (Lledo y cols. 2006 y Gould y Gross 2002).

Las primeras evidencias de neurogénesis en el cerebro adulto de mamíferos las realizó el grupo de Altman alrededor de 1960, con el uso de la técnica de autorradiografía por timidina-[H3], la cual consistía en la incorporación de la timidina-[H3] a las células que se encontraran en la fase de síntesis de DNA en el proceso de mitosis (para una revisión ver Taupin 2007; Gould y Gross 2002). Años después se demostró la neurogénesis en el cerebro adulto de vertebrados no mamíferos como las aves con los trabajos de Nottebohm (1989) y es gracias a éstos que se comienza a aceptar el proceso de neurogénesis como una constante en el adulto. Hasta 1990 finalmente se establece la neurogénesis en roedores adultos, cuando el avance de las técnicas para la detección de las células en proliferación y las nuevas neuronas adquiere una gran fuerza (Gould y Gross 2002).

En los mamíferos, son dos las regiones donde se produce neurogénesis: la zona subgranular (ZSG) del giro dentado (GD) de la formación hipocampal y la zona subventricular (ZSV) de los ventrículos laterales (Hoyk y cols. 2006; Ming y Song 2005 y Xu y cols. 2004). En el GD del hipocampo la generación de neuronas en la ZSG ocurre en la capa de células localizada por debajo de la capa granular, las células aquí generadas migran hacia la capa granular donde se diferencian en neuronas que extienden sus proyecciones axonales hacia la región de CA3 del hipocampo.

Las células que son generadas en la ZSV, por su parte, migran tangencialmente por una vía conocida como vía migratoria rostral (VMR) y llegan finalmente al bulbo olfatorio (BO) donde se integran como neuronas funcionales al sistema olfatorio como se observa en la Fig.9.

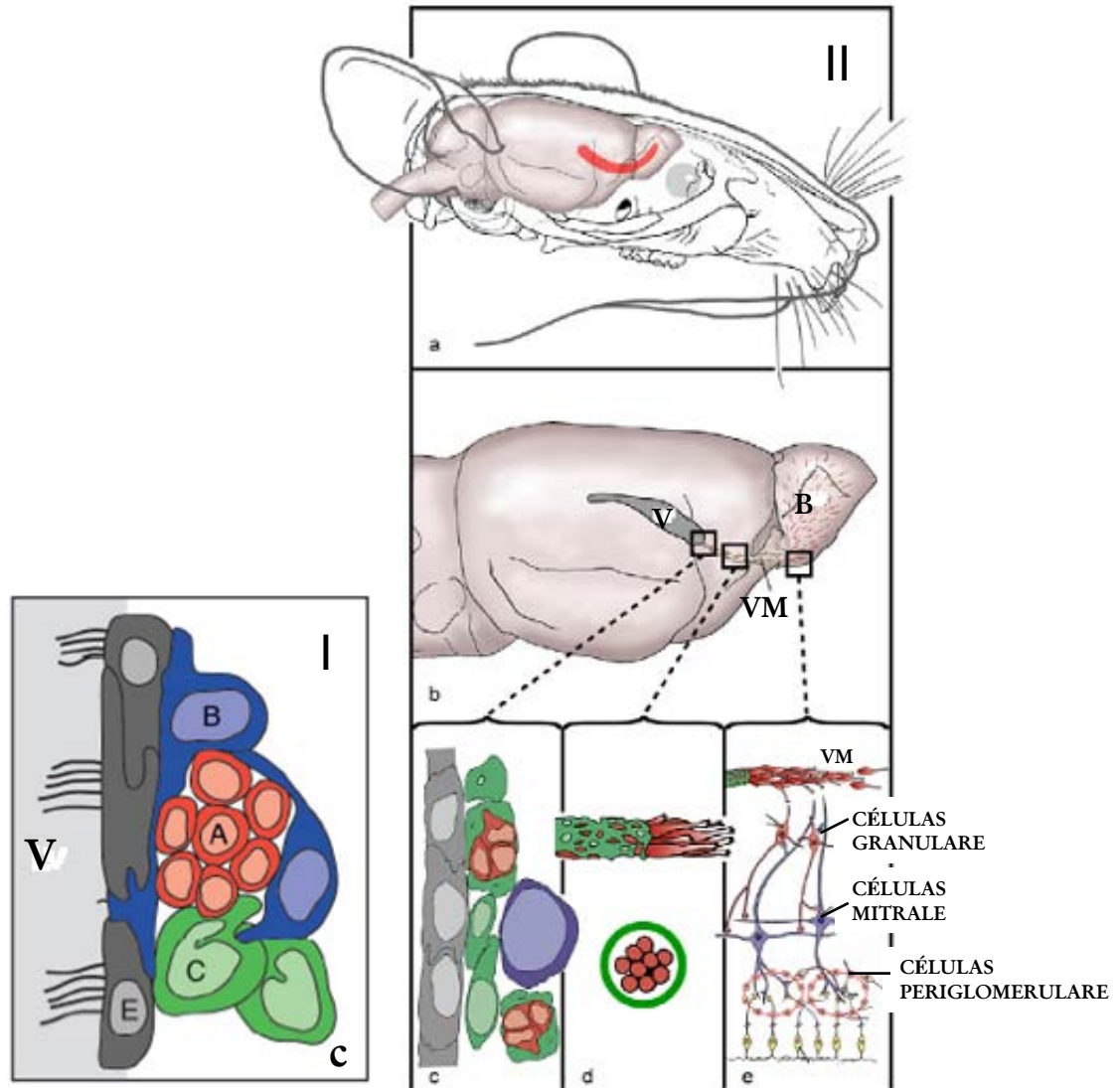


**Fig.9** Neurogénesis en el cerebro adulto de mamífero. Sección sagital esquemática de roedor donde se muestra el ventrículo lateral (VL) y los dos principales sitios de neurogénesis: la zona subventricular (ZSV) localizada en los VL y la zona subgranular (ZSG) de la formación hipocámpica. Las neuronas del bulbo olfatorio (BO) llegan por la vía migratoria rostral (VMR) y provienen de la ZSV. Las neuronas del giro dentado (GD) provienen de la ZSG del mismo hipocampo. La dirección anterior (A) y ventral (V) marcada con flechas en la esquina superior derecha del esquema (*Imagen modificada de Doetsch 2003*).

### ***3.1.1 Proceso de neurogénesis en el bulbo olfatorio***

La neurogénesis en el bulbo olfatorio de roedores posee una gran capacidad plástica que permite la modificación de circuitos neurales así como de proliferación celular durante la etapa postnatal/juvenil hasta la etapa en que los organismos han alcanzado la etapa adulta y poseen una madurez sexual (Bonfanti y cols. 1997).

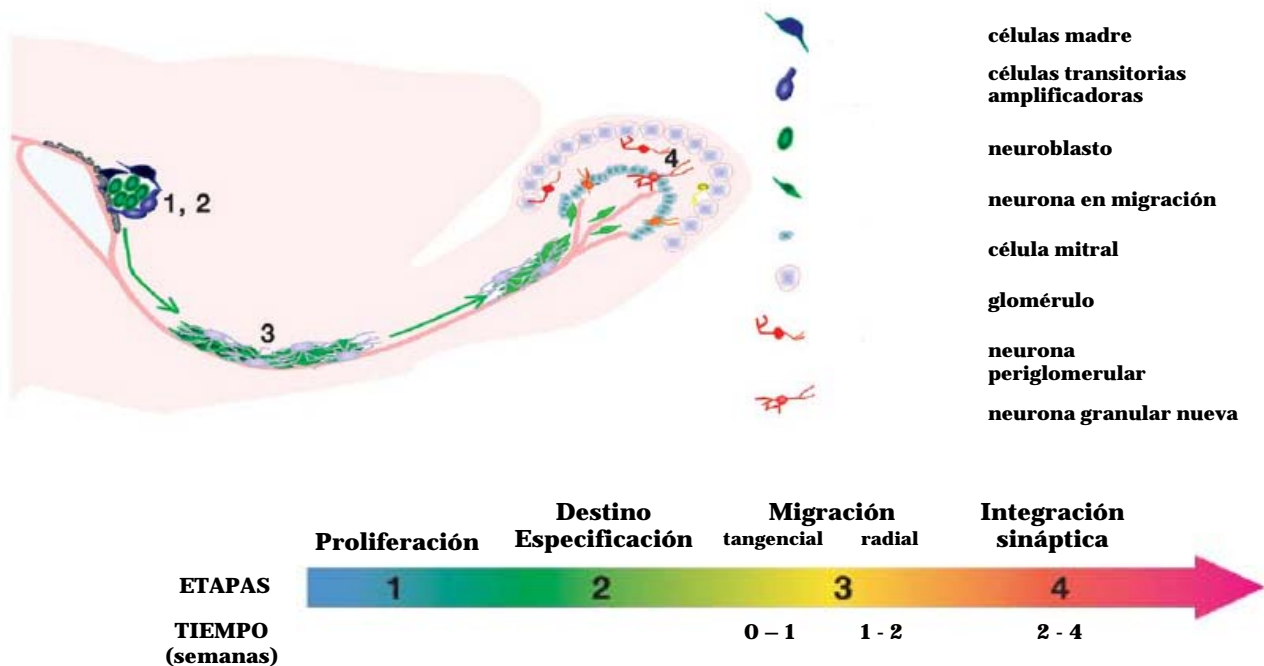
Como ya se mencionó, las nuevas neuronas que son incorporadas en el bulbo olfatorio son generadas en la ZSV de donde migran indiferenciadas a través de la vía migratoria rostral (VMR) hacia el bulbo olfatorio donde se diferencian y se integran a los circuitos neuronales (Petreanu y Alvarez-Buylla 2002). La ZSV es una capa vestigial que está organizada como una red de cadenas de precursores neuronales y gliales que se extienden por las paredes laterales de los ventrículos laterales en el adulto. La ZSV consta de cuatro tipos de células: las células endimarias que se encuentran en las paredes de los ventrículos laterales, las células precursoras con capacidad proliferativa, los astrocitos y las neuronas migratorias jóvenes (Alvarez-Buylla y García-Verdugo 2002). El arreglo de la ZSV consiste de dos grandes componentes celulares: uno de cadenas de neuroblastos que tienen capacidad proliferativa y migratoria y segundo, la glía (astrocitos) protoplasmáticos que dan lugar a un canal de tubos gliales que forman la VMR y que separa las cadenas de células que migran del tejido que los rodea (ver Fig.10) (Giachino y cols. 2002).



**Fig.10** Representación esquemática de la localización del proceso de neurogénesis del bulbo olfatorio así como la identificación de sus componentes. En la imagen se observa (a) en vista lateral la localización de la vía migratoria rostral (VMR) en la cabeza de un roedor; (b) migración de los neuroblastos recién generados que comienza en el ventrículo lateral (VL) continúa por la VMR y termina en el bulbo olfatorio BO donde maduran las neuronas; (c) esquema de la citoarquitectura de la zona subventricular (ZSV) localizada en las paredes del VL; (c') células que componen la ZSV: A- neuroblasto, B-célula madre, C-precursor, E-células endociliares; (d) migración de neuroblastos a través de la VMR –vista sagital y coronal- rodeados por astrocitos; (e) liberación de neuroblastos de la VMR y entrada al BO donde migran Radialmente, se integran y maduran en las diferentes capas. (Imagen modificada de I-Lenington y cols. 2003; II- Gueusi y Lledo 2007).

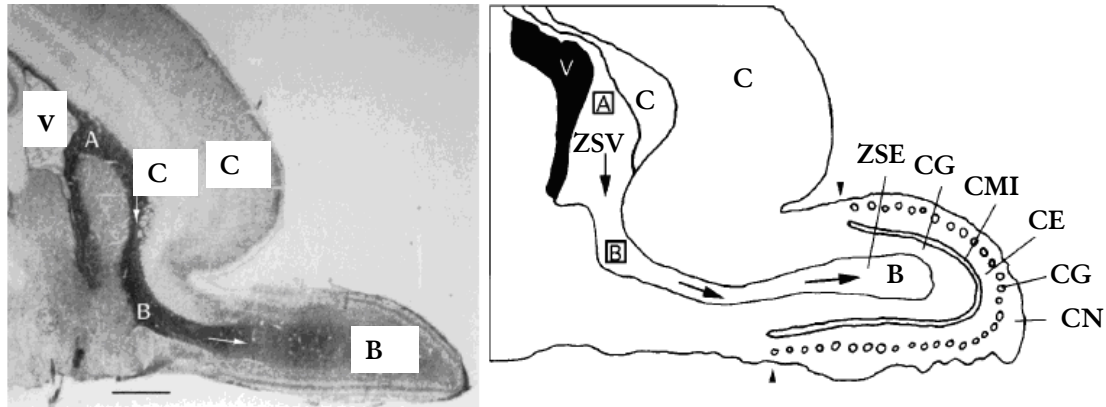
Las células que se generan continuamente en la ZSV, particularmente en la región anterior, migran en dirección rostral una distancia aproximada de 5 a 8mm a través de la VMR hasta finalmente llegar al BO donde se diferenciarán en neuronas granulares y periglomerulares. Éste proceso ocurre cada vez que se genera una célula (Doetsch y Alvarez-Buylla 1996; Lledo y cols. 2006;). En el sistema olfatorio, la migración de las nuevas neuronas generadas es extensa, ya que primero migran tangencialmente a través de la pared del ventrículo lateral, ayudadas de células gliales, en especial de células endependimarias. Cuando salen de la ZSV, comienzan a desplazarse tangencialmente por la VMR y manteniéndose unidas gracias a la ayuda de los astrositos que forman la vía. Cuando llegan al BO, las células se liberan de la VMR y se dispersan radialmente como células individuales en las capas de células del bulbo olfatorio. La migración a través de la VMR es un proceso único llamado migración en cadena en la cual los neuroblastos migran unidos cercanamente unos con otros en una estructura de tubo formada por células gliales. Más de 30,000 neuroblastos salen diariamente de la ZSV por la vía VMR. La velocidad a la que migran estos precursores neuronales no es constante, ya que depende de los estímulos que reciba y del estado fisiológico del sujeto. Como se representa en la Fig.11, las neuronas tardan aproximadamente 2 semanas en migrar hasta el OB (Gheusi y Lledo, 2007). Durante la primera semana, las células migran tangencialmente a través de la capa subependimial en dirección rostral hacia la región central del BO, y durante la segunda semana estas células se dispersan radialmente a través de las capas superficiales del BO donde finalmente toman el lugar que les corresponderá como se observa en la Fig.12 (Bonfanti y cols. 1997).





**Fig.11** Esquema ilustrativo de la migración de las neuronas recién generadas en la zona subventricular que migran tangencialmente por la vía migratoria rostral y que finalmente llegan al bulbo olfatorio donde se integran a los circuitos olfatorios diferenciándose en neuronas periglomerulares ó glomerulares. También se muestran las etapas por las que van pasando las nuevas células que se generan, así como el tiempo que tardan en migrar finalmente al BO, que son alrededor de 2 semanas (15 días). (Imagen modificada de Ming y Song 2005).

Las neuronas recién generadas en el BO poseen diferentes características debido a que se produce más de un tipo. Se han observado neuronas provenientes de la VMR en las diferentes capas que constituyen al BO, tanto el principal como el accesorio. Al parecer, las neuronas que están integrándose constantemente al BO contribuyen a circuitos olfatorios previamente formados ó están relacionadas con la inducción, facilitación, y la generación de nuevos circuitos olfatorios estimulados por alguna conducta en particular como la elección de la comida ó la selección de la pareja (Gheusi y Lledo 2007).



**Fig.12** Esquema ilustrativo de la migración de las neuronas recién generadas en la ZSV que migran tangencialmente por la VMR y que finalmente llegan al BO donde se integran a los circuitos olfatorios diferenciándose en neuronas periglomerulares o glomerulares. También se muestran las etapas por las que van pasando las nuevas células que se generan, así como el tiempo que tardan en migrar finalmente al BO, que son alrededor de 2 semanas (15 días). (*Imagen modificada de Ming y Song 2005*).

### 3.2 Papel de las hormonas ováricas en la Neurogénesis

Se ha descrito que las hormonas ováricas tienen efecto en la modulación de la neurogénesis del BO (Ming y Song 2005; Lledo y cols. 2006; Mak y cols. 2007). McCarthy y Pfaus (1996) describieron que los esteroides gonadales (estradiol y progesterona) que inducen y modulan la receptividad sexual de las ratas hembra, actúan sobre varios sistemas de neurotransmisión a través de mecanismos de plasticidad neuronal en el cerebro adulto. Los estrógenos en particular, parecen ser los responsables del incremento en la proliferación celular en la ZSV, alterando el número celular, grado de proliferación y supervivencia de las células generadas en otras áreas del cerebro. Se ha descrito también, que en ratas adultas, los estrógenos incrementan la formación de espinas dendríticas, la sinaptogénesis y la neurogénesis en el hipocampo (Smith y cols. 2001). También se ha sugerido que los niveles altos de prolactina que son producidos en la primera fase de la gestación y después del parto debido a la lactancia, estimulan la producción de progenitores neurales en la ZSV (Lenington y cols. 2003). Se sabe que el

estradiol está involucrado en la regulación del crecimiento neurítico y la plasticidad sináptica, mediante la expresión de proteínas asociadas a microtúbulos, así como la fosforilación de la proteína Tau, necesaria para el crecimiento axonal (Melcangi y cols. 2007). El grupo de García-Segura y cols. (1994) demostró que la administración de  $17\beta$ -estradiol a ratas ovariectomizadas incrementa la inmunorreactividad a GFAP en el núcleo arcuato. Sin embargo, no se ha descrito hasta el momento que la administración de estrógenos dada a hembras ovariectomizadas genere cambios en la adición de células nuevas al bulbo olfatorio, aunque sí se ha descrito que modifica la proliferación celular de la ZSV (Smith y cols. 2001).

Por otra parte, la progesterona parece también tener algunos efectos en la neurogénesis en el adulto. El grupo de Giachino y cols. (2003) describió que tanto la progesterona, como sus metabolitos neuroactivos (dihidroprogesterona y tetrahydroprogesterona) administrados directamente en la ZSV reducen el número de células en proliferación en la ZSV y modifican las características moleculares y estructurales de los tubos gliales de la VMR, por lo que en conjunto afectan la proliferación activa y en menor medida la migración celular. Aunque aún no se conoce a través de qué mecanismo actúa, se ha descrito que no hay modificaciones evidentes en la proliferación celular en la ZSV cuando la progesterona es administrada subcutáneamente ó intraventricularmente (Giachino y cols. 2003).

En el presente trabajo, los niveles hormonales de los sujetos experimentales se mantuvieron constantes para evitar variaciones.

### **3.3 Herramientas experimentales destinadas al estudio de proliferación celular y neurogénesis**

#### **3.3.1 Técnicas**

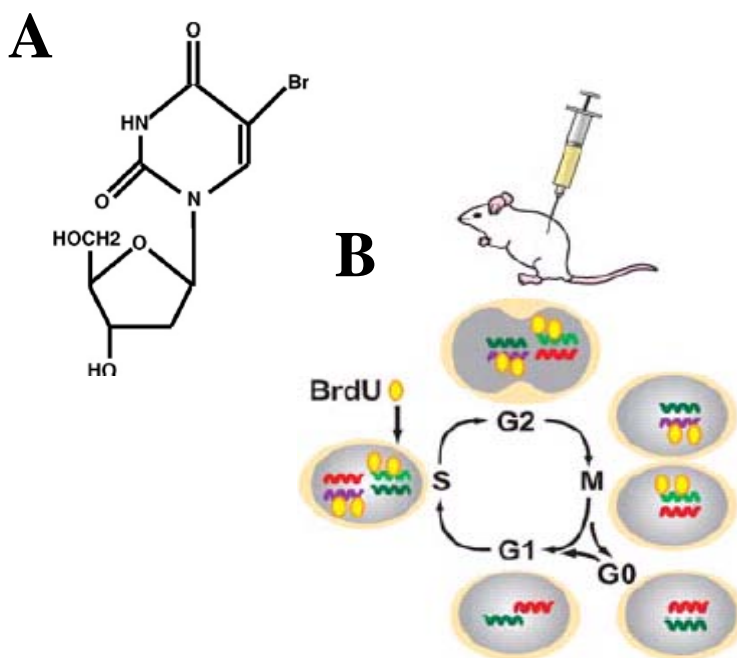
Alrededor de 1960 se desarrolló una técnica, el uso de la timidina-[H3], que consistía en la incorporación de timidina radiactiva al ADN de las células en división que se podía revelar por autorradiografía. Con esto se pudo estudiar la formación de nuevas neuronas en un cerebro adulto, y fue gracias a ésta técnica que se reportó la presencia de neuronas nuevas en bulbo olfatorio, hipocampo y corteza cerebral (para una revisión ver Gould y Gross 2002). Años más tarde, en 1989, Nottebohm y algunos otros grupos demostraron la presencia de neurogénesis en adultos en algunos vertebrados como peces, reptiles y aves.

Hasta los 1990 se describió la presencia de neurogénesis en el cerebro adulto de los roedores debido a la introducción de una nueva técnica como marcador *in vivo* de células en proliferación, la cual consistía en la utilización de análogos de nucleótidos que se adhieren durante la división celular al ADN sustituyendo una base endógena en la fase S del ciclo de la célula que es heredado a las siguientes generaciones (Kee y cols. 2002; Ming y Song 2005; Taupin 2007). Así el 5-Bromo-2'-deoxyuridina (BrdU) se introdujo como técnica para el estudio de la proliferación celular en el desarrollo del sistema nervioso (Gould y Gross 2002).

##### **3.3.1.1 Marcador exógeno BrdU**

El BrdU es una halopirimidina análoga de la timidina (anillo de desoxirribosa unido a la base pirimidínica timina) que se incorpora a las células en división durante la fase S del ciclo celular (ver Fig.13) y es utilizado para el marcaje del nacimiento celular, monitoreo y proliferación, ya que es un indicador de síntesis de ADN.

## HALOPIRIMIDINA



**Fig. 13** Representación de la estructura química del BrdU, que es una halopirimidina y esquema ilustrativo de la adición del marcador exógeno BrdU al ADN en la fase S (síntesis) del ciclo celular. (Imágenes modificadas de A- Taupin 2007 y B- Ming y Song 2005).

La utilización de BrdU puede alterar la estabilidad de las células, debido a que se integra un átomo de bromina, lo cual incrementa el riesgo de que se produzcan mutaciones, intercambio de cromátidas hermanas, etc., sin embargo es la técnica más utilizada para confirmar la proliferación celular en el cerebro.

El BrdU es metabolizado a través de una dehalogenación que permite al residuo de uracilo ser removido del DNA por el sistema de reparación del uracilo glicosilasa. La concentración del análogo de la timidina que alcanza el cerebro es solamente una fracción de lo que se le administra. Una de las metodologías utilizadas más comunes para la administración del marcador BrdU es la inyección intraperitoneal (Taupin 2006).

El BrdU puede revelarse por medio de inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo monoclonal dirigido contra el BrdU que se ha adherido a una región específica del DNA donde ya se ha incorporado el análogo a la timidina. Éste ha sido el marcador principal de

células mitóticas en estudios de neurogénesis en adulto, ya que es una técnica rápida y es un indicador certero de la división celular.

Con respecto a la dosis utilizada, hay mucha discrepancia. Se han utilizado desde 50mg/kg hasta 300mg/kg ya que en adultos estas dosis no son tóxicas. La cantidad total de proliferación celular que se está generando se subestima, debido a que la concentración de marcador que se administra se puede diluir ó difundir; por lo que la concentración del análogo de la timidina que llega finalmente al cerebro es únicamente una fracción de lo administrado. El BrdU es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica, pudiendo ser distribuido de manera intracerebroventricular, intraperitoneal, intravenoso y de manera oral. Las inyecciones intracerebroventriculares permiten que llegue una concentración alta de BrdU al cerebro. Sin embargo, la administración intraperitoneal ó intravenosa de BrdU son comúnmente utilizados ya que no son invasivos y no requieren de cirugía.

El uso del BrdU como marcador, gracias a que no se requiere el uso de material radiactivo, es una técnica rápida, y la detección de las células marcadas se puede observar en secciones de tejido relativamente delgado que se puede obtener de manera sencilla con técnicas histológicas en el laboratorio (Taupin 2006, 2007).

# TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

## **Capítulo 4.**

### **Trabajo de Investigación**

#### **4. Planteamiento del problema**

La conducta sexual es representativa del estado fisiológico de los organismos. En las ratas hembra, esta conducta es muy compleja ya que está determinada por la interacción de estímulos ambientales y fisiológicos (hormonales). El estudio de diferentes modelos de conducta sexual, como lo son que la hembra controle los contactos sexuales (cópula regulada por la hembra) ó que el macho regule la cópula, representan una manera de estudiar las posibles implicaciones fisiológicas, conductuales y plásticas de estas conductas. En los últimos años se ha generado un particular interés en el estudio de la cópula regulada por la hembra debido a los cambios neuroendocrinos que desencadena y las consecuencias reproductivas que provee. Al parecer los cambios neuroendocrinos que se desencadenan por la cópula regulada por la hembra pudieran estar relacionados con la función particularmente del bulbo olfatorio accesorio, ya que es en esta estructura donde el grupo de Rajendren y cols (1993) argumentan que llega la información proveniente de las feromonas liberadas por el macho en la cópula y de donde posteriormente se envía al área preóptico medial del hipotálamo donde se encuentran las células GnRHérgicas que son activadas e inducen la liberación hormonal por parte de la hipófisis, permitiendo así las condiciones fisiológicas adecuadas para la preñez de la rata.

En los capítulos previos se describió la importancia que tiene la olfacción en la expresión de la conducta sexual y el papel fundamental que posee en la detección de olores quimiosensoriales sexualmente relevantes como las feromonas, fundamentales para la expresión de esta conducta (Keller y cols. 2006a,b). También se habló acerca de la capacidad de neurogénesis que posee el bulbo olfatorio en el adulto gracias a su constante recambio de neuronas (Carleton y cols. 2003). Como lo demuestra el hecho de que olores

liberados por ratones macho sexualmente expertos incrementan el número de células nuevas en la ZSV de las hembras media hora después de ser expuestas (Mak y cols. 2007).

Con base en esto se propuso que la conducta sexual en la rata hembra podría ser un estímulo que influyera en la incorporación de un mayor número de células que la que ocurre de manera natural y constante en el bulbo olfatorio. Las hembras utilizadas carecían de experiencia sexual debido a que se ha descrito, mediante estudios con la proteína c-Fos como indicador de activación neuronal, en estructuras del circuito olfatorio, que la rata hembra no requiere de experiencia sexual para presentar una preferencia y atracción por machos sexualmente expertos (Hosokawa y Chiba 2007). Se esperaba encontrar cambios en el número de células nuevas en el bulbo olfatorio accesorio y el bulbo olfatorio principal (Peretto y cols. 2001).

En este trabajo se utilizó un modelo de rata hembra adulta sin experiencia sexual, ovariectomizada y tratada hormonalmente (con estradiol y progesterona) para analizar el incremento de células nuevas en el bulbo olfatorio en el caso de que la hembra regulara ó no los contactos copulatorios. El análisis se realizó mediante la detección de las células que incorporaron el marcador mitótico BrdU en el bulbo olfatorio principal y accesorio.



## **4.1 Hipótesis**

Utilizando un modelo experimental de ratas hembra adultas, sin experiencia sexual, ovariectomizadas y tratadas con estradiol y progesterona, se propone que:

1. La conducta sexual de la hembra (cópula regulada por la hembra ó por el macho) y no la exposición a un macho, influirá en el número de células nuevas que se incorporen al bulbo olfatorio.
2. La cópula regulada por la hembra tendrá mayor influencia que la cópula regulada por el macho en el número de células nuevas que se incorporen al bulbo olfatorio.

## **4.2 Objetivo General**

Determinar la influencia de la conducta sexual femenina sobre el número de células nuevas en el bulbo olfatorio de la rata hembra.

### ***4.2.1 Objetivos Específicos***

1. Determinar si la exposición a un macho sexualmente experto influye en el número de células nuevas en el bulbo olfatorio principal y accesorio de ratas hembra adultas.
2. Determinar si la cópula regulada por la hembra influye en el número de células nuevas en el bulbo olfatorio principal y accesorio de ratas hembra adultas.
3. Determinar si la cópula regulada por el macho influye en el número de células nuevas en el bulbo olfatorio principal y accesorio de ratas hembra adultas.

### **4.3 Sujetos, Material y Método**

#### **Animales**

Se utilizaron ratas (*Wistar*) hembra entre 180-230g de peso, alimentadas *ad-libitum* y mantenidas bajo condiciones del ciclo de luz-oscuridad invertido. Las hembras utilizadas se ovariectomizaron utilizando anestesia (xilacina30%-ketamina70% 1ml/kg). Post-cirugía se trataron con benzoato de estradiol (25µg/kg) y progesterona (1mg/kg). Todas las hembras carecían de experiencia sexual.

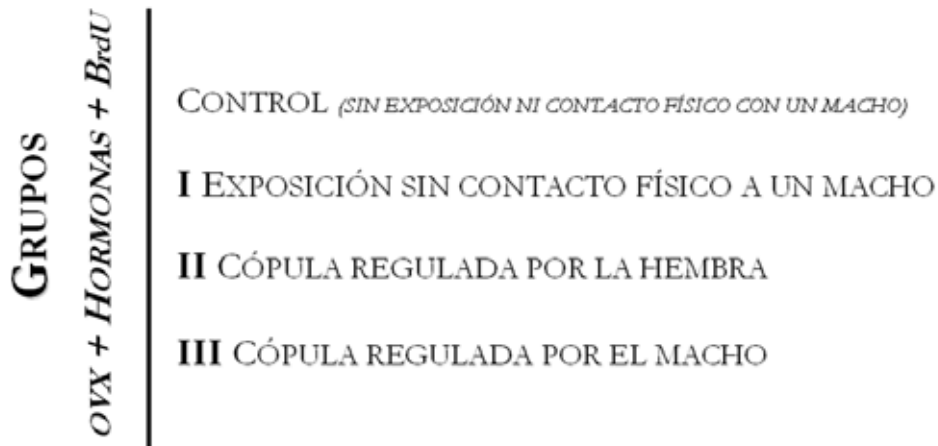
La prueba conductual se realizó dos semanas después de la ovariectomía con una duración de 60 minutos.

#### **Inducción de proceptividad y receptividad en las hembras**

Para inducir la proceptividad de las hembras, se les administró mediante una inyección subcutánea, dos días antes de las pruebas conductuales, benzoato de estradiol (BE, 25µg/rata), en un volumen de 0.2 ml/rata. Para inducir la receptividad, se les inyectó progesterona (1mg/rata) de manera subcutánea el día de la prueba conductual (4 horas antes), en un volumen de 0.2 ml/rata. Las inyecciones siempre se administraron a la misma hora (10 am).

#### **Diseño experimental**

Las hembras se dividieron aleatoriamente en los grupos experimentales y control (ver Fig.14). Las ratas del grupo control no recibieron estímulo por parte de los machos. El grupo I únicamente tuvo contacto visual y olfatorio con el macho, no hubo contacto físico entre hembra y macho. El grupo II realizó la prueba de cópula regulada por la hembra. El grupo III realizó una prueba de cópula regulada por el macho. Todos los machos (*Wistar* entre 250-350gr) que se utilizaron para las pruebas conductuales eran sexualmente expertos. Las hembras sólo realizaron una prueba conductual y no tuvieron contacto con los machos previo a la prueba conductual.



**Fig. 14** Organización de los grupos para las pruebas conductuales (duración 60 minutos). Las ratas hembra se repartieron aleatoriamente en uno de los cuatro grupos indicados en el esquema, recibiendo el mismo tratamiento, ovariectomizadas (OVX) con tratamiento hormonal (estradiol y progesterona) y administración del marcador BrdU en tres ocasiones. El grupo control consistió en hembras que no estuvieron expuestas ni tuvieron contacto con un macho. El grupo I de hembras estuvo expuesto, sin tener contacto físico, a un macho sexualmente experto. Los grupos II y III fueron de cópula con machos sexualmente expertos, siendo el grupo II de hembras que regularon la cópula, y el grupo III de machos que regularon la cópula.

### ***Aparatos***

Para todas las pruebas conductuales se utilizaron cajas de cópula hechas de acrílico con las siguientes dimensiones: 62cm de ancho, 29cm de altura y 42cm de profundidad. El fondo de la caja permaneció cubierto con aserrín (el cual se cambió en cada prueba, además del uso del ácido acético para evitar la impregnación de olores).

Las cajas de cópula utilizadas permitieron la observación de la conducta sexual de las ratas y su posterior registro.

A continuación se describe a mayor detalle cada uno de los grupos:

### ***Grupo control***

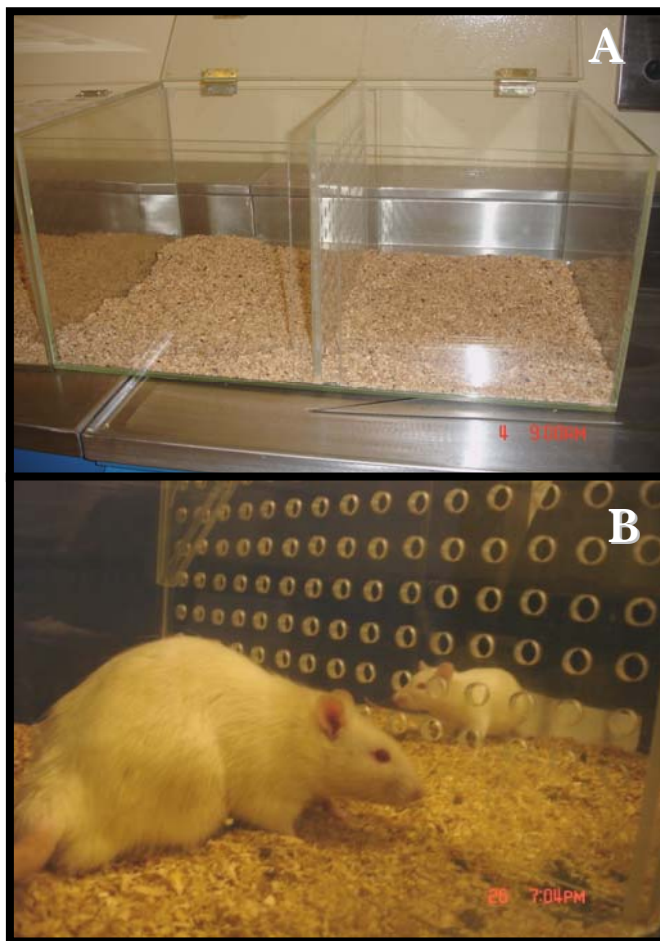
Las ratas de este grupo fueron ovariectomizadas y tratadas con benzoato de estradiol y progesterona pero no tuvieron contacto con ningún macho. Las ratas permanecieron en la caja de cópula (Fig.15) la cual permaneció libre de olores; el aserrín que se utilizó para esta prueba fue esterilizado y renovado para evitar el olor de macho, ya que lo que se buscó en ésta prueba fue que las ratas no recibieran ningún tipo de estímulo olfatorio sexualmente relevante durante 60 minutos.



**Fig. 15** A-Caja de cópula utilizada para el grupo control. B-hembra control en la caja.

### ***Grupo I. Estímulo olfatorio***

Las ratas de este grupo permanecieron, durante 60 minutos, en uno de los compartimentos de la caja de cópula con una separación de acrílico que divide la caja en dos compartimentos (Fig.16). Esta separación de acrílico con orificios de 1cm de diámetro, permitió a las hembras estar expuestas a un macho sexualmente experto, pero sin contacto físico entre ellos. Los machos se colocaron en el otro compartimento donde no estaba la hembra.



**Fig. 16** A-Caja de cópula para estímulos olfatorios y visuales. B-Prueba de estímulo olfatorio y visual donde se observa la división con los orificios que separa los compartimientos de la hembra y del macho.

### ***Grupo II. Cópula regulada por la hembra (pacing)***

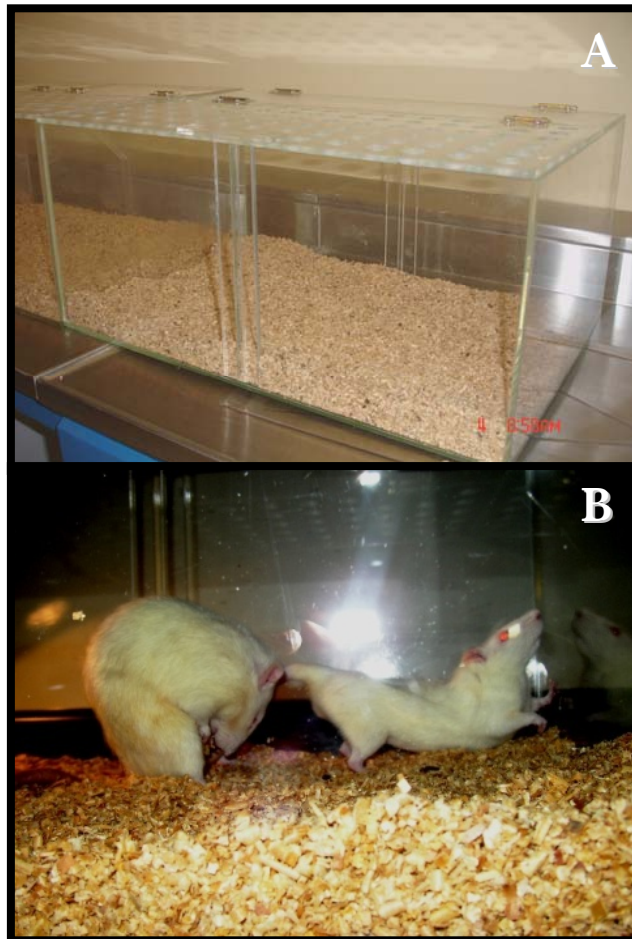
Las hembras de este grupo regularon los tiempos, y el número de contactos que tuvieron con los machos. Las hembras se colocaron en la caja de cópula con una división que genera dos compartimentos en la caja (Fig.17). Ésta división posee únicamente un orificio de 7cm de altura y 4cm de ancho, el cual únicamente puede ser atravesado por las hembras al tener un tamaño menor que el macho. Esto permite a la hembra regular el momento en el que quiera estar en contacto con el macho y espaciar los contactos copulatorios. Las ratas permanecieron en la caja durante 60 minutos; los machos y las hembras fueron colocados en distintos compartimientos.



**Fig. 17** A-Caja de cópula regulada por la hembra (*pacing*). B-Prueba de *pacing* en la que se puede apreciar la división con el orificio que permite a la hembra moverse hacia el compartimiento donde se encuentra el macho.

### ***Grupo III. Cópula regulada por el macho (no regulada)***

La cópula en éste grupo es regulado completamente por el macho (tiempos y número de contactos entre hembras y machos). Estas ratas se colocaron en la caja de cópula (Fig.18) sin la división de acrílico junto con los machos, donde permanecieron 60 minutos.

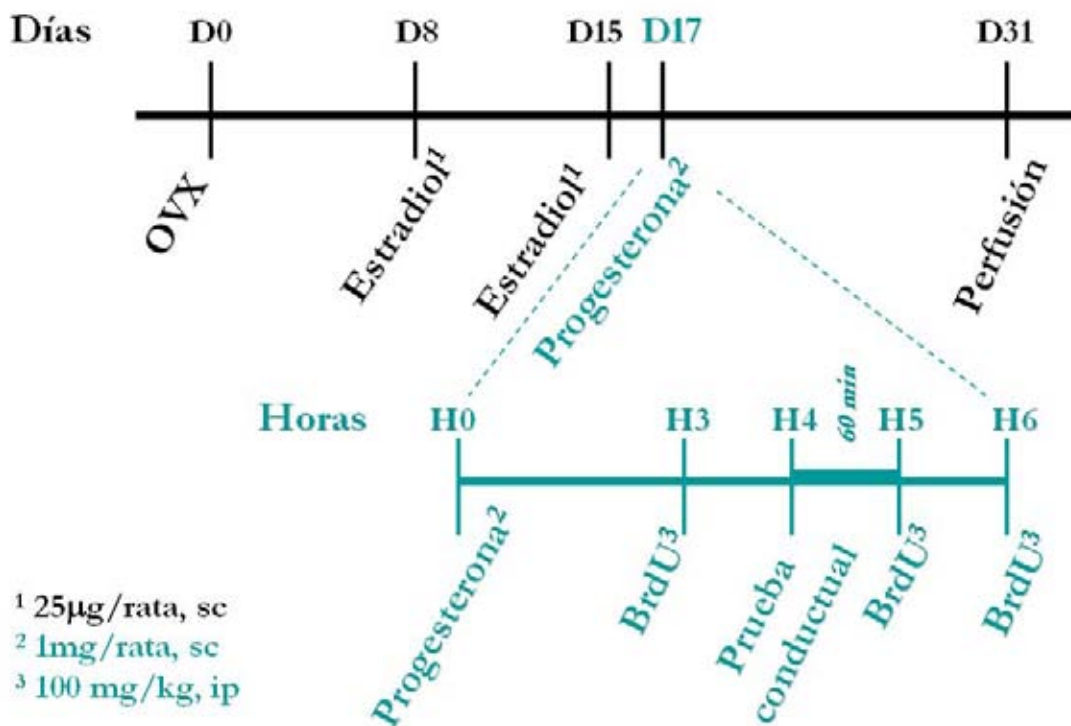


**Fig. 18** A-Caja de cópula regulada por el macho. B-Prueba de cópula donde se observa una interacción entre hembra y macho, en la cual el macho ha regulado los contactos copulatorios.

## Método

Cada experimento tuvo una duración de un mes, durante el cual se les sometió a las hembras a cirugía de remoción de ovarios (OVX), periodo de recuperación, administración de hormonas estradiol y progesterona, administración del marcador, prueba conductual (grupo control, exposición sin contacto físico al macho, cópula regulada por la hembra y cópula regulada por el macho), periodo de migración de las células hacia el bulbo olfatorio y sacrificio de los animales.

En la Fig.19 se muestra a manera de esquema el método utilizado en el presente trabajo:



**Fig. 19** Método. Las ratas hembra sin experiencia sexual se ovariectomizaron (OVX) en el día 0, se les administraron hormonas (estradiol los días 8 y 15; progesterona el día 17) por medio de inyección subcutánea (sc). Cuatro horas después de administrada la progesterona, se realizó la prueba conductual con una duración de 60 minutos. El marcador BrdU se administro intraperitonealmente (ip) en 3 ocasiones, una hora antes, al término y una hora después de la prueba conductual. Las ratas se dejaron descansar hasta el día 31 en el que fueron sacrificadas.



### **Proliferación celular**

El marcador mitótico 5`-Bromo-2`deoxyuridina (BrdU) (Sigma, St.Louis, USA) en 0.9% NaCl) se inyectó intraperitonealmente en una concentración de 100mg/kg en tres tiempos. Se utilizó el siguiente protocolo: una primera dosis de BrdU 60 minutos antes de someter a las hembras a la prueba conductual, una segunda dosis inmediatamente después de que transcurrieran los 60 minutos de la prueba y una tercera dosis 120 minutos después de haber concluido la prueba conductual.

### **Parámetros conductuales**

La actividad sexual de las ratas se registró al momento de las pruebas conductuales de cópula regulada por la hembra y cópula regulada por el macho, durante 60 minutos, con el objeto de confirmar que se presentaran las características distintivas de cada uno de los modelos de cópula.

Se realizó el registro de los siguientes parámetros:

Análisis del número y latencia de montas, intromisiones y eyaculaciones

Serie Copulatoria

Intervalo Posteyaculatorio (IPE)

Intervalo Inter-Intromisión (III)

Porcentaje de Salidas después de monta, intromisión y eyaculación

Latencia de Regreso después de monta, intromisión y eyaculación

En cada registro se tomó en cuenta el grado de lordosis que las hembras presentaron, siendo 1- dorso completamente recto ó no lordosis, 2- ligero arqueamiento de la columna, cabeza y cola y 3- arqueamiento pronunciado de la columna, cabeza y cola.

Para analizar el grado de receptividad que las hembras tenían al momento de la cópula, se cuantificarán los siguientes índices:

Coeficiente de Lordosis (CL): siendo el número de lordosis ( $\Sigma L$ ) presentadas (1,2 ó 3) dividido entre el número de montas ( $\#M$ ) más el número de intromisiones ( $\#I$ ) que recibió del macho multiplicado por 100.

$$CL = \left[ \frac{\sum L}{\#M + \#I} \right] \times 100$$

Intensidad Media de Lordosis (IML): siendo el número de puntos sumados del grado de lordosis ( $\Sigma$  Ptos L) presentada dividido entre el número total de lordosis ( $\Sigma L$ ) presentada.

$$I\bar{X}L = \frac{\sum PtosL}{\sum L}$$

### **Histología e Inmunohistoquímica**

Las ratas se perfundieron vía intracardiaca 15 días después de la prueba conductual con paraformaldehído (PF) 4%. Los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (1ml/rata) (Cheminova, México DF) antes de sacrificarlos. Los cerebros fueron removidos de cada rata teniendo especial cuidado con los bulbos olfatorios. Los cerebros se mantuvieron durante 1 hora en PF, y se cambiaron a una solución de sacarosa 30% donde permanecieron hasta ser cortados. Posteriormente se realizaron cortes sagitales de 30  $\mu$ m de grosor en el microtomo de congelación.

### TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA PARA BrdU

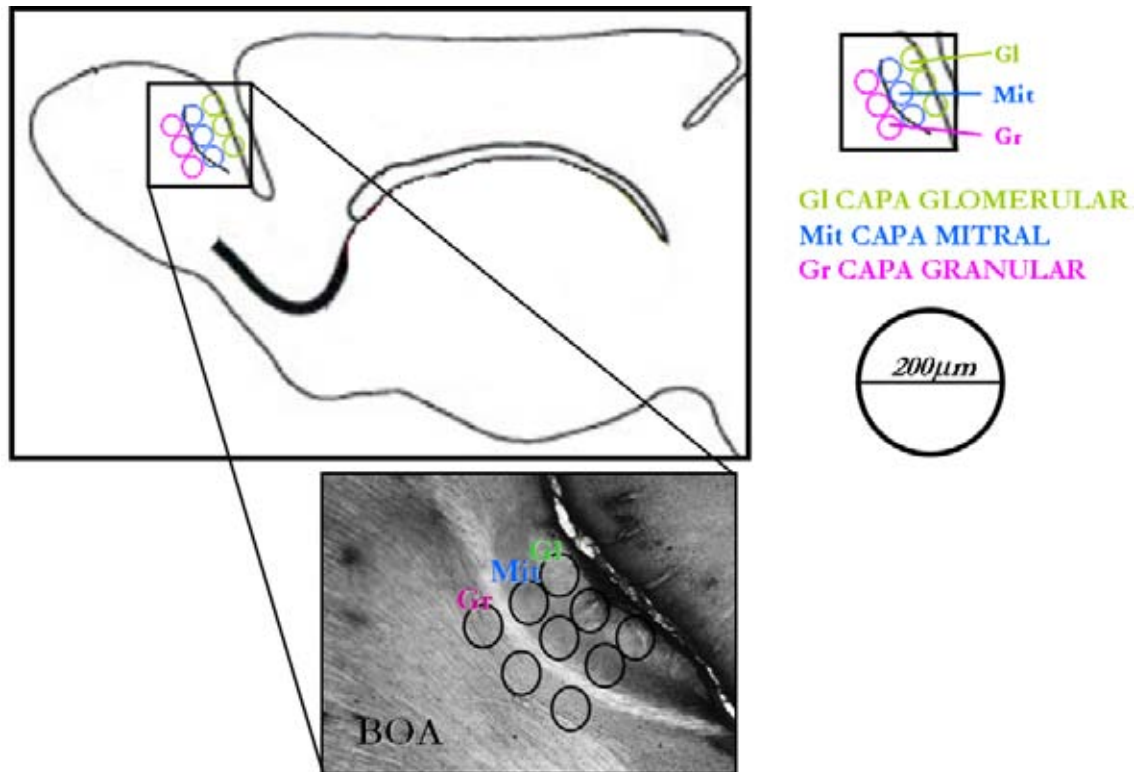
La inmunohistoquímica para detectar la expresión de células positivas al marcador utilizado (BrdU) se realizó con la técnica de flotación. Los tejidos se lavaron en una solución amortiguadora de fosfatos (TBS) y fueron incubados en 2N HCL durante 60 minutos para permitir que el anticuerpo contra BrdU llegara hasta el ADN de los núcleos de

las células. El bloqueo de sitios inespecíficos se realizó incubando los tejidos durante 15 min con suero de caballo (HS 20%) y Tritón-X (Tx 0.3%) en frío. La incubación con el anticuerpo monoclonal anti-BrdU (1:2000) (BD Bioscience) fue durante 16 horas a 4° C. Consecutivamente los tejidos se prepararon durante 1 hr con lavados de TBS, HS (1%) y Tx (0.02%) para después incubarlos con el anticuerpo 2° biotinilado anti-ratón IgG (1:500) (Vector Laboratories, Burlingame, CA) durante 2 hrs. Después se lavaron varias veces y se incubaron con ABC (en 0.32% de Tx) (Vector Laboratories, Burlingame, CA) por 1 hr y la inmunoreacción se reveló con diaminobenzidina (DAB) (Park y cols. 1996). Los cortes se montaron en laminillas gelatinizadas utilizando Permout para cubrirlas.

#### ***4.3.1 Análisis de imagen y cuantificación de células inmunorreactivas a BrdU***

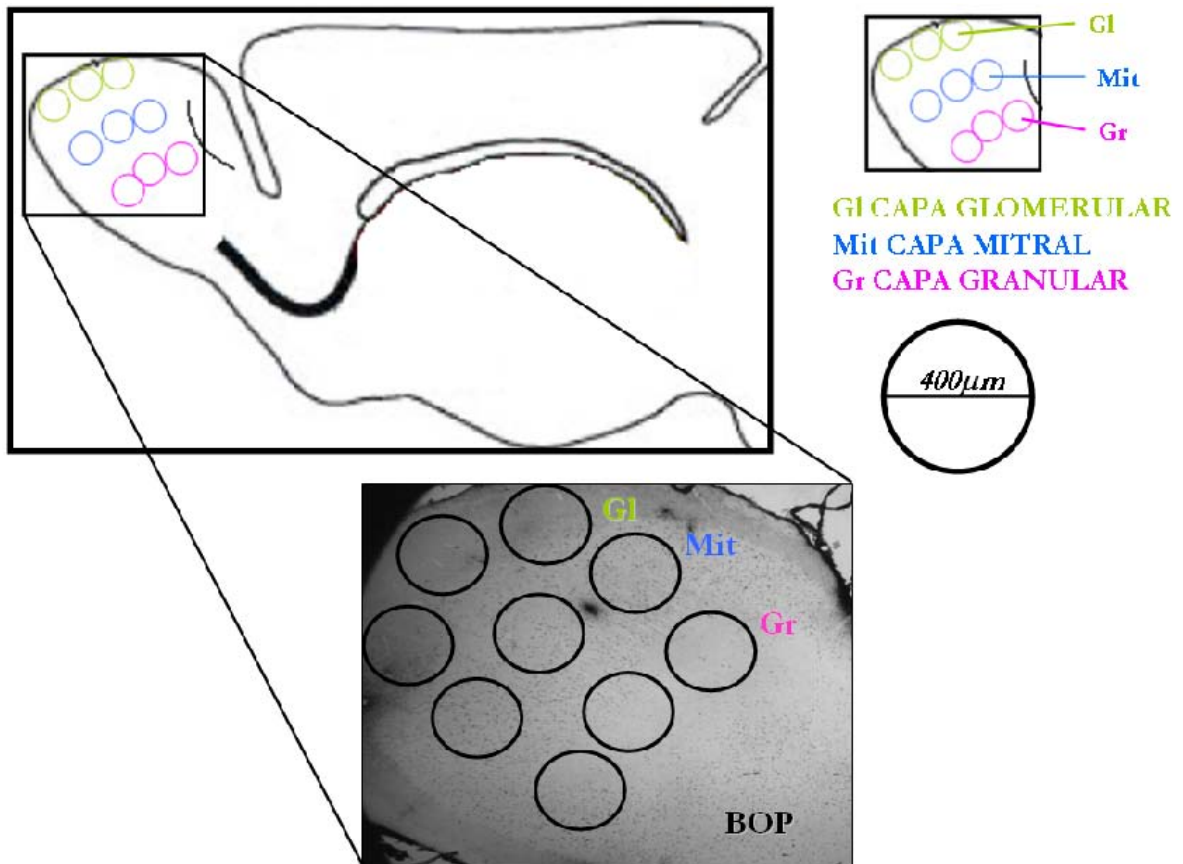
La cuantificación de las células positivas al marcador BrdU se realizó en el bulbo olfatorio principal y accesorio. Se trabajó únicamente con el hemisferio derecho ya que no existe evidencia de que existan diferencias con respecto a la neurogénesis del BO entre hemisferios. Se realizaron cortes sagitales de 30µm siguiendo la dirección de la línea media hacia la corteza. Se obtuvieron cortes seriados a partir del nivel donde coinciden el bulbo olfatorio principal y bulbo olfatorio accesorio (1200 µm partiendo de la línea media) (Paxinos y Watson 1986), de los cuales se tomó cada tercer corte para la cuantificación de las células BrdU+, guardando el resto para un posterior análisis. El análisis cualitativo de las células se realizó de la siguiente manera: utilizando el software Image Pro Plus 6.1 se obtuvieron imágenes 4X de los cortes previamente seleccionados para el conteo de ambas estructuras del bulbo olfatorio accesorio.

Para la cuantificación de las células que incorporaron el marcador BrdU en el bulbo olfatorio accesorio, se delimitó un área de conteo que abarcara gran parte de las regiones, por lo que se utilizaron tres círculos de 200µm de diámetro cada uno, que fueron colocados sobre cada una de las capas de interés (capa glomerular, capa mitral y capa granular). El área delimitada para la cuantificación de las células fue constante para cada corte analizado (ver Fig.20). En total se cuantificaron 3 cortes de cada cerebro (n=7 ratas en total por grupo), de los cuatro grupos trabajados (grupo control y grupos I, II, III; ver Fig.18).



**Fig. 20** Esquema de un corte sagital de cerebro de rata donde se señala con un recuadro el bulbo olfatorio accesorio y el área de cuantificación (200µm de diámetro por círculo indicado a la derecha) que se utilizó para el conteo de las células BrdU+ en las capas glomerular (GI), mitral (Mit) y granular (Gr). Imagen 4X de un corte sagital correspondiente al recuadro marcado en el esquema.

En el caso del bulbo olfatorio principal, la cuantificación de las células que incorporaron el marcador BrdU se delimitó de manera similar, pero, considerando que el área total del bulbo olfatorio principal es mayor, se utilizaron áreas de conteo que abarcaran también gran parte de las regiones; se utilizaron tres círculos de 400µm de diámetro cada uno, que fueron colocados sobre cada una de las capas de interés (capa glomerular, capa mitral y capa granular). El área delimitada para la cuantificación de las células fue constante para cada corte analizado (ver Fig.21). En total se cuantificaron 3 cortes de cada cerebro (n=7 ratas en total por grupo), de los cuatro grupos trabajados (grupo control y grupos I, II, III; ver Fig.18).



**Fig. 21** Esquema de un corte sagital de cerebro de rata donde se señala con un recuadro el bulbo olfatorio principal y el área de cuantificación (400µm de diámetro por círculo indicado a la derecha) que se utilizó para el conteo de las células BrdU+ en las capas glomerular (Gl), mitral (Mit) y granular (Gr). Imagen 4X de un corte sagital correspondiente al recuadro marcado en el esquema.

### ***4.3.2 Análisis Estadístico***

Para el análisis de los parámetros conductuales de número y latencia de montas, intromisiones y eyaculaciones, serie copulatoria, IPE, III, IML y CL que se registraron durante la cópula regulada por la hembra y la cópula regulada por el macho se utilizó la prueba de U de Mann-Whitney debido a que no se encontró homogeneidad de varianza en los grupos. Para los parámetros de la cópula regulada por la hembra, porcentaje de salidas y latencia de regreso después de monta, intromisión y eyaculación se utilizaron análisis de varianza (ADEVA) de datos completamente aleatorios de un factor, seguidas de una prueba Post-Hoc de Fisher LSD.

La estadística que se utilizó para las células con BrdU fue ANOVA seguida de una prueba Post-Hoc de Fisher LSD.

# RESULTADOS

## CAPÍTULO 5

### Resultados

#### 5.1 Análisis de Datos Conductuales

El análisis U de Mann-Whitney mostró que el número de intromisiones ( $z=-3.006$ ,  $p<0.01$ ), de eyaculaciones ( $z=-2.62$ ,  $p<0.01$ ) y la latencia de intromisión ( $z=-2.11$ ,  $p<0.05$ ) fueron significativamente menores en el grupo de cópula regulada por la hembra. El intervalo inter-intromisión ( $z=-2.36$ ,  $p<0.05$ ) fue mayor en el grupo de cópula regulada por la hembra (ver Tabla 1).

**Tabla 1. Parámetros de conducta en la cópula regulada por la hembra y la cópula regulada por el macho.** Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar.

PARÁMETRO CONDUCTUAL		CÓPULA REGULADA POR EL MACHO MEDIA $\pm$ ERROR ESTANDAR	CÓPULA REGULADA POR LA HEMBRA MEDIA $\pm$ ERROR ESTANDAR
NÚMERO	MONTAS	1 $\pm$ 0.8	2 $\pm$ 0.8
	INTROMISIONES	46.57 $\pm$ 2.21	29.71 $\pm$ 2.21 **
	EYACULACIONES	4.142 $\pm$ 0.4	3 $\pm$ 0 **
LATENCIAS (SEGUNDOS)	MONTAS	466.2 $\pm$ 297.04	347.23 $\pm$ 145.9
	INTROMISIONES	1351.5 $\pm$ 96	769.7 $\pm$ 194.9 *
	EYACULACIONES	439.8 $\pm$ 65.5	773.1 $\pm$ 192.33
SERIE COPULATORIA (SEGUNDOS)		1791.4 $\pm$ 134.8	1542.9 $\pm$ 180
INTERVALO POST-EYACULATORIO (SEGUNDOS)		447 $\pm$ 52.44	479.5 $\pm$ 52.8
INTERVALO INTER-INTROMISIÓN (SEGUNDOS)		9.38 $\pm$ 1.31	25.34 $\pm$ 5.0 *
INTENSIDAD MEDIA DE LORDOSIS		1.90 $\pm$ 0.5	1.90 $\pm$ 0.3
COEFICIENTE DE LORDOSIS (%)		100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0

\*Diferente del grupo cópula regulada por el macho  $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ .

El ANDEVA de los porcentajes de salidas ( $F_{(2,20)}=31.26$ ,  $p<0.01$ ) mostró diferencias significativas entre los diferentes parámetros comparados. La prueba Post-Hoc reveló que las diferencias significativas se encontraban entre el porcentaje de salida después de intromisiones y después de eyaculaciones con respecto al porcentaje de salida después de montas.

En las latencias de regreso un análisis ANDEVA ( $F_{(2,20)}=24.63$ ,  $p<0.01$ ) también mostró diferencias entre ellos. Las diferencias se encontraban entre la latencia de regreso después de eyaculación, la cual fue mayor con respecto a las latencias de regreso después de monta e intromisión (ver Tabla 2) de acuerdo al análisis Post Hoc.

**Tabla 2. Latencias de regreso y porcentaje de salidas en las hembras durante la prueba de cópula regulada.** Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar.

PARÁMETRO CONDUCTUAL		CÓPULA REGULADA POR LA HEMBRA MEDIA $\pm$ ERROR ESTANDAR
PORCENTAJE DE SALIDAS (%)	MONTAS	12.53 $\pm$ 12.2
	INTROMISIONES	84.52 $\pm$ 7.8 **
	EYACULACIONES	100 **
LATENCIAS DE REGRESO (SEGUNDOS)	MONTA	21.23 $\pm$ 14.18
	INTROMISIÓN	14.68 $\pm$ 2.61
	EYACULACIÓN	670.78 $\pm$ 130.76 ++

\*\* Diferente de porcentaje de salidas después de monta  $p<0.01$

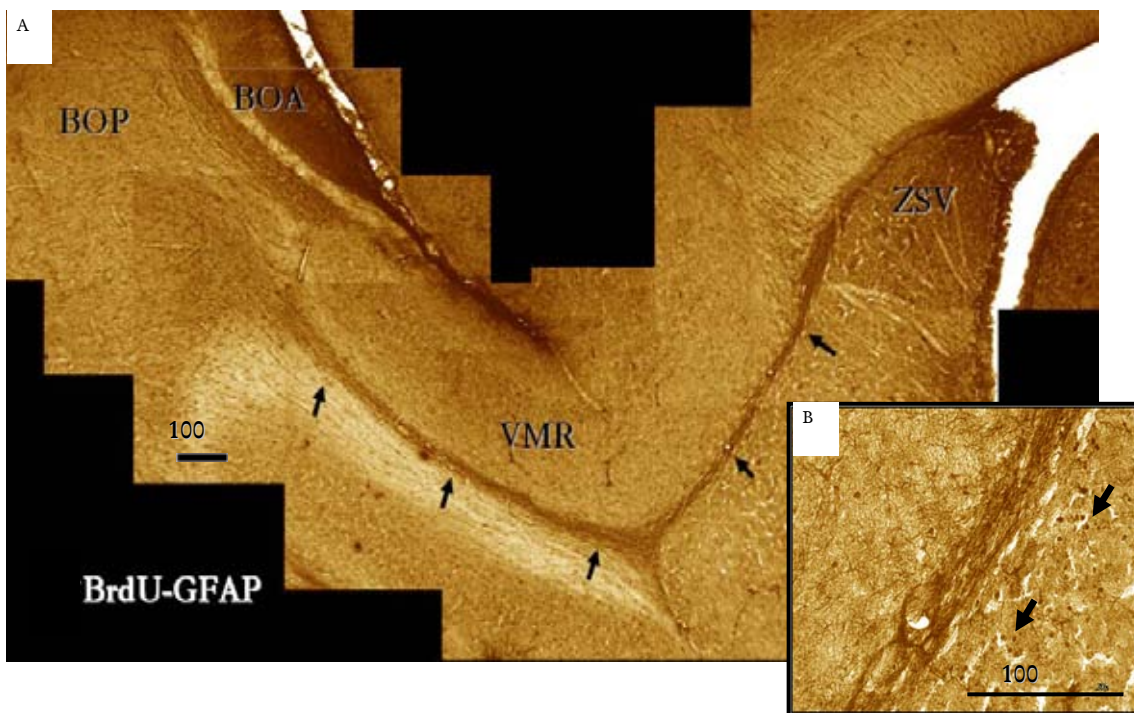
++ Diferente de latencia de regreso después de monta e intromisión  $p<0.01$



## 5.2 Análisis y Cuantificación de Proliferación Celular

### Análisis de Imagen y Cuantificación de células con BrdU en bulbo olfatorio

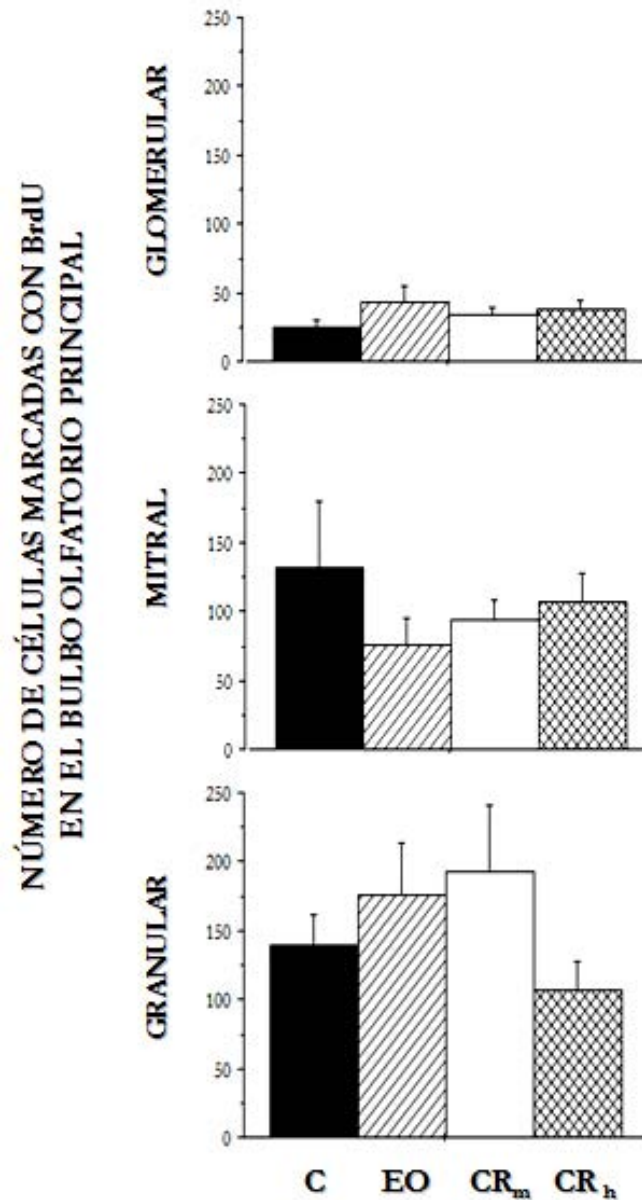
Los cortes sagitales del cerebro permiten asegurar que a los 15 días después de haber administrado el marcador BrdU, las células que incorporaron éste marcador se encuentran en el bulbo olfatorio y no en la vía migratoria rostral. Primero se realizó una doble inmunotinción para BrdU-GFAP en cerebros control para BrdU (inyectados prenatalmente) para localizar la vía migratoria rostral y conocer la morfología que muestran las células que incorporan el marcador (ver Fig.22).



**Fig. 22** A. Reconstrucción de imágenes (4X) que muestran la vía migratoria rostral (VMR-indicada con flechas) que las células recorren previo a su llegada al bulbo olfatorio. B. Acercamiento (40X) de una región de la VMR donde están señaladas con flechas las células que incorporaron el marcador BrdU. ZSV- zona subventricular, VMR- vía migratoria rostral, BOA- bulbo olfatorio accesorio, BOP- bulbo olfatorio principal.

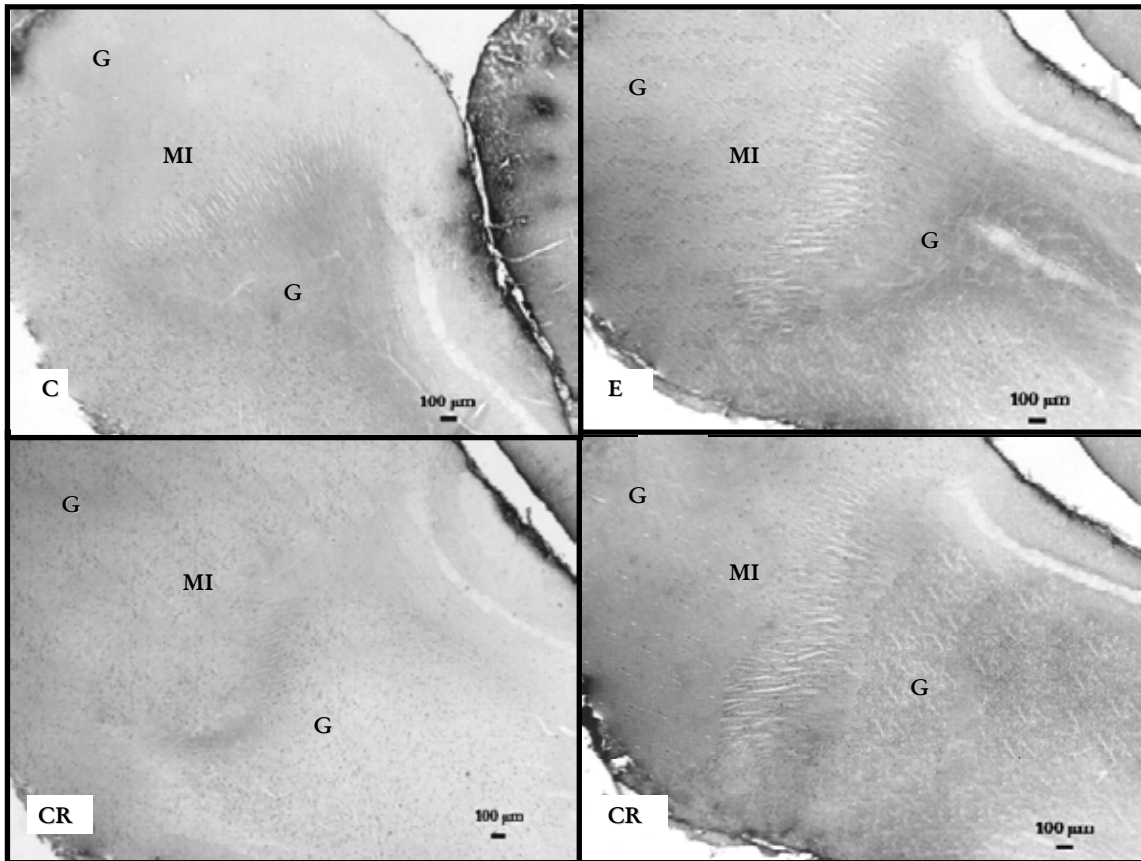
A través de un análisis ciego de los datos se cuantificaron las células que incorporaron el marcador BrdU (Fig.23 y Fig.26).

El ANDEVA para el número de células BrdU+ en el bulbo olfatorio principal no mostró diferencias significativas entre grupos, en ninguna de las capas analizadas: capa glomerular ( $F(3,27)=0.87$ ,  $p=0.47$  ns), capa mitral ( $F(3,27)=0.70$ ,  $p=0.56$  ns) y capa granular ( $F(3,26)=0.87$ ,  $p=0.47$  ns), ver Fig.23.

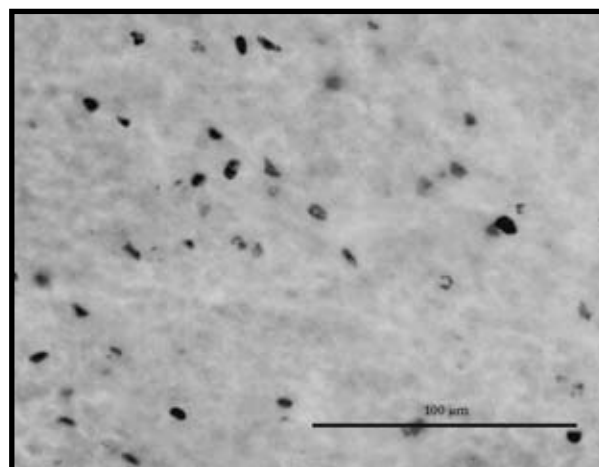


**Fig. 23** Número de células marcadas con BrdU en las diferentes capas (glomerular, mitral y granular) del bulbo olfatorio principal, evaluadas en los grupos C- control, EO- estímulo olfatorio, CR<sub>m</sub>- cópula regulada por el macho, CR<sub>h</sub>- cópula regulada por la hembra. Los datos se representan como media  $\pm$  error estándar.

## Imágenes de la inmunohistoquímica para BrdU del bulbo olfatorio principal

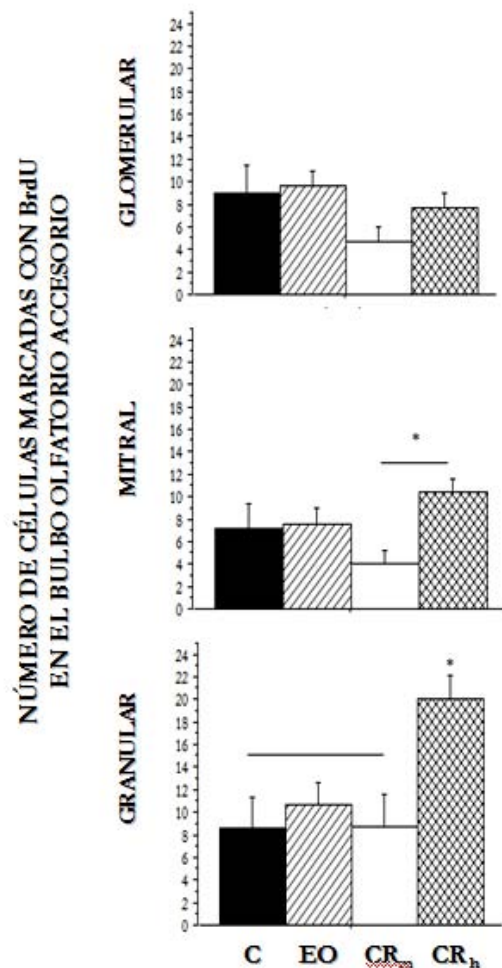


**Fig. 24** Imágenes que muestran las diferentes capas en que se cuantificaron las células con BrdU en el bulbo olfatorio principal. Capas: GR- granular, MIT- mitral, GL- glomerular. Grupos: C-control, EO-estimulo olfatorio, CRh-cópula regulada por la hembra, CRm-cópula regulada por el macho.



**Fig. 25** Imagen de las células BrdU+ en el bulbo olfatorio principal donde se muestra (con una flecha) la distribución del marcador en las células cuantificadas.

En el bulbo olfatorio accesorio, el ANDEVA de el número de células BrdU+ no mostró diferencias en la capa glomerular ( $F_{(3,36)}=1.12$ ,  $p=0.35$  ns) entre los grupos; sin embargo, sí se observaron diferencias entre grupos en la capa mitral ( $F_{(3,35)}=1.56$ ,  $p<0.05$ ) y la capa granular ( $F_{(3,33)}=3.73$ ,  $P<0.05$ ). La prueba Post Hoc reveló en la capa mitral, que el número de células BrdU+ en el grupo de cópula regulada por la hembra fue significativamente mayor con respecto al de cópula regulada por el macho. En la capa granular, el incremento en el número de células BrdU+ en el grupo de cópula regulada por la hembra fue significativamente mayor con respecto a los otros tres grupos (Fig.26).

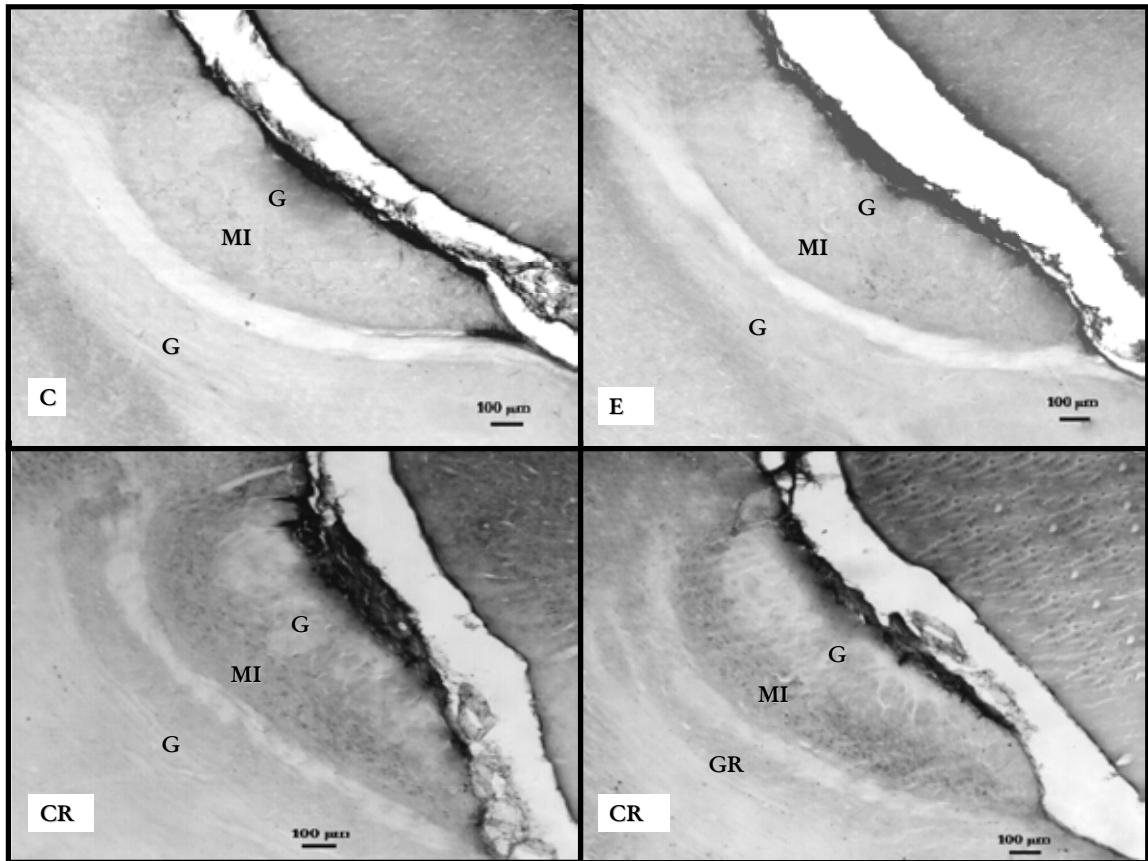


\*Diferente de CR<sub>m</sub>  $p<0.05$

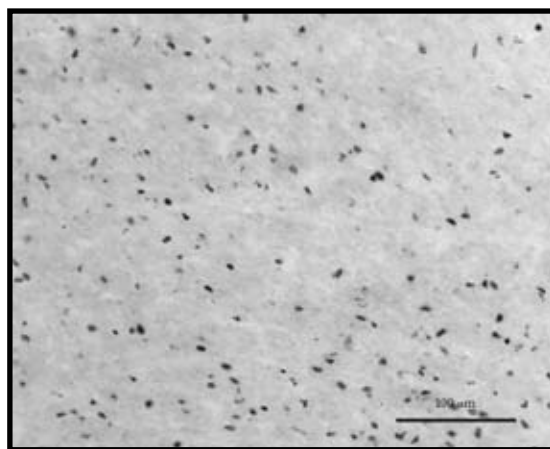
+Diferente de CR<sub>m</sub>, EO y C  $p<0.05$

**Fig. 26** Número de células marcadas con BrdU en las diferentes capas (glomerular, mitral y granular) del bulbo olfatorio accesorio, evaluadas en los grupos C- control, EO- estímulo olfatorio, CR<sub>m</sub>- cópula regulada por el macho, CR<sub>h</sub>- cópula regulada por la hembra. Los datos se representan como media  $\pm$  error estándar.

## Imágenes de la inmunohistoquímica para BrdU del bulbo olfatorio accesorio



**Fig. 27** Imágenes que muestran las diferentes capas en que se cuantificaron las células con BrdU en el bulbo olfatorio accesorio. Capas: GR- granular, MI- mitral, GL- glomerular. Grupos: C-control, EO-estimulo olfatorio, CRh-cópula regulada por la hembra, CRm-cópula regulada por el macho.



**Fig. 28** Imagen de las células BrdU+ en el bulbo olfatorio accesorio donde se muestra (con una flecha) la distribución del marcador en las células cuantificadas.

# DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

## **Capítulo 6**

### ***Discusión y Conclusiones***

#### **6.1 Discusión**

Los resultados del presente estudio indican que la conducta de cópula, regulada por la hembra ó por el macho no tuvo una influencia en el número de células BrdU+ que se observaron en el bulbo olfatorio principal de ratas hembra 15 días después de la misma. En el bulbo olfatorio accesorio en cambio, si se observó un incremento en el número de células BrdU+ en las hembras que regularon la cópula siendo significativamente mayor a los otros grupos, lo que muestra que es una conducta que es capaz de modificar el número de células nuevas que se incorporan al bulbo olfatorio del cerebro adulto.

Se ha descrito que la mayoría de las células que se originan en la zona subventricular del ventrículo lateral migran hacia el bulbo olfatorio principal para luego diferenciarse en células granulares y periglomerulares, sin embargo, la minoría de éstas células migran hacia el bulbo olfatorio accesorio (Bonfanti y cols. 1997; Doetsch y Alvarez-Buylla 1996; Lledo y cols. 2006). A pesar de que sí se cuantificaron una gran cantidad de células BrdU+ en el bulbo olfatorio principal, en ninguna de las capas analizadas (glomerular, mitral y granular) se observaron variaciones significativas por estímulos olfatorios sexualmente relevantes ó por cópula per se con respecto a las hembras control. Sin embargo, el incremento de células BrdU+ localizadas en las capas mitral y granular del bulbo olfatorio accesorio que se cuantificó en el presente trabajo refleja el que ésta sea una estructura que también se encuentra en una constante renovación celular en el transcurso de la vida del organismo (Bonfanti y cols. 1997).

En el proceso de neurogénesis del bulbo olfatorio se distinguen tres etapas principalmente: 1) proliferación celular, cuando se dividen las células (incorporan el BrdU), 2) migración y supervivencia (0-2 semanas), cuando van por la vía migratoria rostral con

dirección al bulbo olfatorio, y 3) diferenciación neuronal e integración sináptica (2-4 semanas), cuando ya están en el bulbo olfatorio y se integran funcionalmente a un circuito pre-existente. Cada una de estas etapas está influenciada por diversos factores que pueden regularlas. Se ha descrito que la conducta (exposición a olores enriquecidos, complejos, novedosos) es un factor regulador en la etapa de migración y supervivencia de las células que asegura que las células lleguen a su destino final, el bulbo olfatorio; sin embargo la conducta no es el único factor que influye, existen una variedad de factores celulares y moleculares que puede influir en la proliferación, migración y supervivencia de las células (Ming y Song 2005). La supervivencia de las células entonces no se le puede atribuir a un solo factor, ya que es una acción conjunta de todos ellos la que hace posible que las células lleguen al bulbo olfatorio.

En éste trabajo se expuso a las hembras a un estímulo conductual, exposición a un macho y cópula (regulada por la hembra ó por el macho) el mismo día que se les inyectó un marcador mitótico (con la finalidad que se incorporara a las células que se dividieran en ese día), se esperó 15 días y los resultados fueron células BrdU+ en bulbo olfatorio. Se contabilizó el número de células BrdU+ en bulbo olfatorio principal y accesorio y se notó que en el bulbo olfatorio accesorio se encontró un incremento de células BrdU+ en el grupo de hembras que regularon la cópula, lo cual podría significar que existe algo particular en éste tipo de cópula que influye sobre los factores ó sobre alguno de ellos en particular, que están modulando la migración y llegada de éstas células al bulbo olfatorio, y que esto no sucede con la cópula regulada por el macho, ni en el estímulo olfatorio.

Funcionalmente, el hecho de que no se observaran cambios en el número de células BrdU+ en el bulbo olfatorio principal como respuesta a los diferentes estímulos (sexualmente relevantes) contrastaría con la idea que se ha propuesto en algunos trabajos en ratones (Mak y cols. 2007) y hurones (Smith y cols. 2001) que describen que los olores corporales detectados por el epitelio olfatorio principal (que posteriormente manda la información a su primer relevo, el bulbo olfatorio principal) son esenciales para el reconocimiento heterosexual de la pareja (Hosokawa y Chiba 2007), por lo que las células que conforman los circuitos olfatorios son muy importantes para éste reconocimiento, sin embargo, quizás no se requiera de la incorporación de nuevas células para ésta función.

El bulbo olfatorio accesorio procesa olores sexualmente relevantes, como parte del sistema olfatorio accesorio. Este sistema tiene un papel muy importante en las hembras para la modulación de la respuesta conductual sexual provocada por feromonas; además es importante para la detección heterosexual de la pareja (Hosokawa y Chiba 2007). En el presente trabajo se observó un incremento en el número de células BrdU+ en la capa mitral y granular. En la capa mitral se encuentran las células que le confieren especificidad a los olores mediante un proceso de inhibición lateral, y en la capa granular están las células que modulan la actividad de las células mitrales y optimizan la función olfatoria; ambos tipos celulares podrían tener un papel indispensable para el reconocimiento específico del macho con el que han tenido contacto. En términos de plasticidad y función, el reemplazo de las neuronas granulares puede ser importante para la plasticidad en la discriminación olfatoria (Petreanu y Alvarez-Buylla 2002).

Sin embargo, para éste trabajo no se diferenció la naturaleza de las células (neuronas inmaduras, maduras, glía), el tiempo de supervivencia ó la funcionalidad, como han hecho otros grupos como el de Huang y Bittman (2001) en hamsters macho donde observaron la activación (medida por c-Fos) de las células BrdU+ en el bulbo olfatorio por la cópula ó por olores sexualmente relevantes. Por lo tanto, lo que se puede asumir con estos resultados es que la conducta sexual, en particular la cópula regulada por la hembra, representó un estímulo externo que favoreció el incremento de células nuevas en el bulbo olfatorio 15 días después del estímulo.

Las dos modalidades de conducta sexual que se utilizaron en éste trabajo, cópula regulada por la hembra y cópula regulada por el macho presentan parámetros conductuales típicos que las diferencian entre sí. Las hembras que regularon la cópula presentaron intervalos mayores entre cada intromisión, además de que en total (en los 60 minutos de la prueba) recibieron un menor número de intromisiones, con una latencia mayor, lo cual corresponde a los parámetros típicos reportados en este tipo de cópula (Erskine 1989; Nuño y cols. 2006; Camacho y cols. 2007). Cuando las hembras tienen la posibilidad de regular la cópula, los periodos de intromisión son más largos, lo que genera que la hembra reciba una estimulación vagino-cervical prolongada y genere un patrón específico de estimulación que puede optimizar la inducción de un estado de preñez (Erskine 1989; 1992; Erskine y cols. 2004). En los últimos años el estudio de la cópula regulada por la hembra ha sido de



particular interés debido a los cambios neuroendocrinos que desencadena y las consecuencias reproductivas que provee. Al parecer los cambios neuroendocrinos (generación de pulsos de prolactina) que se desencadenan por la cópula regulada por la hembra y que le confieren una eficiencia reproductiva pudieran estar relacionados con el reacomodo de circuitos en el bulbo olfatorio accesorio en particular, ya que es en esta estructura donde el grupo de Rajendren y cols (1993) argumentan que llega la información proveniente de las feromonas del macho que son captadas por el órgano vomeronasal, procesadas por el bulbo olfatorio accesorio y enviadas al resto del circuito olfatorio hasta llegar al hipotálamo donde se encuentran las células GnRH que son activadas e inducen la liberación hormonal por parte de la hipófisis, permitiendo las condiciones fisiológicas adecuadas para la preñez de la rata.

Los resultados que se obtuvieron en este trabajo podrían explicarse desde éste punto de vista en donde la información olfatoria proveniente del macho es detectada por el sistema olfatorio accesorio y al ser un olor novedoso (ya que es el primer contacto y estímulo olfatorio sexualmente relevante), y ser de tipo feromonal, se procesa en el bulbo olfatorio accesorio y en particular en las capas mitral y granular manteniendo así la especificidad del olor. Es necesario un reacomodo plástico celular que permita mantener la especificidad de ese olor en particular, por lo que se genera un incremento de células en éstas dos capas para poder hacerlo, adicionado a la estimulación física y la actividad motora que la hembra emite para que se de la cópula.

No se puede atribuir el incremento de las células únicamente a los olores que la hembra percibe, ya que para eso se manejó un grupo exclusivamente de estímulo olfatorio en donde la hembra pudo oler al macho pero sin contacto físico alguno, y no se observó un incremento significativo de células BrdU+ en ninguna de las regiones. Al parecer todo lo que involucra la cópula, desde los estímulos olfatorios hasta el despliegue de la conducta, así como la interacción con factores internos, son importantes para que se de el incremento de células BrdU+ en el bulbo olfatorio accesorio. En particular la estimulación vaginal que la hembra recibe a través del número de intromisiones y eyaculaciones, la latencia de intromisión y el intervalo entre cada intromisión que son los patrones conductuales que distinguen la cópula regulada por la hembra y la cópula regulada por el macho.

En éste trabajo se analizó la influencia 15 días después del estímulo, en el número de células BrdU+ en bulbo olfatorio ante el primer contacto sexual ó estímulo olfatorio sexualmente relevante, por lo que no sabemos si el efecto que se observó podría variar en animales con experiencia sexual. Asimismo, habra que examinar más a detalle cuáles son los factores endógenos que se están influenciando con éste tipo de cópula en particular y cómo es que actúan para favorecer la incorporación de un mayor número de células al bulbo olfatorio.

## 6.2 Conclusiones

Los resultados de este trabajo proponen que la cópula regulada por la hembra es un estímulo capaz de modificar el número de células BrdU+ que se incorporan al bulbo olfatorio accesorio 15 días después de la conducta, pero no al bulbo olfatorio principal. La cópula regulada por el macho no influyó en el número de células nuevas que se incorporan al bulbo olfatorio principal y accesorio.

El análisis cuantitativo de células BrdU+ en el bulbo olfatorio accesorio reveló que las hembras que regularon la cópula mostraron un incremento de células en las capas mitral (con respecto a la cópula regulada por el macho) y granular (con respecto a todos los grupos). Cabe resaltar que en el bulbo olfatorio principal no se observaron diferencias en el número de células BrdU+ en ninguna de las capas analizadas.

Los datos obtenidos nos indican que la conducta sexual de la hembra, cuando los contactos copulatorios son regulados por ella misma, influye en el número de células BrdU+ del bulbo olfatorio accesorio. No obstante, no se conoce a través de que proceso se logre este fenómeno, existen muchos aspectos que no están contemplados en los presentes experimentos. Entre ellos el conocer los factores que están respondiendo al estímulo de la cópula y por lo tanto favoreciendo el incremento en el número de células nuevas en el bulbo olfatorio, el tipo de células (neuronas inmaduras, maduras, glía), la tasa de supervivencia y la funcionalidad de las mismas. De tal forma tendrán que realizarse estudios posteriores para determinarlo. Con estos resultados se puede especular que los cambios neuroanatómicos observados en este trabajo pueden correlacionarse con los cambios fisiológicos (Erskine 1989; 1992) y conductuales (Paredes y Vazquez 1999; Paredes y Alonso 1997) que favorecen la eficiencia reproductiva y la motivación en las hembras que regulan la interacción sexual.

Este trabajo es importante debido a que es el primero que conjunta el estudio de la generación de nuevas células en un cerebro adulto que se incorporan al bulbo olfatorio principal y accesorio en un modelo de rata hembra que regula sus contactos durante el apareamiento; además ofrece información básica acerca de los procesos de un fenómeno plástico que produce cambios neuroanatómicos que se desencadenan como consecuencia de una conducta de gran importancia a nivel evolutivo.

# BIBLIOGRAFÍA

## **Capítulo 7**

### **Bibliografía**

Agmo, A. (1999) Sexual motivation an inquiry into events determining the occurrence of sexual behavior. *Behavioral Brain Research*. 105, 129-150.

Alvarez-Buylla, A. y García-Verdugo, JM. (2002) Neurogenesis in adult subventricular zone. *The Journal of Neuroscience*. 22, 629-634.

Baum, J.M. (1992) Neuroendocrinology of sexual behavior in the male. En Becker J.B., Breedlove S.M. and Crews D. (Eds.) *Behavioral Endocrinology*. USA. 1992. 97-139.

Beach, F.A. (1976) Sexual attractivity, proceptivity, and receptivity in female mammals. *Hormones and behavior*. 7, 105-138.

Blaustein, J.D. y Erskine, M.S. (2002) *Feminine sexual behavior: cellular integration of hormonal and afferent information in the rodent brain*. 1. New York. Academic Press.

Brown, J., Cooper-Kuhn, C.M., Kempermann, G., Van Praag, H., Winkler, J., Gage, F.H. y Kuhn, G.H. (2003) Enriched environment and physical activity stimulate hippocampal but not olfactory bulb Neurogénesis. *European Journal of Neuroscience*. 17, 2042-2046.

Bonfanti, L., Peretto, P., Merighi, A. y Fasolo, A. (1997) Newly-generated cells from the rostral migratory stream in the accesory olfactory bulb of adult rat. *Neuroscience*. 81(2), 489-502.

Carleton, A., Petreanu, L.T., Lansford, R., Alvarez-Buylla, A. y Lledo, P.M. (2003) Becoming a new neuron in the adult olfactory bulb. *Nature Neuroscience*. 6(5), 507-518.

Doetsch, F. y Alvarez-Buylla, A. (1996) Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 93, 14895-14900.

Doetsch, F. (2003) The glial identity of neural stem cells. *Nature Neuroscience*. 6(11), 1127-1134.

Erskine, M.S. (1989) Solicitation Behavior in the Estrous Female Rat: A Review. *Hormones and Behavior*. 23, 473-502.

Erskine, M.S. (1992) Pelvic and pudendal nerves influence the display of paced mating behavior in response to estrogen and progesterone in the female rat. *Behavioral Neuroscience*. 106(4), 690-697.

Erskine, M.S., Lehmann, M.L., Cameron, N.M. y Polston, E.K. (2004) Co-regulation of female sexual behavior and pregnancy induction: an exploratory synthesis. *Behavioral Brain Research*. 153, 295-315.

Freeman, M.E. (1994) The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. En Knobil E. y Neill J.D. (Eds.) *The physiology of reproduction*. 2a Edición. Reven Press. Ltd. New York.

García-Segura, L.M., Luquín, S., Párducz, A. y Naftolin, F. (1994) Gonadal Hormone Regulation of Glial Fibrillary Acidic Protein Immunoreactivity and Glial Ultrastructure in the Rat Neuroendocrine Hypothalamus. *GLIA*. 10, 59-69.

Gheusi, G. y Lledo, P.M. (2007) Control of Early Events in Olfactory Processing by Adult Neurogenesis. *Chemical Senses*. 32, 397-409.

Giachino, C., Galbiati, M., Fasolo, A., Peretto, P. y Melcangi, R.C. (2003) Effects of Progesterone Derivates, Dihydroprogesterone and Tetrahydroprogesterone, on the Supependymal Layer of the Adult Rat. *Neuroactive Steroids and Neurogenesis*. 493-502.

Gould, E. (2007) How widespread is adult neurogenesis in mammals? Perspectives. *Nature Reviews. Neuroscience*. 8, 481-488.

Gould, E. y Gross, C.G. (2002) Neurogenesis in Adult Mammals: Some progress and problems. *The Journal of Neuroscience*. 22, 619-623.

Hardy, D.F. y DeBold, J.F. (1972) Effects of coital stimulation upon behavior of the female rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*. 78(3), 400-408.

Hoyk, Z., Varga, C. y Párducz, Á. (2006) Estrogen-induced region specific decrease in the density of 5-bromo-2-deoxyuridine-labeled cells in the olfactory bulb of adult female rats. *Neuroscience*. 141, 1919-1924.

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.

Hosokawa N. y Chiba A. (2007) Effects of sexual experience on conspecific odor preference and male odor-induced activation of the vomeronasal projection pathway and the nucleus accumbens in female rats. *Brain Research*. 1175, 66-75.

Jenkins, W.J. y Becker, J.B. (2005) Sex. In Whishaw, I.Q. y Kolb B. *The Behavior of the Laboratory rat*. Oxford.

Karlson P. y Luscher M. (1959) Pheromones: a new term for a class of biologically active substances. *Nature* 183:55-56.

Kee, N., Sivalingam, S., Boonstra, R. y Wojtowicz, J.M. (2002) The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis. *Journal of Neuroscience Methods*. 115, 97-105.

<sup>a</sup>Keller, M., Douhard, Q., Baum M.J. y Bakker, J. (2006) Destruction of the Main Olfactory Epithelium Reduces Female Sexual Behaviour and Olfactory Investigation in Female Mice. *Chemical Senses*. 31, 315-323.

<sup>b</sup>Keller, M., Pierman, S., Douhard, Q., Baum, M.J. y Bakker, J. (2006) The vomeronasal organ is required for the expression of lordosis behaviour, but not sex discrimination in female mice. *European Journal of Neuroscience*. 23, 521-530.

Kemperman, G. (2006) *Adult Neurogenesis. Stem Cells and Neuronal Development in the Adult Brain*. USA. Oxford.

Kolb Bryan (1995) *Brain Plasticity and Behavior*. USA. Lawrence Erlbaum Associates Publishers.

Kornberg, E. y Erskine, M.S. (1994) Effects of differential mating stimulation of the onset of prolactin surges in the pseudopregnant rats. *Psychoneuroendocrinology*. 19(4), 357-371.

Lledo, P., Alonso, M. y Grubb, M. (2006) Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nature reviews. Neuroscience*. 7.

Mak, G.K. Enwere, E.K. Gregg, C. Pakarainen, T. Poutanen, M. Huhtaniemi, I. y Weiss, S. (2007) Male pheromone-stimulated neurogenesis in the adult female brain: possible role in mating behavior. *Nature Neuroscience*. 1-9.

Martínez, I. y Paredes, R.G. (2001) Only self-paced mating is rewarding in rats of both sexes. *Hormones and Behavior*. 40(4), 510-517.

McCarthy M.M. y Pfaus J.G. (1996) Steroid modulation of neurotransmitter function to alter female reproductive behavior. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 7(9):327-333.

Melcangi R.C., García-Segura L.M. y Mensah-Nyagan A.G. (2007) Review: Neuroactive steroids: State of the art and new perspectives. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 1-21.

Ming, G. y Song, H. (2005) Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annual Review of Neurosciences*. 28, 223-250.

Nelson, R.J. (2000) *An Introduction to Behavioral Endocrinology*. 2a Edición. Sinauer Associates, Inc. 273-335.

Nottebohm F. (1989) From bird song to neurogenesis. *Scientific American*. 260(2), 74-79.

Paredes, R.G. y Alonso, A. (1997) Sexual Behavior Regulated (Paced) by the Female Induces Conditioned Place Preference. *Behavioral Neuroscience*. 111(1), 123-128.

Paredes, R.G. y Vázquez, B. (1999) What do female rats like about sex? Paced mating. *Behavioral Brain Research*. 105, 117-427.

Paxinos G. y Watson C. (1986) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 2<sup>nd</sup> Edition. Sydney: Academic Press.

Peretto, P. Giachino, C. Panzica G. y Fasolo, A. (2001) Sexually dimorphic neurogenesis is topographically matched with the anterior accessory olfactory bulb of the adult rat. *Cell Tissue Res*. 306, 385-389.

Peteanu, L. y Alvarez-Buylla A. (2002) Maturation and Death of Adult-Born Olfactory Bulb Granule Neurons: Role of Olfaction. *The Journal of Neuroscience*. 22(14), 6106-6113.

Pfaff, D.W. (1971) Steroid sex hormones in the rat brain: specificity of uptake and physiological effects. In C.H. Sayer, Gorski, R.A. (eds.). *Steroid Hormone and Brain Function*. 103-112. Berkeley. University of California Press.

Rajendren, G. Dudley, C.A. Moss, R.L. (1993) Influence of male rats on the luteinizing hormone-releasing hormone neuronal system in female rats: role of the vomeronasal organ. *Neuroendocrinology*. 57, 898-906.

Rocheffort, C. y Lledo, P.M. (2005) Short-term survival newborn neurons in the adult olfactory bulb alter exposure to a complex odor environment. *European Journal of Neuroscience*. 22, 2863-2870.

Rocheffort, C., Gheusi, G., Vincent, J.D. y Lledo, P.M. (2002) Enriched odor exposure increases the number of newborn neurons in the adult olfactory bulb and improves odor memory. *The Journal of Neuroscience*. 22(7), 2679-2689.

Routtenberg, A. Cantalalops, I., Zaffuto, S., Serrano, P. y Namgung, U. (2000) Enhanced learning after genetic overexpression of a brain growth protein. *PNAS*. 9(13), 657-662.

ShIPLEY M.T. (2004) Olfactory System. In: *The rat nervous system*. 3<sup>rd</sup> Edition (Paxinos, G.Ed) 1328. Sydney, Australia. Prince of Wales Medical Research Institute. The University of New South Wales.

Smith C.M. y Luskin M.B. (1998) Cell cycle length of olfactory bulb neuronal progenitors in the rostral migratory stream. *Developmental Dynamics*. 213, 220-227.

Smith, M.T., Pencea, V., Wang, Z., Luskin, M.B. y Insel T.R. (2001) Increased number of BrdU-labeled neurons in the rostral migratory stream of the estrus prairie vole. *Hormones and Behavior*. 39, 11-21.

Taupin, P. (2005) Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system: functionality and potential clinical test. *Medical Science Monitor*. 11(7), 247-252.

Taupin, P. (2006) Neurogenesis in the adult central nervous system. Elsevier. 329, 465-475.

Taupin, R. (2007) BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: paradigms, pitfalls, limitations, and validation. *Brain Research Reviews*. 53, 198-214.

Winans S.S. y Powes J.B. (1977) Olfactory and vomeronasal deafferentation of male hamsters: histological and behavioral analyses. *Brain Research*. 126:325-344.

Xu, Y., Tamamaki, N., Noda, T., Kimura, K., Itokazu, Y., Matsumoto, N., Dezawa, M. y Ide, C. (2004) Neurogenesis in the ependymal layer of the adult rat 3rd ventricle. Elsevier. *Experimental Neurology*. 192, 251-264.



# INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

## Capítulo 8

### Índice de Figuras y Tablas

#### 8.1 Índice de Figuras

**Fig.1** Esquema representativo del estro conductual en la rata hembra (recuadro) que ocurre cuando los niveles de estrógeno disminuyen y se elevan los niveles de progesterona. (*Imagen modificada de Jenkins y Becker 2005*).

**Fig.2** Patrón hormonal del ciclo estral de la rata. Concentración hormonal en plasma en el transcurso del ciclo expresados en ng/ml. En la gráfica se indica el período en el cual ocurre la receptividad sexual y la ovulación. Las barras negras representan el intervalo de oscuridad en un ciclo 12-12 (*Imagen modificada de Freeman 1994*).

**Fig.3** Patrón hormonal del ciclo estral de la rata. Concentración hormonal en plasma en el transcurso del ciclo expresados en ng/ml. En la gráfica se indica el período en el cual ocurre la receptividad sexual y la ovulación. Las barras negras representan el intervalo de oscuridad en un ciclo 12-12 (*Imagen modificada de Freeman 1994*).

**Fig.4** En este esquema se muestra a) la postura normal que presenta una rata hembra y b) la postura de lordosis en donde se observa como el canal vaginal al volverse completamente horizontal se vuelve accesible al macho y se facilita la penetración. (*Imagen modificada de Nelson 2000*).

**Fig. 5** Esquema ilustrativo de la cuantificación del grado de lordosis de la rata hembra. (*Imagen modificada de Hardy y DeBold 1972*).

**Fig.6** Esquema representativo del Sistema Olfatorio Accesorio (SOA) de roedor. En A) están representadas las vías de proyección involucradas en éste circuito (*Imagen modificada de Winans y Powers 1977*) y en B) en vista sagital se observan las estructuras (*Imagen modificada de Baum 1992*). 1-órgano vomeronasal, 2-bulbo olfatorio accesorio, 3,4-núcleos de la amígdala, 5,NLET-núcleo lecho de la estría terminal, 6,APM/H-área preóptico medial del hipotálamo.

**Fig.7** Esquema representativo del Sistema Olfatorio Principal (SOP) de roedor. En A) están representadas las vías de proyección involucradas en éste circuito (*Imagen modificada de Winans y Powers 1977*) y en B) en vista sagital se observan las estructuras (*Imagen modificado de Baum 1992*). A-epitelio olfatorio, B-bulbo olfatorio principal, C-núcleo olfatorio anterior, D-núcleo cortical anterior y E-núcleo posterolateral de la amígdala, G-corteza piriforme, H-corteza entorinal, NLET-núcleo lecho de la estría terminal, APM/H-área preóptico medial del hipotálamo.

**Fig.8** Principales regiones donde se ha observado la presencia de neuronas nuevas en un cerebro adulto, dentro de las cuales se observan las dos regiones neurogénicas mayormente estudiadas: bulbo olfatorio y giro dentado. (*Imagen modificada de Gould 2007*).

**Fig.9** Neurogénesis en el cerebro adulto de mamífero. Sección sagital esquemática de roedor donde se muestra el ventrículo lateral (VL) y los dos principales sitios de neurogénesis: la zona subventricular (ZSV) localizada en los VL y la zona subgranular (ZSG) de la formación hipocámpica. Las neuronas del bulbo olfatorio (BO) llegan por la vía migratoria rostral (VMR) y provienen de la ZSV. Las neuronas del giro dentado (GD) provienen de la ZSG del mismo hipocampo. La dirección anterior (A) y ventral (V) marcada con flechas en la esquina superior derecha del esquema (*Imagen modificada de Doetsch 2003*).

**Fig.10** Representación esquemática de la localización del proceso de neurogénesis del bulbo olfatorio así como la identificación de sus componentes. En la imagen se observa (a) en vista lateral la localización de la vía migratoria rostral (VMR) en la cabeza de un roedor;

(b) migración de los neuroblastos recién generados que comienza en el ventrículo lateral (VL) continúa por la VMR y termina en el bulbo olfatorio BO donde maduran las neuronas; (c) esquema de la citoarquitectura de la zona subventricular (ZSV) localizada en las paredes del VL; (c') células que componen la ZSV: A-neuroblasto, B-célula madre, C-precursor, E-células endocelulares; (d) migración de neuroblastos a través de la VMR –vista sagital y coronal- rodeados por astrocitos; (e) liberación de neuroblastos de la VMR y entrada al BO donde migran Radialmente, se integran y maduran en las diferentes capas. (*Imágenes modificadas de I-Lenington y cols. 2003; II- Gueusi y Lledo 2007*).

**Fig.11** Esquema ilustrativo de la migración de las neuronas recién generadas en la ZSV que migran tangencialmente por la VMR y que finalmente llegan al BO donde se integran a los circuitos olfatorios diferenciándose en neuronas periglomerulares o glomerulares. También se muestran las etapas por las que van pasando las nuevas células que se generan, así como el tiempo que tardan en migrar finalmente al BO, que son alrededor de 2 semanas (15 días). (*Imagen modificada de Ming y Song 2005*).

**Fig.12** Esquema ilustrativo de la migración de las neuronas recién generadas en la ZSV que migran tangencialmente por la VMR y que finalmente llegan al BO donde se integran a los circuitos olfatorios diferenciándose en neuronas periglomerulares o glomerulares. También se muestran las etapas por las que van pasando las nuevas células que se generan, así como el tiempo que tardan en migrar finalmente al BO, que son alrededor de 2 semanas (15 días). (*Imagen modificada de Ming y Song 2005*).

**Fig. 13** Representación de la estructura química del BrdU, que es una halopirimidina y esquema ilustrativo de la adición del marcador exógeno BrdU al ADN en la fase S (síntesis) del ciclo celular. (*Imágenes modificadas de A- Taupin 2007 y B- Ming y Song 2005*).

**Fig. 14** Organización de los grupos para las pruebas conductuales (duración 60 minutos). Las ratas hembra se repartieron aleatoriamente en uno de los cuatro grupos indicados en el esquema, recibiendo el mismo tratamiento, ovariectomizadas (OVX) con tratamiento

hormonal (estradiol y progesterona) y administración del marcador BrdU en tres ocasiones. El grupo control consistió en hembras que no estuvieron expuestas ni tuvieron contacto con un macho. El grupo I de hembras estuvo expuesto, sin tener contacto físico, a un macho sexualmente experto. Los grupos II y III fueron de cópula con machos sexualmente expertos, siendo el grupo II de hembras que regularon la cópula, y el grupo III de machos que regularon la cópula.

**Fig. 15** A-Caja de cópula utilizada para el grupo control. B-hembra control en la caja.

**Fig. 16** A-Caja de cópula para estímulos olfatorios y visuales. B-Prueba de estímulo olfatorio y visual donde se observa la división con los orificios que separa los compartimientos de la hembra y del macho.

**Fig. 17** A-Caja de cópula regulada por la hembra (*spacing*). B-Prueba de *spacing* en la que se puede apreciar la división con el orificio que permite a la hembra moverse hacia el compartimiento donde se encuentra el macho.

**Fig. 18** A-Caja de cópula regulada por el macho. B-Prueba de cópula donde se observa una interacción entre hembra y macho, en la cual el macho ha regulado los contactos copulatorios.

**Fig. 19** Método. Las ratas hembra sin experiencia sexual se ovariectomizaron (OVX) en el día 0, se les administraron hormonas (estradiol los días 8 y 15; progesterona el día 17) por medio de inyección subcutánea (sc). Cuatro horas después de administrada la progesterona, se realizó la prueba conductual con una duración de 60 minutos. El marcador BrdU se administró intraperitonealmente (ip) en 3 ocasiones, una hora antes, al término y una hora después de la prueba conductual. Las ratas se dejaron descansar hasta el día 31 en el que fueron sacrificadas.

**Fig. 20** Esquema de un corte sagital de cerebro de rata donde se señala con un recuadro el bulbo olfatorio accesorio y el área de cuantificación (200µm de diámetro por círculo

indicado a la derecha) que se utilizó para el conteo de las células BrdU+ en las capas glomerular (Gl), mitral (Mit) y granular (Gr). Imagen 4X de un corte sagital correspondiente al recuadro marcado en el esquema.

**Fig. 21** Esquema de un corte sagital de cerebro de rata donde se señala con un recuadro el bulbo olfatorio principal y el área de cuantificación (400µm de diámetro por círculo indicado a la derecha) que se utilizó para el conteo de las células BrdU+ en las capas glomerular (Gl), mitral (Mit) y granular (Gr). Imagen 4X de un corte sagital correspondiente al recuadro marcado en el esquema.

**Fig. 22** A. Reconstrucción de imágenes (4X) que muestran la vía migratoria rostral (VMR- indicada con flechas) que las células recorren previo a su llegada al bulbo olfatorio. B. Acercamiento (40X) de una región de la VMR donde están señaladas con flechas las células que incorporaron el marcador BrdU. ZSV- zona subventricular, VMR- vía migratoria rostral, BOA- bulbo olfatorio accesorio, BOP- bulbo olfatorio principal.

**Fig. 23** Número de células marcadas con BrdU en las diferentes capas (glomerular, mitral y granular) del bulbo olfatorio principal, evaluadas en los grupos C- control, EO- estímulo olfatorio, CR<sub>m</sub>- cópula regulada por el macho, CR<sub>h</sub>- cópula regulada por la hembra. Los datos se representan como media ± error estándar.

**Fig. 24** Imágenes que muestran las diferentes capas en que se cuantificaron las células con BrdU en el bulbo olfatorio principal. Capas: GR- granular, MIT- mitral, GL- glomerular. Grupos: C-control, EO-estímulo olfatorio, CR<sub>h</sub>-cópula regulada por la hembra, CR<sub>m</sub>- cópula regulada por el macho.

**Fig. 25** Imagen de las células BrdU+ en el bulbo olfatorio principal donde se muestra (con una flecha) la distribución del marcador en las células cuantificadas.

**Fig. 26** Número de células marcadas con BrdU en las diferentes capas (glomerular, mitral y granular) del bulbo olfatorio accesorio, evaluadas en los grupos C- control, EO- estímulo

olfatorio, CR<sub>m</sub>- cópula regulada por el macho, CR<sub>h</sub>- cópula regulada por la hembra. Los datos se representan como media  $\pm$  error estándar.

**Fig. 27** Imágenes que muestran las diferentes capas en que se cuantificaron las células con BrdU en el bulbo olfatorio accesorio. Capas: GR- granular, MIT- mitral, GL- glomerular. Grupos: C-control, EO-estimulo olfatorio, CR<sub>h</sub>-cópula regulada por la hembra, CR<sub>m</sub>-cópula regulada por el macho.

**Fig. 28** Imagen de las células BrdU+ en el bulbo olfatorio accesorio donde se muestra (con una flecha) la distribución del marcador en las células cuantificadas.

## 8.2 Índice de Tablas

**Tabla 1.** Parámetros de conducta en la cópula regulada por la hembra y la cópula regulada por el macho. Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar.

**Tabla 2.** Latencias de regreso y porcentaje de salidas en las hembras durante la prueba de cópula regulada. Los datos se expresan como media  $\pm$  error estándar.